



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة قاصدي مرباح - ورقلة
UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES APPLIQUEES
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE DOCTORAT
(LMD)

Spécialité : GENIE DES PROCEDES ET ENVIRONNEMENT

Intitulé

**Synthèse et l'étude des propriétés bactériologique
d'une série des bases de Schiff fluorées et
pénicilliniques**

Présentée et Soutenue publiquement
Par :

RAACHE IMANE

Le : **04 / 07 / 2017**

Devant le jury composé de :

-Mr. Fares Kahoul	M.C.A	U.K.M. Ouargla	Président
-Mr. M.Rida Ouahrani	Professeur	U.H.L . El. Oued	Examineur
-Mr. Salah Eddine Laouini	M.C.A	U.H.L . El. Oued	Examineur
-M ^{lle} . Noura Chaouche	M.C.A	U.K.M. Ouargla	Examinatrice
-Mr. Louanes Hamzioui	M.C.A	U.K.M. Ouargla	Examineur
-Mr. Lakhdar Sekhri	Professeur	U.K.M. Ouargla	Rapporteur

Année universitaire : 2016 – 2017

Dédicace

A mes parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie dans les moments difficiles dans mes études, et dans ce moment particulier de la thèse.

A ma chère famille du petit au grand

A mes enseignants et professeurs du primaire à l'université

A tous mes amis

Je dédie ce modeste travail

Imane

REMERCIEMENTS

*Cette thèse n'aurait pas pu être ce qu'elle est, sans l'aide de ALLAH source de toute connaissance qui m'a donné la force afin de l'accomplir. **فَاللّٰهُمَّ لَكَ الْحَمْدُ كَمَا يَنْبَغِي لِجَلَالِ وَجْهِكَ وَ عَظِيْمِ سُلْطٰنِكَ***

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus cordiaux et ma vive reconnaissance à mon directeur de thèse, le professeur **Lakher SAKHRI**, pour son encouragement, ses conseils précieux, sa disponibilité, ses suggestions pertinentes, ses critiques constructives et surtout pour sa patience tout au long de ce projet. j'ai été toujours satisfaite par sa pédagogie et sa modestie qui m'ont grandement permis de surmonter les difficultés et faire face aux autres problèmes rencontrés afin de bien achever ce travail, sans oublier de mettre l'accent sur ses qualités humaines et morales que j'ai toujours appréciées. Merci de m'avoir guidé avec autant de professionnalisme et d'avoir consacré énormément de temps et d'attention pour la correction de ce manuscrit ; je ne peux, Monsieur que sincèrement vous exprimer ma parfaite considération pour cette qualité d'encadrement si sérieuse et consistante. Que dieu préserve votre optimisme et votre enthousiasme.*

Je remercie vivement les membres de ce respectable jury :

- *Monsieur le Docteur **Fares KAHOU***

Je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

- *Monsieur le professeur **M.Rida OUAHRANI**, votre venue en tant qu'examineur m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements.*

- *Monsieur le Docteur **Salah Eddine LAOUINI** d'avoir accepté de se déplacer et d'être membre du jury, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements.*

- *Je remercie le Docteur **Noura CHAUCHE** d'avoir accepté de lire, instruire et juger cette Thèse. Merci pour votre contribution à l'amélioration de ce document. Veuillez Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon profond respect.*

- *Je remercie le Docteur **Louanes HAMZIOUI** d'avoir accepté de lire, instruire et juger cette Thèse. Merci pour votre contribution à l'amélioration de ce document. Veuillez Trouvez ici l'expression ma profonde reconnaissance.*

*Je remercie tout particulièrement Monsieur **Ahmed TABCHOUCHE**, de m'avoir guidée tout au long de ces années de thèse. Ce travail résulte non seulement de mes efforts mais aussi des tiens et surtout de tes encouragements, ta disponibilité, ton écoute, ta patience, ton soutien, ta confiance, tes précieux conseils tout au long de ce travail. Je te souhaite une très bonne continuation.*

Un grand merci à tous mes collègues et ami(e)s : Ouahiba, Saadia, Soumia, Siham, Rawia, Salah Eddine, Bilal, Ryma, Imane, Ramla et tous ceux que j'oublie ... Grâce à vous, ces années seront inoubliables. Tous ensemble, vous avez contribué à maintenir une formidable ambiance.

Enfin, je remercie sincèrement mes parents ainsi que mon frère Amine et mes sœurs, pour leur amour et leur soutien sans faille. Sans eux, je n'en serais jamais arrivé là. je remercie aussi mes oncles Sadak et Sahbi pour leur soutien constant dans les moments difficiles.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

المخلص

يندرج هذا العمل في إطار تحضير مركبات جديدة من نوع قواعد شيف، انطلاقا من الامين البينيسيليني 4-amino tetrafluoropyridine مع 1'acide 6- aminopenicillanique او الامين الفليوري مع ساليسالدهيد و بنزالدهيد على التوالي.

ثلاث مركبات قمنا بتحضيرها، قاعدة شيف بينيسيلينية -3,3-(2-hydroxybenzylideneamino)-6-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (BP₁) بمردود (E)-N (BF₁) %48 يقدر ب 55%، المركب الثاني قاعدة شيف مفلورة بمردود يقدر ب 48% (BF₁) و اخرها المركب الفليوري benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine (4AETFP) بمردود يقدر ب 33%.

هذه المركبات الثلاثة تم التعرف عليها بواسطة الدراسات الطيفية المختلفة مثل (طيف الاشعة فوق البنفسجية، طيف الاشعة تحت الحمراء، طيف الرنين النووي للهيدروجين و الكروماتوغرافي الغازي المقترن بقياس الطيف الكتلي).

قمنا بتطبيق هذه المركبات في المجال البيولوجي، حيث تركز اختيارنا على دراسة مضادات البكتيريا، مضادات الفطريات و مضادات الاكسدة. تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمركباتنا اظهر حساسية بكتيرية بالنسبة لكل من السلالات البكتيرية الخمسة المختبرة *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*، *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus faecium* و *Streptococcus B*.

وعموما، أظهرت جميع المركبات الثلاث نتائج جد مهمة على البكتيريا المختبرة. لاحظنا أن القوة المضادة للبكتيريا لقاعدة شيف البنسيلينية كانت أكثر أهمية من غيرها من المركبات.

دراسة النشاط المضاد الفطريات للمركبات الثلاثة على السلالة الفطرية *Candida albicans*، اعطت فعالية تبقى معتدلة مقارنة ب Nystatine. مساحة التثبيط تزيد كلما زاد تركيز كل من المركبات المدروسة.

تشير نتائجنا أن قاعدة شيف البنسيلينية (BP₁) أظهرت أعلى فعالية لتثبيط نشاط الجذر الحر DPPH، تليها على التوالي المركبين (4AETFP) و (BF₁) و لكن هذه الفعالية تبقى معتدلة بالمقارنة مع مضاد الأكسدة Trolox.

الكلمات المفتاحية: قواعد شيف ، 6APA ، 4-aminotetrafluoropyridine ، طرق التحليل الطيفي، الفعالية المضادة للبكتيريا، الفعالية المضادة للفطريات، الفعالية المضادة للأكسدة.

ABSTRACT

In the present work, we have been interested in the synthesis of new compounds of Schiff base types. The latter are obtained essentially from a penicillinic or fluorinated amine and benzaldehyde salicylaldehyde, respectively.

Three compounds were synthesized, a Penicillinic Schiff base 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (**BP₁**) **55%**, Fluorinated Schiff base (E) -N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine (**BF₁**) **45%** and a fluorinated compound 4-amino-2-ethoxy-3-5,6-trifluoropyridine **33%**.

These synthesized compounds are identified and characterized using the usual physicochemical methods such as ultraviolet, infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. During the implementation of these analytical techniques, we have been able to demonstrate the structures of the synthesized compounds, while appreciating their purity.

As regards the application of these compounds in the field of biology, our choice has been focused on antimicrobial activities and antioxidant activity. In this case, the evaluation of the antibacterial effect of our compounds shows a bacterial sensitivity towards the five strains tested *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* of the Gram negative and *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* and *Streptococcus B* of the gram positive. The antibacterial effect is proportional to the concentration of the compounds.

Overall, the three compounds exhibited a broad spectrum of action on the bacteria tested. It should be noted that the antibacterial capacity of the penicillinic Schiff base was found to be greater than that of the other compounds.

The study of the antifungal activity was demonstrated by the diameter of inhibition of the *Candida albicans* strain. The compounds synthesized exerted moderate activity against the fungal strain tested. The diameters of the inhibition zone increase whenever the concentration of each product is increased.

The study of the antioxidant activity by the DPPH method shows that the greatest activity is obtained with the Schiff base BP₁ followed by those of 4AETFP and BF1 respectively.

Key words: Schiff base; 6APA; 4-aminotetrafluoropyridine; Spectroscopic methods; Antibacterial activity; Antifungal activity; Antioxidant activity.

RESUME

Au cours du présent travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux composés de types bases de Schiff. Ces derniers sont obtenus essentiellement à partir d'une amine pénicillinique ou fluorée et de salicylaldéhyde de benzaldéhyde respectivement.

Trois composés ont été synthétisés, une base de Schiff pénicillinique 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (**BP₁**) **55%**, une base de Schiff fluorée (E)-N benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **48%** (**BF₁**) et un composé fluoré 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine (**4AETFP**) **33%**.

Ces composés synthétisés sont identifiés et caractérisés au moyen des méthodes physico-chimiques habituelles comme l'ultraviolet, l'infrarouge, la résonance magnétique nucléaire ¹H et la spectrométrie de masse. Lors de la mise en œuvre de ces techniques d'analyse, nous avons pu mettre en évidence les structures des composés synthétisés, tout en appréciant leur pureté.

Pour ce qui est de l'application de ces composés dans le domaine de la biologie, notre choix à été porté sur les activités antimicrobiennes et l'activité antioxydante. Dans ce cas, l'évaluation de l'effet antibactérien de nos composés montre une sensibilité bactérienne vis-à-vis des cinq souches testés *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* du Gram négative et *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* et *Streptocoque B* du gram positive. L'effet antibactérien est proportionnel à la concentration des composés.

Globalement, les trois composés ont présenté un large spectre d'action sur les bactéries testés. Notons que le pouvoir antibactérien de la base de Schiff pénicillinique s'est révélé plus important que celui des autres composés.

L'étude de l'activité antifongique à été démontré par le diamètre d'inhibition de la souche *Candida albicans*. Les composés synthétisés ont exercé une activité modérée vis-à-vis la souche fongique testée. Les diamètres de la zone d'inhibition augmentent à chaque fois qu'on augmente la concentration de chaque produit.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH montre que le plus grande activité est obtenue avec la base de Schiff BP₁ suivi respectivement par celles de 4AETFP et de BF₁.

Mots clés : Base de Schiff ; 6APA ; 4-aminotetrafluoropyridine; méthodes spectroscopiques; Activité antibactérienne; Activité antifongique; Activité antioxydante.

Liste des Tableaux

Tableau I.1	Différents types de bases de Schiff	10
Tableau I.2	les différentes conditions et les rendements de la réaction de bases de Schiff fluorées.....	23
Tableau I.3	la structure chimique et les propriétés physiques des nouvelles bases de Schiff 4 (a-j)	25
Tableau II.1	les réactifs et les solvants utilisés dans la présente étude.....	29
Tableau III.1	Tests de solubilité sur le composé BP1.....	46
Tableau III.2	Propriétés analytique et physique du composé BP ₁	47
Tableau III.4	Tests de solubilité sur les composés 4ATFP , 4AETFP et BF1.....	53
Tableau III.5	Propriétés analytique et physique des composé BF ₁ , 4AETFP,4ATFP.....	54
Tableau III.6	Bandes de vibrations caractéristiques de 4ATFP, 4AETFP et BF ₁	58
Tableau III.7	Les données des spectres de masse.....	65
Tableau III.8	Activité antibactérienne de base de Schiff Pénicillinique PB1.....	68
Tableau III.9	Activité antibactérienne de 4AETFP.....	71
Tableau III.10	Activité antibactérienne de BF ₁	73
Tableau III.11	Concentration inhibitrice à 50% des BP ₁ , 4AETFP et BF ₁	79
Tableau III.12	Les valeurs de la capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (TEAC).....	80

Liste des figures

Figure I-1	La structure générale d'une base de Schiff.....	4
Figure I.2	Exemples de bases de Schiff bioactives, produit naturels, composés dérivés d'un produit naturel, et composé non-naturel.....	4
Figure I.3	N,N-bis(furan-2ylmethylene)propane-1,3-diamine.....	13
Figure I.4	2-[(2-hydroxy-3-methoxy-benzylidene)-amino]-pyridin-3-ol.....	13
Figure I.5	bases de Schiff dérivées du Chitosane.....	14
Figure I.6	Bases de Schiff de dérivés de quinazolinone	15
Figure I.7	complexes base de Schiff dérivée de 2-amino-3 hydroxypyridine et du 3-méthoxysalicylaldéhyde.....	16
Figure I.8	Cholesteryl-n-(4-((E)-(4'-cyanobiphenyl-4-ylimino) methyl)- phenoxy ou 3-hydroxyphenoxy) alkanoates.....	17
Figure I.9	la structure générale des pénicillines.....	18
Figure I.10	structures des bases de Schiff flourées.....	24
Figure II.1	Diagramme général de la procédure expérimentale.....	28
Figure II-2	Structure de 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo- 4-thia-1-aza-bicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylic acid (BP1)	36
Figure II-3	Structure de 4-amino-2,3,5,6-tétrafluoropyridine (4ATFP).....	38
Figure II-4	Structure de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine.....	38
Figure II-5	Structure de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine.....	39
Figure II-6	Réalisation de la gamme de dilution de BP ₁ , BF ₁ , 4AETFP.....	42

Figure II-7	Protocole expérimentale de l'essai de l'activité antibactérienne et antifongique de chaque composé synthétisé (BP ₁ , BF ₁ , 4AETFP).....	43
Figure III.1	Spectre infrarouge du 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid BP ₁	48
Figure III.2	Spectre UV-vis du BP ₁	49
Figure III. 3	Spectre infrarouge de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine.....	55
Figure III. 4	Spectre infrarouge de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine.....	56
Figure III. 5	Spectre infrarouge de (E)-N benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine.....	57
Figure III.6	Spectre UV-vis du (E)-N benzylidene-2,3,5,6 tetrafluoropyridin-4-amine.....	59
Figure III.7	Spectre de masse de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine.....	60
Figure III.8	Spectre de masse de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine.....	62
Figure III.9	Spectre de masse de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine.....	64
Figure III.10	Spectre de RMN ¹ H de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine.....	67
Figure III.11	Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration du BP ₁	69
Figure III.12	Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration du 4AETFP.....	72
Figure III.13	Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration du (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine BF ₁	73

Figure III.14	Structure de Fluoroquinolone.....	74
Figure III.15	Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration de BP ₁ , BF ₁ , 4AETFP.....	75
Figure III.16	Structure de fluconazole.....	76
Figure III.17	Activité antiradicalaire des BP ₁ , BF ₁ et 4AETFP.....	78
Figure III.18	Activité antiradicalaire de Trolox	79

Liste des schémas :

Schéma I.1	Réaction générale de la formation d'une base de Schiff.....	5
Schéma I.2	La séquence réactionnelle pour la synthèse d'une base de Schiff.....	5
Schéma I.3	Réaction de déshydratation d'une base de Schiff catalysé par un acide	7
Schéma I.4	Mécanisme de formation d'une base de Schiff.....	8
Schéma I.5	la réaction de formation des bases de Schiff pénicilliniques (11 _{a-h}).....	19
Schéma I.6	La synthèse de 6-(4-(diméthylamino) benzylidèneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid	20
Schéma I.7	synthèse de base de Schiff pénicillinique.....	21
Schéma I.8	synthèse des bases de Schiff fluorées.....	23
Schéma III.1	Schéma réactionnel conduisant à l'obtention de la 6-(2-hydroxybenzylidèneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid	46
Schéma III.2	Mécanisme réactionnel de la synthèse de 4-aminotetrafluoropyridine...	50
Schéma III.3	Mécanisme réactionnel de la synthèse de 4AETFP.....	51
Schéma III.4	Mécanisme de substitution nucléophile dans l'amine 4ATFP par Nu (KOEt).....	52
Schéma III.5	Mécanisme réactionnel de la synthèse de BF ₁	53
Schéma III.6	Fragmentation proposée de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine.....	61
Schéma III.7	Fragmentation proposée de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6 trifluoropyridine...	63
Schéma III.8	Fragmentation proposée de (E)-N benzylidène-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine.....	65
Schéma III.9	Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (RH).....	78

Liste des abréviations :

6APA	L'acide 6-aminopénicillanique
THF	Tétrahydrofurane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil
TEAC	Capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox
SDA	Sabouraud dextrose agar
4ATFP	4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine
4AETFP	4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine
BP	Base de Schiff pénicillinique
BF	Base de Schiff fluorée
EC₅₀	Efficient Concentration à50%
MeOH	Méthanol
EtOH	Ethanol
CCM	Chromatographie sur couche mince
UV/VIS	L'ultraviolet - visible
IR	Infrarouge
RMN	Résonance magnétique nucléaire
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
ZnCl₂	chlorure de zinc
TiCl₄	tétrachlorure de titane
PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
Ti(OR)₄	Titanium isopropoxide
H₂SO₄	acide sulfurique
NaHCO₃	bicarbonate de sodium
Mg (ClO₄)₂	perchlorate de Magnesium
CH₃COOH	acide acétique
Er(OTf)₃	Erbium(III) triflate ou Erbium(III) trifluoromethanesulfonate
P₂O₅	pentoxyde de phosphore
Al₂O₃	alumine ou oxyde d'aluminium
HCl	acide chlorhydrique

[bmim] BF₄	1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate
NaHSO₄	hydrogénosulfate de sodium
SiO₂	dioxyde de silicium
CaO	oxyde de calcium

Sommaire

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES TABLEAUX, DES FIGURES, DES SCHEMAS ET ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1	Rappel théorique sur les bases de Schiff	3
I-1-1	Définition des bases de Schiff	3
I-1-2	Formation des bases de Schiff	5
I-1-3	Classification des bases de Schiff	9
I-1-4	Différentes méthodes de synthèse des imine	11
I-1-5	Bases de Schiff et activités biologiques	12
I-1-5-1	Activité antibactérienne	12
I-1-5-2	Activité antifongique	13
I-1-5-3	Activité anti-inflammatoire	14
I-1-5-4	Activités anticancéreuse	15
I-1-5-5	Activité antioxydante	16
I-2	Rappel sur la synthèse et les applications des bases de Schiff pénicillinique et fluoré	18
I-2-1	Les bases de Schiff pénicillinique	18
I-2-2	Les bases de Schiff fluoré	21
I-3	Conclusion 1	26

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II-	Matériels et méthodes	28
II-1	Partie synthèse	29
II-1-1	Matières et méthodes d'analyse	29
II-1-1-1	Le Point de fusion	30
II-1-1-2	La Chromatographie Sur Couche Mince (CCM)	30
II-1-1-3	L'Ultraviolet - Visible (UV/Vis).....	32
II-1-1-4	Spectrométrie infrarouge.....	33

II-1-1-5 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire	34
II-1-1-6 Spectrométrie de masse	35
II-1-2 La Synthèse.....	36
I-1-2-1 Synthèse de la base de Schiff pénicillinique	36
➤ 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza- bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (BP1).....	37
I-1-2-2 Synthèse de la base de Schiff fluorée.....	37
➤ Synthèse de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine (4ATFP).....	38
➤ Synthèse de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine (4AETFP).....	38
➤ Synthèse de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine.....	39
II-2 Partie activité biologique.....	40
II-2-1 Activité antibactérienne.....	40
II-2-1-1 Souches bactériennes utilisées.....	40
II-2-1-2 Méthode de diffusion sur gélose.....	41
II-2-2 Activité antifongique.....	41
II-2-2-1 souche fongique utilisée.....	41
II-2-2-2 L'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose.....	41
II-2-3 L'activité antioxydante.....	43
I-2-3-1 Matières utilisées.....	43
I-2-3-2 Méthode de DPPH.....	44

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et discussion.....	45
III-1 Partie synthèse.....	45
III-1-1 Synthèse de la base de Schiff pénicillinique BP ₁	45
III-1-1-1 Propriétés physiques et analytiques.....	46
III-1-1-2 Caractérisations spectrales et identification des structures.....	47
1- Analyse par IR.....	47
2- Analyse par UV/Vis.....	49
III-1-2 Synthèse de la base de Schiff fluorée BF ₁	50
➤ Synthèse de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine (4ATFP)	50
➤ Synthèse de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine (4AETFP).....	51
➤ Synthèse de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine.....	52

III-1-2-1	Propriétés physiques et analytiques.....	53
III-1-2-2	Caractérisations spectrales et identification des structures.....	54
1-	Analyse par IR.....	54
2-	Analyse par UV/Vis.....	58
3-	Analyse par GC-MS.....	59
4-	Analyse par RMN ¹ H.....	66
➤	4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine.....	66
➤	4-amino-2-éthoxy-3,5,6-trifluoropyridine.....	66
III-1-3	Conclusion.....	67
III-2	Partie biologique.....	68
III-2-1	l'activité antimicrobienne.....	68
III-2-1-1	Activité antibactérienne.....	68
III-2-1-2	L'activité antifongique.....	75
III-2-2	L'activité antioxydante.....	77
III-2-2-1	Relation entre la production des radicaux libres a l'origine du stress oxydatif et le cancer.....	77
	CONCLUSION.....	81
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83
	ANNEXES.....	92
	PUBLICATION.....	104

Introduction

Générale

INTRODUCTION GENERALE

La chimie et la biologie font aujourd'hui partie de notre environnement quotidien, ces deux disciplines étant à la croisée de nombreuses industries et de nombreux secteurs. La chimie organique d'hier s'étend aujourd'hui aux molécules biologiques, aux molécules inorganiques et aux macromolécules. Elle crée des édifices plus ou moins complexes jusqu'à l'élaboration d'une chimie supramoléculaire fondée sur des interactions diverses entre molécules et explique leurs propriétés[1].

Les Bases de Schiff sont parmi les composés organiques les plus couramment utilisés. Portent réellement le nom de leur inventeur Hugo Schiff (1834-1915) qui fut le premier chimiste à synthétiser ce type de composés[2].

Les bases de Schiff sont des composés contenant le groupe azométhine (-HC=N-) et sont produites de la condensation des cétones ou des aldéhydes avec des amines primaires. La formation de la base de Schiff a lieu généralement sous l'effet catalytique d'un acide, d'une base ou avec la chaleur. Les communes bases de Schiff sont des solides cristallins faiblement basiques[3, 4].

Depuis, nous devons faire remarquer que la synthèse des bases de Schiff constitue un thème de recherche d'actualité qui ne cesse d'attirer de nombreuses équipes de recherche à travers le monde, que ce soit sur le plan universitaire ou industriel. Cela peut être associé essentiellement à l'importance et à la diversité des applications de ce type de composés. Les bases de Schiff sont largement utilisées dans le domaine biologique à cause de leur propriétés antibactériennes ; antifongiques; anti-inflammatoires [5-10], antiprolifératif et anticancéreuses [11, 12], en industrie dans la lutte contre la corrosion [13-16]. Ils peuvent aussi avoir une vaste application dans le domaine du traitement des eaux à cause de leur grande capacité de complexation des métaux de transition notamment dans la récupération des métaux lourds dans les effluents nocifs industriels [3].

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit se focalisent sur la synthèse, la caractérisation et les propriétés biologiques antibactériennes, antifongiques et antioxydantes de nouvelles bases de Schiff pénicilliniques et fluorés.

INTRODUCTION GENERALE

Les composés fluorés et pénicilliniques constituent une classe importante de composés qui a reçu beaucoup d'intérêts ces dernières années, à cause de leurs activités biologiques diverses [17, 18], pour ce raison nous nous somme intéressés dans ce travail à la synthèse de ces deux types des bases de Schiff (fluorés et pénicilliniques).

Ce manuscrit est organisé en deux parties et trois chapitres :

Le premier chapitre de ce manuscrit porte sur une mise au point bibliographique des Bases de Schiff : leur définition et historique, leur réaction de formation, leurs types et leurs domaines d'application, ainsi une rappelle des travaux bibliographiques effectués sur les bases de Schiff pénicilliniques et fluorés et leurs activités biologiques.

Le deuxième chapitre est consacré à la description des techniques et protocoles expérimentaux mis en œuvre pour réaliser ce travail.

Enfin les résultats obtenus de la synthèse; de la caractérisation spectrale et l'identification des structures de nos composés et leurs activités antibactériennes, antifongiques et antioxydants sont interprétés à la lumière de la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I
Synthèse
bibliographique

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce chapitre nous allons décrire dans un premier temps, des généralités sur les bases de Schiff ; puis un bref rappel bibliographique résumant les principaux travaux liés à la préparation des bases de Schiff pénicillinique et fluorés et leurs activités biologiques s'avère nécessaire.

I-1 Rappel théorique sur les bases de Schiff

Les ligands bases de Schiff représentent un rôle important dans différents domaines de la chimie. En effet, des efforts considérables ont été déployés pour développer les méthodes de synthèse de ces composés, qui ont suscité, pendant très longtemps une attention très particulière chez beaucoup de chercheurs en se basant sur leur importance dans le domaine biologique, médicale, pharmaceutique ainsi que dans le domaine industriel.

I-1-1 Définition des bases de Schiff :

Les bases de Schiff portent réellement le nom de leur inventeur Hugo Schiff (1834-1915) qui fut le premier chimiste à synthétiser ce type de composés en 1864 [2, 19].

✓ Une base de Schiff est définie comme tout produit comportant une fonction imine dont l'un des constituants sur le carbone ou sur l'azote, est un groupement aromatique [20, 21]

✓ Une base de Schiff est définie comme étant la condensation d'une amine primaire avec une cétone ou un aldéhyde. Par extension, on appelle base de Schiff tout produit comportant une double liaison C=N issue de la réaction entre un azote nucléophile et un composé carbonyle [22, 23].

Les bases de Schiff ont la structure générale suivante (Figure I-1) :

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

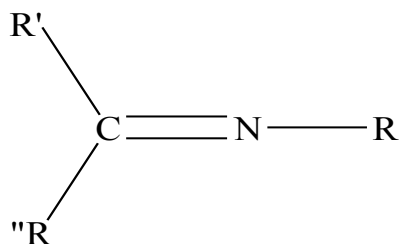


Figure I-1: la Structure générale d'une base de Schiff.

Où R', R'' et/ou R= aryle ou alkyle.

En effet, les groupes imines ou azométhines sont présents dans différents produits naturels, composés dérivés d'un produit naturel, et composé non-naturel, la figure I.2 montre certains exemples. Le groupe imine présent dans ces composés a été démontré d'être indispensable à leurs activités biologiques [6, 24, 25].

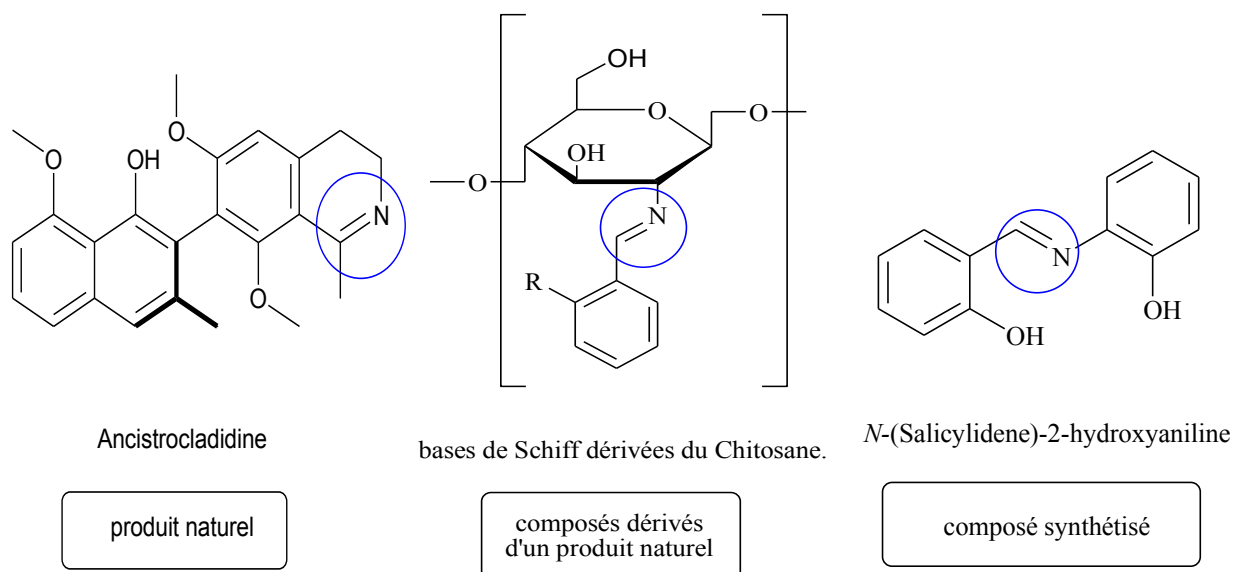


Figure I.2 : Exemples de bases de Schiff bioactives, produit naturels, composés dérivés d'un produit naturel, et composé non-naturel [26]

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1-2 Formation des bases de Schiff

La base de Schiff est formée par une réaction de condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone sur l'amine primaire quelle soit aliphatique ou aromatique comme cela est illustré par le schéma suivant :

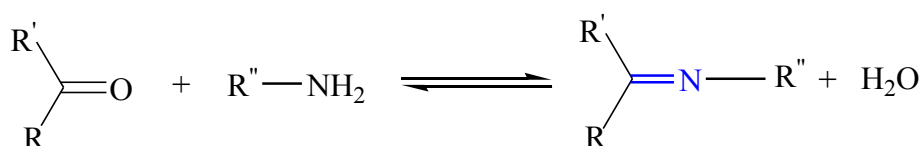


Schéma I.1: Réaction générale de la formation d'une base de Schiff.

(R, R' et R'' = alkyle ou aryle groupe)

Les bases de Schiff qui contiennent le groupe aryle comme substituant sont considérées les plus stable, compte tenu d'une plus large délocalisation électronique sur la surface de la molécule. Ces dernières sont faciles à synthétiser. Quant aux bases de Schiff de la série aliphatique, elles sont relativement moins stables que les aromatiques. Notons que les bases de Schiff issues de la condensation des aldéhydes aliphatiques sont relativement moins stables et facilement polymérisable[2, 27].

La formation des bases de Schiff à partir d'un aldéhyde ou une cétone est une réaction réversible et s'effectue généralement sous catalyse acide ou basique, ou par chauffage[27].

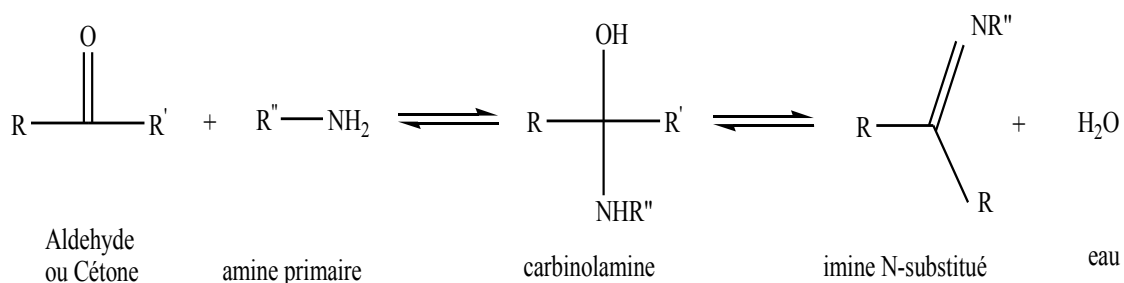


Schéma I.2: La séquence réactionnel pour la synthèse d'une base de Schiff

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

En général, la réversibilité de cette réaction impose souvent l'élimination de l'eau du milieu réactionnel afin de déplacer l'équilibre vers la droite ou vers la formation de la base de Schiff. Ceci est réalisable par l'emploi d'un montage couramment appelé « Dean-stark »[2].

La première étape dans cette réaction c'est l'attaque de nucléophile de l'atome d'azote de l'amine sur le carbone de carbonyle, qui conduit à un intermédiaire instable nommé carbinolamine, dont un atome de carbone est porteur de deux fonctions électroattractrices (la fonction hydroxyle et la fonction amine NHR)[10, 27].

La réaction peut adopter le chemin inverse conduisant à la formation des produits de départ. Enfin, lorsque le groupe hydroxyle se trouve éliminé, la fonction imine C=N est aussitôt formée et la base de Schiff est alors obtenue. Il est à noter que beaucoup de facteurs peuvent affecter le cours de cette réaction de condensation, par exemple le pH de solution, l'effet stérique ainsi que les effets électroniques.

Comme l'amine est basique, elle est rapidement protonée dans le milieu acide faisant en sorte qu'elle ne peut plus fonctionner comme agent nucléophile et par conséquent la réaction ne peut pas avoir lieu. En outre, dans un milieu fortement basique, la réaction est empêchée à cause de l'absence de protons dans le milieu réactionnel qui provoquent l'attaque de l'hydroxyle du carbinolamine conduisant à la formation de la base de Schiff et l'eau [2, 27].

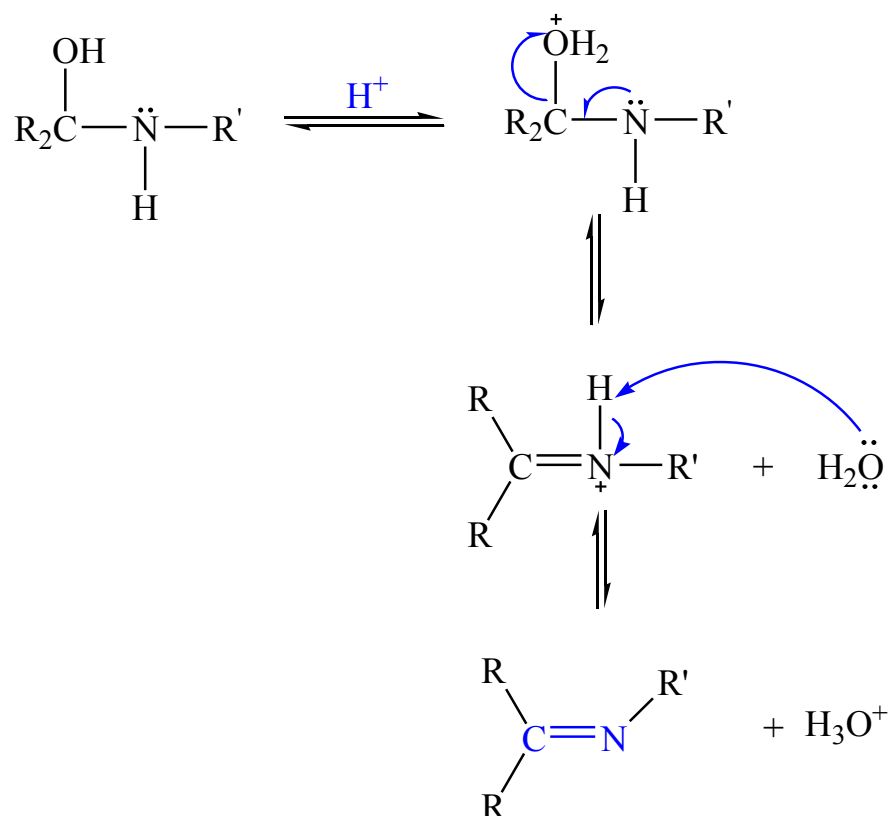


Schéma I.3: Réaction de déshydratation d'une base de Schiff catalysé par un acide.

Généralement les aldéhydes réagissent plus vite que les cétones dans ces réactions de condensation puisque la base de Schiff résultante de l'aldéhyde présente moins de gênes stériques que ceux d'une cétone. De plus, la densité électronique sur l'atome de carbone du groupe carbonyle est plus faible dans le cas de la cétone que dans le cas de l'aldéhyde faisant en sorte que l'efficacité de l'attaque nucléophile de l'amine est régulée en tant que telle[2].

Les bases de Schiff sont généralement des solides qui précipitent au fur et à mesure de leur formation dans le milieu réactionnel facilitant ainsi leur éventuelle séparation qui peut être aisément réalisée par filtration.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Un autre schéma explique le mécanisme de formation d'une base de Schiff :

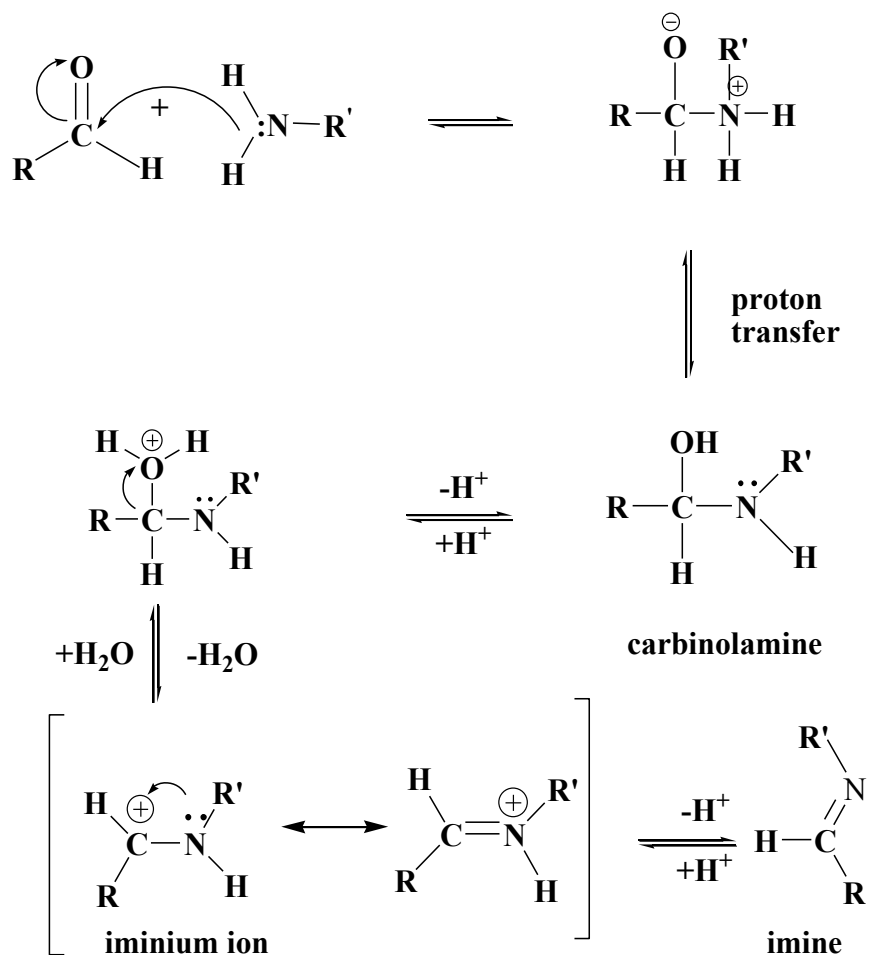


Schéma I.4: Mécanisme de formation d'une base de Schiff [10].

