



# Mémoire de fin d'études

PRESENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE : Master

**Filière : Chimie**  
**Option : Chimie des Matériaux**

**THÈME :**

*Synthèse d'un composé  