Comme est de coutume dans les réactions catalytiques d'employer des quantités infimes de catalyseur, c'est effectivement le cas ici afin d'assurer l'attaque nucléophile de l'amine sinon la base de Schiff ne serait jamais formée.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1-3 Classification des bases de Schiff

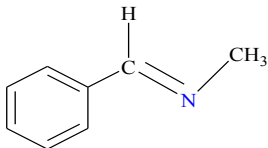
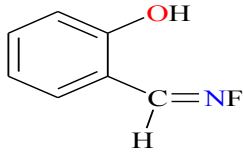
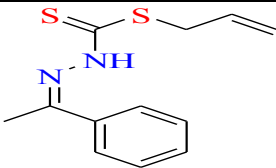
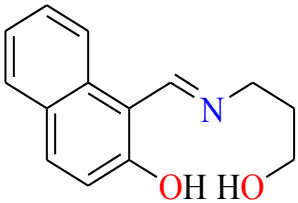
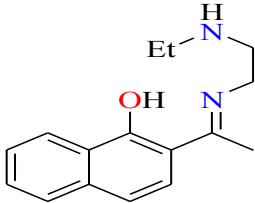
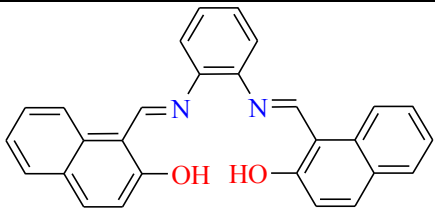
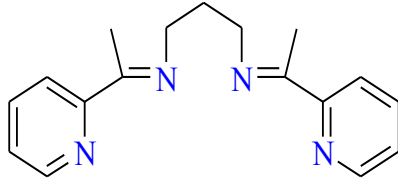
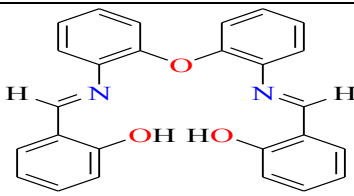
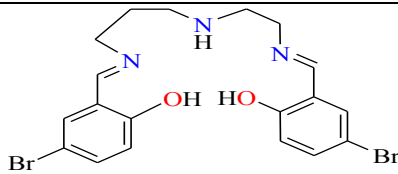
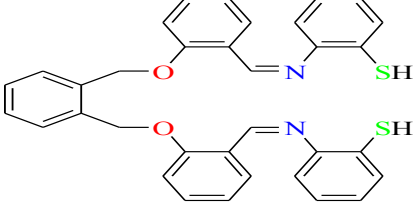
Les ligands bases de Schiff sont doués d'une aptitude à former des liaisons de coordination avec les métaux de transition selon les conditions de réactions utilisées. La littérature a consacré beaucoup d'efforts à la chimie de coordination particulièrement au cours des deux dernières décennies où l'on a assisté à une production scientifique extrêmement fertile compte tenu d'une activité de recherche très intense, on note qu'ils sont focalisés essentiellement sur la complexation des ligands bases de Schiff avec les métaux de transition[2, 23].

Ces ligands sont en général des molécules organiques possédant des atomes donneurs d'électrons au sens de Lewis. Ces composés peuvent alors être classifiés comme monodentate, bidentate et polydentate basés sur le nombre de sites de coordination du ligand[28].

Les exemples dans le **Tableau I.1** donnés ci-après montrent les différents types de structures de ces bases de Schiff

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1 : Différents types de bases de Schiff

Ligand monodentate	
 <p>(E)-N-benzylidenemethanamine [23].</p>	
Ligand bidentate	
 <p>2-(fluoroiminomethyl)phenol [29].</p>	 <p>[30]</p>
Ligand tridentate	
 <p>1-(3-hydroxypropyliminomethyl) naphthalene-2-ol [31]</p>	 <p>(1-(2-(methylamino) ethylimino)ethyl) naphthalene-1-ol [32].</p>
Ligand tétradentate	
 <p>N,N'-bis((2-hydroxy-1 naphthyl)methylidene)phenyl-1,2- diamine [33].</p>	 <p>N,N'-bis(1-(pyridin-2-yl)ethylidene) propane-1,3-diamine [34].</p>
Ligand pentadentate	
 <p>[35]</p>	 <p>[36]</p>
Ligand hexadentate	
 <p>2,2'-{1,2-phenylenebis[methyleneoxy-2,1- phenylene(Z)methylidene-nitrilo]}dibenzenthiole [37].</p>	

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1-4 Différentes méthodes de synthèse des imine

La première préparation des imines a été rapportée au 19^{ème} siècle par Schiff (1864). Depuis, diverses méthodes de synthèse des imines ont été décrites[38]. La synthèse classique rapportée par Schiff implique la condensation d'un composé carbonyle avec une amine sous une distillation azéotropique[26].

Des tamis moléculaires sont alors utilisés pour éliminer complètement l'eau formée dans le système [39]. Dans les années 90, une méthode d'élimination de l'eau a été mise au point en utilisant des solvants déshydratants tels que l'orthosilicate de tétraméthyle ou l'orthoformiate de triméthyle [40, 41].

En 2004, Chakraborti et al [42] ont démontré que l'efficacité de ces méthodes dépend de l'utilisation de composés carbonyles fortement électrophiles et d'amines fortement nucléophiles. Ils ont proposé comme alternative l'utilisation de substances qui fonctionnent comme des acides de Brønsted-Lowry ou de Lewis pour activer le groupe carbonyle des aldéhydes, catalyser l'attaque nucléophile par les amines et déshydrater le système, éliminant l'eau comme étape finale [42]. Des exemples d'acides de Brønsted-Lowry ou de Lewis utilisés pour la synthèse de bases de Schiff comprennent $ZnCl_2$, $TiCl_4$, PPTS, $Ti(OR)_4$, H_2SO_4 , $NaHCO_3$, $Mg(ClO_4)_2$, CH_3COOH , $Er(OTf)_3$, P_2O_5/Al_2O_3 , HCl [42-54].

Au cours des 12 dernières années, un certain nombre d'innovations et de nouvelles techniques ont été rapportées, y compris l'utilisation de l'irradiation de micro-ondes /sans solvant, la synthèse à l'état solide, $[bmim]BF_4$ /tamis molecular, Irradiation de l'infrarouge /sans solvant, $NaHSO_4.SiO_2$ / micro-ondes / sans solvant, sans solvant / CaO / micro-ondes et irradiation de ultrasons / silice [55-63].

Parmi ces innovations, l'irradiation par micro-ondes a été largement utilisée en raison de sa simplicité opérationnelle[62]. L'utilisation de l'irradiation micro-ondes a commencé avec les études indépendantes de Rousell et Majetich [64, 65].

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

L'irradiation par micro-ondes est moins problématique sur le plan de l'environnement que d'autres méthodes, car elle supprime l'utilisation excessive de solvants aromatiques et de l'appareil Dean-Stark pour l'élimination azéotropique de l'eau. Une autre caractéristique de cette technique est que les réactions atteignent une efficacité élevée dans un laps de temps plus court[26].

I-1-5 Bases de Schiff et activités biologiques

Depuis quelques années, on assiste à travers la littérature scientifique à un intérêt concernant les bases de Schiff qui présentent des activités biologiques spécifiques en général reliées à la présence de ce groupement fonctionnel. Je citerai ici quelques exemples récents concernant diverses pathologies et maladies majeures en relation avec des activités antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, anticancéreuse ...

I-1-5-1 Activité antibactérienne

L'augmentation du taux de mortalité associé à des maladies infectieuses est directement liée à plusieurs bactéries présentant une résistance aux antibiotiques. Le manque de traitements efficaces est la principale cause de ce problème[66, 67]. Le développement de nouveaux agents antibactériens avec des mécanismes d'action plus efficaces est sans aucun doute un besoin médical urgent[68]. Les bases de Schiff ont été présentées comme agents antibactériens prometteurs.

Plus récemment, G.G. Mohamed et coll [69]. Ont rapporté en 2015 la synthèse et l'activité antibactérienne de [N1,N3-bis(furan-2-ylmethylene)propane-1,3-diamine] **1** (figure I . 3) contre des bactéries de Gram négatives (*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*) et Gram positif (*Bacillus vulgaris* et *Staphylococcus pyogones*). Les auteurs ont montré que le ligand de base de Schiff s'est révélé avoir une activité modérée contre toutes les souches bactériennes testées avec une concentration minimale inhibitrice de 25mg/ml.

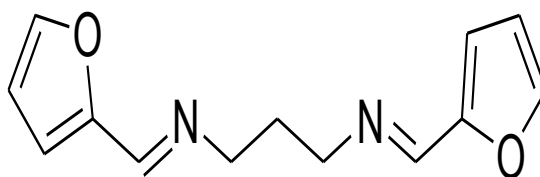


Figure I.3 : N,N-bis(furan-2-ylmethylene)propane-1,3-diamine (**1**)

Ainsi, dans un article récent Abdel-Rahman et coll [12], ont conçu, synthétisé et étudié une base de Schiff à partir de 2-amino-3-hydroxypyridine et 3-méthoxysalicylaldehyde. Leurs études de l'activité antibactérienne ont montré que le ligand **2** a une moyenne efficacité antibactérienne contre des bactéries de Gram négatives (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) et Gram positif (*Micrococcus luteus*).

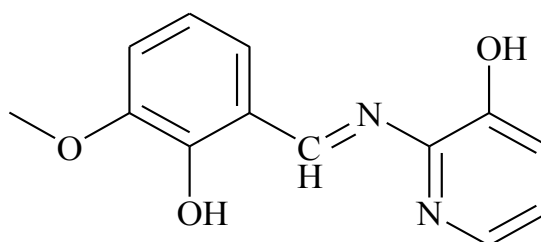
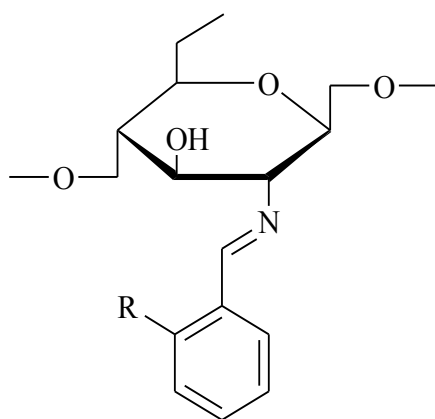


Figure I.4: 2-[(2-hydroxy-3-méthoxy-benzylidène)-amino]-pyridin-3-ol (**2**)

I-1-5-2 Activité antifongique

Les infections fongiques ne sont généralement pas limitées aux tissus superficiels. En effet, une augmentation significative de la vie en danger par les infections fongiques systémiques a été rapportée [70]. La recherche et le développement des traitements les plus efficaces des agents antifongiques sont nécessaires [71, 72], et certaines des bases de Schiff décrites, sont connues pour être des agents antifongiques prometteurs.

Les composés **3** et **4** (figure I.5) sont des exemples de bases de Schiff dérivées du Chitosane ayant une activité antifongique. Ils inhibent la croissance de *Botrytis cinerea* et *Colletotrichum lagenarium* de 26-33% et 35-38% lorsqu'ils sont utilisés à 1000 ppm, respectivement [6].



R=H (3) ou OH (4)

Figure I.5 : bases de Schiff dérivées du Chitosane.

I-1-5-3 Activité anti-inflammatoire

Les réactions inflammatoires sont induites par les infections microbiennes et virales; l'exposition aux allergènes, les radiations et les produits chimiques toxiques, les maladies auto-immunes et chroniques, l'obésité, la consommation d'alcool, l'utilisation de tabac, et une alimentation riche en calories[73, 74].

Plus récemment, en 2015 Rakesh, K et coll [75], ont rapporté la synthèse et in vitro activité anti-inflammatoire des bases de Schiff de dérivés de quinazolinone .

Les composés (5) et (6) (Figure I.6), présentaient une excellente activité avec des valeurs IC_{50} 84, 67 μ M/mL, respectivement, beaucoup mieux que l'aspirine standard (IC_{50} = 166 μ M/mL). La CI_{50} a été déterminée pour les composés présentant une concentration d'inhibition supérieure à 50%

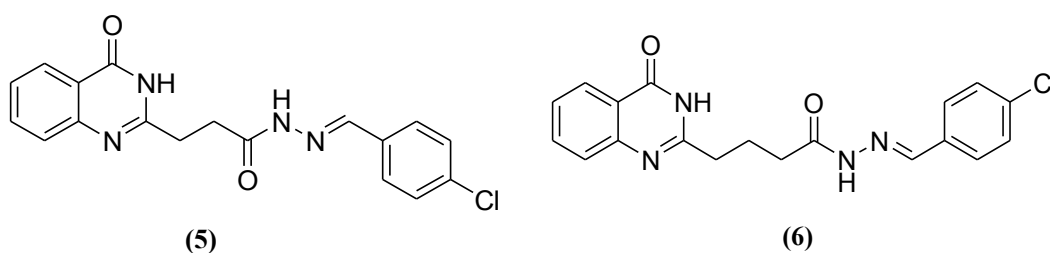


Figure I.6 : Bases de Schiff de dérivés de quinazolinone

I-1-5-4 Activités anticancéreuse

Par définition, Le cancer est une tumeur maligne qui est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme conduisant à l'invasion des tissus voisins par une croissance illimitée, l'invasion et la métastase des cellules [76, 77]. Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, particulièrement dans les pays à faibles revenus ou à revenus intermédiaires [78]. Les bases de Schiff ont été présentées comme agents anticancéreux prometteurs.

En 2016 Abdel-Rahman et al [12] ont rapporté la synthèse et l'activité anticancéreuse des trois complexes de Fe (II), Cd (II) et Zn (II) avec une base de Schiff dérivée de la 2-amino-3 hydroxypyridine et du 3-méthoxysalicylaldéhyde.

Les auteurs ont montré que les résultats de la cytotoxicité indiquent que tous les complexes testés ont démontré une cytotoxicité puissante ($IC_{50} = 4,55-8,44 \mu\text{g/ml}$) vis-à-vis des cellules cancéreuses HCT-116 et une cytotoxicité puissante ($IC_{50} = 1,45-6,75 \mu\text{g/ml}$) contre les cellules cancéreuses HepG-2. Le complexe Cadmium (7) a présenté l'effet de cytotoxicité le plus élevé avec une valeur CI_{50} de $4,55 \mu\text{g/ml}$, suivi du complexe (8) avec une valeur de CI_{50} de $5,46 \mu\text{g/ml}$ et ensuite complexe (9) avec une valeur de CI_{50} de $8,44 \mu\text{g/ml}$ dans le cas de cellules cancéreuses HCT- 116. Le complexe de cadmium (7) a présenté l'effet de cytotoxicité le plus élevé avec une valeur de CI_{50} de $1,45 \mu\text{g/ml}$, suivi du complexe(8) avec une valeur de CI_{50} de $1,76 \mu\text{g/ml}$ puis complexe (9) avec une valeur de CI_{50} de $6,75 \mu\text{g/ml}$ dans le cas de cellules cancéreuses HepG- 2. Il a été repéré également que tous les complexes sont plus puissants que le ligand libre.

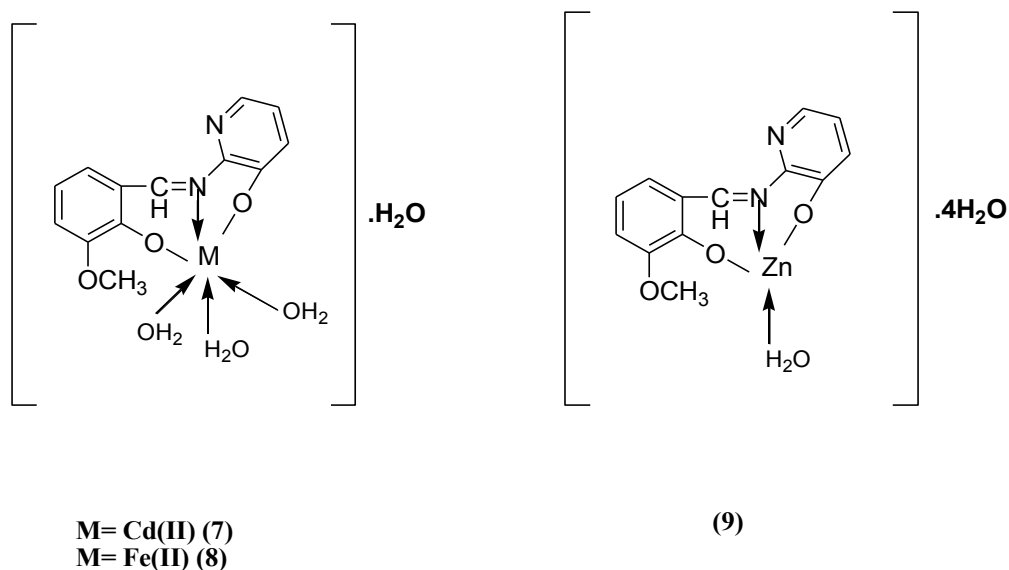


Figure I.7 : complexes base de Schiff dérivée de 2-amino-3 hydroxypyridine et du 3-méthoxysalicylaldéhyde.

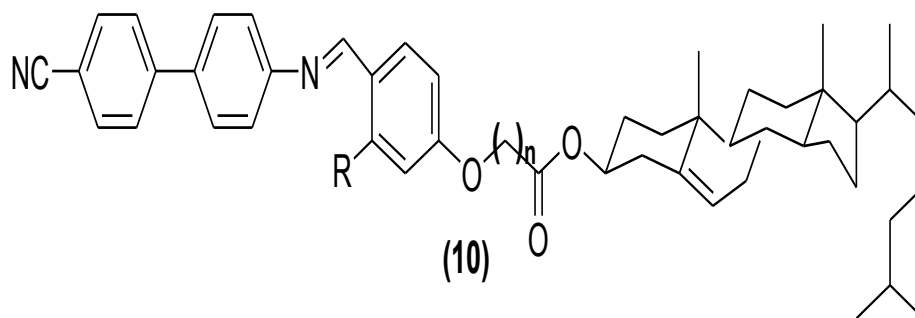
I-1-5-5 Activité antioxydante

Un antioxydant peut être défini comme étant toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats[78]. En d'autres termes, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ROS), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Les bases de Schiff ont été présentées également comme agents antioxydante prometteurs.

Kumar. M et coll [79]. Ont rapporté en 2014 la synthèse et l'activité antioxydante d'une série de base de Schiff dérivés de cholestérol (**10a-j**).

Les composés (**10b**; **10d** ; **10j**) présentait une excellente activité antioxydante que la vitamine C ($IC_{50} = 32,50\mu M$) avec des valeurs de CI_{50} (12,53, 13,75 et 13,90 μM) respectivement, dans le dosage de DPPH.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



Composés	R	n
10a	H	4
10b	OH	4
10c	H	5
10d	OH	5
10 ^e	H	6
10f	OH	6
10g	H	8
10h	OH	8
10i	H	10
10j	OH	10

Figure I.8: Cholesteryl-n-(4-((E)-(4'-cyanobiphenyl-4-ylimino) methyl)- phenoxy ou 3-hydroxyphenoxy) alkanoates

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-2 Rappel sur la synthèse et les applications des bases de Schiff pénicillinique et fluoré

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux bases de Schiff pénicillinique et fluoré :

I-2-1 Les bases de Schiff pénicilliniques

La pénicilline se considère parmi les plus importants antibiotiques découvert pour la premier fois par Fleming en 1929 à travers sa remarque fut sur l'arrêt de l'évolution de la bactérie staphylocoque après qu'une moisissure est tombé dans l'exemple de teste, et Fleming a attribué ça à l'influence d'une substance produite par la moisissure et il l'appelée « pénicilline » que sa moindre quantité peut tuer les microbes elle a été utilisée en 1941 pour la première fois dans le traitement médical[80-82].

Les pénicillines ont en commun une structure de base qui est l'acide 6-aminopénicillanique (acide-6-amino-3, 3 -diméthyl-7-oxo-4- thia-1 -azabicyclo [3.2.0] heptane -2- carboxylique) formé par l'association de noyau bêta-lactame et du noyau thiazolidine. Les pénicillines se distinguent les unes des autres par la nature du radical R lié au noyau.

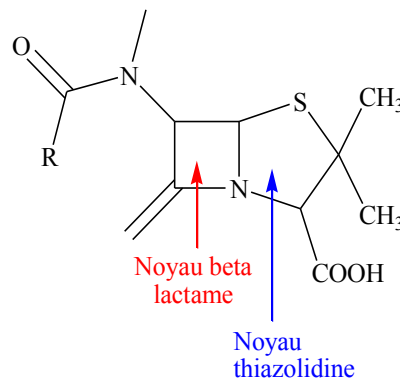


Figure I.9 : la structure générale des pénicillines.

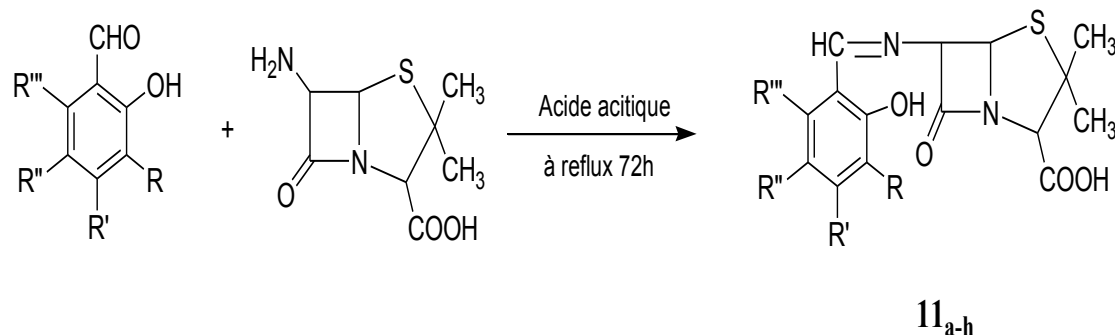
Les études bibliographiques ont montré que les bases de Schiff pénicillinique ont une activité biologique importante à cause de leur structure qui contient le groupe imine (C=N) et le noyau des pénicillines l'acide 6-aminopénicillanique, et en ce qui concerne la synthèse de ce type des bases de Schiff et leurs activités, on peut particulièrement citer les travaux suivants :

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

En 1994, L Bonsignore et al [83] ; ont rapporté la synthèse des bases de Schiff pénicilliniques (**11_{a-h}**) par une condensation de l'acide 6-aminopénicillanique et 2-hydroxybenzaldehydes substitués. Les réactions ont été effectuées dans l'éthanol (95%) avec 1ml de l'acide acétique glacial comme un catalyseur à une température est égal à 40 °C et à reflux pendant 72 heures.

Les bases de Schiff ont été préparées avec de rendements raisonnables allant de 30- 96%, et caractérisés par les techniques spectroscopiques (RMN ¹H et IR). Ces composés ont montré une meilleure activité antibactérienne par apport à l'ampicilline (100µg/ml) dans le cas de composé **11_g** contre la souche bactérienne *S. aureus* avec une valeur de CMI égale à 25µg/ml.

Le schéma donné ci-dessous explique la réaction de formation des bases de Schiff pénicilliniques (**11_{a-h}**):



Composés	R	R'	R''	R'''
11a	H	H	OCF ₃	H
11b	H	OH	H	OH
11c	H	H	Br	H
11d	Br	H	Br	H
11^e	H	OCH ₃	H	H
11f	H	H	Cl	H
11g	Cl	H	Cl	H
11h	H	H	NO ₂	H

Schéma 1.5: la réaction de formation des bases de Schiff pénicilliniques (**11_{a-h}**).

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ainsi, en 1995 Yatsimirskaya, N et coll [84], ont rapporté la synthèse et la détermination spectrophotométrique d'acides 6-aminopénicillaniques comme une nouvelle base de Schiff avec para-diméthylaminobenzaldéhyde en présence de micelles de dodécylsulfate de sodium.

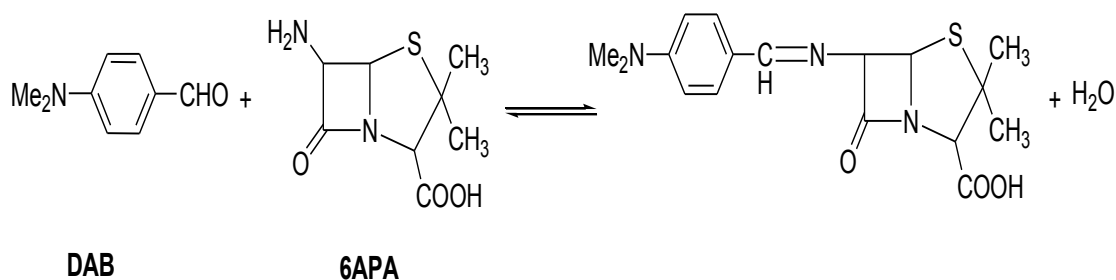


Schéma 1.6: La synthèse de 6-(4-(diméthylamino) benzylidèneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique acid

Enfin, je rapporte dans cette dernière partie les travaux de S. JOSHI et coll [18], concernant la synthèse, la caractérisation et l'étude de l'activité biologique d'une nouvelle base de Schiff (**12**) qui est produite par une réaction équimolaire de *p*-chlorobenzaldéhyde avec l'amoxicilline trihydrate. La réaction a été effectuée à reflux dans le méthanol avec 0,1% de KOH comme catalyseur pendant 4 heures. La base de Schiff a été préparée avec 78% de rendements et caractérisée par les techniques spectroscopiques (RMN ¹H et IR) et par l'analyse élémentaire (C, H et N). Ce composé a montré une activité antibactérienne importante.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

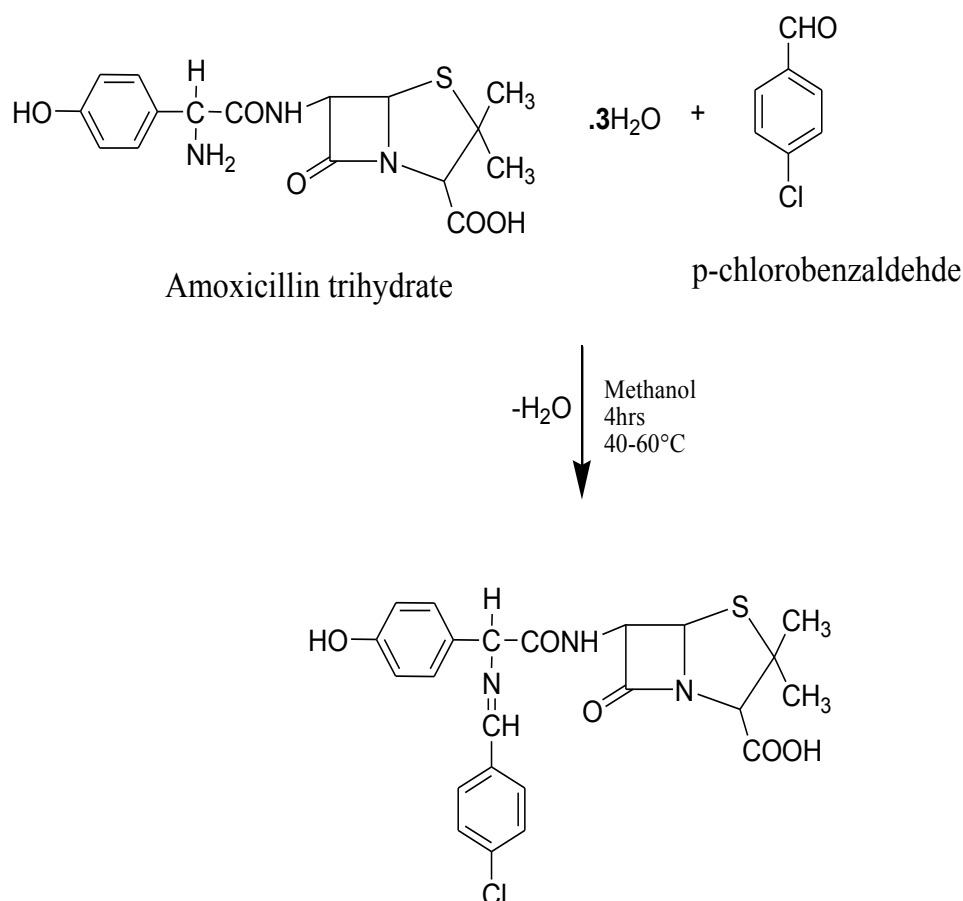


Schéma 1.7 : synthèse de base de Schiff pénicillinique (12)

I-2-2 Les bases de Schiff fluorées

Les composés fluorés sont d'un grand intérêt pour le chimiste en raison des propriétés particulières induites par la présence d'un ou plusieurs atomes de fluor. Ils sont devenus une part importante de la recherche, notamment dans l'industrie pharmaceutique, agrochimique et des polymères. Leurs applications sont nombreuses: colorants, surfactants, gaz propulseurs pour aérosols ou inhalateurs, cristaux liquides, anesthésiques, pesticides, substituts sanguins, revêtements de poêles à frire, textiles. On retrouve également des composés fluorés dans quasi toutes les classes de médicaments (antitumoraux, anti-infectieux, anti-inflammatoires, médicaments du système nerveux central...) [85-87].

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

En effet, les bases de Schiff fluorées sont très intéressantes, principalement en biologie, et en ce qui concerne la synthèse de ce type des bases de Schiff et leurs activités, nous allons tenter de citer les travaux les plus récents.

Plus récemment, en 2015 Alcives Avila-Sorrosa et coll [88], ont rapporté la synthèse, la caractérisation et l'activité biologique des nouveaux bases de Schiff fluorées **1-6** du type [C₆H₄-1-(OH)-3-(CH=NArF)]. Les auteurs ont synthétisé ces composés par une réaction de condensation de 3-hydroxybenzaldehyde et différentes anilines fluorées avec l'utilisation des tamis moléculaires activés de 4 Å dans le CH₂Cl₂ (Schéma I.8).

Le mélange réactionnel a été maintenu à température ambiante sous atmosphère de dinitrogène pendant 48 h. La série de bases de Schiff fluorées a été obtenue sous forme de solides microcristallins avec de bons rendements.

La caractérisation structurale a été effectuée par des techniques spectroscopiques communes telles que IR, RMN ¹H, RMN ¹³C, spectrométrie de masse, analyse élémentaire et l'analyse de diffraction des rayons X.

L'exploration de l'activité antibactérienne contre des bactéries gram-positives et des bactéries gram-négatives a montré que ces composés incluant les substituants F ou CF₃ aux positions méta, c'est-à-dire [C₆H₄-1-(OH)-3-(CH=NC₆H₃-3,5-F₂)] (**3**), [C₆H₄-1-(OH)-3-(CH=NC₆H₄-3-CF₃)] (**5**), [C₆H₄-1-(OH)-3-(CH=NC₆H₃-3,5-(CF₃)₂)] (**6**), pour être les meilleurs lorsque leur activité est comparée contre l'ampicilline.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

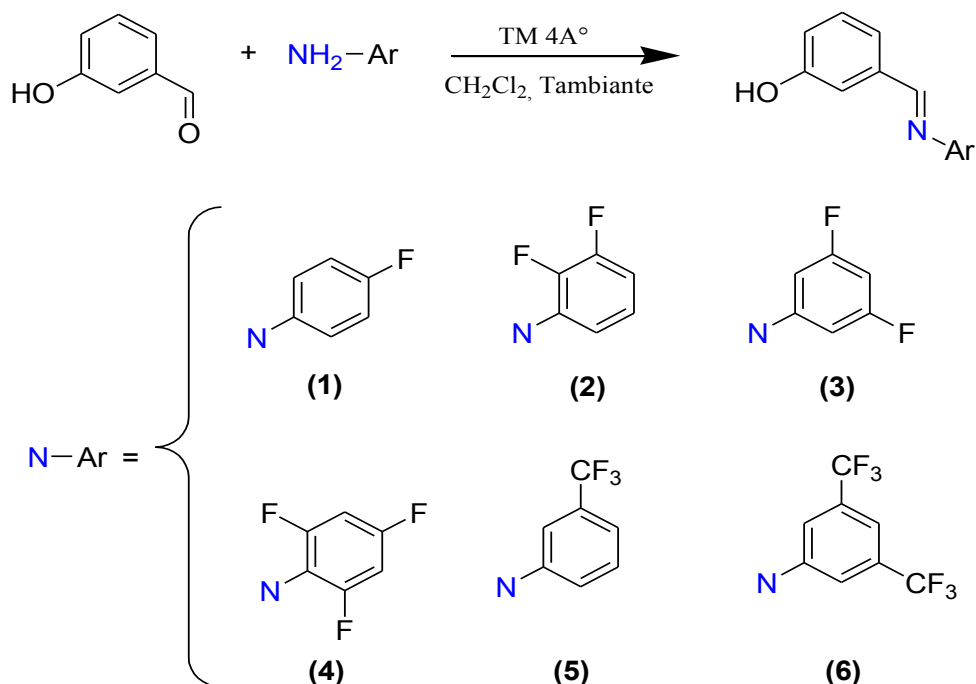


Schéma I.8 : synthèse des bases de Schiff fluorées

Ainsi, en 2015 Pang, W et al [89], ont rapporté la synthèse, la caractérisation et l'étude comparative d'une série de bases de Schiff fluorées 1a–b, 2a–b et 3a–b. Les réactions ont été effectuées sous des conditions différentes. Le tableau suivant regroupe les solvants, les températures et les rendements de ces produits.

Tableau I.2 : les différentes conditions et les rendements de la réaction de bases de Schiff fluorées

Composés	Solvant	Température	Temps De Réaction (h)	Rendement (%)
1a	Dichloromethane (solvant d'extraction)	120 C°	16	67
1b	Ethanol	A reflux	2	63
2a	Ethanol	A reflux	2	45
2b	Dichloromethane	Ambiante	24	50
3a	Dichloromethane	Ambiante	24	79
3b	Toluene	A reflux	20	66

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La caractérisation structurale de ces composés a été effectuée par des techniques spectroscopiques communes telles que IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , spectrométrie de masse, analyse élémentaire et l'analyse de diffraction des rayons X.

Les structures de ces bases de Schiff sont représentées ci-dessous (Figure I.10):

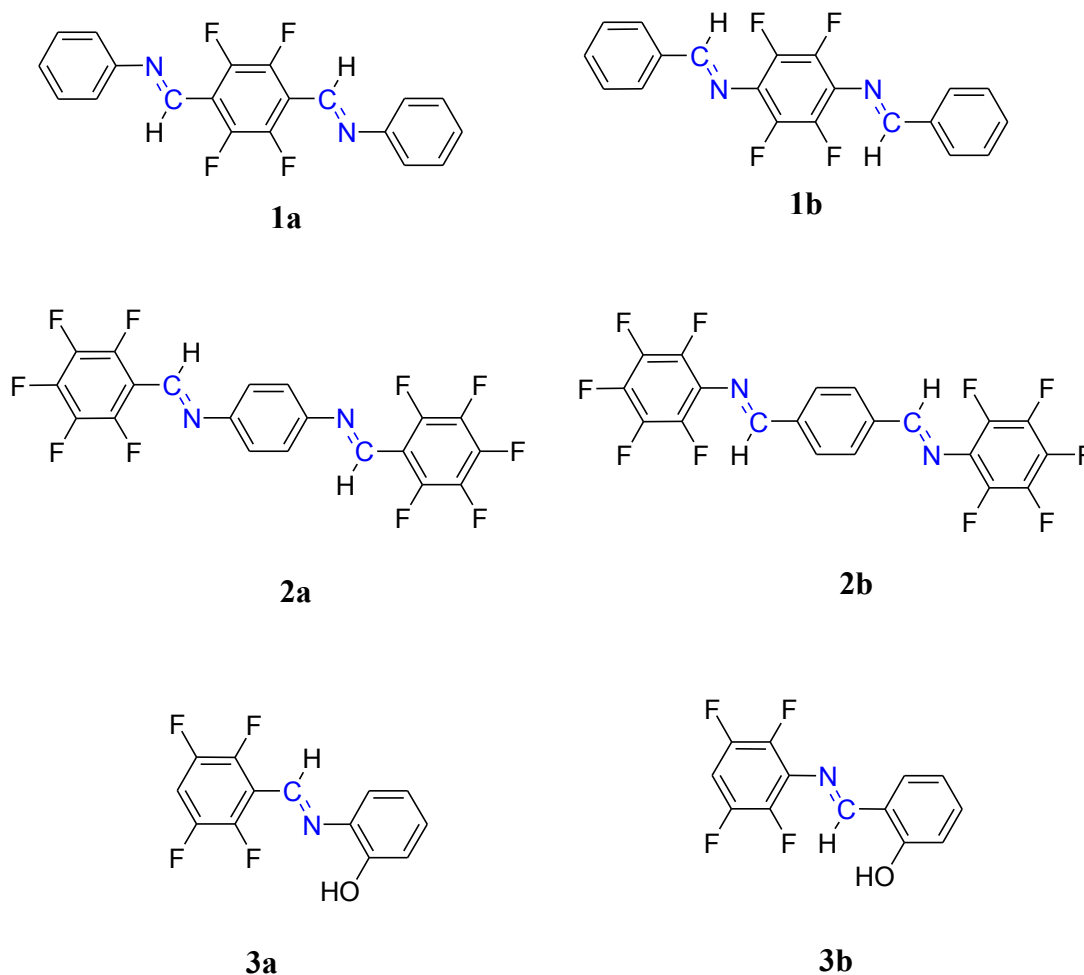



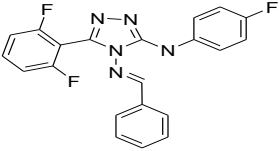
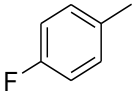
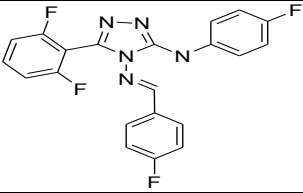
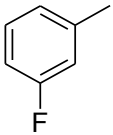
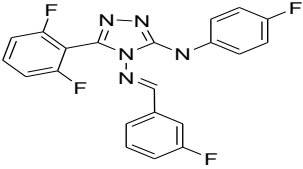
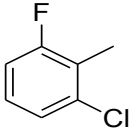
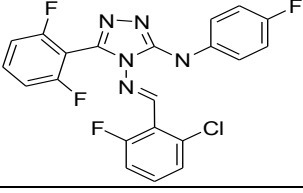

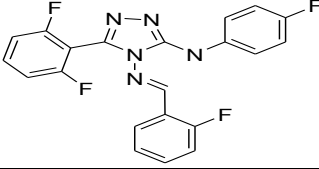
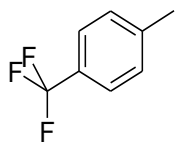
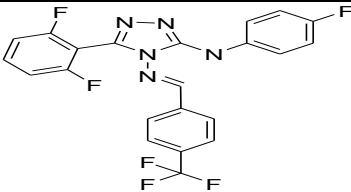
Figure I.10 : structures des bases de Schiff fluorées.

C'est aussi en 2013 Kumar, B.N.P et al [90], ont utilisé le 2,6-difluorobenzohydrazide **1** et le 4-fluorophénylisothiocyanate comme réactifs de départ pour synthétiser le 5-(2,6 difluorophenyl)-*N*-(4-fluorophényl)-4H-1,2,4-triazole -3,4-diamine **3**. En outre, le composé **3** réagit avec des fluoro-benzaldéhydes substitués pour donner une série de bases de Schiff **4 (a-j)**. Tous ces composés ont été caractérisés en utilisant IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , MS et analyses élémentaires.

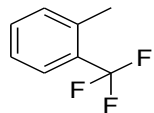
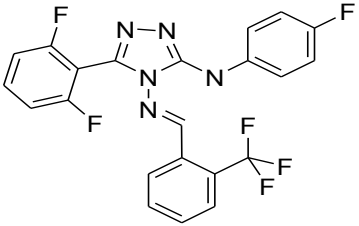
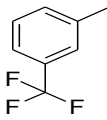
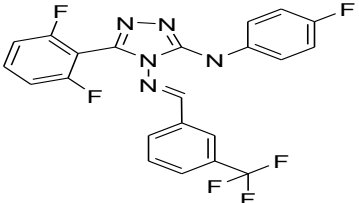
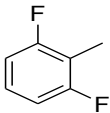
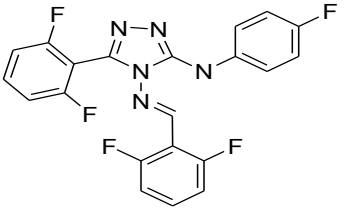
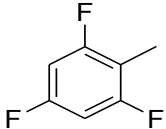
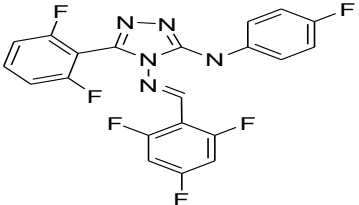
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les nouveaux composés ont été évalués pour leur effet antiprolifératif en utilisant la méthode d'essai MTT contre quatre lignées de cellules cancéreuses humaines (K562, COLO-205, MDA-MB231 et IMR-32) pendant la période de 24 heures. Parmi les séries, les composés **4f**, **4g** et **4h** présentaient une bonne activité sur toutes les lignées cellulaires sauf K562, tandis que les autres composés de la série présentaient une activité modérée. Le tableau suivant représente la structure chimique et les propriétés physiques des nouvelles bases de Schiff **4 (a-j)**.

Tableau 1.3 : la structure chimique et les propriétés physiques des nouvelles bases de Schiff **4 (a-j)**

Composé	R	Structure	Rendement %	Point de fusion C°
4a			81	154-156
4b			84	163-165
4c			86	162-164
4d			81	168-170
4e			85	161-163
4f			87	184-186

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

4g			84	185-187
4h			86	184-186
4i			78	166-168
4j			79	172-174

I-3 Conclusion 1 :

Au cours de cette étude bibliographique nous avons montré la diversité des méthodes de synthèse des bases de Schiff qu'ont été largement explorées pour des applications industrielles.

Toutefois, l'activité biologique des composés bases de Schiff mérite une étude plus approfondie. Bien que la recherche sur ce sujet soit à son début, un certain nombre de rapports de divulguer les effets des bases de Schiff sur les agents pathogènes d'intérêt clinique ont été récemment augmenté. Les composés, base de Schiff ont été révélés comme des pistes prometteuses pour la conception d'agents antimicrobiens plus efficace. Les progrès dans ce domaine, demande une analyse des relations structure-activité des bases de Schiff, ainsi que le mécanisme d'action de ces composés.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II- Matériels et méthodes

Le présent travail consiste, au préalable, en la synthèse de deux types de bases de Schiff, fluorées et pénicilliniques. Ensuite ces composés seront appliqués dans le domaine biologique par l'étude de leurs activités notamment l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydant.

Dans cette partie expérimentale nous avons présenté les deux axes de recherche ;

Le premier axe, est consacré à réaliser les étapes suivantes :

- la synthèse des bases de Schiff pénicilliniques.
- la synthèse des bases de Schiff fluorés.
- Caractérisation et identification de la structure par les méthodes spectroscopiques notamment spectrométrie UV/ visible, spectrométrie IR, spectrométrie résonance magnétique nucléaire et la méthode chromatographique en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/MS).

Dans le deuxième axe :

- L'étude du pouvoir antibactérien des bases de Schiff vis-à-vis des souches bactériennes (Gram (+) / Gram (-)) après solubilisation des composés dans le DMSO.
- L'étude du pouvoir antifongique des bases de Schiff vis-à-vis une souche fongique par la méthode de diffusion de disque.
- L'étude du pouvoir antioxydant des bases de Schiff par la méthode de DPPH.

Les réactions de synthèse de nos composés ont été réalisées au laboratoire de Génie des Procédés de la faculté des sciences appliquées de l'université Kasdi Merbah Ouargla.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

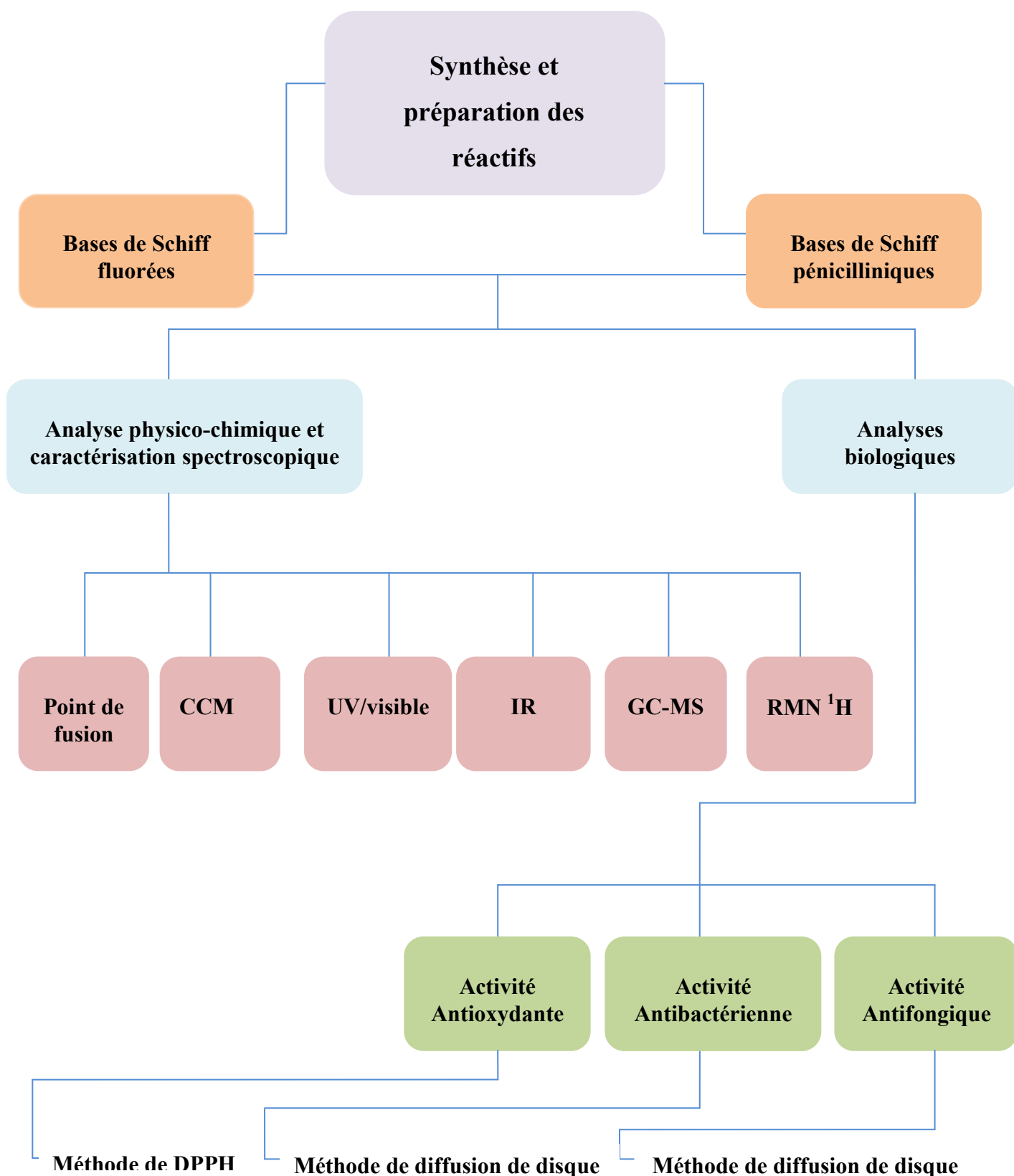


Figure II.1: Diagramme général de la procédure expérimentale.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II-1 Partie synthèse :

Comme nous l'avons signalé dans le Chapitre I, les réactions de condensation entre un aldéhyde et une amine ont permis de synthétiser les bases de Schiff. Les travaux publiés par les différents chercheurs ont montré, en particulier, l'intérêt d'utiliser un catalyseur tel qu'un acide organique (acide formique) ou minéral (HCl, H₂SO₄, etc...) ou une base (NaOH) lors de la réaction de condensation entre une amine et un aldéhyde [27].

La caractérisation des bases de Schiff est habituellement réalisée par une combinaison de méthodes spectroscopiques, de mesures de susceptibilité magnétique et de détermination du poids moléculaire. Les techniques spectroscopiques constituent le principal moyen d'élucider la structure moléculaire.

II-1-1 Matières et méthodes d'analyse

Nous rappelons que tous les produits et solvants présentés dans le tableau II.1 sont utilisés sans aucune purification préalable dans la préparation de nos composés.

Tableau II.1 : les réactifs et les solvants utilisés dans la présente étude

Réactif /solvant	Formule	Pureté	Marque /fournisseur
Pentafluoropyridine	C ₅ F ₅ N	99%	ALDRICH
Ammoniac aqueuse	NH ₃ aq		ALDRICH
6APA	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	99%	CHINA MEHICO ANTIBIOTICAL- SAIDAL- MEDEA
Benzaldéhyde	C ₇ H ₆ O	98%	ALDRICH
Salicylaldéhyde	C ₇ H ₆ O ₂	99%	ALDRICH
Potassium hydroxide	KOH	99%	ALDRICH
sulfate de magnésium	MgSO ₄	98%	FLUKA
acide sulfurique	H ₂ SO ₄	95%	FLUKA C
Ethanol absolue	C ₂ H ₆ O	99,8%	ALDRICH
Méthanol	CH ₄ O	99%	ALDRICH
DMSO	C ₂ H ₆ OS	99%	ALDRICH
THF	C ₄ H ₈ O	99%	ALDRICH

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Diethyle ether	C ₄ H ₁₀ O	98%	Prolabo
Ether de pétrole	/	94%	Biochem Chemopharma
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	99,5%	ALDRICH
Chloroforme	CHCl ₃	99%	Biochem Chemopharma

D'un autre côté, un bref rappel des différentes techniques utilisées pour renforcer la caractérisation et l'identification de nos composés est donné ci-dessous.

II-1-1-1 Le Point de fusion

Ce terme désigne le changement d'état d'un matériau quand celui-ci passe d'un état solide à un état liquide. Le point de fusion est la température exacte nécessaire à cette transformation et sa détermination est très importante puisqu'elle est hautement dépendante de la pureté du matériel testé. Cette technique est donc utilisée pour définir la qualité d'une substance [91, 92].

Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil de **Gallenkamp melting points apparatus** muni d'un support des tubes capillaires qui portent le produit. Dans ce travail les points de fusion ont été rapportés sans correction.

II-1-1-2 La Chromatographie Sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse et de séparation des constituants d'échantillon.

La séparation est réalisée sur une fine couche (100–200 µm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté.

On distingue trois étapes pour effectuée une séparation par une chromatographie sur couche mince [93]:

- **Dépôt de l'échantillon** : On commence par déposer un petit volume (compris entre quelques nanolitres et plusieurs microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un tube capillaire. La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

- **Développement de la plaque :** La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres. Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

- **Révélation post-chromatographique :** La localisation des composés après migration se fait sur la plaque débarrassée de l'éluant.

Les composés qui donnent des taches invisibles doivent être « révélés ». À cette fin la phase stationnaire contient un indicateur consistant en un sel de zinc qui émet une fluorescence verte lorsqu'on éclaire la plaque au moyen d'une lampe *UV* à ($\lambda = 254$ nm). Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde apparaît sous forme d'une tache sombre (ou quelquefois colorée) sur un fond illuminé en vert.

Chaque composé est défini par son R_f , qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R_f = \text{distance parcourue par le soluté} / \text{distance parcourue par le front de solvant.}$$

La pureté des produits a été vérifiée sur des plaques CCM de la marque MERCK constitués d'un gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence F254 sur un support aluminium.

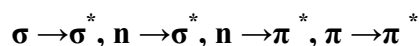
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II-1-1-3 L'Ultraviolet - Visible (UV/Vis)

L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1 100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'« UV/Visible », parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain. La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-VIS) est une technique d'un âge respectable encore très utilisée dans les laboratoires et dans l'industrie ces domaines spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées proche UV (185-400 nm), visible (400-700 nm) et très proche infrarouge (700-1 100 nm). La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm[93, 94].

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs de ses électrons superficiels. Il y a alors modification de son énergie électronique, l'une des trois composantes avec l'énergie de rotation et l'énergie de vibration de l'énergie mécanique totale de la molécule

Les composés de la chimie organique forment l'essentiel des études faites en UV/visible. Les transitions observées ont pour origine les électrons des liaisons σ ou π et les doublets non-liants n des atomes tels H, C, N, O. Chaque fois qu'il en est possible, on indique pour toute bande d'absorption sa nature en relation avec les orbitales moléculaires concernées et le coefficient d'absorption molaire ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). On distingue les transitions suivantes



L'UV/Visible est largement exploité en analyse quantitative, depuis fort longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution. La loi de Beer et Lambert présentée ici sous sa forme actuelle :

$$A = \epsilon l c$$

A désigne l'absorbance, paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre, **l** est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée, **c** la concentration molaire et ϵ le coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) à la longueur d'onde λ à laquelle on fait la mesure. Ce coefficient, (également appelé

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

coefficient d'absorbance) propre au composé analysé, dépend en outre de la température et du solvant. Généralement sa valeur est repérée pour la seule longueur d'onde du maximum d'absorption[93].

Dans ce travail l'étude par absorption UV/Vis des bases de Schiff a été conduite sur un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1800 pour la base de Schiff pénicillinique et OPTIZEN (MECASYS) pour la fluoré. La cellule d'étude, en quartz, est de 1 cm d'épaisseur, le solvant adéquat pour mener cette étude est le méthanol ou le DMSO, selon le type de composé. Les spectres électroniques ont été tracés dans l'intervalle de 200 à 800 nm.

II-1-1-4 Spectrométrie infrarouge

Les techniques de spectrophotométrie infrarouge sont utilisées pour la détermination des groupements fonctionnels permettant de proposer la structure. Chaque liaison présente des vibrations caractéristiques de fréquence bien déterminée. Dans les conditions normales de température et de pression, les atomes et les groupements fonctionnels constituant le composé sont exposés à un rayonnement électromagnétique[28].

Sous l'effet d'un rayonnement électronique infrarouge, les liaisons moléculaires absorbent une partie de cette énergie et vibrent selon les mouvements de différents types (vibrations d'élongation ou de déformation). Le domaine infrarouge, dans lequel se trouvent les énergies de vibration des liaisons moléculaires, est divisé en trois zones[95]:

- proche infrarouge : $\lambda = 0.8 \text{ à } 2.5 \text{ mm}$ (ou $\nu = 4000 \text{ à } 12500 \text{ cm}^{-1}$).
- moyen infrarouge : $\lambda = 2.5 \text{ à } 25 \text{ mm}$ (ou $\nu = 400 \text{ à } 4000 \text{ cm}^{-1}$).
- lointain infrarouge : $\lambda = 25 \text{ à } 1000 \text{ mm}$ (ou $\nu = 10 \text{ à } 400 \text{ cm}^{-1}$).

Les analyses en infra rouge ont été menées sur un spectrophotomètre FTIR SHIMADZU IR Affinity-1-, spectrophotomètre FTIR Cary 600 series de Agilent Technologies ou spectrophotomètre FTIR SHIMADZU série 2000 à double faisceau, muni d'un système d'acquisition à transformée de Fourier; le KBr est le support utilisé pour la préparation des pastilles, les spectres sont tracés entre 450 et 4000 cm^{-1} .

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II-1-1-5 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN), dont les premiers travaux, vers 1945, sont dus aux physiciens Bloch et Purcell, est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La RMN permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide. Elle sert aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale, mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve de toute sa puissance[93, 96].

La meilleure méthode pour obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires, elle revêt donc une importance pratique toute particulière en chimie organique et en biochimie. Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, elle permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié. Elle est devenue, pour ces raisons, une des techniques majeures d'étude aussi bien des structures moléculaires que des cristaux[97].

La RMN tire des informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon quand on le soumet à un champ magnétique intense et constant, produit par un aimant. Le document de base, fourni par ces appareils, est le spectre de RMN. Il s'agit d'un diagramme représentant des signaux de résonance. Pour produire ces signaux, on utilise conjointement un second champ environ 10 000 fois plus faible que le précédent, en faisant appel à une source de radiations électromagnétiques du domaine des radiofréquences[96].

Le spectre de RMN résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines des fréquences envoyées par cette source électromagnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur [93].

Les spectres RMN ^1H des composés synthétisés ont été enregistrés par des différents spectromètres, le premier a été effectué à l'INRAP (institut national de la recherche et d'analyse physico-chimique) de Tunisie à l'aide d'un BRUKER Ultrashield Plus 500 spectromètre avec une fréquence de 500 MHz. En utilisant du DMSO- d_6 comme solvant et un étalon interne à température ambiante et le nombre de balayage est (16-1K).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Les autres spectres ont été effectués au service analytique et spectroscopique du Département de chimie, Université de Manchester. Le spectre RMN ^1H été enregistré à 35 ° C à l'aide d'un Perkin Elmer R10 spectromètre à 60 MHz et 54,6 MHz pour le spectre RMN ^{19}F . En utilisant du tétraméthylsilane (TMS) comme un référence pour les spectres RMN ^1H , et pour les spectres RMN ^{19}F , les changements chimiques ont été mesurés par rapport à l'acide trifluoroacétique (TFA) comme un référence d'échange extern. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à la référence appropriée.

II-1-1-6 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon.

Elle est présente dans des secteurs très divers : chimie organique et inorganique, biochimie, chimie clinique et environnementale, géochimie. Elle sert à toutes sortes d'analyses dans le but de déterminer la nature, la composition et même la structure éventuellement d'échantillons divers pour le respect des réglementations et dans l'industrie en général[98].

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'échantillon étudié. Pour arriver à ce résultat, on commence par transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons...). Ces ions sont alors soumis, sous un très bon vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport masse /charge, donc éventuellement leur nature.

Les résultats sont présentés au moyen d'un graphe appelé spectre de masse sur lequel figurent les abondances des ions formés classés par ordre croissant de leur rapport masse/charge. En opérant dans des conditions identiques, la fragmentation est reproductible et de ce fait, caractéristique du composé étudié. Ce dernier est détruit par l'analyse [93].

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

L'analyse de nos composés a été effectuée à l'INRAP (institut national de la recherche et d'analyse physico-chimique) de Tunisie, Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Agilent 6890, suivi d'un spectromètre de masse type Agilent 5975B à quadripôle de tension d'ionisation de 70 eV. Les colonnes utilisées sont :

- HP-5MS; 5% Phenyl Methyl Siloxane d'une longueur de 30 m et d'un diamètre interne égale à 0,25mm. L'épaisseur du film étant de 0,25 μm
- TR-FAME ; d'une longueur de 60 m et d'un diamètre interne égale à 0,25mm. L'épaisseur du film étant de 0,25 μm .

Les conditions opératoires sont :

- La température de l'injecteur (mode split) : 250°C
- La programmation de température : de 40 °C à 300 °C à raison de 2°C/min ;
- Le gaz vecteur utilisé est l'Hélium avec un débit de 0.8 ml/min.

II-1-2 La Synthèse

II-1-2-1 Synthèse de la base de Schiff pénicillinique

En ce qui concerne la synthèse des différents ligands bases de Schiff, on a choisi comme mode opératoire celui décrit par L Bonsignore et Al[83].

La structure de la base de Schiff pénicillinique BP₁ est représenté ci-après (Figure II-1)

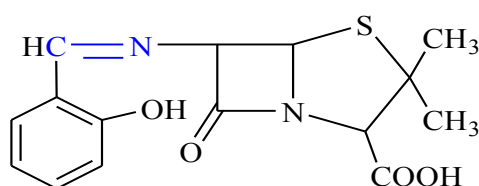


Figure II-2: Structure de 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique acid (BP₁)

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

➤ **6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (BP₁):**

Dans un ballon de 150 ml surmonté d'un réfrigérant. Une solution de salicylaldehyde (2.442 g, 20 mmol) dans 20 ml du méthanol (MeOH 99%) et 3 gouttes de l'acide H₂SO₄ concentré a été ajoutée lentement à une suspension de 6-APA (5,19 g, 24 mmol) dans 30 ml du méthanol (MeOH 99%). Le mélange, sous agitation, est porté au reflux pendant 72 heures.

La réaction a été suivie par CCM (éther de pétrole / acétate d'éthyle: 50/50) après la disparition de l'aldéhyde. Et à la fin de la réaction, le 6-APA n'ayant pas réagi a été séparé par filtration, le solvant a été évaporé sous pression réduite (évaporateur rotatifs) et le résidu brut été obtenu à l'état de pâte.

Cette pâte est lavée à l'eau puis un précipité orange est obtenu. Ceci a conduit à **BP₁**.

II-1-2-2 Synthèse de la base de Schiff fluorée

Deux méthodes de synthèse ont été effectuées, dans le but de préparer ce type de base de Schiff.

La première, en utilisant comme milieu réactionnel le solvant éthanol; cet essai n'a pas donné le composé désiré, mais on a obtenu un autre nouveau composé ce qui est le 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine.

La deuxième, fondé sur l'utilisation de tétrahydrofurane comme le solvant de la réaction, fut efficace pour conduire à base de Schiff désirée ce qui est le (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine.

La première étape, l'amine 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine, a été préparée par une méthode celui décrit par Sekhri.L [99] et a été utilisée comme un réactif de départ pour la préparation de la base de Schiff fluorée dans la deuxième étape.

➤ Synthèse de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine (4ATFP)

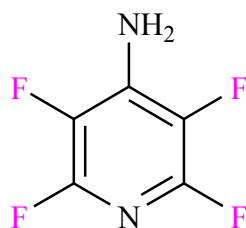


Figure II-3: Structure de 4-amino-2,3,5,6-tétrafluoropyridine (4ATFP)

On a synthétisé la 4-amino-2,3,5,6-tétrafluoropyridine à partir de 2,3,4,5,6-pentafluoropyridine (25 g, 148 mmoles) dissoute dans du THF (175 ml) dans un ballon à fond rond surmonté d'un réfrigérant à reflux pour donner une solution limpide. Lors de l'addition d'ammoniac aqueux (0,88, 125 ml), une solution trouble a été produite et une réaction exothermique s'est produite. Le mélange a ensuite été porté au reflux pendant 18 heures. La solution limpide produite a été versée dans de l'eau (500 ml) et le mélange entier a été extrait avec de l'éther (3 x 75 ml). L'extrait a été séché par l'utilisation de (MgSO₄), puis évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif et le résidu a été libéré des dernières traces de solvant sous vide, pour donner un solide crème pâle. La recristallisation du matériau brut dans l'éther de pétrole a donné de longues aiguilles blanches de 4ATFP.

➤ Synthèse de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine (4AETFP)

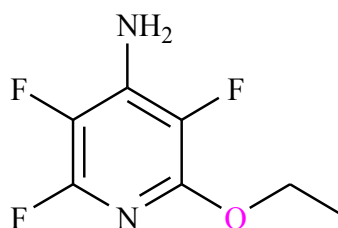


Figure II-4: Structure de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans un ballon de 50 ml surmonté d'un réfrigérant contenant 0.28 g (5 mmole) de l'hydroxyde de potassium dans 15 ml d'éthanol (EtOH), sont ajoutés à 0.83 g (5 mmole) de 4-amino-2,3,5,6-tétrafluoropyridine, dissoutes dans 5 ml d'éthanol. Le mélange, sous agitation, est porté au reflux sous atmosphère d'azote pendant une heure. Ensuite, on a ajouté 0,53 g (5 mmoles) de benzaldéhyde et on a agité le mélange à température ambiante pendant 72 heures. Une couleur jaune est observée et la réaction a été suivie par CCM (éther de pétrole/acétone : 95/5%) ; le brut réactionnel est ensuite vaporisé à l'aide d'un évaporateur rotatif, le résidu a été libéré des dernières traces de solvant sous vide, pour donner un solide blanc pâle qui a ensuite été lavé à l'eau et recristallisé dans l'éthanol pour donner une poudre microcristalline blanche correspondante à la 2-éthoxy-3,5, 6-trifluoropyridin-4-amine (4AETFP).

➤ Synthèse de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine

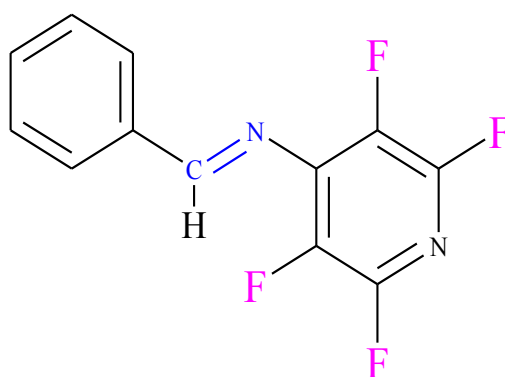


Figure II-5: Structure de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine.

Dans un ballon de 50 ml surmonté d'un réfrigérant contenant 0.28 g (5 mmole) de l'hydroxyde de potassium (KOH) dans 15 ml de THF, sont ajoutés à 0.83 g (5 mmole) de 4-amino-2,3,5,6-tétrafluoropyridine, dissoutes dans 5 ml de THF. Le mélange, sous agitation, est porté au reflux sous atmosphère d'azote pendant une heure jusqu'à la solubilité totale de KOH. Ensuite, on a ajouté 0,53 g (5 mmoles) de benzaldéhyde et on a agité le mélange à température ambiante pendant 2 heures. Un précipité est observé à la fin de la réaction. Le brut réactionnel est ensuite filtré, lavé par le THF pour donner une poudre crème correspondante à la (E)-N benzylidene-

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2,3,5,6- tétrafluoropyridin-4-amine. La pureté de composé a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant le dichlorométhane/méthanol (CH₂Cl₂/MeOH : 9.5/0.5, v/v) comme éluant.

II-2 Partie activité biologique

Les molécules synthétisées au cours de ce travail de thèse ont été exploitées pour leurs activités biologiques, notamment leurs activités antibactérienne, antifongique et antioxydante au niveau de laboratoire de Biotechnologie INRAP (institut national de la recherche et d'analyse physico-chimique) de Tunisie.

II-2-1 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'effet antibactérien des bases de Schiff est testée par la méthode de la diffusion sur gélose selon les recommandations NCCLS [100]. La méthode des disques est une méthode de diffusion des produits à tester à partir d'un disque de papier (whatman N°3) qui permet de mesurer qualitativement la sensibilité des souches aux effets antimicrobiens. La méthode des disques est choisie dans cette étude pour sa fiabilité et sa simplicité. Cette méthode nous fournit des résultats préliminaires sur la sensibilité des souches et les activités antibactériennes du produit, grâce aux diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques mesurés en millimètres.

II-2-1-1 Souches bactériennes utilisées

Le matériel microbiologique est constitué de cinq souches bactériennes pathogènes, responsables de certaines maladies infectieuses graves. Ces bactéries sont

- *Escherichia coli* ATCC 8739 G (-),
- *Salmonella typhimurium* ATCC14028 G (-),
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 G (+),
- *Enterococcus faecium* ATCC 19434 G (+),
- *Streptocoque B* G (+).

Elles proviennent du laboratoire de Biotechnologie INRAP (institut national de la recherche et d'analyse physico-chimique) de Tunisie.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II-2-1-2 Méthode de diffusion sur gélose

Les souches bactériennes à tester sont reprises dans un milieu nutritif agar non inhibiteur (Mueller–Hinton) afin d’obtenir des colonies isolées. Après incubation à 37°C pendant une nuit, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées dans une solution saline dans un tube à essai. La suspension bactérienne est ajustée en comparaison à un standard Mc Farland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/ml). Après l’ajustement, un écouvillonnage est réalisé et la surface bactérienne est laissée sécher pendant au moins 30 min. Des disques de papier Whatman de 6mm de diamètre sont placés sur le tapis bactérien à l’aide d’une pince stérile en appliquant une légère pression sur l’agar, puis des prises de 15 μ l des de différentes concentrations des bases de Schiff sont déposées sur les disques. Le contrôle positif utilisé est un agent antibactérien standard qui est l’ampicilline (10 μ g / disque) et du solvant (DMSO) comme témoin négatif pour toutes les souches. L’incubation se fait à 37°C pendant 24h. Le résultat est exprimé en diamètre d’inhibition, les zones d’inhibition claires autour des disques indiquent la présence d’une activité antimicrobienne. Le test a été exécuté en double.

II-2-2 Activité antifongique

L’évaluation de l’effet antifongique des bases de Schiff est testée par la même méthode de l’activité antibactérienne avec quelques modifications.

II-2-2-1 souche fongique utilisée

La souche fongique provienne du laboratoire de Biotechnologie INRAP (institut national de la recherche et d’analyse physico-chimique) de Tunisie. Cette souche est *Candida albicans* ATCC 10231.

II-2-2-2 L’activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose

La souche fongique à tester est reprise dans un milieu nutritif agar non inhibiteur Sabouraud Dextrose Agar (SDA) afin d’obtenir des colonies isolées. Après incubation à 37°C pendant une nuit, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées dans une solution saline dans un tube à essai. La suspension fongique est ajustée en comparaison à un standard Mc Farland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/ml).

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Après l'ajustement, un écouvillonnage est réalisé et la surface fongique est laissée sécher pendant au moins 30 min. Des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre sont placés sur le tapis fongique à l'aide d'une pince stérile en appliquant une légère pression sur l'agar, puis des prises de 15 μ l des de différentes concentrations des bases de Schiff sont déposées sur les disques. Le contrôle positif utilisé est un agent antifongique standard qui est la Nystatine (100 μ g / disque) et du solvant (DMSO) comme témoin négatif pour la souche fongique. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. Le résultat est exprimé en diamètre d'inhibition, les zones d'inhibition claires autour des disques indiquent la présence d'une activité antimicrobienne. Le test a été exécuté en double.

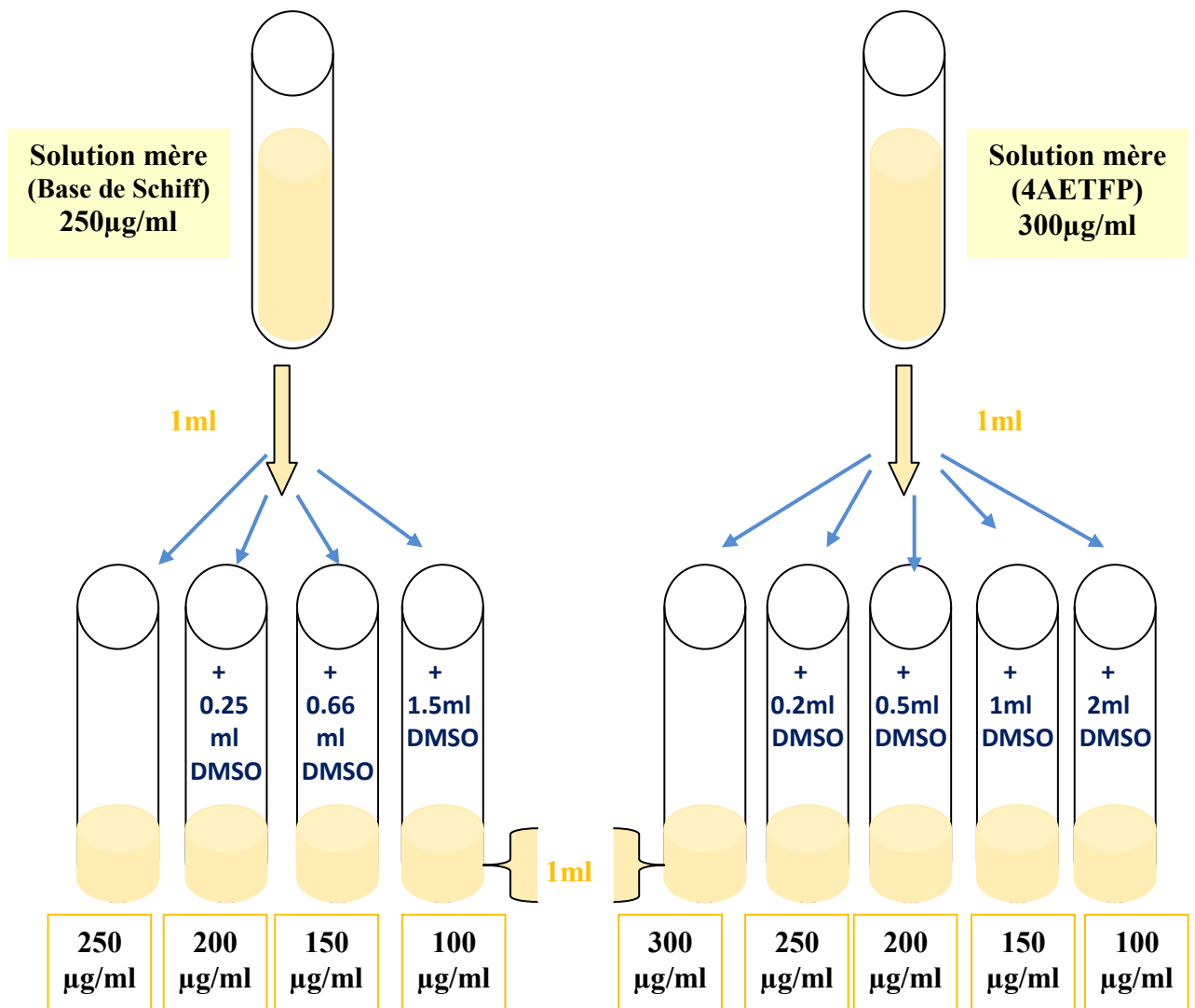


Figure II.6 : Réalisation de la gamme de dilution de BP₁, BF₁, 4AETFP

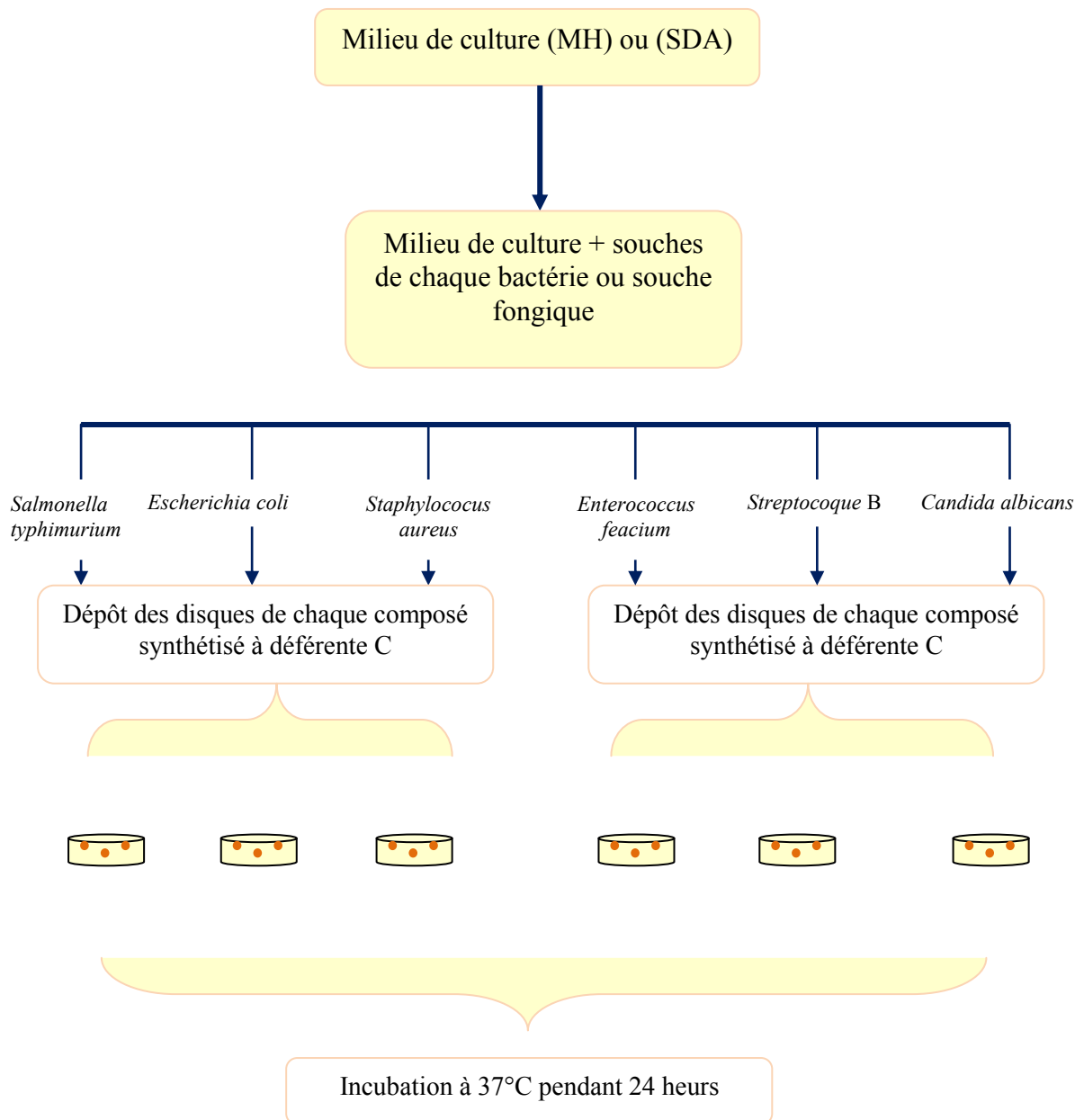


Figure II.7: Protocole expérimentale de l'essai de l'activité antibactérienne et antifongique de chaque composé synthétisé (BP₁, BF₁, 4AETFP).

II-2-3 L'activité antioxydante

II-2-3-1 Matières utilisées

- DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)
- Trolox

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II-2-3-2 Méthode de DPPH

L'activité antiradicalaire de DPPH' a été déterminée en se basant sur les essais décrits en 1995 par Brand-Williams et *al.* [101] avec quelques modifications. Ainsi, dans un volume de 1 ml, on prépare différentes concentrations de l'extrait à tester dans le méthanol, on ajoute, ensuite 2 ml de la solution de DPPH' de concentration 0,1 mM. Après agitation vigoureuse, le mélange est incubé pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 515 nm par un spectrophotomètre UV vis (JASCO-V530). Une solution contenant 1 ml de méthanol et 2 ml de DPPH' considérée comme blanc analytique est préparée en parallèle.

L'estimation de l'activité antiradicalaire est exprimée par la valeur du pourcentage d'inhibition (%I) calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\%I = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100$$

Avec **Abs₀** : absorbance du blanc analytique.

Abs₁ : absorbance de la solution en présence d'extrait.

La courbe donnant la variation du (%I) en fonction des différentes concentrations de l'extrait, permet de déterminer l'activité antiradicalaire ou EC₅₀ (Efficient Concentration 50%), défini comme étant la quantité d'extrait nécessaire pour diminuer de moitié la concentration initiale de DPPH

La capacité antioxydante est exprimée en équivalent Trolox (TEAC) ; elle correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en µM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit.

Chapitre III

Résultats et Discussion

III- Résultats et discussion

III-1 Partie synthèse

D'une manière générale, les réactions d'addition nucléophile sur des composés carbonylés permettant de créer des doubles liaisons Carbone-Azote sont généralement réalisées avec des catalyseurs acides et quelques fois basiques[27].

III-1-1 Synthèse de la base de Schiff pénicillinique BP₁

Plusieurs essais ont été réalisés, en jouant sur les conditions opératoires apportées au milieu réactionnel, confirment l'obtention du produit de condensation; mais la chromatographie sur couche mince (ccm) montre également la présence d'un produit secondaire minoritaire (trace) que nous ne sommes pas parvenus à identifier.

La stratégie que nous avons adoptée pour la synthèse de la base de Schiff pénicillinique, 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid était de condenser l'acide 6-aminopénicillanique avec du salicylaldéhyde en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique sous reflux dans le méthanol.

La réaction est le résultat de l'attaque nucléophile de l'azote de l'amine sur le carbonyle de l'aldéhyde. Ceci entraîne la formation de la double liaison carbone-azote (-C=N-), et la formation de l'imine après élimination d'une molécule d'eau, comme indiqué dans (Schéma III.1).

➤ L'addition est d'autant plus facile que le caractère nucléophile des réactifs azotés (l'amine) est élevé. Inversement, les amines, faibles nucléophiles, s'additionnent plus facilement sur les aldéhydes en présence d'un acide dont le rôle est d'activer le groupe carbonyle de cette fonction. L'élimination d'eau est relativement facile dans ce cas. Cela montre l'importance du pH pour ces réactions [102].

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

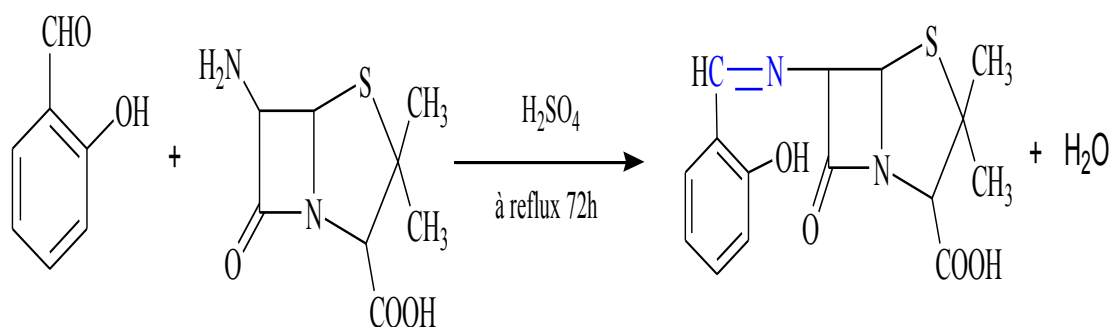


Schéma III.1 : Schéma réactionnel conduisant à l'obtention de la 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique acid

III-1-1-1 Propriétés physiques et analytiques

La base de Schiff pénicillinique 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique acid est obtenu à l'état de poudre et stable à température ambiante.

Les tests de solubilité sur le composé BP₁, les propriétés analytiques et physiques sont regroupés dans les tableaux III.1 et III.2.

Tableau III.1 : Tests de solubilité sur le composé BP₁

Solvant	méthanol	éthanol	Eau	chloroforme	dichlométhane	DMSO	Acétate d'éthyle
Solubilité	S	S	IS	S	S	S	IS

S : Soluble ; IS : insoluble

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.2 : Propriétés analytique et physique du composé BP₁

Composé	Formule moléculaire	Masse mléculaire	Point de fusion ° C	Rendement (%)	État physique
BP ₁	C ₁₅ H ₁₇ N ₂ O ₄ S	321	170 (décomposition)	55,8	Poudre orange

Les résultats de tableau III.1 révèlent que le composé BP₁ est soluble dans la majorité des solvants organiques usuels et insoluble dans l'eau.

III-1-1-2 Caractérisations spectrales et identification des structures

Une fois que le composé purifié, nous avons procédé à son identification par les différentes méthodes spectrales afin de confirmer la structure déjà proposée.

1- Analyse par IR

Le spectre infrarouge de composé BP₁ a été enregistré dans un domaine de 4000-450 cm⁻¹ en utilisant spectrophotomètre FTIR SHIMADZU IR Affinity-1.

Les principales bandes de vibration des différents groupements fonctionnels au sein de structure, sont présentées dans le tableau III.3 ci-après Le spectre FT-IR de BP1 est représenté à la figure III.1.

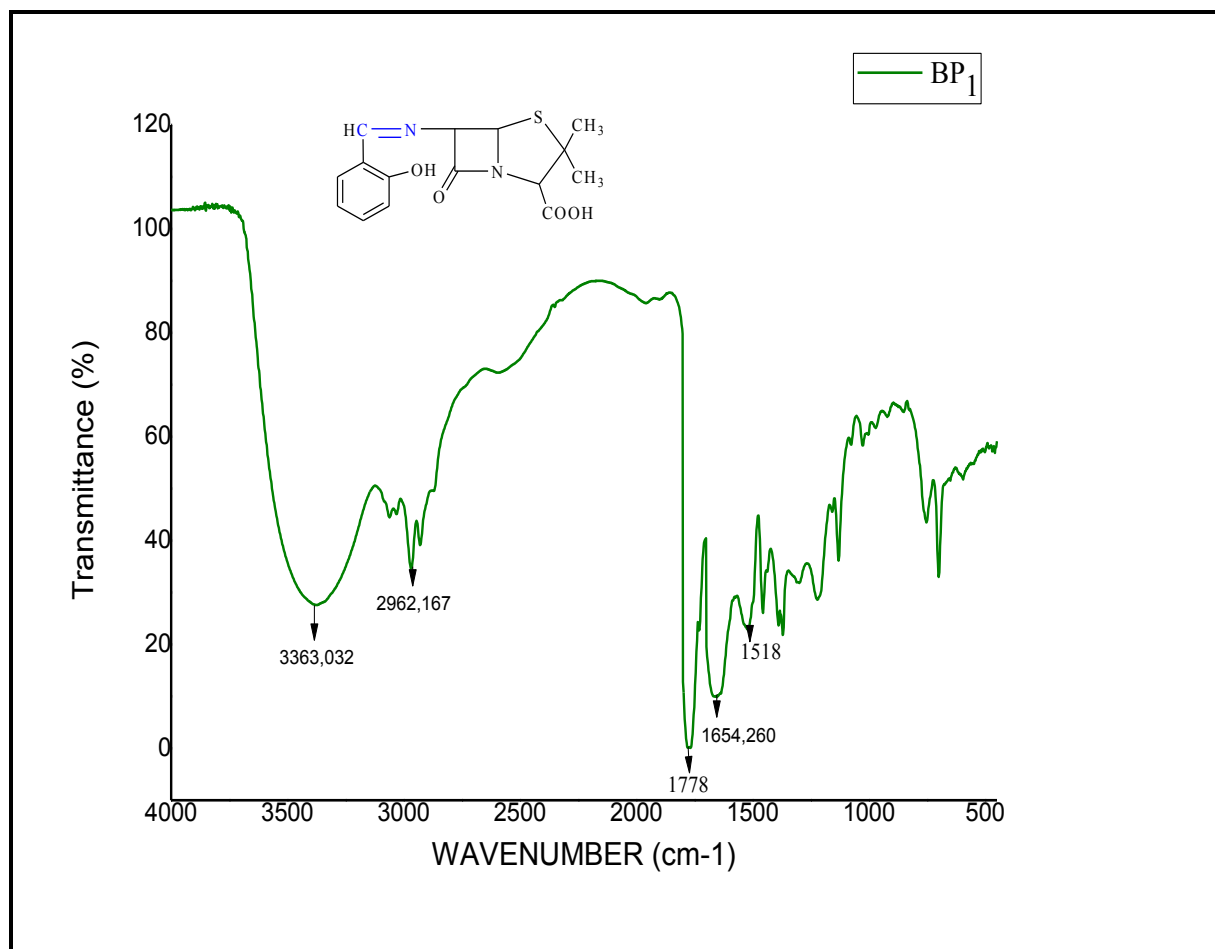


Figure III.1 : Spectre infrarouge du 6-(2-hydroxybenzylideneamino)-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique acid **BP₁**

L'IR confirme la persistance de la bande d'absorption de la fonction azométhine (C=N) au voisinage de 1654 cm⁻¹. Le spectre présenté montre également une large bande aux alentours de 3363 cm⁻¹ correspondante au groupement OH phénolique. Des absorptions entre 2831 cm⁻¹ et 3056 cm⁻¹ attribuées au (C-H) aromatique et une bande à 1518cm⁻¹ qui est assigné la C=C aromatique et une autre bande à 1778cm⁻¹ forte et intensité qui correspond à la liaison C=O de l'acide carboxylique. Comme attendu, aucune bande de vibration N-H attribuable au l'amine primaire utilisé comme réactifs (3518-3442 cm⁻¹) n'est détectée.

Tableau III.3: Bandes de vibrations caractéristiques du BP₁

Groupement fonctionnel	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	
	observé	Rapporté [83, 103]
C=N	1654	1600-1680
OH phénolique	3363	3100-3500
C-H aromatique	2962	3000-3100
C=O acide carboxylique	1778	1740-1800
C=C aromatique	1518	1480-1585

2- Analyse par UV/Vis

Les spectres UV-vis de BP₁ et 6APA sont enregistrés dans le domaine (200-800 nm) en milieu diméthylsulfoxyde (DMSO). Le spectre du BP₁ présente une bande d'absorption situées à 264 nm est attribuable à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ chromophore azométhine (C=N), comme cela est montré dans la figure donnée ci-dessous:

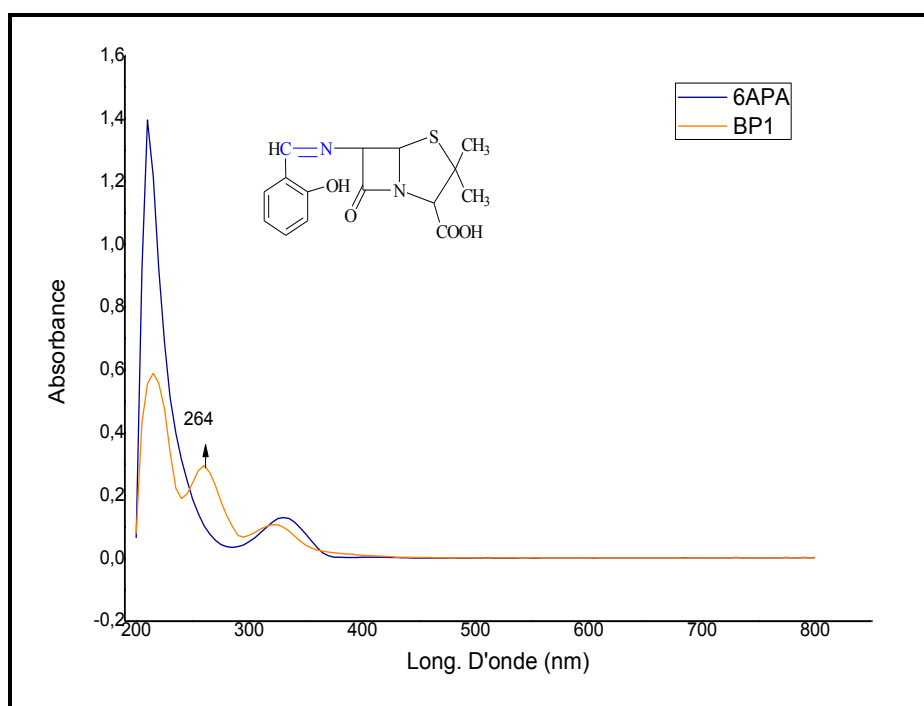


Figure III.2 : Spectre UV-vis du BP₁

III-1-2 Synthèse de la base de Schiff fluorée BF₁

➤ Synthèse de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine (4ATFP)

La première étape est la préparation de l'amine 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine, par une méthode celui décrit par Sekhri.L [99] selon le la réaction indiqué dans le schéma III.2

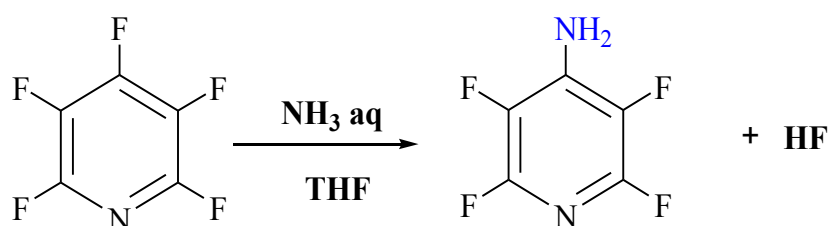
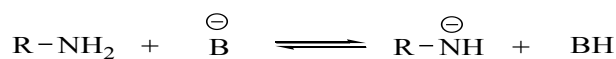


Schéma III.2 : mécanisme réactionnel de la synthèse de 4-aminotetrafluoropyridine

Afin de parvenir à synthétiser une base de Schiff fluorée à partir de l'amine 4ATFP et le benzaldéhyde, plusieurs essais ont été effectués, en jouant sur les conditions opératoires apportées au milieu réactionnel, nous nous sommes appliqués à une synthèse classique implique une réaction d'amine avec le benzaldéhyde à reflux sous atmosphère d'azote puis par l'utilisation de l'acide sulfurique et l'acide acétique glaciale comme des catalyseurs. Ces essais se sont révélés infructueux.

Les difficultés évoquées ci-dessus nous ont conduit à réaliser différemment la réaction de condensation par l'utilisation d'un catalyseur basique (KOH) dont le rôle est d'activer le pouvoir nucléophile d'amine, Selon ce que rapporté par Milcent,R [102] et Mercier, J.-P. et P. Godard [104], que la substitution nucléophile est favorisée lorsque le pouvoir nucléophile du réactif est élevé, d'une manière générale le caractère nucléophile d'un réactif est influencé par plusieurs facteurs parmi lesquels la basicité, ainsi les anions sont de meilleurs nucléophiles que les espèces neutres correspondantes car ils sont davantage capables de céder des électrons ;

L'ion amidure R-NH^- c'est un base forte et un nucléophile puissant par rapport à l'amine R-NH_2



Couple amine : R-NH_2 / amidure : R-NH^-

Alors ; la stratégie que nous avons adoptée pour la synthèse de la base de Schiff fluorée était de condenser l'amine 4ATFP avec du benzaldéhyde en présence de l'hydroxyde de potassium comme catalyseur ; à des quantités équimolaires sous reflux dans l'éthanol.

➤ Synthèse de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine (4AETFP)

Tout comme dans la partie précédente, la réaction a été réalisée en présence du KOH conduisant à la condensation avec un rendement modéré de 33%. Nous avons trouvé un nouveau produit dont le spectre de masse (figure III.7) ne correspond pas à la structure proposé pour le produit souhaité, comme indiqué dans le schéma III.3

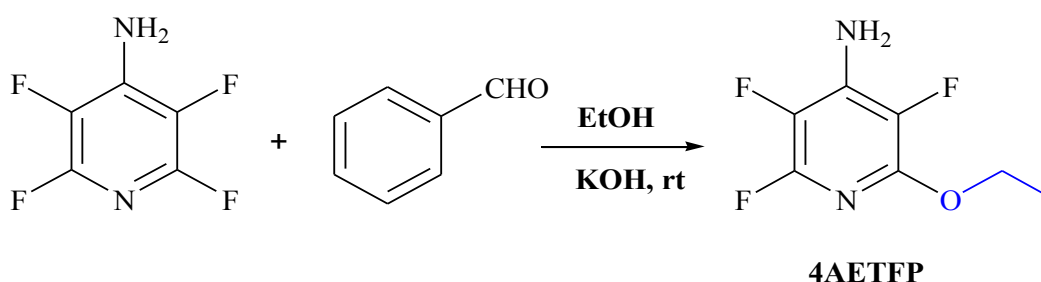


Schéma III.3 : mécanisme réactionnel de la synthèse de 4AETFP

cependant, lorsque nous avons utilisé de l'EtOH comme solvant, seulement le 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine a été produit. On peut interpréter que la présence de EtO^- / EtOH dans le mélange favorise la substitution nucléophile pour donner 4AETFP au lieu de l'addition nucléophile au groupe carbonyle d'aldéhyde pour donner la base de Schiff BF_1 .

En 2005, Sekhri.L [99] a indiqué que la réaction de la 2,3,5,6-tétrafluoro-4-(2,4,6-triméthylphénylazo) pyridine avec un équimolaire de méthylate de sodium dans du méthanol a donné le 2,3,5-trifluoro-6-méthoxy -4- (2,4,6-triméthylphénylazo) pyridine.

Cette réaction est analogue à la réaction que nous avons réalisée dans ce projet qui implique la condensation de la 4-amino 2,3,5,6-tétrafluoropyridine 1 avec un équimolaire d'EtO⁻ / EtOH.

De plus, la formation du produit 4AETFP fournit une preuve supplémentaire que la substitution nucléophile dans le composé aminé 4ATFP par Nu (KOEt) est fortement dirigée vers les positions ortho.

Comme on pouvait s'y attendre, le composé aminé 4ATFP ne nécessite pas plus que sa propre capacité incorporée pour le retrait d'électrons et il est lui-même attaqué par des nucléophiles puissants, par exemple par ⁻OEt (éthoxyde de potassium KOEt) dans l'éthanol. Le groupe sortant F est aidé par EtOH, HF étant évolué et ⁻OEt régénéré (Schéma III.4).

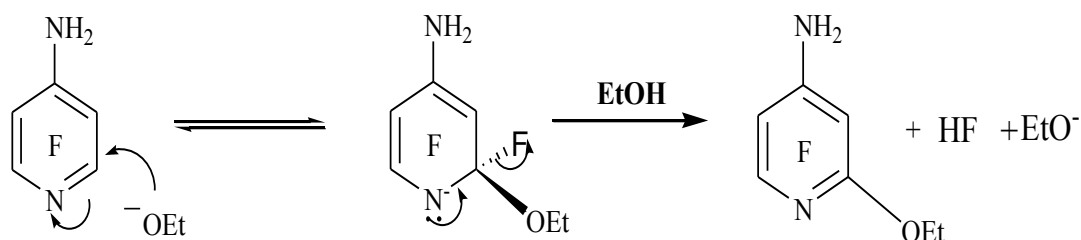


Schéma III.4 : Mécanisme de substitution nucléophile dans l'amine 4ATFP par Nu (KOEt)

➤ Synthèse de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine

En conservant le même mode opératoire, cette réaction se déroule en milieu de THF au lieu de l'éthanol à reflux et en présence du KOH, cette approche nous a permis d'obtenir la base de Schiff fluoré souhaité avec un rendement acceptable.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

La réaction est le résultat de l'attaque nucléophile de l'azote de l'amine sur le carbonyle de l'aldéhyde. Ceci entraîne la formation de la double liaison carbone-azote ($-C=N-$), et la formation de l'imine après élimination d'une molécule d'eau, comme indiqué dans (schéma III.5).

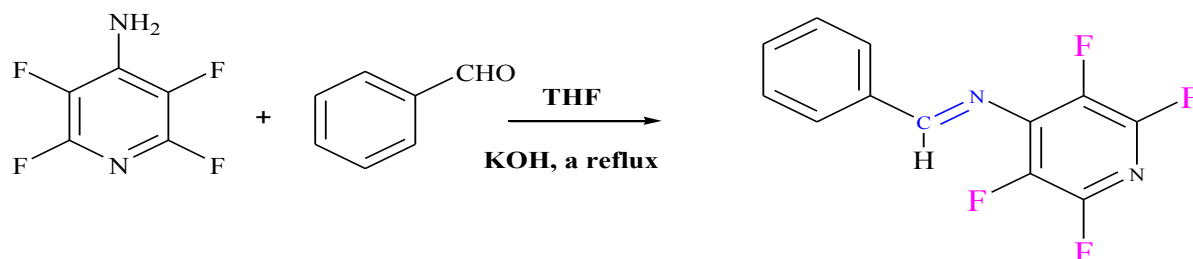


Schéma III.5 : mécanisme réactionnel de la synthèse de BF₁

III-1-2-1 Propriétés physiques et analytiques

Les tests de solubilité et les propriétés analytiques et physiques des composés 4ATFP, 4AETFP et BF₁ sont regroupés dans les tableaux III. 4 et III.5

Tableau III.4: Tests de solubilité sur les composés 4ATFP , 4AETFP et BF₁

composé \ Solvant	Méthanol	éthanol	Eau	chloroforme	dichlomethane	DMSO	Acétate d'éthyle
4ATFP	S	S	IS	S	S	S	IS
4AETFP	S	S	IS	S	S	S	IS
BF ₁	S	S	S	IS	IS	S	IS

S : Soluble ; IS : insoluble

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de tableau III.4 révèlent que tous les composés sont solubles dans la majorité des solvants organiques usuels et insoluble dans l'eau, sauf le BF₁ est soluble dans l'eau.

Tableau III.5 : Propriétés analytique et physique des composé BF₁, 4AETFP,4ATFP

Composé	Formule moléculaire	Masse moléculaire	Point de fusion ° C	Rendement (%)	État physique
4ATFP	C ₅ H ₂ N ₂ F ₄	166	85-87	80	Aiguilles blanches longues
4AETFP	C ₇ H ₇ N ₂ OF ₃	192	80-83	33	Poudre microcristalline blanche
BF ₁	C ₁₂ H ₆ N ₂ F ₄	254	>250	48,52	Poudre crème

III-1-2-2 Caractérisations spectrales et identification des structures

Une fois que les composés purifiés, nous avons procédé à leurs identification par les différentes méthodes spectrales afin de confirmer les structures déjà proposées.

1- Analyse par IR

Les spectres infrarouges des composés 4ATFP, 4AETFP et BF₁ ont été enregistrés dans un domaine de 4000-450 cm⁻¹ en utilisant spectrophotomètre FTIR SHIMADZU IR Affinity-1- et spectrophotomètre FTIR Cary 600 series de Agilent Technologies. Les principales bandes de vibration des différents groupements fonctionnels au sein des structures, sont présentées dans le tableau III.6 ci-après Les spectres FT-IR de 4ATFP et 4AETFP sont représentés dans les figures III.2 et III.3 respectivement.

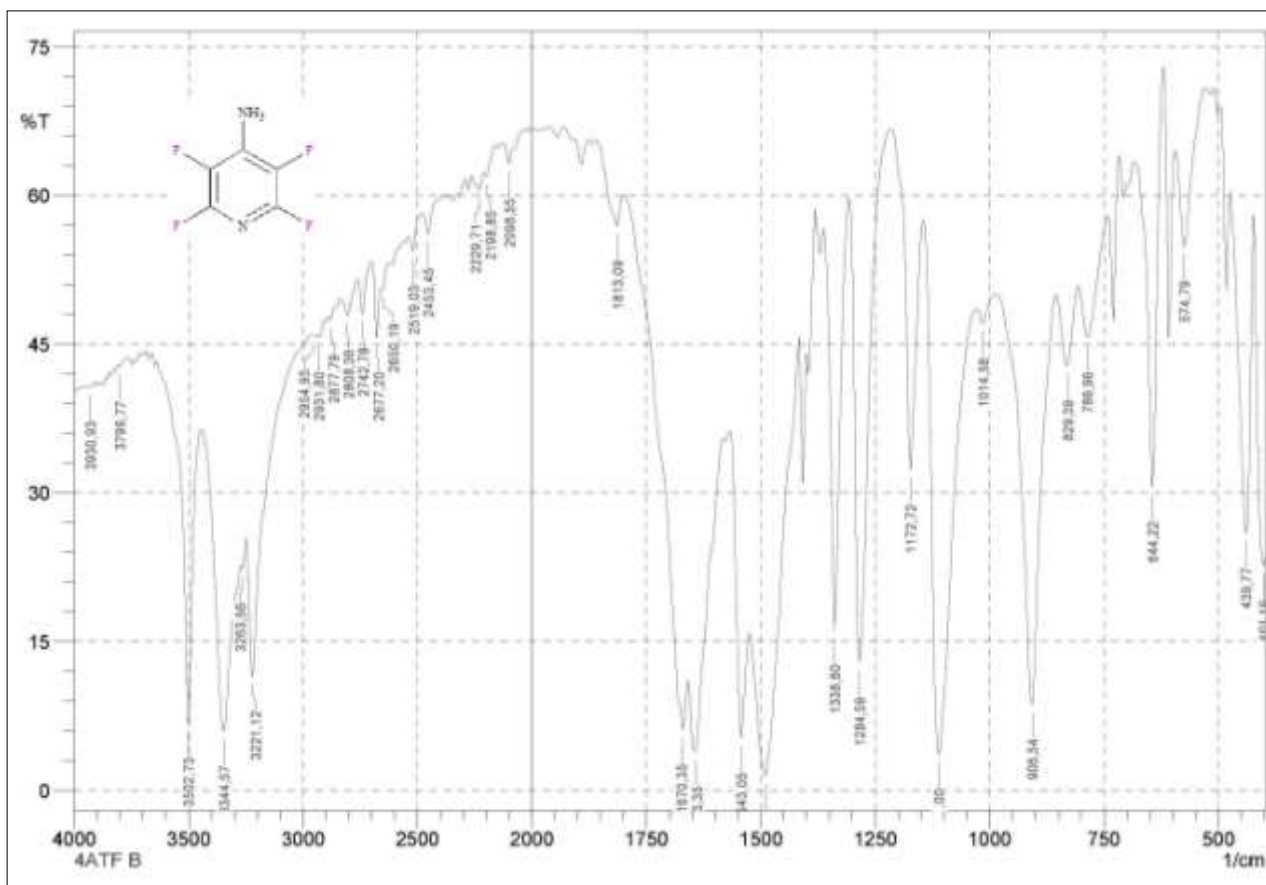


Figure III. 3 : Spectre infrarouge de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine

L'IR confirme la persistance des bandes d'absorption de la fonction amine entre 3300 et 3500 cm^{-1} , le spectre présenté montre également des bandes aux alentours de 1100 - 1250 cm^{-1} correspondante aux liaisons C-F. Des absorptions entre 1480 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} attribuées au C=C aromatique et une bande à 1640 cm^{-1} qui est assigné la C=N de pyridine et une autre bande à 1281 cm^{-1} qui correspond à la liaison C-N de l'amine aromatique .

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Comme attendu, dans le spectre de (E)-N benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine représenté sur la figure ci-dessous, aucune bande de vibration N-H attribuable au l'amine primaire utilisé comme réactifs (3518-3442 cm^{-1}) n'est détectée. L'IR confirme l'apparition d'une d'absorption de la fonction azométhine (C=N) au voisinage de 1600 cm^{-1} , Des absorptions entre 2850 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} attribuées au (C-H) aromatique, le spectre présenté montre également des bandes aux alentours de 1100-1250 cm^{-1} correspondante aux liaisons C-F.

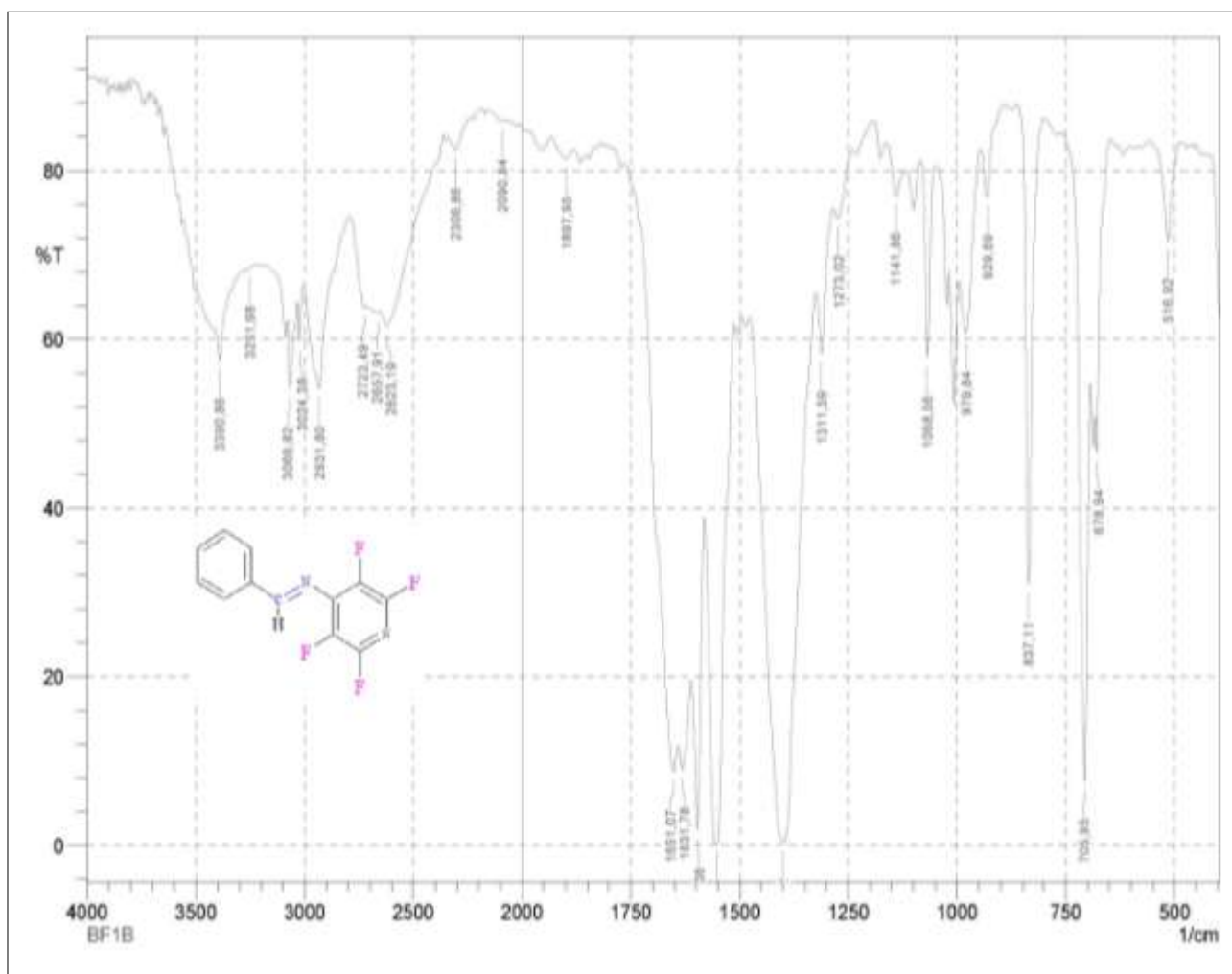


Figure III. 4 : Spectre infrarouge de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau III.6 résume les principales bandes de vibration des composés synthétisés

Tableau III.6 : Bandes de vibrations caractéristiques de 4ATFP, 4AETFP et BF₁

	4ATFP	4AETFP	BF₁	
Groupement fonctionnel	Nombre d'onde (cm⁻¹)			
	observé	observé	observé	Rapporté[105]
C-F	1100-1250	1100-1250	1100-1250	1000-1200
-NH ₂	3300 -3500	3200 -3500	/	3410-3500
C=C aromatique	1480-1550	1450- 1614	1400-1500	1580-1600
C-H aliphatique	/	2329 et 2978,5	/	2870-2960
C-H aromatique	/	/	2850-3000	3070- 3130
C-N aromatique	1281	1274,9	1311,6	1360-1180
C-O	/	1353	/	1000-1300
C=N (imine)	/	/	1600	1600-1680
C=N (pyridine)	1640	1650	1630-1650	/

2- Analyse par UV/Vis

Le spectre UV-vis de BF₁ est enregistré dans le domaine (200-800 nm) en milieu diméthylsulfoxyde (DMSO). Le spectre du BF₁ présente une bande d'absorption situées à 264 nm est attribuable à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ chromophore azométhine (C=N), comme cela est montré dans la figure donnée ci-dessous:

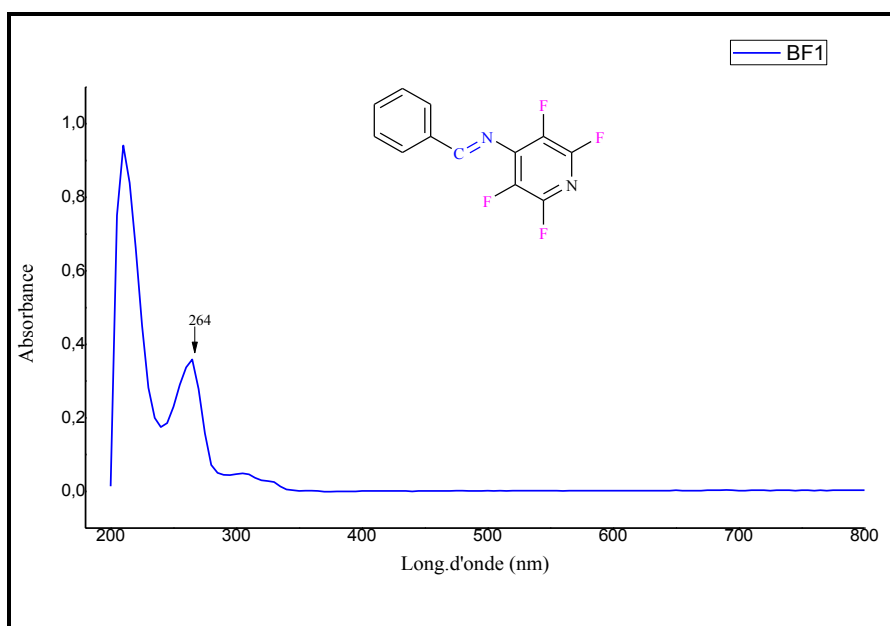


Figure III.6 : Spectre UV-vis du (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine

3- Analyse par GC-MS

La structure et la pureté des composés 4ATFP, 4AETFP et BF₁ ont été déterminées par la GC/MS. Les spectres de masse de ces composés et la fragmentation des masses proposées sont donnés dans les figures et les schéma données ci-dessous ; Les chromatogramme des différents composés sont également donnés en annexe.

La pureté du matériau de départ 4ATFP et du 4AETFP a été confirmée par des données spectroscopiques: Analyse GC-MS (70 eV) a révélé la présence d'un seul composant comme indiqué dans l'annexe 8

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

File :C:\msdchem\1\DATA\2016\Mai 2016\160502-02.D
Operator : ok
Acquired : 2 May 2016 13:02 using AcqMethod TR-FAME STANDARD.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 570-1
Misc Info : A externe
Vial Number: 72

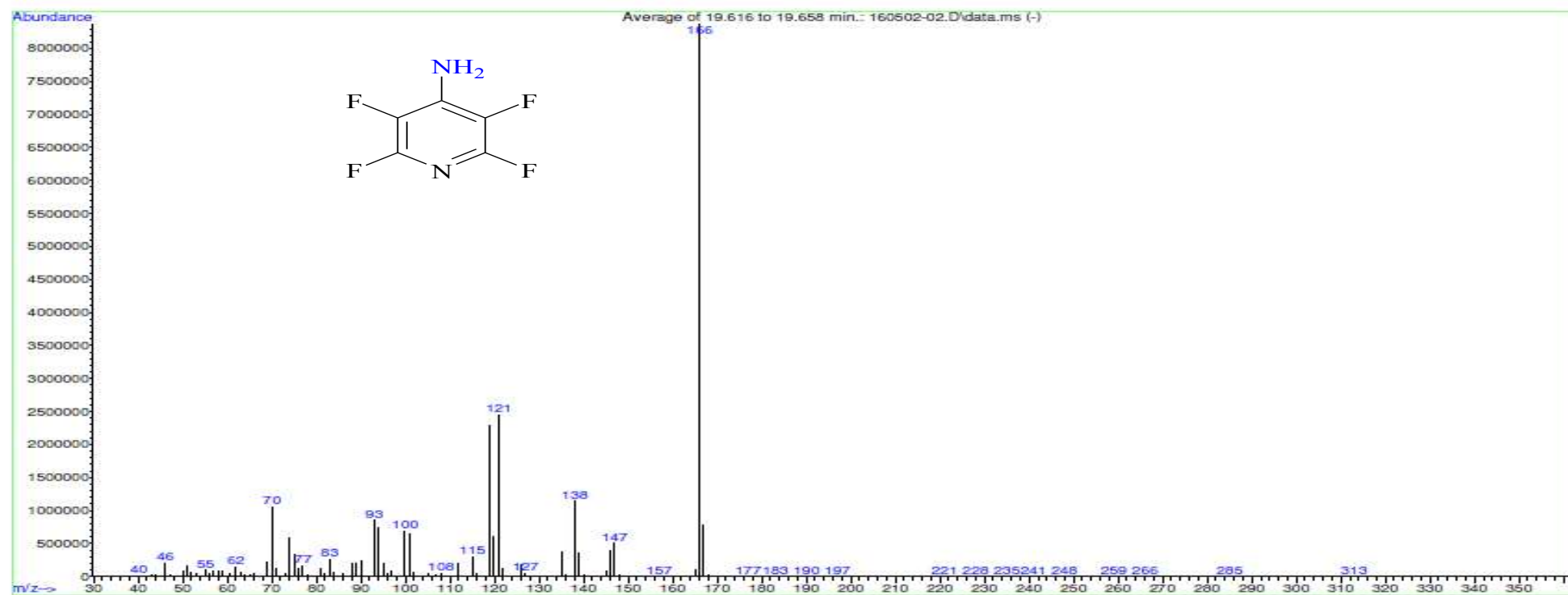


Figure III.7 : Spectre de masse de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

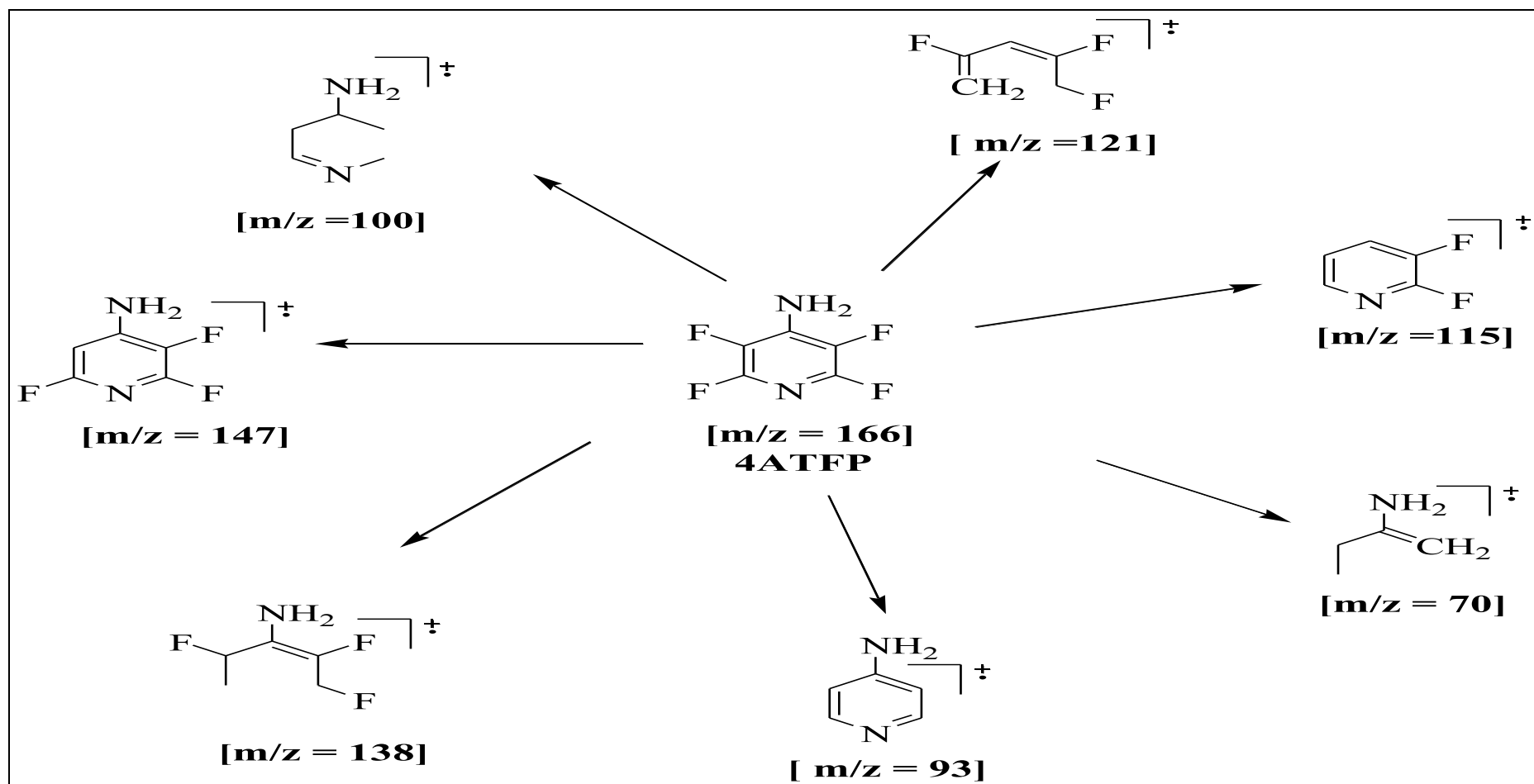


Schéma III.6 : Fragmentation proposée de 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

File : C:\msdchem\1\DATA\2016\Mai 2016\160502-03.D
Operator : ok
Acquired : 2 May 2016 13:42 using AcqMethod TR-FAME STANDARD.M
Instrument : GCMS
Sample Name : 570-2
Misc Info : A externe
Vial Number : 73

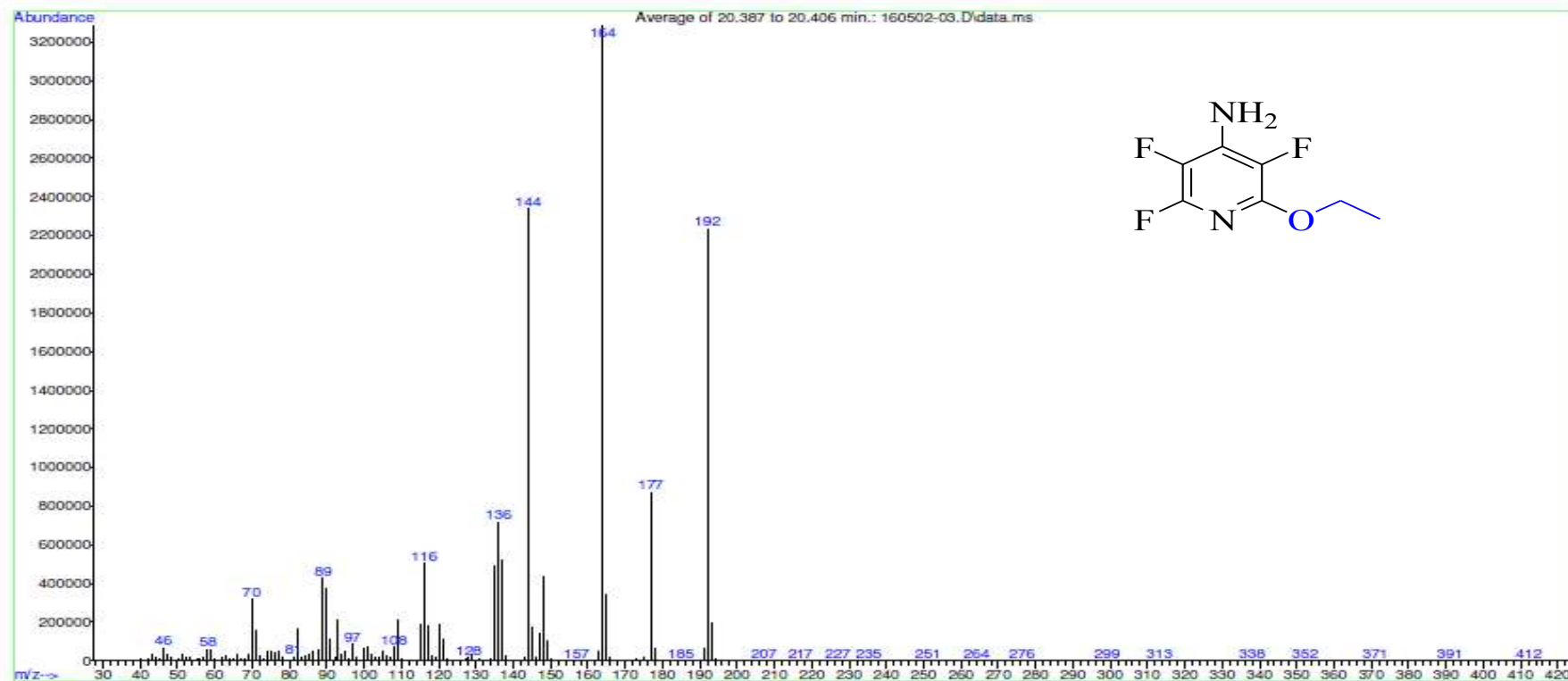


Figure III.8 : Spectre de masse de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine

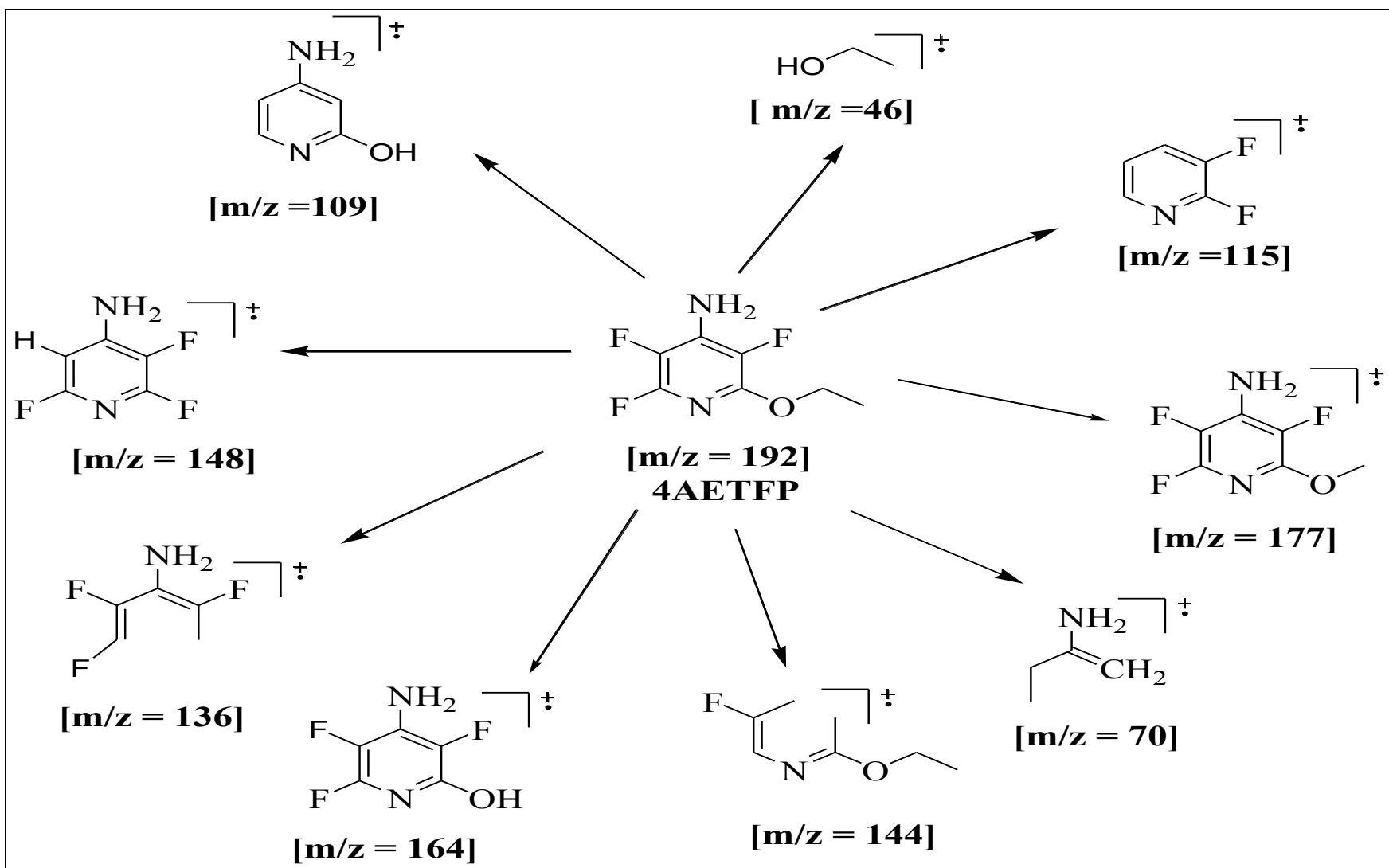


Schéma III.7 : Fragmentation proposée de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

File :C:\msdchem\1\DATA\2016\juillet 2016\160726-06.D
Operator : BS
Acquired : 26 Jul 2016 15:39 using AcqMethod HP5MS-STANDARDLESS60 MIN .M
Instrument : GCMS
Sample Name : 895/2
Misc Info : externe
Vial Number : 3

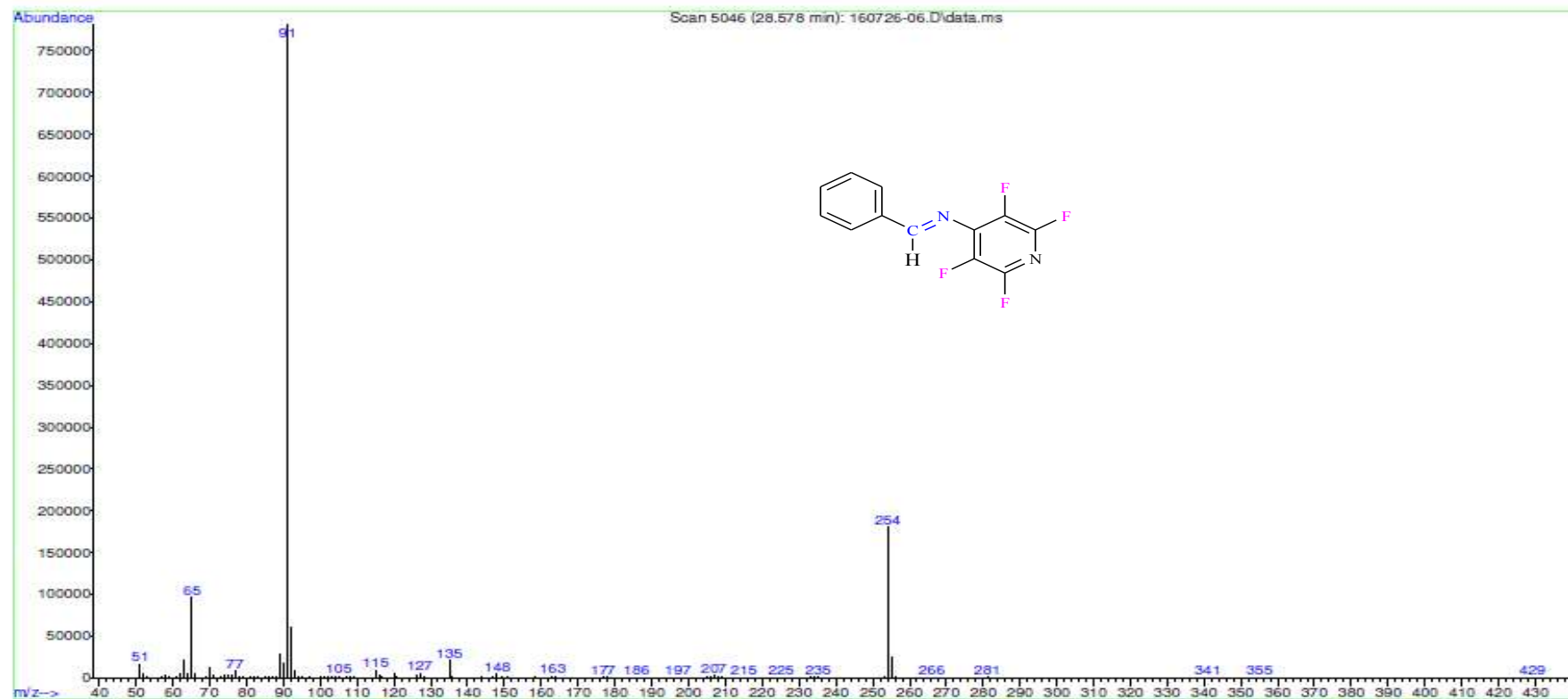


Figure III.9 : Spectre de masse de (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine

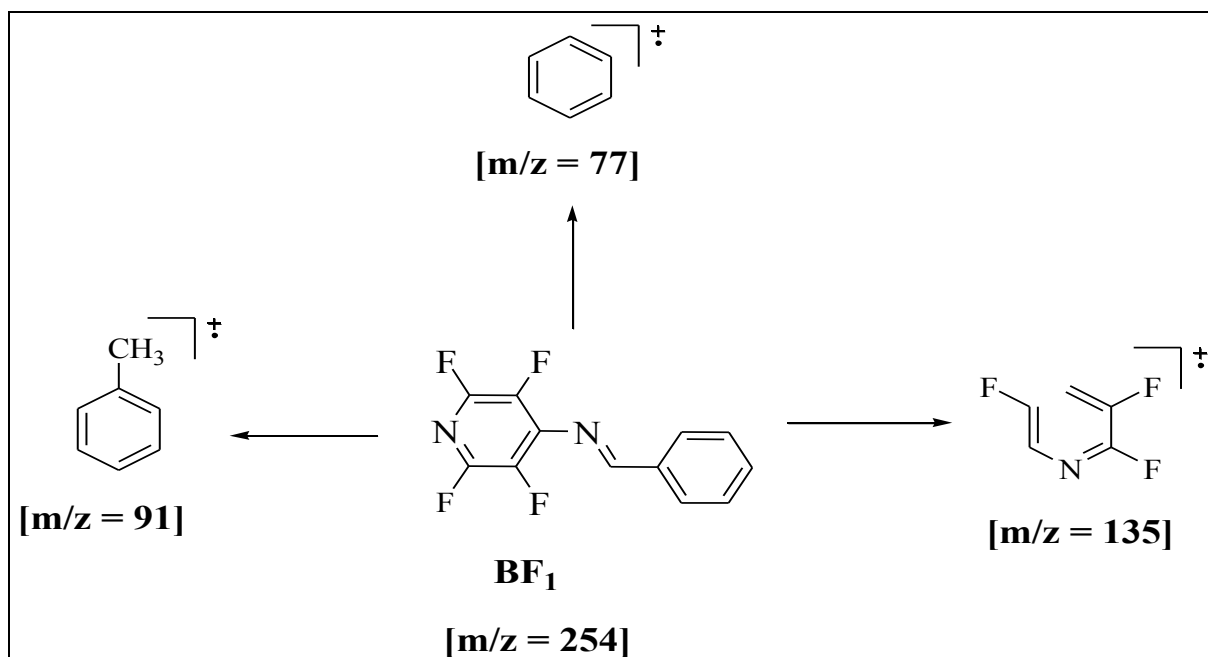


Schéma III.8 : Fragmentation proposée de (E)-N benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine

Le pourcentage d'abondance pour différentes valeurs m / z des composés 4ATFP, 4AETFP et BF₁ est donné dans le tableau III.7 :

Tableau III.7 : Les données des spectres de masse

4ATFP		4AETFP		BF ₁	
[m/z]	% d'abondance	[m/z]	% d'abondance	[m/z]	% d'abondance
166	100	192	68	254	22.5
147	6.25	177	25.75	135	4.37
138	15	164	100	91	100
121	31.25	148	12.12	77	1.65
100	8.75	144	71.21		
93	11.75	136	21.21		
70	13.75	116	13.63		
		109	7.75		
		70	10.66		

4- Analyse par RMN ¹H

L'analyse structurale des nos composés a été donc menée par RMN ¹H pour confirmer leurs structures

➤ 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine

Le spectre RMN ¹H été enregistré à 35 ° C à l'aide d'un Perkin Elmer R10 spectromètre à 60 MHz et 54,6 MHz pour le spectre RMN ¹⁹F. En utilisant du tétraméthylsilane (TMS) comme un référence pour les spectres RMN ¹H, et pour les spectres RMN ¹⁹F, les changements chimiques ont été mesurés par rapport à l'acide trifluoroacétique (TFA) comme un référence d'échange extern.

La RMN ¹H a montré le déplacement chimique a 6,7ppm correspond aux protons de NH₂, alors que les déplacements chimiques 15,1 et -85,1 ppm de la RMN ¹⁹F sont attribués respectivement au (F-2 et F-6), (F-3 et F-5)

➤ 4-amino-2-éthoxy-3,5,6-trifluoropyridine

Le spectre RMN ¹H du 4-amino-2-éthoxy-3,5,6-trifluoropyridine a été enregistré sur un spectromètre BRUKER Ultrashield Plus 500 avec une fréquence de 500 MHz. En utilisant du DMSO-d₆ comme solvant et un standard interne à température ambiante, le nombre de balayage est (16-1K).

Ce spectre montre un déplacement chimique à 6,7 ppm correspond aux protons de groupement NH₂, alors que les déplacements chimiques 4,2 et 1,4 ppm sont attribués respectivement aux protons de (CH₂) et (CH₃), comme indiqué dans la Figure III.9.

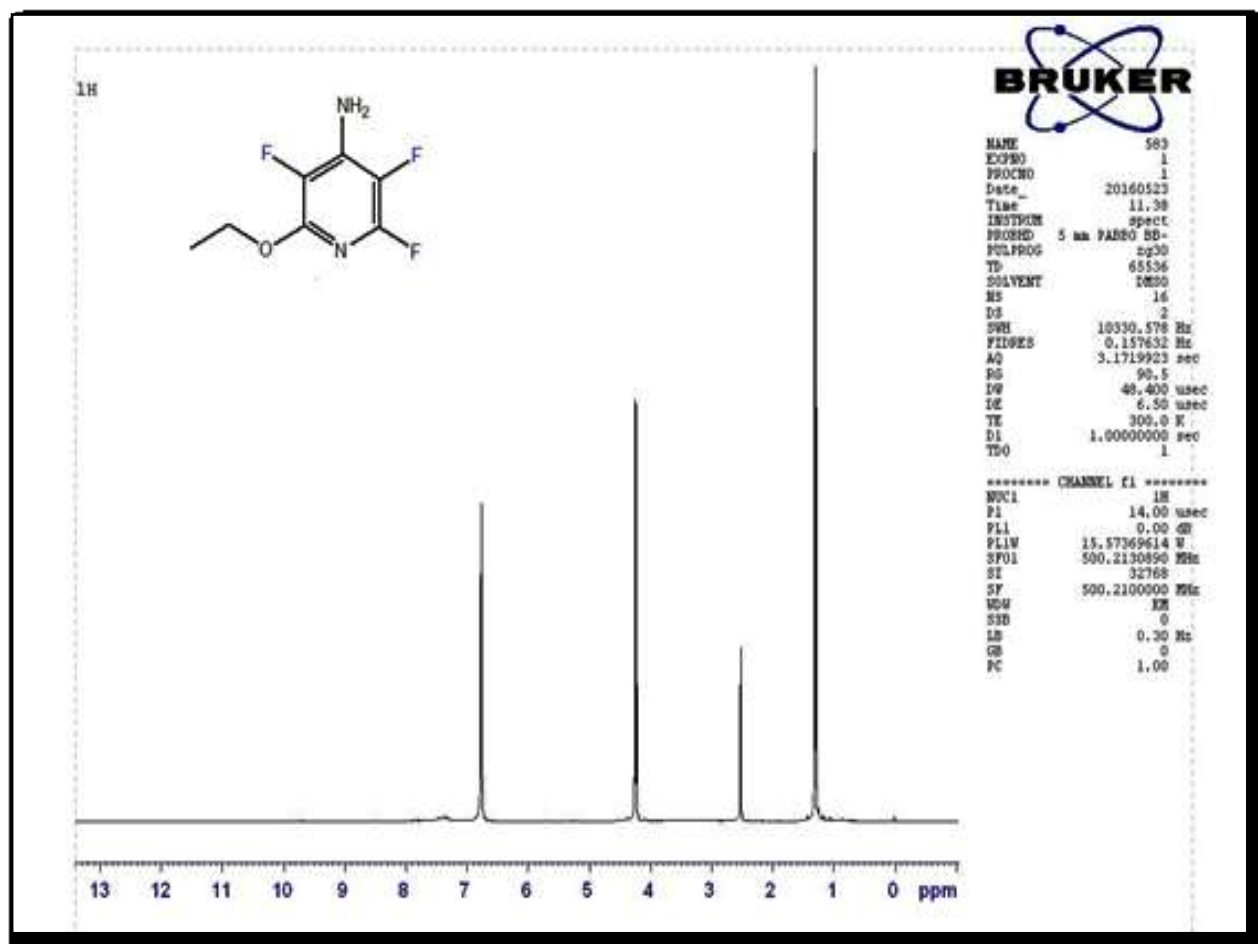


Figure III.10 : Spectre de RMN ^1H de 4-amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine

III-1-3 Conclusion

Deux types de composés fluorés et pénicilliniques ont été synthétisés. La pureté des produits de synthèse est excellente et les rendements sont acceptables. Les analyses spectrales (IR, UV/Vis, SM et RMN ^1H) nous ont permis de caractériser et d'identifier toutes les structures. L'interprétation des différents spectres est conforme aux structures proposées.

III-2 Partie biologique

III-2-1 l'activité antimicrobienne

Au cours de nos investigations, l'activité antimicrobienne a été évaluée contre cinq types des bactéries en utilisant la méthode de diffusion de disque sur milieu de Mueller-Hinton gélosé et sur une souche fongique et également par la méthode de diffusion de disque sur milieu SDA.

III-2-1-1 Activité antibactérienne :

Le test de sensibilité bactérienne à nos composés est regroupé dans les Tableaux III.8,9 et 10. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures. L'action inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné par les composés testés.

Tableau III.8 : Activité antibactérienne de base de Schiff Pénicillinique PB₁

Concentration (µg/ml)	diamètres d'inhibition (mm)				
	100	150	200	250	Ampicilline
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 G(-)	-	7.75±0.3	8.75±0.3	9±0.0	12.5±0.7
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 G(-)	-	7.25±0.3	9.25±0.3	10±0.0	15,5±0.7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 G(+)	10.5±0.7	13.5±0.7	15.5±0.7	18.5±0.7	39,5±0.7
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 G(+)	17.5±0.7	19.25±0.3	21±0.0	22.5±0.7	37±0.7
<i>Streptocoque B</i> G(+) (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	16±1.4	11.5±0.7	21.5±0.7	23.5±0.7	35,5±0.7

En effet, la base de Schiff pénicillinique BP₁ a montré un important effet inhibiteur contre les microorganismes étudiés.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

A partir des résultats du test, on constate clairement que le composé n'a présenté aucune activité inhibitrice pour *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 à une concentration de 100 µg / ml et présente une légère activité à une concentration de 200 et 250 µg / ml .

Les micro-organismes les plus sensibles à ce composé étaient *Enterococcus faecium* ATCC 19434 et *Streptocoque B* du gram positive, dont a une concentration de 100 et 250 µg/ml le diamètre d'inhibition est égale à 17,5 et 22,5mm pour *Enterococcus faecium* et (16 ; 23,5) mm dans le cas de *Streptocoque B* respectivement.

Suite à ces résultats, le BP₁ est jugée modérément active contre les souches d'*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, avec diamètre d'inhibition de 10,5 et 18,05 mm à des concentrations de 100 et 250 µg/ml respectivement.

La figure III.10 montre les diamètres d'inhibition en fonction des déférentes concentrations de la basse de Schiff BP₁.

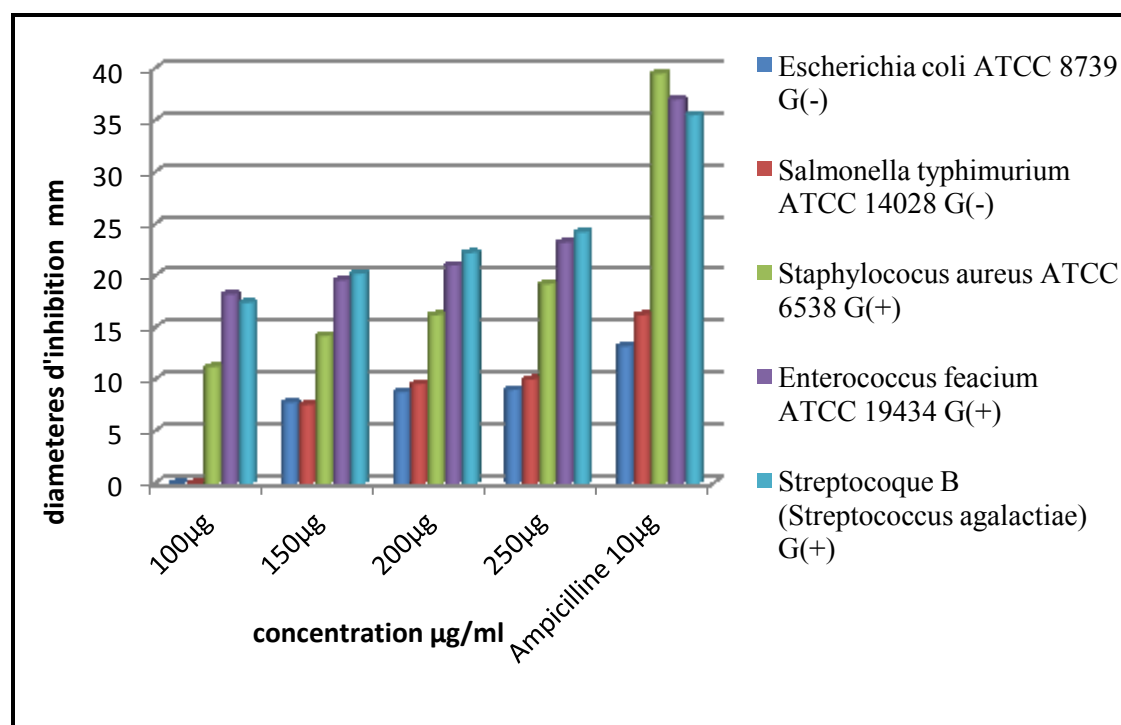


Figure III.11 : Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration du BP₁

L'action antibactérienne de BP₁ peut être attribuée à sa structure de base des beta-lactamines le cycle beta-lactame.

Les β-lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse de paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par une inactivation des principaux enzymes impliqués dans cette construction et regroupés sous le terme de PLP (Protéines Liant les Pénicillines) :

- Transpeptidases
- Endo-peptidases
- Carboxypeptidases.

En mimant la structure tridimensionnelle de la séquence D-Ala-D-Ala, les béta-lactamines se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase, enzyme essentielle à la synthèse de la paroi bactérienne. Elles forment un lien covalent avec l'enzyme et empêchent donc toute activité de celui-ci, les béta-lactamines sont des substrats-suicide [106].

Concernant l'activité de 4AETFP le composé fluoré, le 4AETFP a réagi positivement aux souches microbiennes testées, comme cela est montré dans le tableau donnée ci-dessous :

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.9 : Activité antibactérienne de 4AETFP.

Concentration (µg/ml)	diameters of the inhibition (mm)					
	Ampicilline 10µg	100	150	200	250	300
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 G(-)	12±1.4	8,75±0.3	10,25±0.3	11±0.7	12,75±1.0	14±1.4
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 G(-)	14,5±0.7	9±0.0	10,75±0.3	11,5±0.7	13,5±0.7	14,5±0.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 G(+)	31,5±0.7	9.5±0.7	10,5±0.0	11,25±0.3	13±0.0	14.25±0.3
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 G(+)	37.75±0.3	8,5±0.0	10,5±0.7	13,5±0.7	14,75±0.3	16,5±0.7
<i>Streptocoque B</i> (<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>) G(+)	26,5±0.7	9,25±0.3	10,25±1.7	11,75±2.4	14,5±0.7	16,5±0.7

Le composé fluoré est jugée modérément active contre les cinq souches à testés du gram négative *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et du gram positif *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* et *Streptocoque B* avec des diamètres d'inhibition, respectives, de (14 ; 14,5 ; 14,25 ; 16,5 et 16,5) mm et de concentration de 300 µg/ml.

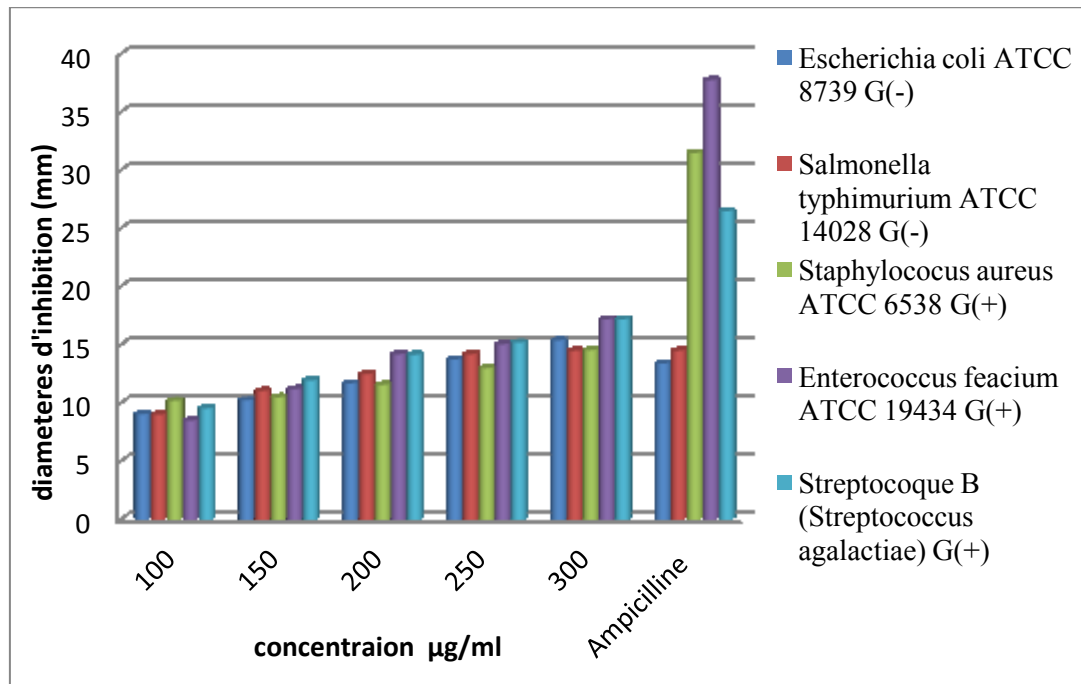


Figure III.12 : Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration du 4AETFP

Enfin, la base de Schiff Fluorée BF₁ a révélé une activité antibactérienne modérée sur l'ensemble des bactéries testées (tableau III.10). Seules les souches à Gram positive *Streptocoque B* sont les plus sensibles avec un diamètre d'inhibition de 19,5 mm à une concentration de 250 µg/ml. Les souches, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* de Gram négative ont été moins sensibles vis-à-vis de la base de Schiff fluorée BF₁, avec des zones d'inhibition de (11 et 10,5) mm et concentration de 250 µg/ml respectivement.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.10 : Activité antibactérienne de BF₁

Concentration (µg/ml)	diameters of the inhibition (mm)				Ampicilline
	100	150	200	250	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 G(-)	7±0.0	9±0.7	10.25±0.3	11±0.0	12.5±0.7
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 G(-)	7±0.3	8.75±0.3	9.5±0.0	10.5±0.0	15,5±0.7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 G(+)	-	8.75±0.3	9.5±0.7	10±0.7	39,5±0.7
<i>Enterococcus feacium</i> ATCC 19434 G(+)	-	9±0.0	10.25±0.3	11.5±0.7	37±0.7
<i>Streptocoque B</i> G(+) (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	9±0.7	12.75±0.3	16.25±1.0	19.5±0.7	35,5±0.7

Contrairement le composé n'a présenté aucune activité inhibitrice aux souches de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus feacium* à une concentration de 100 µg / ml et présente une faible activité à une concentration 250 µg / ml avec diamètre d'inhibition de 10 et 11,5 mm respectivement (figure III.13).

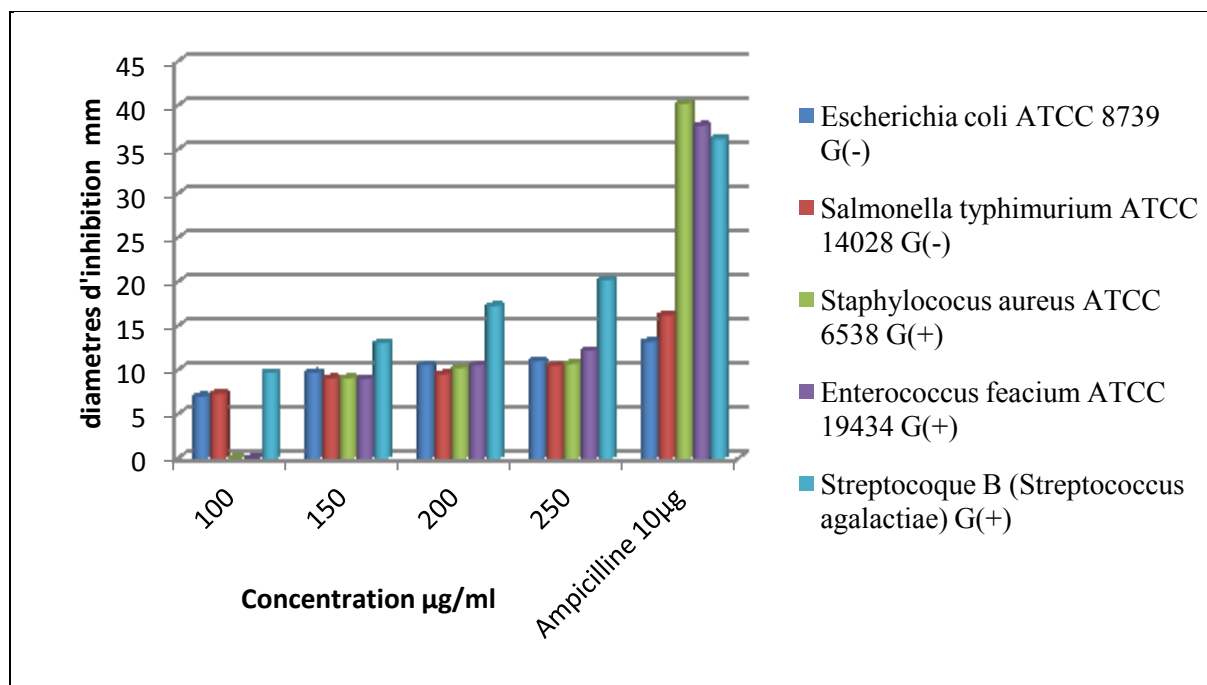


Figure III.13 : Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration du (E)-N benzylidene-2,3,5,6- tetrafluoropyridin-4-amine BF₁.

L'action antimicrobienne de nos composés fluorés 4AETFP et BF₁ peut être facilement attribuée à la présence de plusieurs atomes de fluor qui a montré leurs pouvoir antibactérien à lutter contre plusieurs souches bactériennes testées, dont les composés fluoré sont devenus une part importante de la recherche dans l'industrie pharmaceutique, on retrouve ces composés dans quasi toutes les classe de médicaments (anti-tumoraux, anti-infectieux, anti-inflammatoires, médicaments du système nerveux central)

Alors que fluoroquinolone (Figure III.14), forme une classe d'antibiotiques à large spectre (bactéries Gram positif et négatif). Ces molécules agissent par inhibition de la topoisomérase bactérienne (inhibant la synthèse des acides nucléiques) [108].

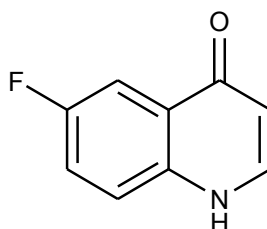


Figure III.14 : Structure de Fluoroquinolone

Ainsi le groupe imine présent dans BF₁ s'est avéré critique pour leur activité biologique

Globalement, Les composé BP₁, 4AETFP et BF₁ ont présenté un large spectre d'action sur les bactéries testées. Notons que le pouvoir antibactérien de la base de Schiff pénicillinique s'est révélé plus important que celui des deux autres composés fluorés.

III-2-1-2 L'activité antifongique

Les résultats des diamètres d'inhibition de l'activité antifongique de nos composés BP₁, 4AETFP et BF₁ sont indiqués dans la figure III.15.

Les résultats ont révélé que ces composés présentant des degrés variables d'effets inhibiteurs sur la croissance de la souche *Candida albicans* ATCC 10231. La base de Schiff pénicillinique est le composé fluorés 4AETFP présentait une activité modérée par rapport à Nystatine 100µg avec des diamètre des zones d'inhibition allant de 9,7 à 15,2 mm, dont à une concentration de 250 µg/ml du BP₁ et 4AETFP le diamètre d'inhibition est de (14,55 et 15,2) mm respectivement.

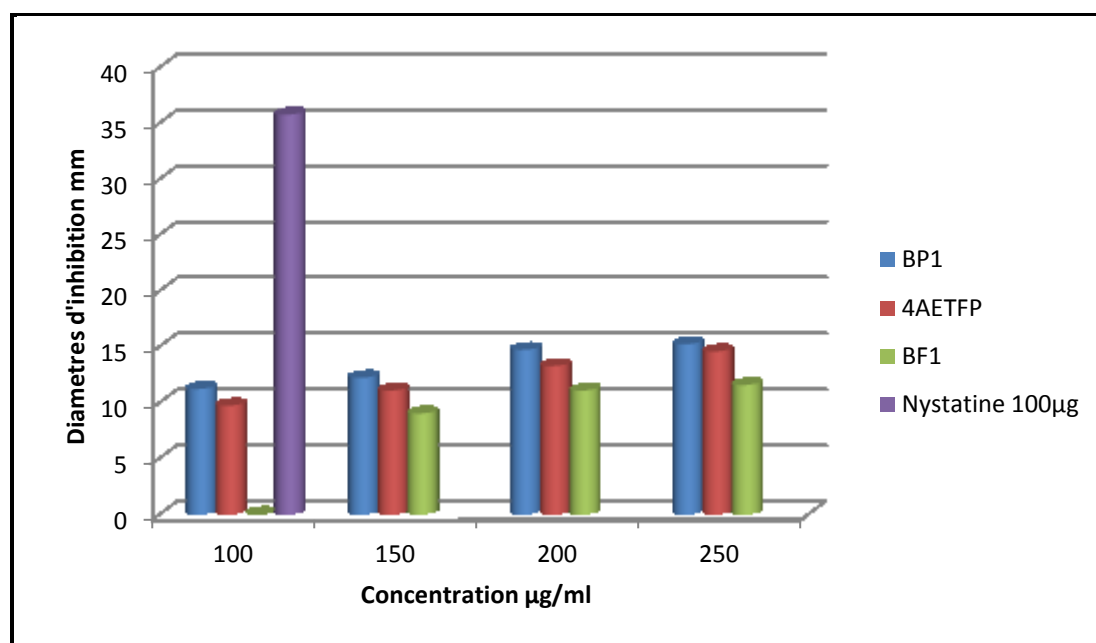


Figure III.15 : Les diamètres d'inhibition des souches en fonction de la concentration de BP₁, BF₁, 4AETFP

Alors que la base de Schiff fluorés BF₁ présentait une activité faible contre *C. albicans*. avec des diamètres d'inhibition de (9; 11,05 et 11,55) mm et de concentration de (150 ; 200 et 250) µg/ml respectivement.

Comme vu précédemment, l'action antimicrobienne de nos composés fluorés 4AETFP et BF₁ peut être facilement attribuée à la structure de base ; du BP₁ est le cycle

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

beta-lactame, et la présence de plusieurs atomes de fluor dans le cas de BF₁ et 4ATFP qui a montré leurs pouvoir antifongique ;

Le fluconazole est l'un des médicaments leader des antifongiques (produit à plus de 20 tonnes par an). Ce composé, de part sa faible lipophilie (due aux deux atomes de fluor) est éliminé rapidement de l'organisme et présente donc une faible toxicité[109] .

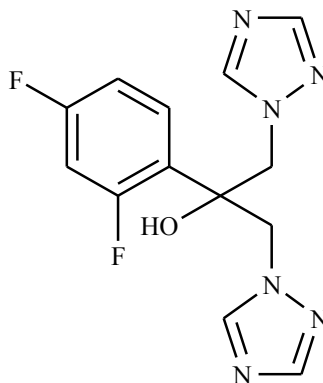


Figure III.16 : Structure de fluconazole

III-2-2 L'activité antioxydante

III-2-2-1 Relation entre la production des radicaux libres a l'origine du stress oxydatif et le cancer

Le stress oxydatif résultant du déséquilibre crée par la production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est considéré comme étant impliqué de façon critique dans le processus normal de vieillissement, mais aussi dans le développement et la progression de diverses pathologies humaines dont les cancers. En effet, l'initiation et la progression du cancer ont été associées au stress oxydatif en augmentant les mutations de l'ADN ou en induisant des dommages de l'ADN, l'instabilité du génome et la prolifération cellulaire. Les cellules normales sont hypersensibles aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) si elles ne sont pas suffisamment protégées par des mécanismes antioxydants et pouvant conduire à la formation de cancer [78].

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* est faite par plusieurs techniques. Ces méthodes se basent exclusivement sur la capacité réductrice ou piégeage des radicaux comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant [78].

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des composé testées a été réalisée par le piégeage du radical libre DPPH.

La capacité antioxydante est exprimée en équivalent Trolox (TEAC) ; elle correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit.

Trolox ou l'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyrane-2-carboxylique, est un analogue hydrophil de la vitamine E. Comme cette dernière, il s'agit d'un antioxydant, qui est utilisé en biologie et en biochimie pour limiter les dommages dus au stress oxydant.

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante [78].

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi la décoloration vers la couleur jaune (Figure III.17).

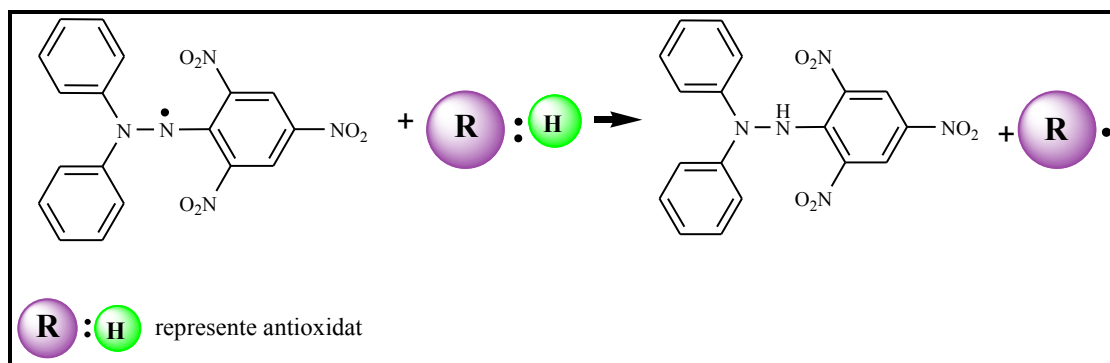


Schéma III.9: Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (RH) [110].

La figure III.18 et III.19 éclairci l'efficacité des BP₁, 4AETFP, BF₁ et de Trolox respectivement à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

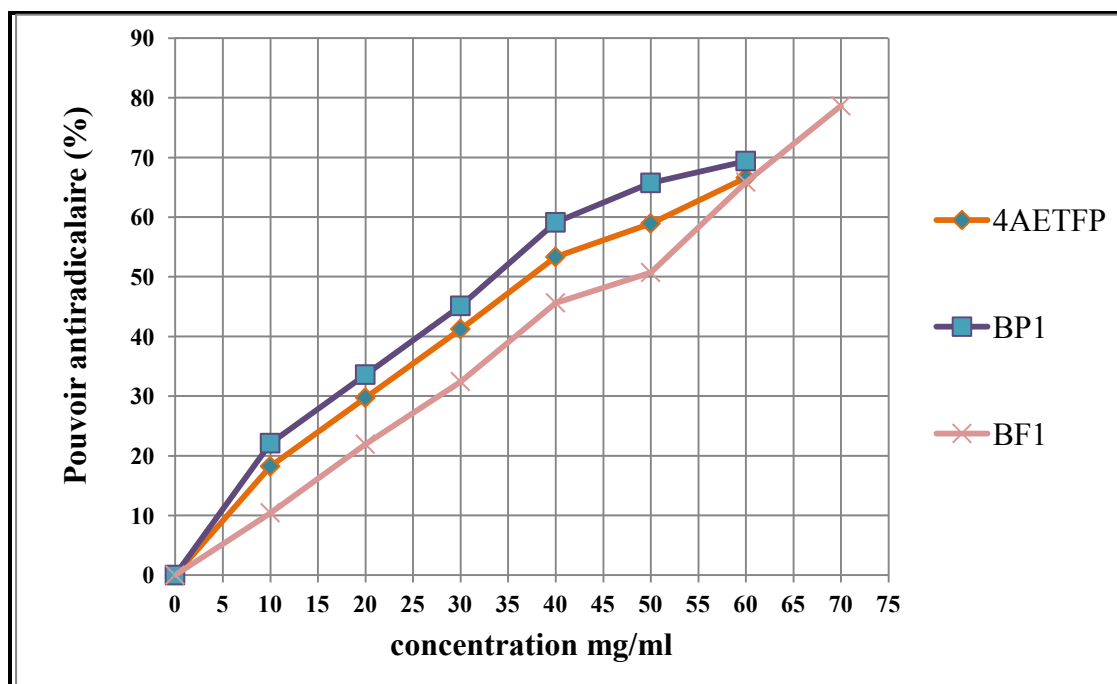


Figure III.17: Activité antiradicalaire des BP₁, BF₁ et 4AETFP.

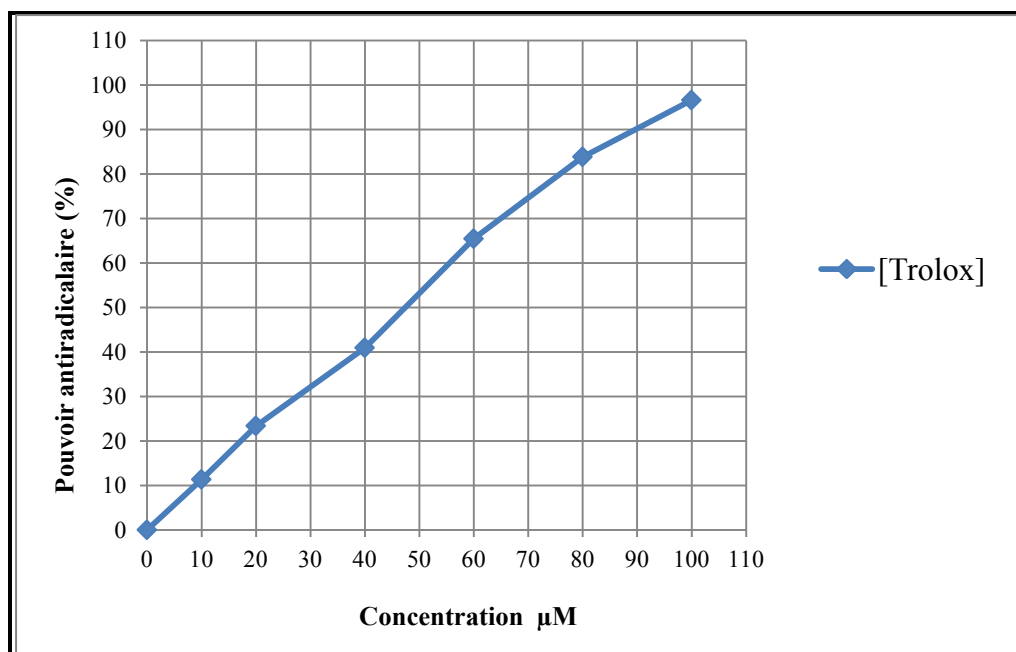


Figure III.18: Activité antiradicalaire de Trolox.

La valeur IC₅₀ (autrement appelée concentration inhibitrice à 50%) ou (EC₅₀ Efficient Concentration à 50%) est déterminée et regroupée dans le tableau III.11 pour nos produits et le standard utilisé. Elle est définie comme étant la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution initiale du DPPH. Les EC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet antiradicalaire important.

Tableau III.11 : Concentration inhibitrice à 50% des BP₁, 4AETFP et BF₁

	Trolox	4AETFP	BP₁	BF₁
EC₅₀ (mg/ml)	46,73±0,25	36,82±1,3	33,75±0,32	47,54±1,54
µM	(0,01169)			

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs de la capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (TEAC) sont déterminées et regroupées dans le tableau III.12 :

Tableau III.12 : Les valeurs de la capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (TEAC)

Composé	EC₅₀ (mg/mL)	Equivalent Trolox (µmoles Trolox/g d'extrait)
BP₁	33,75	1 ,38
4AETFP	36,82	1,269
BF₁	47,54	0,98

D'après les résultats, l'activité antiradicalaire a augmenté par l'augmentation des concentrations. Il semble que le Trolox est l'antioxydant le plus efficace que les composés étudiés avec une valeur de $46,75 \pm 0,25 \mu\text{M}$. Parmi les trois extraits, la base de Schiff pénicillinique est la plus active dont IC₅₀ égale à 33,75 mg/ml, suivi par le composé fluoré 4AETFP, avec une valeur de 36,82 mg/ml et finalement la base de Schiff fluorée qui semble être la moins performante avec un IC₅₀ de 47,73 mg/ml.

Les EC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'équivalent Trolox dont les valeurs faibles reflètent une valeur d'équivalent Trolox élevée.

Conclusion

CONCLUSION

Au cours du présent travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux composés de types bases de Schiff. Ces derniers sont obtenus essentiellement à partir d'une amine pénicillinique et autre fluorée .

La mise au point de la synthèse de ces types d'imines s'est révélée particulièrement intéressante en elle-même, d'où un intérêt porté sur une large gamme de structures. D'autre part, nous nous sommes focalisés sur la synthèse d'un nouveau composé fluoré dérivé de l'amine fluoré 4 Aminotétrafluoropyridine.

En effet, nous sommes parvenus à un rendement de 55% de la base de Schiff pénicillinique dérivé de la condensation du l'amine 6APA avec le benzaldéhyde, après 72 heures de chauffage sous agitation à reflux en présence de l'acide sulfurique comme catalyseur .

L'orientation vers un deuxième type d'imines , imines fluorés a ensuite été motivée par l'utilisation d'un catalyseur basique (KOH) ,dont le rôle est d'activer le pouvoir nucléophile. Cette modification nous a permis d'aboutir à la synthèse de l'*imine* souhaité avec un rendement de 48%. Cependant, cette étude nous a permis d'approfondir nos connaissances sur la réactivité particulière de l'amine fluorée.

Ces composés synthétisés sont identifiés et caractérisés au moyen des méthodes spectroscopiques habituelles comme l'ultraviolet, l'infrarouge, la résonance magnétique nucléaire ^1H et la spectrométrie de masse. Lors de la mise en œuvre de ces techniques d'analyse, nous avons pu mettre en évidence les structures des composés synthétisés, tout en appréciant leur pureté.

Concernant l'application de ces composés dans le domaine de la biologie, notre choix à été porté sur les activités antimicrobiennes et l'activité antioxydante. Dans ce cas, l'évaluation de l'effet antibactérien de nos composés montre une sensibilité bactérienne vis-à-vis cinq souches du Gram positive et négative testés. L'effet antibactérien est proportionnel à la concentration des composés.

CONCLUSION

Globalement, les trois composés ont présenté un large spectre d'action sur les bactéries testés. Notons que le pouvoir antibactérien de la base de Schiff pénicillinique s'est révélé plus important que celui des autres composés.

L'étude de l'activité antifongique a été démontré par le diamètre d'inhibition de la souche *C. albicans*. Les composés synthétisés ont exercé une activité modérée vis-à-vis la souche fongique testée. Les diamètres de la zone d'inhibition augmentent à chaque fois qu'on augmente la concentration de chaque produit.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH montre que la plus grande activité est obtenue avec la base de Schiff pénicillinique suivi respectivement par celles de 4AETFP et de BF₁.

L'action antimicrobien et antioxydant de nos composé peut être attribué à la structure de base de pénicilline le cycle Beta-Lactame dans le cas de base de Schiff pénicilliniques et d'autre part la présence de l'atome de fluor dans les autres composé cependant, les composé fluoré sont devenus dans quasi toutes les classe de médicament.

Comme perspectives à ce travail, on peut proposer ce qui suit

- Orienter le travail vers la synthèse de complexes base de Schiff fluorées et pénicilliniques
- D'étudier d'autres propriétés biologiques de ces composés, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antivirales et autres.
- Préparation des macromolécules.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BENMANSOUR Nee BABA AHMED, Y., *Synthèse, étude physico-chimique et activité biologique des complexes de cuivre et/ou nickel dérivés d'Hydrazone et Thiadiazole*, 2015, thèse de doctorat, ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN
2. DERAFA, W., *Synthèse de nouveaux complexes de base de schiff de métaux de transition non symétriques (manganèse ou fer) contenant un résidu moléculaire électropolymérisable*, 2014, thèse de magister, FARHAT ABBAS SETIF.
3. DAR KEBIRA, F., *Synthèses, caractérisations et étude structurale des complexes de nickel et de cuivre*, 2013, thèse de magister, Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
4. Mahmud, T., *Synthesis and characterization of the amino acid Schiff bases and their complexes with copper (II)*, 2010, university of MANCHISTER, UK.
5. Ashraf, M.A., et al. *Synthesis, characterization and biological Activity of Schiff Bases*. in *International Conference on Chemistry and Chemical Process*. 2011.
6. Guo, Z., et al., *Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan*. *Carbohydrate research*, 2007. **342**(10): p. 1329-1332.
7. Zhou, Y., et al., *A class of novel Schiff's bases: Synthesis, therapeutic action for chronic pain, anti-inflammation and 3D QSAR analysis*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2010. **18**(6): p. 2165-2172.
8. Kumar, S., et al., *Synthesis and antimicrobial study of some Schiff bases of sulfonamides*. *J. Curr. Pharm. Res*, 2010. **1**(1): p. 39-42.
9. Yousif, E., et al., *Synthesis and antimicrobial screening of tetra Schiff bases of 1, 2, 4, 5-tetra (5-amino-1, 3, 4-thiadiazole-2-yl) benzene*. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2014. **18**(3): p. 269-275.
10. Tallon, T.M., *Synthesis of imidazole schiff base ligands, their silver (I) complexes and their activities against candida albicans*, 2010, thèse de doctorat, Department of Chemistry, The National University of Ireland, Maynooth.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

11. Krzysztof Sztanke, A.M., Anna Osinka, Małgorzata Sztanke *An insight into synthetic Schiff bases revealing antiproliferative activities in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013. **21**: p. 3648-3666.
12. Abdel-Rahman, L.H., et al., *Some new nano-sized Fe (II), Cd (II) and Zn (II) Schiff base complexes as precursor for metal oxides: Sonochemical synthesis, characterization, DNA interaction, in vitro antimicrobial and anticancer activities*. *Bioorganic Chemistry*, 2016. **69**: p. 140-152.
13. Gupta, N.K., et al., *Schiff's bases derived from l-lysine and aromatic aldehydes as green corrosion inhibitors for mild steel: Experimental and theoretical studies*. *Journal of Molecular Liquids*, 2016. **215**: p. 47-57.
14. Mohammed, M.Q., *Synthesis and characterization of new Schiff bases and evaluation as Corrosion inhibitors*. *Journal of Basrah Researches*, 2011. **37**(4): p. 116-130.
15. Naik, U.J., et al., *Electrochemical and theoretical investigation of the inhibitory effect of two Schiff bases of benzaldehyde for the corrosion of aluminium in hydrochloric acid*. *Journal of Molecular Structure*, 2016. **1125**: p. 63-72.
16. Singh, P. and M.A. Quraishi, *Corrosion inhibition of mild steel using Novel Bis Schiff's Bases as corrosion inhibitors: Electrochemical and Surface measurement*. *Measurement*, 2016. **86**: p. 114-124.
17. Marrec, O., *Synthèse de pyrroles fluoroalkylés: nouvelles réactions de trifluorométhoxylation nucléophile: application à la synthèse d'hétérocycles trifluorométhoxylés*, 2009, thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I.
18. PAWAR, V., V. UMA, and S. JOSHI, *SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL STUDIES OF SCHIFF BASES METAL COMPLEXES CO (II), ZN (II), NI (II), AND MN (II) DERIVED FROM AMOXICILLIN TRIHYDRATE WITH VARIOUS ALDEHYDES*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2011. **2**: p. 240-250.
19. Schiff, H., *Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: eine neue Reihe organischer Basen*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1864. **131**(1): p. 118-119.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

20. Holm, R. and M. O'connor, *The stereochemistry of bis-chelate metal (II) complexes*. Progress in Inorganic Chemistry, Volume 14, 1971: p. 241-401.
21. FELLAH, M.F.Z.C., *Synthèse et détermination structurale de complexes de métaux de transition et d'entités 3d-4f*, 2008, thèse de doctorat, INSA Rennes.
22. Mugerli, L., *Microarrays fonctionnels de gouttes: de la synthèse chimique combinatoire au criblage de molécules bioactives*, 2006, thèse de doctorat, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
23. OUARI, K., *Synthèse de ligands bases de schiff tetradentates non symétriques et obtention de complexes de métaux de transition.-propriétés électro catalytiques appliquées au modèle cytochrome p450*, 2008, thèse de doctorat, FERHAT ABBAS SETIF.
24. Bringmann, G., et al., *Ancistrotanine C and Related 5, 1'-and 7, 3'-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids from Ancistrocladus tanzaniensis 1*. Journal of natural products, 2004. **67**(5): p. 743-748.
25. Souza, A.O.d., et al., *Antimycobacterial and cytotoxicity activity of synthetic and natural compounds*. Química Nova, 2007. **30**(7): p. 1563-1566.
26. da Silva, C.M., et al., *Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities*. Journal of Advanced Research, 2011. **2**(1): p. 1-8.
27. Abdul, R., *Synthesis and biological studies of some Schiff base compounds and their transition metal complexes*, 2005, thèse de doctorat, Bahauddin Zakariya University, Multan.
28. HENNI, A., *Synthèses et Caractérisations des Ligands, Complexes de Zinc et Complexes de Zinc-Alcalino-terreux*, 2013, thèse de magister, Université ABOU BEKR BELKAID, TLEMCEN.
29. Dutta, S. and A. Chakravorty, *Water soluble manganese (III) and manganese (IV) complexes of tridentate onco ligands*. Polyhedron, 1994. **13**(12): p. 1811-1816.
30. Nanjundan, N., et al., *Distorted tetrahedral bis-(N, S) bidentate Schiff base complexes of Ni (II), Cu (II) and Zn (II): Synthesis, characterization and biological studies*. Polyhedron, 2016. **110**: p. 203-220.
31. Bag, S., et al., *Syntheses and characterizations of square planar nickel (II) complexes with pendant ligands: Examples of bi-dentate bonding modes of*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- potentially tri-and tetra-dentate Schiff bases*. Polyhedron, 2013. **65**: p. 229-237.
32. Bhattacharyya, A., et al., *Synthesis, characterization and self-assembly of three dicyanamide bridged polynuclear copper (II) complexes with N 2 O donor tridentate Schiff bases as blocking ligands*. Polyhedron, 2016.
33. Sarkar, N., P.K. Bhaumik, and S. Chattopadhyay, *Manganese (III) complexes with tetradentate salicylaldimine Schiff bases: Synthesis, structure, self assembly and catalase activity*. Polyhedron, 2016. **115**: p. 37-46.
34. Roy, M., et al., *An experimental and computational investigations of supramolecular anion- π/π - π/π -anion assemblies in mononuclear Zn (II) complexes with a versatile tetradentate N-donor Schiff base ligand*. Polyhedron, 2015. **102**: p. 764-772.
35. Pérez-Pérez, J., et al., *Schiff pentadentate ligands based on an [ON 2 O 2] core displaying structural isomerism and their coordination to dibutyltin moieties*. Inorganic Chemistry Communications, 2016. **70**: p. 75-78.
36. Krüger, C., et al., *Iron (III) complexes with pentadentate Schiff-base ligands: Influence of crystal packing change and pseudohalido coligand variations on spin crossover*. Polyhedron, 2015. **87**: p. 194-201.
37. Ekmekcioglu, P., et al., *Synthesis, structural and biochemical activity studies of a new hexadentate Schiff base ligand and its Cu (II), Ni (II), and Co (II) complexes*. Journal of Molecular Structure, 2015. **1099**: p. 189-196.
38. Zheng, Y., et al., *One pot synthesis of imines from aromatic nitro compounds with a novel Ni/SiO₂ magnetic catalyst*. Catalysis letters, 2009. **128**(3-4): p. 465-474.
39. Westheimer, F. and K. Taguchi, *Catalysis by molecular sieves in the preparation of ketimines and enamines*. The Journal of Organic Chemistry, 1971. **36**(11): p. 1570-1572.
40. Love, B.E. and J. Ren, *Synthesis of sterically hindered imines*. The Journal of Organic Chemistry, 1993. **58**(20): p. 5556-5557.
41. Look, G.C., et al., *Trimethylorthoformate: a mild and effective dehydrating reagent for solution and solid phase imine formation*. Tetrahedron letters, 1995. **36**(17): p. 2937-2940.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

42. Chakraborti, A.K., S. Bhagat, and S. Rudrawar, *Magnesium perchlorate as an efficient catalyst for the synthesis of imines and phenylhydrazones*. Tetrahedron letters, 2004. **45**(41): p. 7641-7644.
43. BILLMAN, J.H. and K.M. TAI, *Reduction of schiff bases. II. Benzhydrylamines and structurally related compounds 1a, b*. The Journal of Organic Chemistry, 1958. **23**(4): p. 535-539.
44. White, W.A. and H. Weingarten, *A versatile new enamine synthesis*. The Journal of Organic Chemistry, 1967. **32**(1): p. 213-214.
45. Branchaud, B.P., *Studies on the preparation and reactions of tritylsulfenimines*. The Journal of Organic Chemistry, 1983. **48**(20): p. 3531-3538.
46. Armstrong, J.D., et al., *A novel synthesis of disubstituted ureas using titanium (IV) isopropoxide and sodium borohydride*. Tetrahedron letters, 1997. **38**(9): p. 1531-1532.
47. Liu, G., et al., *Synthesis of enantiomerically pure N-tert-butanefulfinyl imines (tert-butanefulfinimines) by the direct condensation of tert-butanefulfinamide with aldehydes and ketones*. The Journal of Organic Chemistry, 1999. **64**(4): p. 1278-1284.
48. Roman, G. and M. Andrei, *New Schiff bases from ortho-hydroxy aryl aldehydes*. Bull Chem Technol Macedonia, 2001. **20**(2): p. 131-6.
49. Samec, J.S. and J.E. Bäckvall, *Ruthenium-Catalyzed Transfer Hydrogenation of Imines by Propan-2-ol in Benzene*. Chemistry—A European Journal, 2002. **8**(13): p. 2955-2961.
50. Baricordi, N., et al., *A new 'one-pot' synthesis of 2-substituted 3-nitro pyrrolidines through a multicomponent domino reaction*. Tetrahedron letters, 2004. **45**(7): p. 1373-1375.
51. Panneerselvam, P., et al., *Synthesis of Schiff bases of 4-(4-aminophenyl)-morpholine as potential antimicrobial agents*. European journal of medicinal chemistry, 2005. **40**(2): p. 225-229.
52. Dalpozzo, R., et al., *Erbium (III) triflate: a valuable catalyst for the synthesis of aldimines, ketimines, and enamines*. Synthesis, 2006. **2006**(07): p. 1127-1132.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

53. Naeimi, H., F. Salimi, and K. Rabiei, *Mild and convenient one pot synthesis of Schiff bases in the presence of P 2 O 5/Al 2 O 3 as new catalyst under solvent-free conditions*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2006. **260**(1): p. 100-104.
54. Kulkarni, A., S.A. Patil, and P.S. Badami, *Synthesis, characterization, DNA cleavage and in vitro antimicrobial studies of La (III), Th (IV) and VO (IV) complexes with Schiff bases of coumarin derivatives*. European journal of medicinal chemistry, 2009. **44**(7): p. 2904-2912.
55. Varma, R.S., R. Dahiya, and S. Kumar, *Clay catalyzed synthesis of imines and enamines under solvent-free conditions using microwave irradiation*. Tetrahedron letters, 1997. **38**(12): p. 2039-2042.
56. Schmeyers, J., et al., *Quantitative solid–solid synthesis of azomethines*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1998(4): p. 989-994.
57. Vass, A., J. Dudás, and R.S. Varma, *Solvent-free synthesis of N-sulfonylimines using microwave irradiation*. Tetrahedron letters, 1999. **40**(27): p. 4951-4954.
58. Tanaka, K. and R. Shiraishi, *Clean and efficient condensation reactions of aldehydes and amines in a water suspension medium*. Green Chemistry, 2000. **2**(6): p. 272-273.
59. Andrade, C.K.Z., et al., *Molecular sieves in ionic liquids as an efficient and recyclable medium for the synthesis of imines*. Synlett, 2004. **2004**(12): p. 2135-2138.
60. Vázquez, M.Á., et al., *Infrared Irradiation: Effective Promoter in the Formation of N-Benzylideneanilines in the Absence of Solvent*. Synthetic communications, 2004. **34**(15): p. 2705-2718.
61. Gopalakrishnan, M., et al., *Silica gel supported sodium hydrogen sulfate as an efficient and reusable heterogeneous catalyst for the synthesis of imines in solvent-free conditions under microwave irradiation*. Journal of Chemical Research, 2005. **2005**(5): p. 299-303.
62. Gopalakrishnan, M., et al., *New environmentally-friendly solvent-free synthesis of imines using calcium oxide under microwave irradiation*. Research on Chemical Intermediates, 2007. **33**(6): p. 541-548.
63. Guzen, K.P., et al., *Eco-friendly synthesis of imines by ultrasound irradiation*. Tetrahedron letters, 2007. **48**(10): p. 1845-1848.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

64. Gedye, R., et al., *The use of microwave ovens for rapid organic synthesis*. Tetrahedron letters, 1986. **27**(3): p. 279-282.
65. Giguere, R.J., et al., *Application of commercial microwave ovens to organic synthesis*. Tetrahedron letters, 1986. **27**(41): p. 4945-4948.
66. Baquero, F., *Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 1997. **39**(suppl 1): p. 1-6.
67. Alekshun, M.N. and S.B. Levy, *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1037-1050.
68. Rice, L.B., *Unmet medical needs in antibacterial therapy*. Biochemical pharmacology, 2006. **71**(7): p. 991-995.
69. Mohamed, G.G., E.M. Zayed, and A.M. Hindy, *Coordination behavior of new bis Schiff base ligand derived from 2-furan carboxaldehyde and propane-1, 3-diamine. Spectroscopic, thermal, anticancer and antibacterial activity studies*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **145**: p. 76-84.
70. Sundriyal, S., R.K. Sharma, and R. Jain, *Current advances in antifungal targets and drug development*. Current medicinal chemistry, 2006. **13**(11): p. 1321-1335.
71. Martins, C., et al., *In vitro studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers*. Journal of applied microbiology, 2009. **107**(4): p. 1279-1286.
72. Martins, C., et al., *Curcumin as a promising antifungal of clinical interest*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2009. **63**(2): p. 337-339.
73. Schetter, A.J., N.H. Heegaard, and C.C. Harris, *Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 37-49.
74. Aggarwal, B.B., R. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(2): p. 425-430.
75. Rakesh, K., H. Manukumar, and D.C. Gowda, *Schiff's bases of quinazolinone derivatives: Synthesis and SAR studies of a novel series of potential anti-inflammatory and antioxidants*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2015. **25**(5): p. 1072-1077.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

76. Chang, C.-C., et al., *Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms*. Journal of bioscience and bioengineering, 2011. **111**(5): p. 501-511.
77. Takahashi, H., et al., *Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory*. Journal of bioscience and bioengineering, 2006. **102**(1): p. 46-52.
78. Bayala, B., *Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes*, 2014, thèse de doctorat, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
79. Kumar, M., T. Padmini, and K. Ponnuvel, *Synthesis, characterization and antioxidant activities of Schiff bases are of cholesterol*. Journal of Saudi Chemical Society, 2014.
80. RICHARD, C., *Sir Alexander Fleming, le découvreur de la pénicilline et son biographe André Maurois*. L'Eurobiologiste, 1996. **30**(224): p. 23-27.
81. Abraham, E., et al., *Further observations on penicillin. 1941*. European journal of clinical pharmacology, 1992. **42**(1): p. 3.
82. Fleming, A., *Penicillin*. British medical journal, 1941. **2**(4210): p. 386.
83. Bonsignore, L., et al., *Synthesis and antimicrobial activity of coumarin and benzodioxazepine-, diazazepine-and benzoxazepine-substituted penicillins*. European journal of medicinal chemistry, 1994. **29**(6): p. 479-485.
84. Yatsimirskaya, N.T., I.N. Sosnovskaya, and A.K. Yatsimirsky, *Spectrophotometric determination of 6-aminopenicillanic and 7-aminocephalosporanic acids as the schiff bases with para-dimethylaminobenzaldehyde in the presence of sodium dodecyl sulfate micelles*. Analytical biochemistry, 1995. **229**(2): p. 249-255.
85. Lacroix, S., *Synthèse de précurseurs soufrés pour le radiomarquage au fluor-18 de sondes d'hypoxie à motifs perfluorés*, 2006, UCL.
86. Maienfisch, P. and R.G. Hall, *The importance of fluorine in the life science industry*. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2004. **58**(3): p. 93-99.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

87. Purser, S., et al., *Fluorine in medicinal chemistry*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(2): p. 320-330.
88. Alcives Avila-Sorrosa, J.I.H.-G., Alicia Reyes-Arellano, Rubén A. Toscano, Reyna Reyes-Martínez, J. Roberto Pioquinto-Mendoza, David Morales-Morales, *Synthesis, structural characterization and biological activity of fluorinated Schiff-bases of the type [C₆H₄-1-(OH)-3-(CHNArF)]*. Journal of Molecular Structure, 2015. **1085**: p. 249-257.
89. Pang, W., et al., *Synthesis, characterization and comparative study of a series of fluorinated Schiff bases containing different orientation CHN spacers*. Journal of Molecular Structure, 2015. **1096**: p. 21-28.
90. Kumar, B.N.P., K.N. Mohana, and L. Mallesha, *Synthesis and antiproliferative activity of some new fluorinated Schiff bases derived from 1, 2, 4-triazoles*. Journal of Fluorine Chemistry, 2013. **156**: p. 15-20.
91. Mesplède, J. and J. Randon, *100 manipulations de chimie générale et analytique* 2004: Editions Bréal.
92. Jensen, W.B. *THE OESPER COLLECTIONS IN THE HISTORY OF CHEMISTRY*. in *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*. 2002. AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA.
93. Rouessac, F. and A. Rouessac, *Analyse Chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes* 2000: Dunod.
94. Primer, A., *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. Copyright Hewlett-Packard Company, Hewlett-Packard publication, (12-5965).
95. George, W.O. and P.S. McIntyre, *Infrared spectroscopy* 1987: John Wiley & Sons Inc.
96. Günther, H., et al., *La spectroscopie de RMN: principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie* 1994: Masson.
97. Hesse, M., et al., *Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique* 1997: Masson.
98. De Hoffmann, E., J. Charette, and V. Stroobant, *Spectrométrie de masse*. 1994.
99. Sekhri, L., *HPLC Resolution of Their Isomers*. 2005.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

100. Wayne, P., *National committee for clinical laboratory standards*. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing, 2002. **12**.
101. Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
102. Milcent, R., *Chimie organique hétérocyclique: structures fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels*2003: L'Editeur: EDP Sciences.
103. Parikh, V.M., *Absorption spectroscopy of organic molecules*1974: Addison Wesley Publishing Company.
104. Mercier, J.-P. and P. Godard, *Chimie organique: une initiation*2001: PPUR presses polytechniques.
105. Coates, J., *Interpretation of infrared spectra, a practical approach*. Encyclopedia of analytical chemistry, 2000.
106. Grare, M., *De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène: études moléculaire (s), cellulaires (s) et structurale (s) en vue de l'identification des cibles d'action: le cas du para-guanidinoéthylcalix [4] arène*, 2009, Nancy 1.
107. Pontié, M., et al., *Traitement des eaux destinées à la consommation humaine*. L'actualité chimique, 2006(301-302): p. 2.
108. Bonnet-Delpon, D. *Le fluor: un élément essentiel en chimie médicinale*. in *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2008. Elsevier.
109. Banks, R.E. and K. Lowe, *Fluorine in Medicine in the 21st Century: Conference Papers*1994: University of Manchester Instit. of Science and Tech.
110. Liang, N. and D.D. Kitts, *Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action*. Molecules, 2014. **19**(11): p. 19180-19208.

Annexe

ANNEXE



Annexe01 : Montage de synthèse de BP₁, 4AETFP, BF₁

ANNEXE



Annexe 02 : Appareil de Point du fusion



Annexe 03 : Spectrophotomètre UV- Visible

ANNEXE



Annexe 04 : spectromètre IR



**Annexe 05 : Analyse par GC/MS
Agilent 6890, couplé avec un spectromètre de masse type Agilent 5975B**

ANNEXE

acqmeth

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS

C:\MSDCHEM\1\METHODS\TR-FAME standard.M

Control Information

Sample Inlet : GC
Injection Source : GC ALS
Mass Spectrometer : Enabled

6890 GC METHOD

OVEN

Initial temp: 40 'C (On) Maximum temp: 260 'C
Initial time: 2.00 min Equilibration time: 0.50 min
Ramps:
 # Rate Final temp Final time
 1 10.00 240 8.00
 2 0.0(off)
Post temp: 0 'C
Post time: 0.00 min
Run time: 30.00 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Split
Initial temp: 240 'C (On)
Pressure: 12.78 psi (On)
Split ratio: 25:1
Split flow: 19.9 mL/min
Total flow: 23.3 mL/min
Gas saver: On
Saver flow: 20.0 mL/min
Saver time: 2.00 min
Gas type: Helium

BACK INLET (UNKNOWN)

COLUMN 1

Capillary Column
Model Number: THERMO 260M154P
TR-FAME
Max temperature: 260 'C
Nominal length: 60.0 m
Nominal diameter: 250.00 um
Nominal film thickness: 0.25 um
Mode: constant flow
Initial flow: 0.8 mL/min
Nominal init pressure: 12.78 psi
Average velocity: 23 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

COLUMN 2

(not installed)

FRONT DETECTOR (NO DET)

BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1

Data rate: 20 Hz
Type: test plot
Save Data: Off

SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz
Type: test plot
Save Data: Off

Page 1

ANNEXE

Zero: 0.0 (off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

acqmeth
Zero: 0.0 (off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

COLUMN COMP 1
(No Detectors Installed)

COLUMN COMP 2
(No Detectors Installed)

THERMAL AUX 2
Use: MSD Transfer Line Heater
Description:
Initial temp: 280 'C (On)
Initial time: 0.00 min
Rate Final temp Final time
1 0.0(off)

POST RUN
Post Time: 0.00 min

TIME TABLE
Time Specifier Parameter & Setpoint

GC Injector

Front Injector:
Sample Washes 0
Sample Pumps 2
Injection Volume 1.00 microliters
Syringe Size 10.0 microliters
PreInj Solvent A Washes 10
PreInj Solvent B Washes 10
PostInj Solvent A Washes 10
PostInj Solvent B Washes 10
Viscosity Delay 0 seconds
Plunger Speed Fast
PreInjection Dwell 0.00 minutes
PostInjection Dwell 0.00 minutes

Back Injector:
No parameters specified
Column 1 Inventory Number :
Column 2 Inventory Number :

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
Acquisition Mode : Scan

MS Information

Solvent Delay : 5.00 min

ANNEXE

```
acqmeth
EM Absolute      : False
EM Offset        : 0
Resulting EM voltage : 1870.6

[Scan Parameters]
Low Mass         : 40.0
High Mass        : 450.0
Threshold        : 150
Sample #         : 2      A/D Samples  4
Plot 2 low mass  : 40.0
Plot 2 high mass : 450.0

[MSZones]
MS Quad          : 150 C   maximum 200 C
MS Source        : 230 C   maximum 250 C
```

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

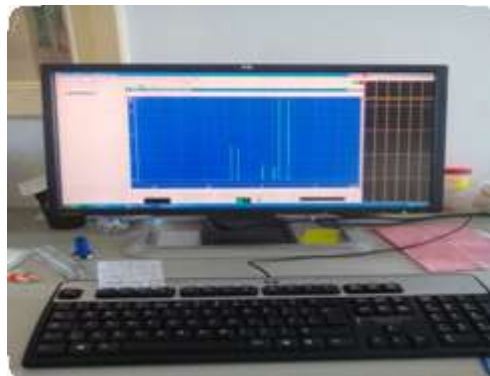
TUNE PARAMETERS for SN: US10630062

```
-----
EMISSION      : 34.610
ENERGY        : 69.922
REPELLER      : 19.568
IONFOCUS      : 90.157
ENTRANCE_LE   : 32.000
EMVOLTS       : 1870.588
AMUGAIN       : 1543.000
AMUOFFSET     : 123.750
FILAMENT      : 2.000
DCPOLARITY    : 0.000
ENTLENSOFFS   : 16.565
MASSGAIN      : -877.000
MASSOFFSET    : -38.000
```

END OF TUNE PARAMETERS

END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

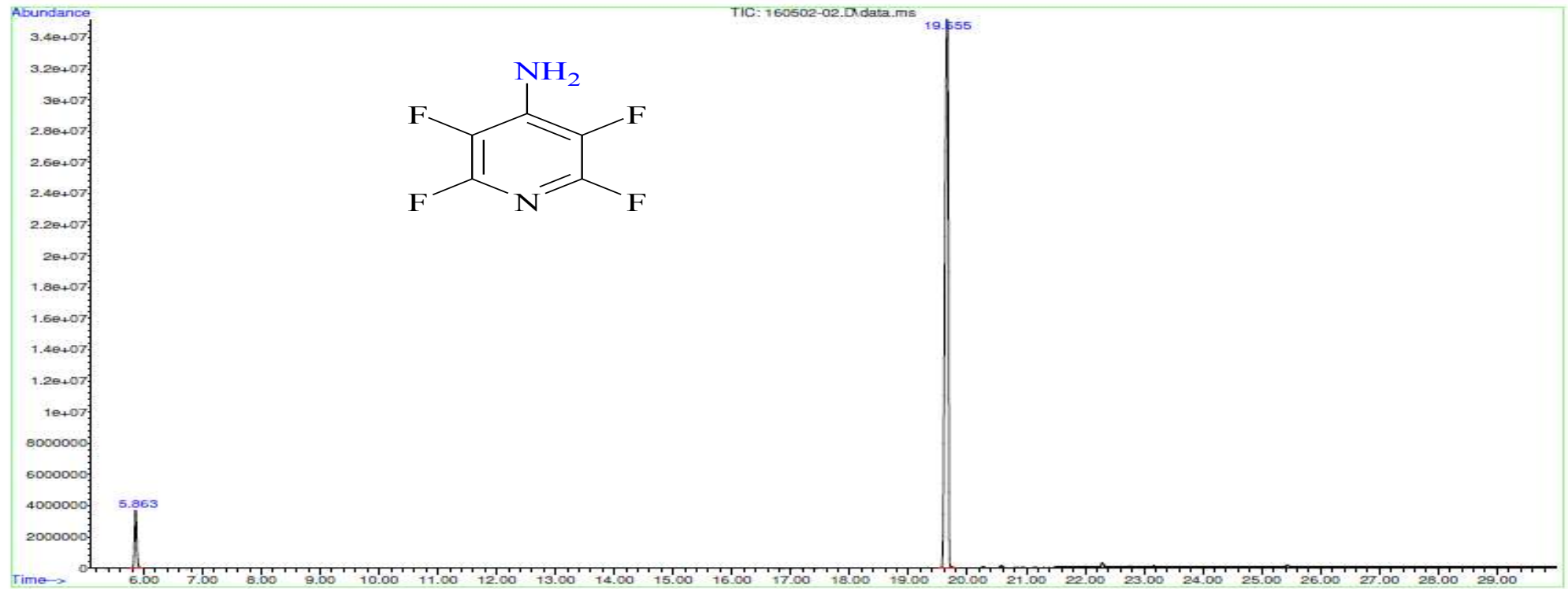
ANNEXE



**Annexe 07 : Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire BRUKER
Ultrashield Plus 500 spectromètre**

ANNEXE

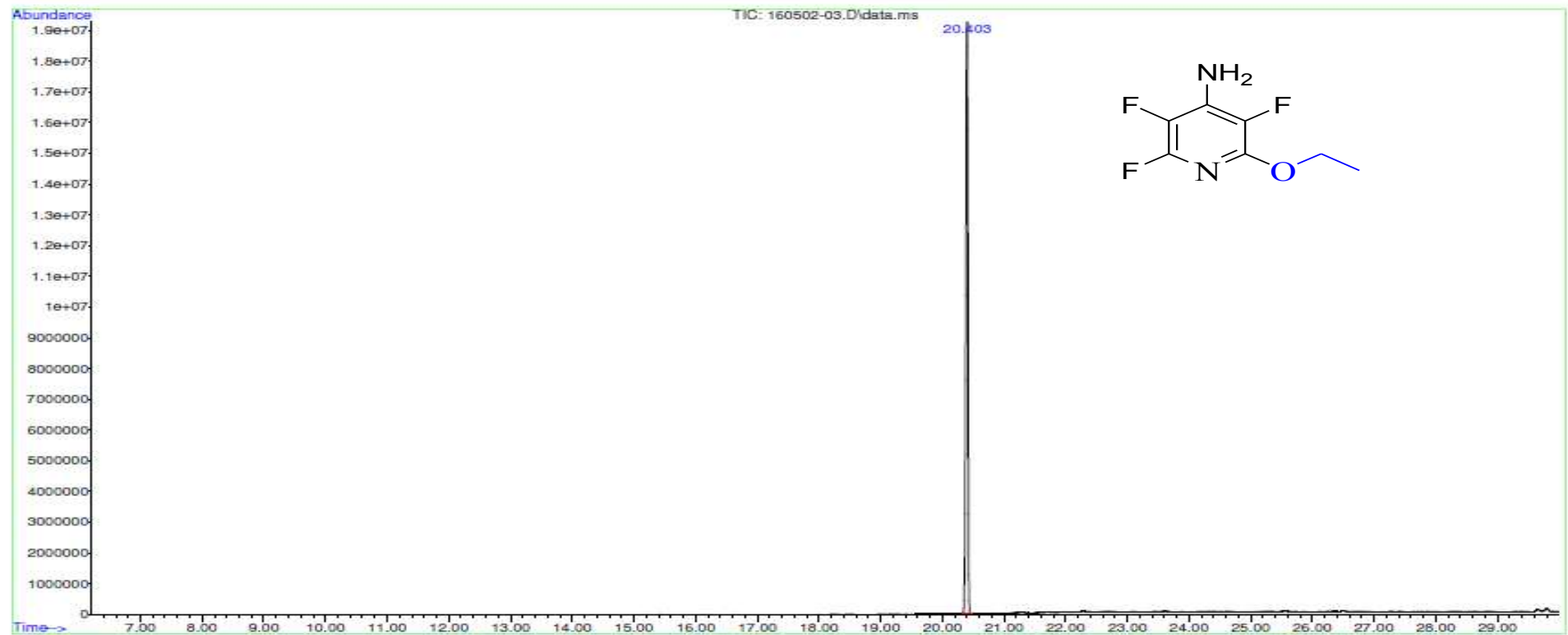
File :C:\msdchem\1\DATA\2016\Mai 2016\160502-02.D
Operator : ok
Acquired : 2 May 2016 13:02 using AcqMethod TR-FAME STANDARD.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 570-1
Misc Info : A externe
Vial Number: 72



Annexe 08 : chromatogrammes GC/MS de composé 4ATFP

ANNEXE

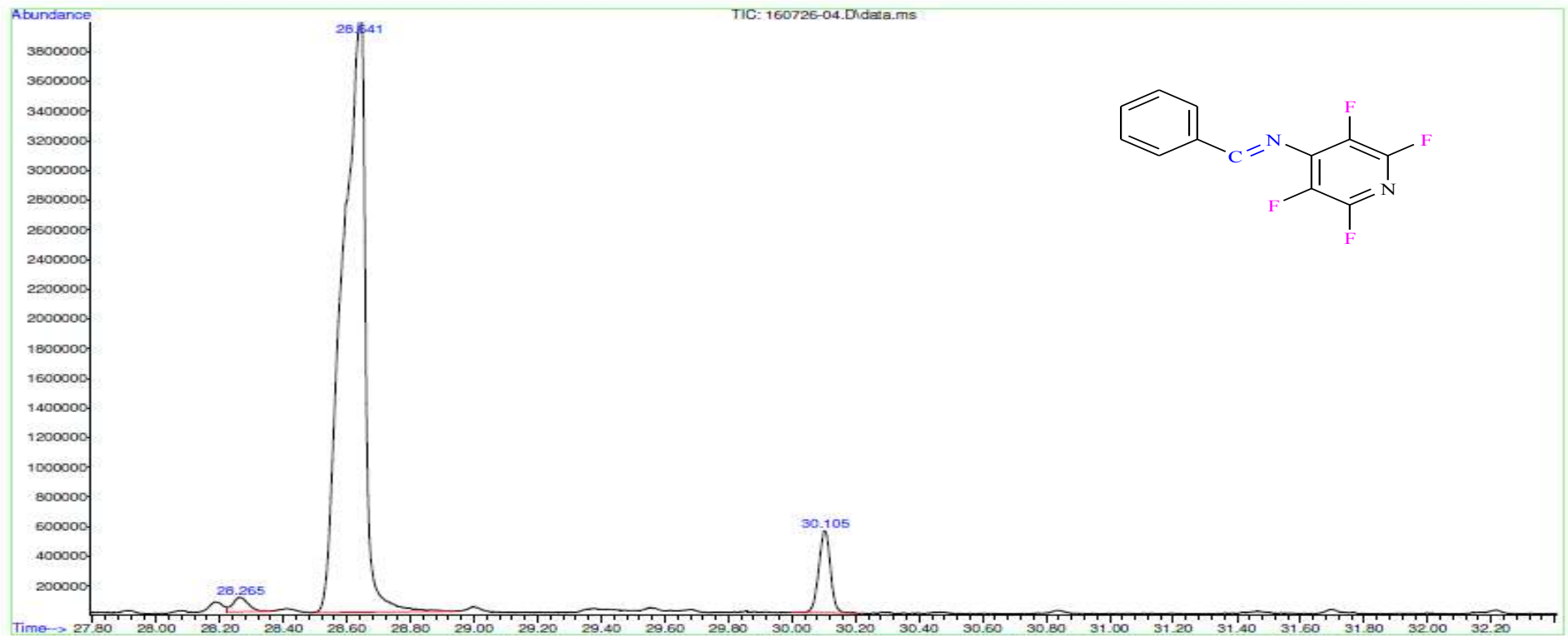
File :C:\msdchem\1\DATA\2016\Mai 2016\160502-03.D
Operator :ok
Acquired : 2 May 2016 13:42 using AcqMethod TR-FAME STANDARD.M
Instrument : GCMS
Sample Name : 570-2
Misc Info : A externe
Vial Number : 73



Annexe 09 : chromatogrammes GC/MS de composé 4AETFP

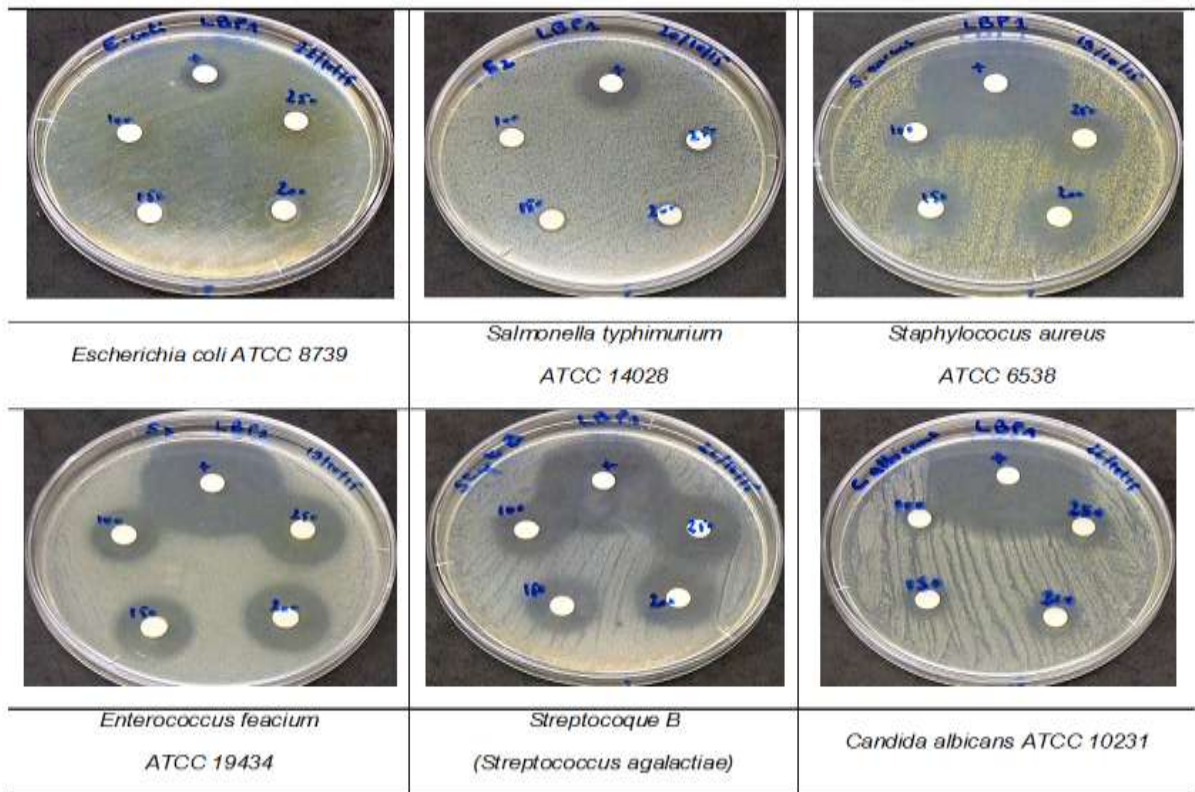
ANNEXE

File :C:\msdchem\1\DATA\2016\juillet 2016\160726-04.D
Operator : BS
Acquired : 26 Jul 2016 13:42 using AcqMethod HP5MS-STANDARDLESS60 MIN.M
Instrument : GCMS
Sample Name: 895/1
Misc Info : externe
Vial Number: 2

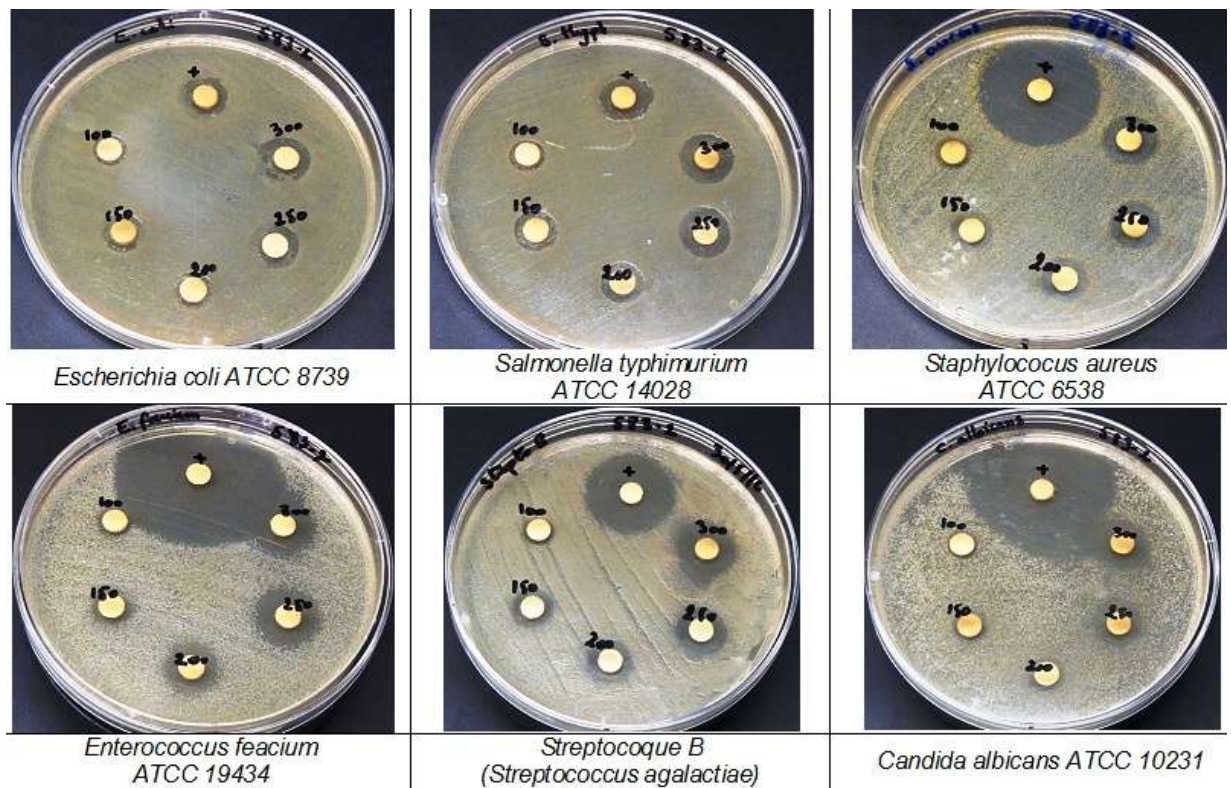


Annexe 10: chromatogrammes GC/MS de composé BF₁

ANNEXE

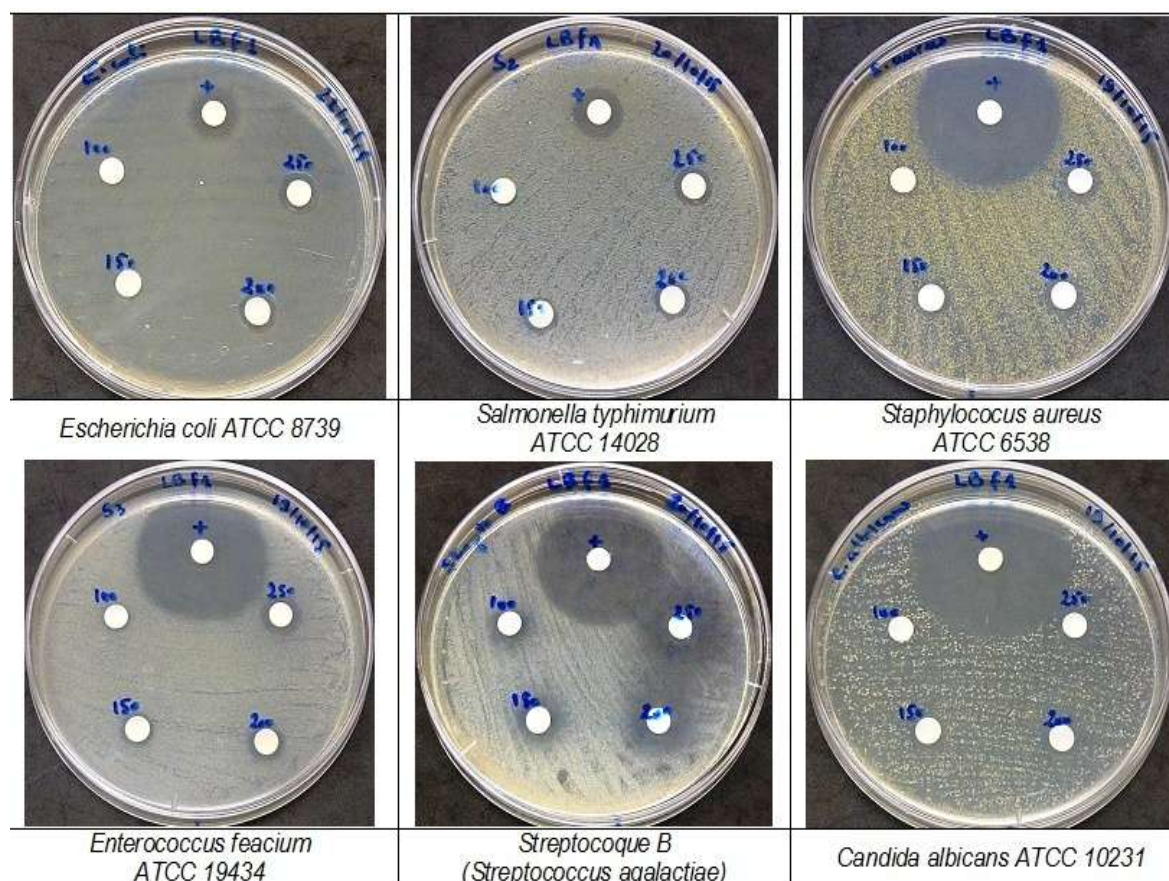


Annexe 11 : l'activité antibactérienne et anti fongique de BP₁

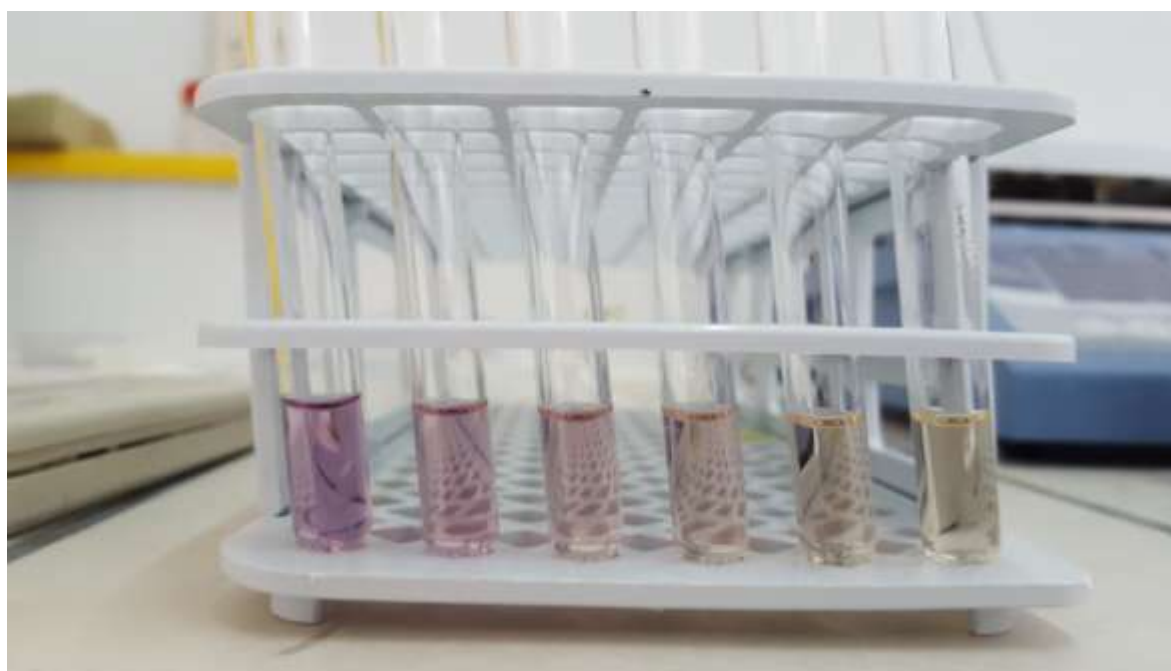


Annexe 12 : l'activité antibactérienne et anti fongique de 4AETFP

ANNEXE



Annexe 13 : l'activité antibactérienne et anti fongique de BF1



Annexe 14 : Test DPPH

Publications



Studies on the Synthesis of Fluorinated Schiff Bases; Biological Activity of Resulting (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine and 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine

IMANE RAACHE, LAKHDAR SEKHRI* and AHMED TABCHOUCHE

Lab. Dynamic Interactions and Reactivity of Systems, Process Engineering Department, Faculty of Applied Sciences, University Kasdi Merbah, Ouargla 30000, Algeria.

*Corresponding author E-mail : sekhriil@yahoo.fr

<http://dx.doi.org/10.13005/ojc/320408>

(Received: June 28, 2016; Accepted: July 30, 2016)

ABSTRACT

The present work is aimed mainly to synthesize new fluorinated compounds and their biological significance against tested bacteria and fungus. Thus, the 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4 was synthesized by the reaction of 4-amino 2,3,5,6-tetrafluoropyridine 1 with benzaldehyde 2 in EtOH to obtain the pure product as white crystals in 33% yield. The purity of this compound was estimated by TLC technique and microanalysis while its structure was supported by the usual spectroscopic methods such as UV, infrared, ¹H. NMR, and gas chromatography coupled by a mass spectrometry (GC/MS). 4-amino 2,3,5,6-tetrafluoropyridine 1 coupled readily to benzaldehyde 2 when we have used THF as solvent resulting a new Schiff base (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine 3 in 48 % yield. Exploration of the anti-bacterial activity against both *gram-positive* and *gram-negative* bacteria showed that these compounds 3 and 4 compounds at a concentration of 250 µg/ml exhibited a slight activity towards *Enterococcus faecium*; *Streptococcus B* and *Staphylococcus aureus* exhibited a mild/moderate activity for the case of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* when compared to Ampicillin. From the results obtained by the antifungal activity, it is found that this fluorinated Schiff base 3 and fluorinated ethoxypyridine 4 are more active against *Candida albicans* at a concentration of 250 µg/ml when compared to Nystatine.

Keywords: Synthesis, Anti-bacterial activities, Antifungal activity, Fluorinated Schiff bases.

INTRODUCTION

Fluorinated compounds have gained an increasing interest due to their successful

applications in different fields of chemistry, such as supramolecular studies; design of new materials and as important starting materials in the syntheses of new molecules with biological functions.¹⁻⁴

Due to its small steric size, fluorine has been used as a replacement for hydrogen in many biologically active molecules, including amino acids.⁴ And the introduction of fluorine into an organic molecule via electrophilic or nucleophilic reactions and most commonly, from fluorinated building blocks, have become a key in the search and discovery of new drugs or increasing the activity of those that already exist; fluorine can cause significant changes in an organic molecule, mainly by its electron-withdrawing inductive effect, which in turn causes differences in interactions with biological receptors or enzymes, as well as on the metabolic fate of the drug.^{5, 6} It is curious that notwithstanding the abundance of this element, natural fluorinated compounds are very rare. In fact, most of the known fluorinated organic compounds have been synthesized in the laboratory.⁷

On the other hand, Schiff bases, named after Hugo Schiff,⁸ are formed when any primary amine reacts with an aldehyde or a ketone under specific conditions. Structurally, a Schiff base (also known as imine or azomethine) is an interesting compound with a functional group that contains a carbon–nitrogen double bond with the nitrogen atom connected to an aryl or alkyl group (R₂R₃C=N-R₁). The chain on the nitrogen makes the Schiff bases a stable imine.^{9, 10}

Schiff bases appear to be important intermediates in a number of enzymatic reaction involving interaction of the amino group of an enzyme, usually that of a lysine residue, with a carbonyl group of the substrate.¹¹

In general, Schiff bases have a wide range of potential applications in various biological fields,¹² also fluorinated Schiff bases derivatives have been widely studied because they have antifungal, antibacterial,^{1, 13, 14} DNA cleavage¹⁵ and anticancer¹⁶ activities which give it attracted remarkable attention.

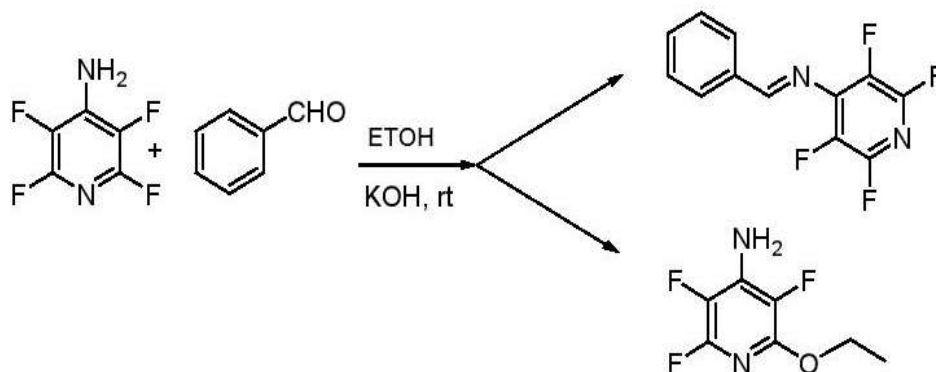
Thus, in this opportunity we report here the synthesis and characterization of new fluorinated compounds from 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** with benzaldehyde **2**. The structural analysis alongside with their preliminary studies of their biological activity on *gram-positive* and *gram-negative* bacteria and on *Candida Albicans* fungus of these compounds is also informed.

EXPERIMENTAL

Material

2,3,4,5,6-Pentafluoropyridine, KOH, and benzaldehyde are used without further purification as well as solvents dichloromethane, ethanol were purchased from Aldrich.

The microbiological material consists of five bacterial pathogens strains: *Escherichia coli* ATCC 8739 G (-), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 G (-) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 G (+), *Enterococcus faecium* ATCC 19434 G (+), *Streptococcus B* G (+) and a fungus specie is *Candida Albicans* ATCC 10231; were obtained from INRAP (National Institute of Research and physico-chemical analysis) of Tunisia.



Scheme 1: Synthesis of the fluorinated Schiff base 3 and fluorinated ethoxy ethoxy aminopyridine 4

Instrumentation

The FT-IR spectra were performed in the range from 4000 to 400 cm^{-1} on a SHIMADZU 2000 with KBr pellets. Melting points were determined in a Gallenamp capillary melting points apparatus and were reported without correction. The ^1H NMR spectra of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4** and (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** were recorded on a BRUKER Ultrashield Plus 500 spectrometer with frequency of 500 MHz, using DMSO- d_6 as solvent and internal standard at room temperature number of scan is (16-1K). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** were normally recorded at 35°C using a Perkin Elmer R10 or R12 or

Perkin Elmer Hitachi R20A spectrometer operating at 60°C MHz for ^1H NMR spectra and 54.6 MHz for ^{19}F NMR spectra. Tetramethylsilane (TMS) was used as a reference for ^1H NMR spectra and for ^{19}F NMR spectra, chemical shifts were measured relative to trifluoroacetic acid (TFA) as an external interchange reference unless otherwise stated. Positive chemical shifts are in ppm downfield of appropriate reference.

Mass spectra was performed at the INRAP (National Institute of Research and physico-chemical analysis) of Tunisia, The gas chromatograph used is an Agilent 6890, coupled to a mass spectrometer type Agilent 5975B with a quadrupole ionization

Table 1: Analytical data for compounds **1**, **3** and **4**

Comp.	Molecular Formula	Melting Point °C	Yield (%)	Physical state
1	$\text{C}_5\text{H}_2\text{N}_2\text{F}_4$	85-87	80	long white needles
34	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{F}_4\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{OF}_3$		80-8380-83	48,5248,52 white microcrystalline powder

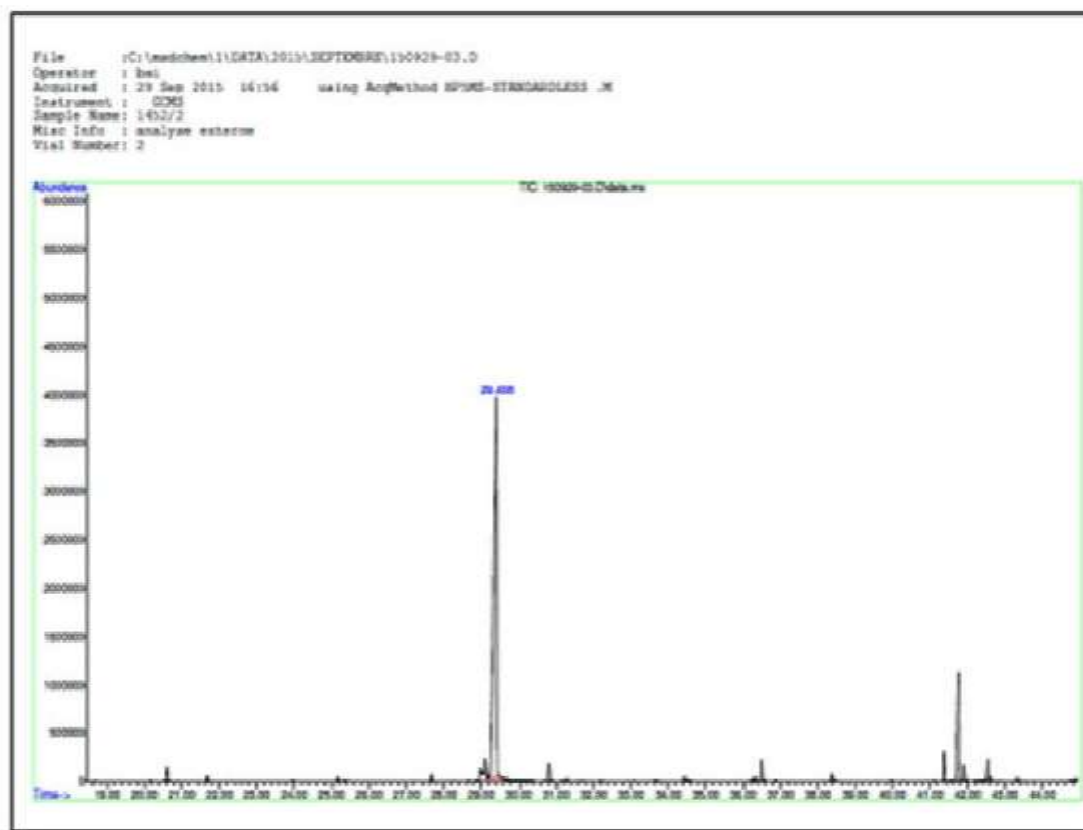


Fig. 1: GC-MS Chromatogram of (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3**

voltage of 70 eV. The column used is a TR-FAME; with a length of 60 m and an internal diameter equal to 250 μm . The wire thickness being 0.25 m.

The operating conditions are:

- The temperature of the injector (split mode): 240°C.
- The temperature programming: from 40°C to 260°C at a rate of 2°C/ minutes.
- The vector gas used is helium with a flow rate of 0.8 ml / minutes.

Procedure

Preparation of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine 1

4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** was synthesized from 2,3,4,5,6-Pentafluoropyridine (25 g, 148 mmol) was dissolved in THF (175 ml) in a round-bottomed flask equipped with a reflux condenser to give a clear solution. On addition of aqueous ammonia (0.88, 125 ml) a cloudy solution was produced and an exothermic reaction ensued. The mixture was then refluxed for 18 hours. The clear solution produced was poured into water (500

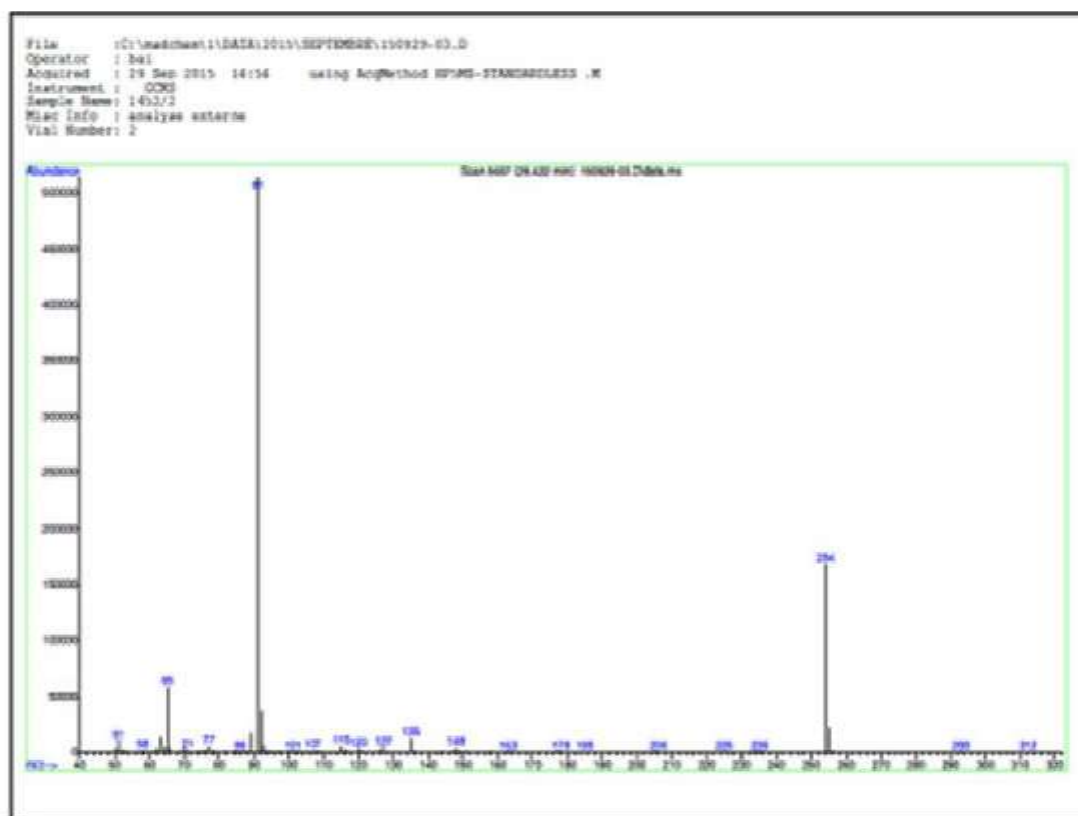
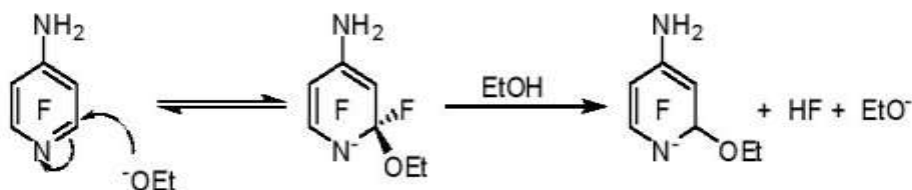


Fig. 2: Mass spectra of (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3**



Scheme-2

Scheme 2: Mechanism of nucleophilic substitution in amino-compound **1** by Nu (KOEt)

ml) and the whole mixture was extracted with ether (3x75ml). The extract was dried (MgSO_4), evaporated using rotary evaporator and the residue freed from the last traces of solvent in *vacuo*, to give a pale cream solid. Recrystallization of the crude material from light petroleum gave long white needles of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** (20 g, 0.12 mol, 80%), mp. 85–87°C; IR (KBr, cm^{-1}): 3500-3300 (NH str.) 1450-1190 Py-F; ^1H (CDCl_3): δ 5.05 (2H, br s, $-\text{NH}_2$; ^{19}F (CDCl_3): δ 15.1 (2F, m, F-2 and F-6), -85.1 (2F, F-3 and F-5); MS: m/z 166 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Preparation of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4**

0.93 g (5 mmol) of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** was added to potassium hydroxide 0.28 g (5 mmol) in 15 ml of ethanol contained in 50 mL three-necked round bottom flask equipped with a reflux condenser maintained under nitrogen. The mixture was stirred and heated to reflux for 1h. Then 0.53g (5 mmol) benzaldehyde was then added and the mixture was stirred at room temperature for 72 hours. The reaction was followed by TLC (petroleum ether /acetone, 95:5%). After filtration, the filtrate was vaporated using rotary evaporator and the residue freed from the last traces of solvent in *vacuo*, to afford a pale white solid which was then recrystallized from ethanol to yield a white microcrystalline powder corresponding to 2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridin-4-amine (0.66g, mmol, 48.52%), mp. 80–83°C; The product was identified by comparison its spectra with those of an authentic sample: IR (KBr, cm^{-1}): 3500-3300 (NH str.) 1450-1190 Py-F, 1250 (C-O asym str.) and 1040 (C-O sym str.); ^1H NMR (500 MHz, DMSO d_6): δ 1.4 (3H, t, CH_3), 4.2 (2H, q, CH_2) and 6.7 (2H, br s, $-\text{NH}_2$); MS: m/z 192 ($[\text{M}]^+$, 66.6%), 177 ($[\text{M}-\text{Me}]^+$, 29.33%), 164 ($[\text{M}-\text{Et}]^+$, 100%).

Preparation of (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3**

The previous procedure was used except THF was used instead of Ethanol. 0.83g of (5 mmol) of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** was added to potassium hydroxide 0.28g (5 mmol) in 15 ml of ethanol contained in 50 mL three-necked round bottom flask equipped with a reflux condenser maintained under nitrogen. The mixture was stirred and heated to reflux for 1h. Then 0.53 g (5 mmol) benzaldehyde was then added and the mixture was

stirred at room temperature for 72h. The reaction was followed by TLC (petroleum ether /acetone, 95:5%). After evaporation under vacuum a cream powder was obtained corresponding to new compound **3** (0.66 g, 48.52%), mp. 80–83°C; IR (KBr, cm^{-1}): 3000–2850 v C-H Aromatic, 1660–1614 C=N, 1100 $\mu\text{Py-F}$; MS: m/z 254 ($[\text{M}]^+$ 30.7%), 91 (C_7H_7) $^+$, 100%).

In the FT-IR spectra of the imino-compound **3**, a stretching vibration bands due to the presence of the C-H aromatic were observed in the range of 3000–2850 cm^{-1} . However, more important resulted the observation of strong stretching vibration bands due to the presence of the imino functional group (C=N) in the range of 1660–1614 cm^{-1} . The strong bands around 1100 cm^{-1} are attributed to the C-F stretching vibrations.

Antimicrobial studies

The evaluation of the antibacterial and Antifungal effects was tested by the agar diffusion test according to R. Alizadeh *et al*⁵

Antibacterial activity

The synthesized Schiff base (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** and 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4** were screened for their *in vitro* antibacterial activity against *Gram-negative* and *Gram-positive* bacterial strains.

A suspension of the tested microorganisms was spread on the appropriate solid media plates and incubated overnight at 37°C. After 1 day, 4-5 loops of pure colonies were transferred to saline solution in a test tube for each bacterial strain and adjusted to the 0.5 Mc Farland turbidity standards (~108 cells/mL). Sterile cotton dipped into the bacterial suspension and the agar plates were streaked three times, each time turning the plate at a 60° angle and finally rubbing the swab through the edge of the plate. Sterile paper discs (Glass Microfibre filters, Whatman; 6mm in diameter) were placed onto inoculated plates and impregnated with different concentrations of the Schiff base. Ampicillin (10 μg /disc) and solvent (DMSO) were used as positive and negative control for all strains.

Inoculated plates with discs were placed in a 37°C incubator. After 24 hours of incubation, the

results were recorded by measuring the zones of growth inhibition surrounding the disc. Clear inhibition zones around the discs indicated the presence of antimicrobial activity. The test was run in duplicate.

Antifungal activity

All cultures were routinely maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated at 28°C. The inoculums of non-sporing fungi, *Candida albicans* were performed by growing the culture in Sabouraud Dextrose broth at 37°C for overnight. Volume of 0.1 ml of diluted fungal culture suspension was spread with the help of spreader on SDA plates uniformly. Sterile 6 mm discs were impregnated with the test complexes. Wells of 6 mm size were cut and loaded with different concentrations of the Schiff base. Antibiotic disc, Nystatin (100 µg/disc) was used as positive control. *C. albicans* plates were incubated at 37°C for 18-48 h and antifungal activity was determined by measuring the diameters of the inhibition zone (mm).

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis part

The strategy we have adopted for the synthesis of fluorinated Schiff base, (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** and fluorinated ethoxy aminopyridine **4** was to condense 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** with benzaldehyde **2** by using EtOH as solvent and again by using THF as shown in (Scheme 1). The analytical and physical data are listed in Table 1.

(E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3**

As we might expect, the fluorinated base schiff **3** was successfully obtained when we used THF, and its structure was confirmed by the following spectroscopic data.

FT-IR spectrometry analysis

In the FT-IR spectra of the imino-compound **3**, a stretching vibration bands due to the presence of the C-H aromatic were observed in the range of 3000–2850 cm⁻¹. However, more important results were the observation of strong stretching vibration bands due to the presence of the imino functional group (C=N) in the range of 1660–1614 cm⁻¹. The

strong bands around 1100 cm⁻¹ are attributed to the C-F stretching vibrations.

Gas chromatography–mass spectrometry GC-MS analysis

Analytical GC-MS (70 eV) (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) of the Schiff base revealed the presence of one component only as shown in (Fig.1).

Mass spectroscopy

The mass spectrum was characteristic of a schiff base with a molecular ion at m/z 254 (66.6%); the major breakdown pattern is tbenzyl (C₆H₅CH₂ ion at m/z192 (100%) (Fig. 2).

4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4**

However, when we used EtOH as solvent, only **4** was produced and no schiff base **3** obtained. This could be interpreted that the presence of EtO-/EtOH in the mixture favored the nucleophilic substitution in order to yield **4** instead the nucleophilic addition to the carbonyl group of aldehyde in order to give the schiff base **3**.

In 2005 we reported that the reaction of 2,3,5,6-tetrafluoro-4-(2,4,6-trimethylphenylazo) pyridine with an equimolar of sodium methoxide in methanol gave 2,3,5-trifluoro-6-methoxy-4-(2,4,6-trimethylphenylazo) pyridine.¹⁷ This reaction is analogous to a reaction we carried out in this project which involved treating 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine **1** with equimolar of EtO-/EtOH. Moreover, the formation of product **4** provides further evidence that nucleophilic substitution in amino-compound **1** by *Nu* (KOEt) is directed strongly to the ortho positions.

As we might expected, the amino-compound **1** requires no more than its own inbuilt capacity for electron withdrawal and is itself attacked by powerful nucleophiles, e.g., by -OEt (sodium OEt ethoxide) in methanol. The F- leaving group is helped off by EtOH, HF being evolved and -OEt regenerated (Scheme-2).

The structure of compound **4** was confirmed by the following spectroscopic data:

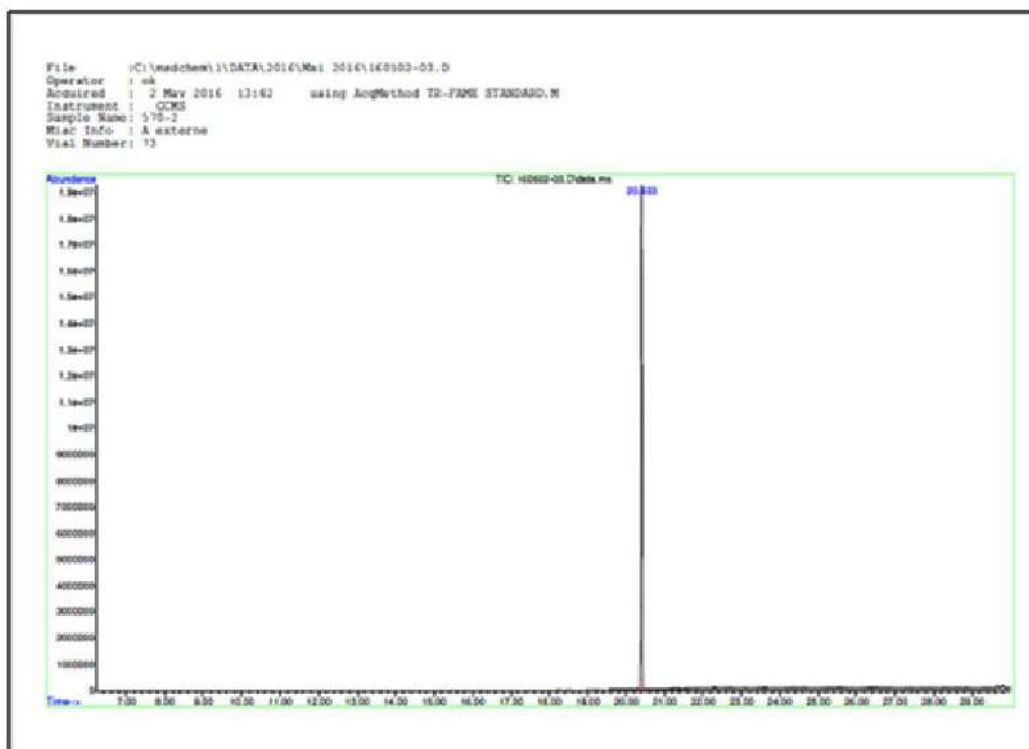


Fig. 3: GC-MS Chromatogram of amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4

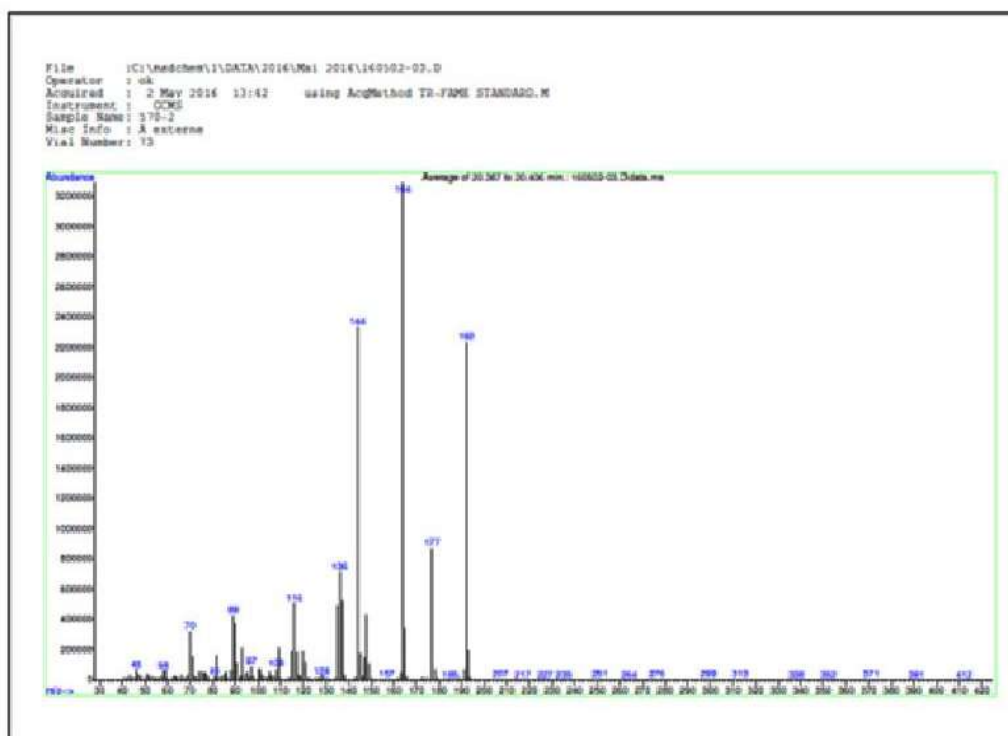


Fig. 4: Mass spectra of amino-2-ethoxy-3,5,6- trifluoropyridine 4

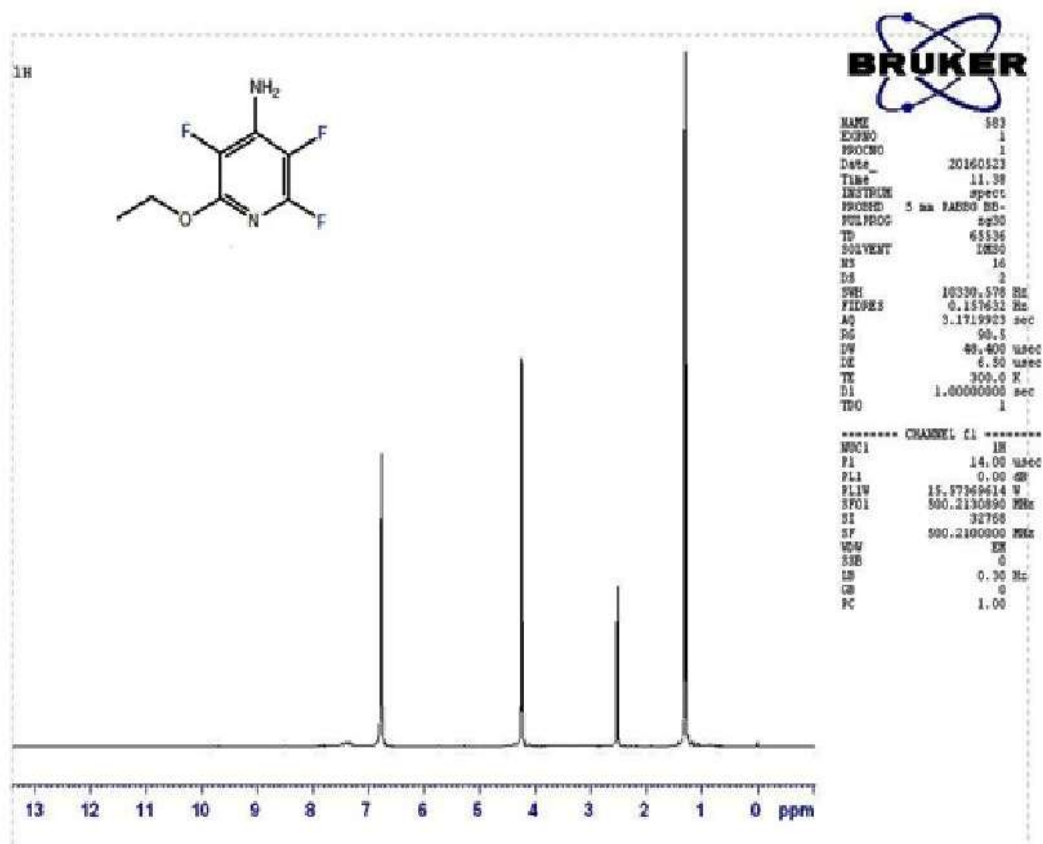
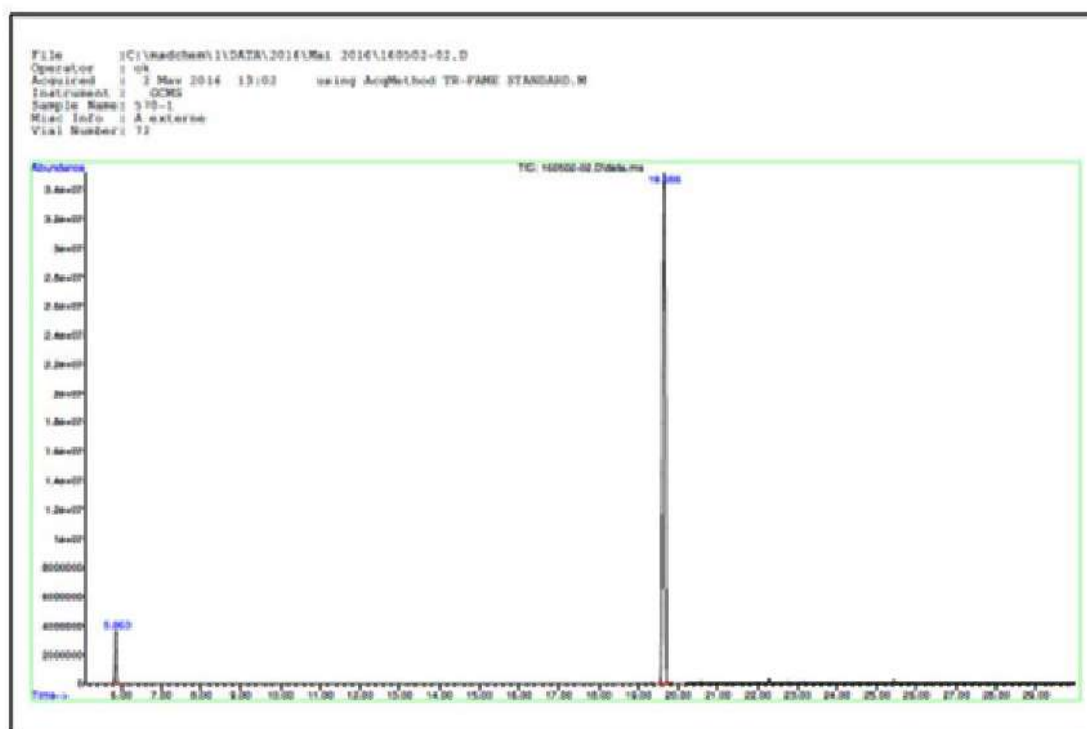
Fig. 5 : ¹H NMR spectrum of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4

Fig. 6: GC-MS of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine 1

FT-IR spectrometry analysis

The IR spectrum showed that the amino group was still present (3500-3300 (NH str.), 1450-1190 Py-F, 1250 (C-O asym str.) and 1040 (C-O sym str.)

Gas chromatography–mass spectrometry analysis

Analytical GC-MS (70 eV) (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4 revealed the presence of one component only as shown in (Fig. 3).

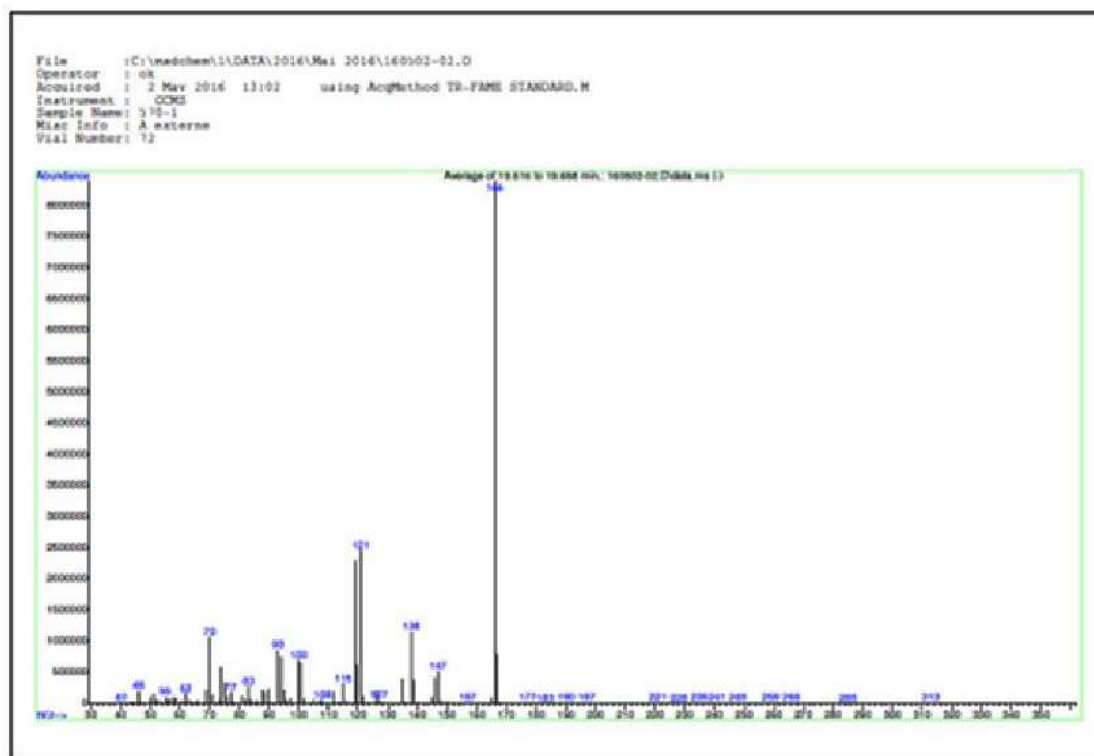


Fig.7: Mass spectra of 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine 1

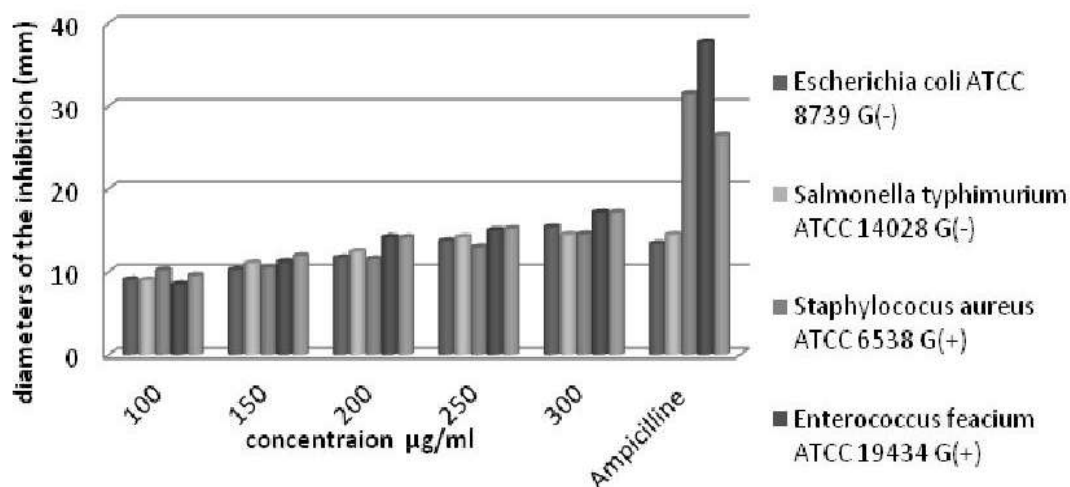


Fig. 8: The influence of difference concentrations of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4 vs the inhibition diameter on the five bacterial pathogens strains

Mass spectroscopy

The mass spectrum showed a molecular ion at m/z 192 and base peak at m/z 164 as shown in (Fig. 4).

4.2 (2H, q, CH_2) and 6.7 (2H, br s, $-\text{NH}_2$) as shown in (Fig.5).

 ^1H NMR spectrometry analysis

^1H NMR spectrum comprises three absorptions of intensity 3 : 2 : 2 at 1.4 (3H, t, CH_3),

Starting material 4-amino-2,3,5,6-tetrafluoropyridine 1

The purity of starting material 1 was confirmed by spectroscopic data:

Analytical GC-MS (70 eV) (Gas

Table 2: Antibacterial activity of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4 diameters of the inhibition (mm)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Ampicilline 10 μg	100	150	200	250	300
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 G(-)	12 \pm 1.4	8,75 \pm 0.3	10,25 \pm 0.3	11 \pm 0.7	12,75 \pm 1.0	14 \pm 1.4
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 G(-)	14,5 \pm 0.7	9 \pm 0.0	10,75 \pm 0.3	11,5 \pm 0.7	13,5 \pm 0.7	14,5 \pm 0.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 G(+)	31,5 \pm 0.7	9.5 \pm 0.7	10,5 \pm 0.0	11,25 \pm 0.3	13 \pm 0.0	14.25 \pm 0.3
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 G(+)	37.75 \pm 0.3	8,5 \pm 0.0	10,5 \pm 0.7	13,5 \pm 0.7	14,75 \pm 0.3	16,5 \pm 0.7
<i>Streptocoque B</i> (<i>Streptococcus agalactiae</i>) G(+)	26,5 \pm 0.7	9,25 \pm 0.3	10,25 \pm 1.7	11,75 \pm 2.4	14,5 \pm 0.7	16,5 \pm 0.7

Table 3: Antifungal activity of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4 diameters of the inhibition (mm)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Nystatine 100 μg	100	150	200	250	300
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	33,5 \pm 0.7	9 \pm 0.7	10,75 \pm 0.3	12,25 \pm 1.0	14,25 \pm 0.3	14,75 \pm 0.3

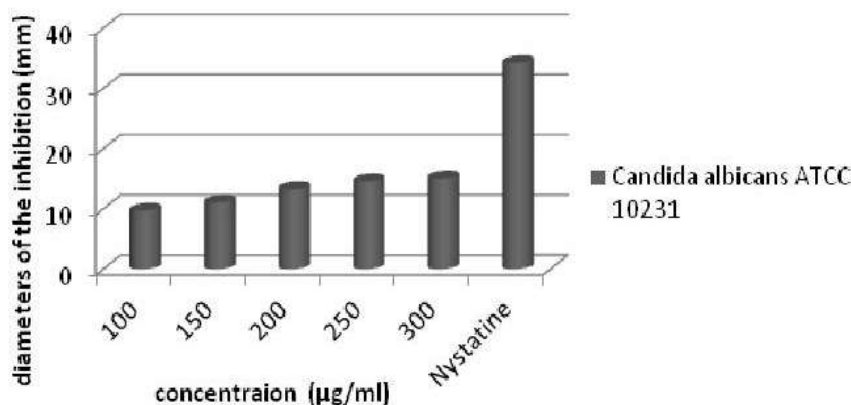


Fig. 9: The influence of difference concentrations of 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4 vs the inhibition diameter on *Candida albicans*

Chromatography-Mass Spectrometry revealed the presence of one component only as shown in (Fig. 6.); the FT-IR showed that a free amine group is present and this was confirmed by the down-field shift in the N-H stretching and bending bands around 3500–3300 cm⁻¹. The strong bands around 1100 cm⁻¹

are attributed to the C-F stretching vibrations. ¹H NMR showed the chemical shift δ 6.7 and this due to the presence of –NH₂. Whereas the chemical shifts δ 15.1 and -85.1 of ¹⁹F NMR are attributed respectively to the (F-2 and F-6), (F-3 and F-5); mass spectrum complied with a normal fragmentation

Table 4: Antibacterial activity of (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine 3 diameters of the inhibition (mm)

Concentration (µg/ml)	100	150	200	250	Ampicilline
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 G(-)	7±0.0	9±0.7	10.25±0.3	11±0.0	12.5±0.7
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 G(-)	7±0.3	8.75±0.3	9.5±0.0	10.5±0.0	15.5±0.7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 G(+)	-	8.75±0.3	9.5±0.7	10±0.7	39.5±0.7
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434 G(+)	-	9±0.0	10.25±0.3	11.5±0.7	37±0.7
<i>Streptococcus B</i> G(+)(<i>Streptococcus agalactiae</i>)	9±0.7	12.75±0.3	16.25±1.0	19.5±0.7	35.5±0.7

Table 5: Antifungal activity of (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine 3 diameters of the inhibition (mm)

Concentration (µg/ml)	100	150	200	250	Nystatin
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	9±0.0	10.75±0.3	11.25±0.3	35,75

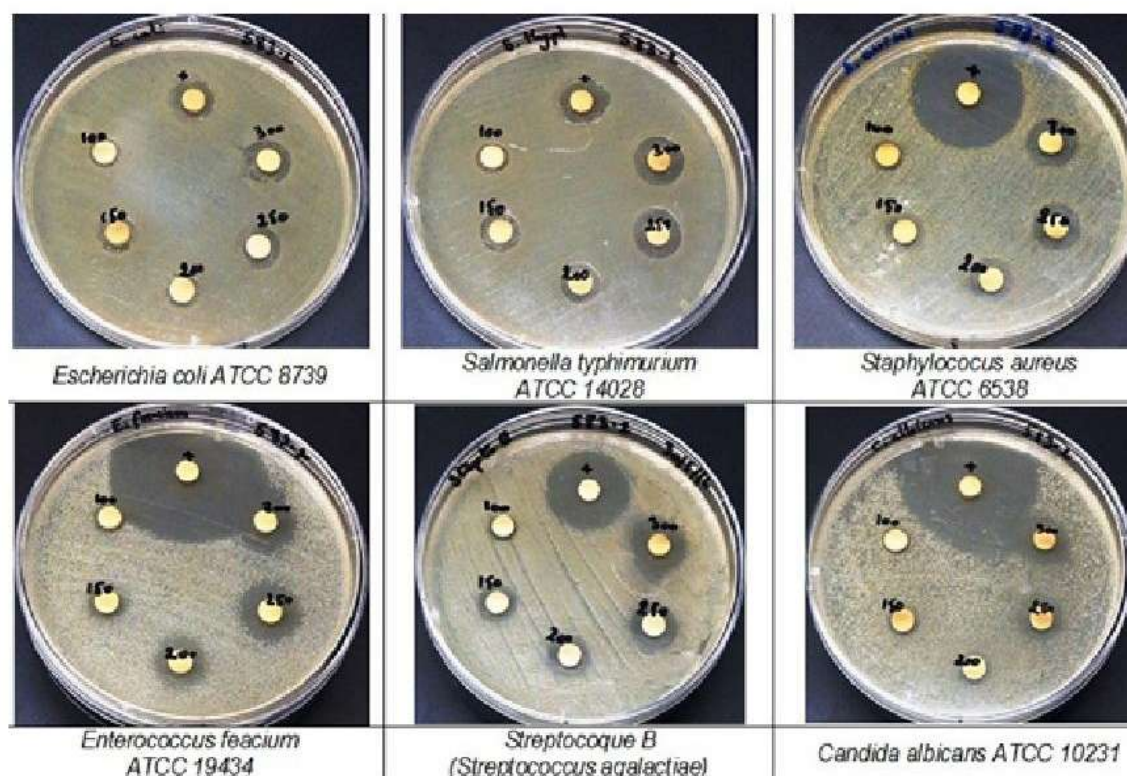


Fig. 10: showing zone of inhibition against all bacterial and fungus pathogens strains

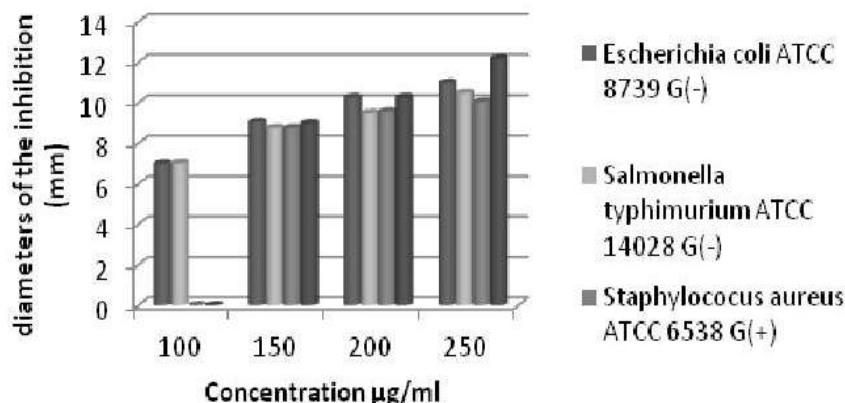


Fig.11: The influence of difference concentrations of 3 vs the inhibition diameter on five bacterial pathogens strains

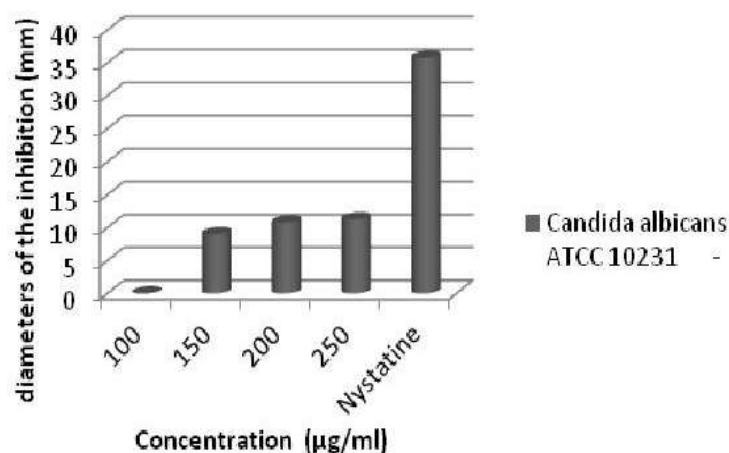


Fig.12: The influence of difference concentrations of 3 vs the inhibition diameter on *Candida albicans* ATCC 10231

mechanism for this compound: m/z : 166 ($[M]^+$, 100%) as shown in (Fig. 7).

Antibacterial activity part

4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine 4

Antibacterial activity

The antibacterial activity of the 2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridin-4-amine 4 was evaluated by the agar diffusion method at concentrations of 100; 150; 200; 250 µg/ml using Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as solvent and ampicillin as standard drug. Inhibition areas were measured in mm at the end of 24 h of incubation at 35°C. The results are reported in Table 2 and figure 8.

From the screening results, it is clearly observed that the fluorinated compound 4 showed a significant activity towards *Escherichia coli*;

Streptococcus B and *Salmonella typhimurium* at concentration 200; 250 and 300 µg/ml, a mild/moderate activity for the case of *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus B* and *Enterococcus faecium* at concentration 100; 150; 200 µg/ml when compared to Ampicilline.

Antifungal activity

The antifungal activity of the imino fluorinated compound was evaluated by the agar diffusion method at concentrations of 100; 150; 200; 250; 300 µg/ml using Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as solvent and ampicillin as standard drug. The results are reported in Table 3 and figure 9 and 10.

From the screening results it is clearly observed that compound 4 showed a slight activity towards *Candida albicans* at concentration 200; 250

and 300 µg/ml, a mild/moderate activity for the case of concentration 100; 150 µg/ml when compared to Nystatine.

(E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine 3

Antibacterial activity

The antibacterial activity of the (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** was evaluated by the agar diffusion method at concentrations of 100; 150; 200; 250 µg/ml using Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as solvent and ampicillin as standard drug. Inhibition areas were measured in mm at the end of 24 h of incubation at 35°C. The results are reported in Table 4 and fig. 11.

From the screening results it is clearly observed that compound showed no inhibitory activity for the *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* at concentration 100 µg/ml and exhibited a slight activity towards *Escherichia coli*; *Streptocoque B* and *Salmonella typhimurium* at concentration 200 and 250 µg/ml, a mild/moderate activity for the

case of *Staphylococcus aureus*; *Streptocoque B* and *Enterococcus faecium* at concentration 100; 150 and 200 µg/ml when compared to Ampicilline .

Antifungal activity

The antifungal activity of the imino fluorinated compound was evaluated by the agar diffusion method at concentrations of 100; 150; 200 and 250 µg/ml using dimethyl sulfoxide (DMSO) as solvent and ampicillin as standard drug. The results are reported in Table 5 and (fig.12).

From the screening results it is clearly observed that compound showed a mild/moderate activity towards *Candida albicans* at concentration 200 and 250µg/ml when compared to Nystatine.

The antibacterial and antifungal activity may be due to the effect of compounds **3** and **4** on the permeability of the cell membrane and the function of the bacterial cell. This can be attributed to the presence carbon-fluorine bond that have inhibitory efficacy on the positive and negative gram bacteria. On the other hand, Schiff bases appear to

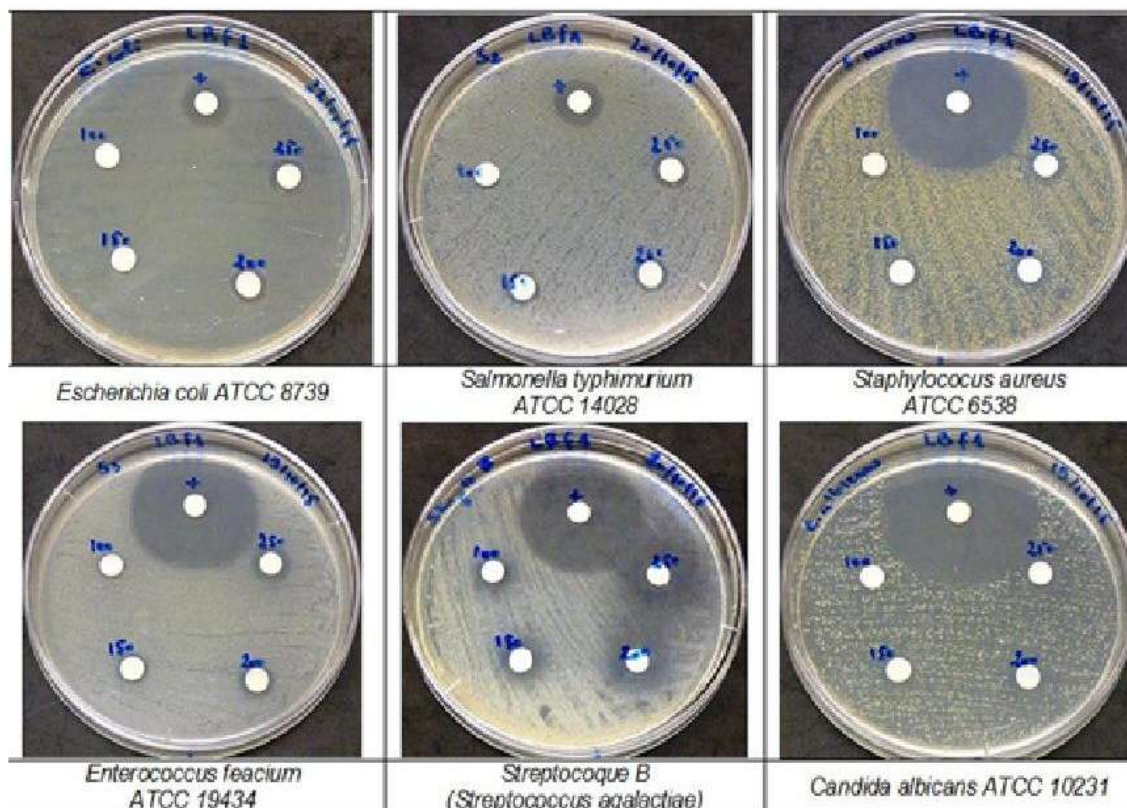


Fig. 12: showing zone of inhibition against all bacterial and fungus pathogens strains

be important intermediates in a number of enzymatic reaction involving interaction of the amino group of an enzyme, usually that of a lysine residue, with a carbonyl group of the substrate.¹¹ Schiff bases have also a wide range of potential applications in various biological fields,¹² also fluorinated Schiff bases derivatives have been widely studied because they have antifungal, antibacterial,^{1,13,14} DNA cleavage¹⁵ and anticancer¹⁶ activities which give it attracted remarkable attention.

Generally, the two fluorinated compounds (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** and 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4** are more or less effective towards the tested bacteria.

CONCLUSION

The reaction of 4-amino tetrafluoropyridine **1** with benzaldehyde **2** in EtOH/ or THF gave 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4** and a Schiff base (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** in 33 and 48 % yields respectively.

Exploration of the anti-bacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria showed that these compounds **3** and **4** compounds at a concentration of 250 µg/ml exhibited a slight activity towards *Enterococcus faecium*; *Streptococcus B* and *Staphylococcus aureus* exhibited

a mild/moderate activity for the case of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* when compared to Ampicillin. From the results obtained by the antifungal activity, it is found that this fluorinated Schiff base **3** and fluorinated ethoxy pyridine **4** are more active against *Candida albicans* at a concentration of 250 µg/ml when compared to Nystatine.

The results obtained in the present study suggest that the synthesized Schiff base (E)-N-benzylidene-2,3,5,6-tetrafluoropyridin-4-amine **3** and 4-amino-2-ethoxy-3,5,6-trifluoropyridine **4** can be used in treating diseases caused by the tested organisms. Further fluorinated Schiff base investigations may be carried out to synthesize and identify the sites responsible for the antimicrobial activity.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to express their sincere thanks to Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MHESR) for their support and providing the necessary facilities to carry out this research. They are thankful to the staff of INRAP (National Institute of Research and physico-chemical analysis) of Tunisia. Sincere thanks are due to the staff of the analytical and spectroscopic services of the Department of chemistry, University of Manchester for their assistance and providing the necessary facilities.

REFERENCES

- Alcives Avila-Sorrosa, J. I. H.; Alicia Reyes, A. R.; Reyna, R. M. J.; Roberto, P. M.; David Morales, M. *Journal of Molecular Structure* **2015**, *1085*, 249-257.
- Bi, H.; Ye, K.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Liu, Y.; Wang, Y. *Organic Electronics* **2010**, *11*, 1180-1184.
- Maienfisch, P.; Hall, R. G. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2004**, *58*, 93-99.
- Bagryanskaya, I. Y.; Gatilov, Y. V.; Maksimov, A. M.; Platonov, V. E.; Zibarev, A. V. *Journal of Fluorine Chemistry* **2005**, *126*, 1281-1287.
- Patani, G. A.; LaVoie, E. J. *Chemical reviews* **1996**, *96*, 3147-3176.
- Kumar, B. N. P.; Mohana, K. N.; Mallesha, L. *Journal of Fluorine Chemistry* **2013**, *156*, 15-20.
- Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 320-330.
- Schiff, H. Justus, L. *Annalen der Chemie* **1864**, *131*, 118-119.
- Da Silva, C. M.; da Silva, D. L.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; de Resende, M. A.; Martins, C. V. B.; de F tima, . *Journal of Advanced Research* **2011**, *2*, 1-8.
- Pang, W.; Zhao, J. W.; Zhao, L.; Zhang, Z. K.; Zhu, S. Z. *Journal of Molecular Structure* **2015**, *1096*, 21-28.
- Abdul, R.; PhD Thesis, *Bahauddin Zakariya University*, Multan, 2005.
- Sinha, D.; Tiwari, A. K.; Singh, S.; Shukla, G.; Mishra, P.; Chandra, H.; Mishra, A. K.;

- European journal of medicinal chemistry* **2008**, *43*, 160-165.
13. Karthikeyan, M. S.; Prasad, D. J.; Poojary, B.; Bhat, K. S.; Holla, B. S.; Kumari, N. S. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14*, 7482-7489.
14. Singh, H. L. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2010**, *76*, 253-258.
15. Alizadeh, I. Y. R.; Afzal, M.; Srivastav, S.; Srikrishna, S.; Arjmand, F. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**, *1*, 15-21.
16. Krzysztof S. A. M.; Osinka. A.; Sztanke, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 3648-3666.
17. Sekhri, L. *Asian Journal of chemistry* **2005**, *17*(3), 1747-1766.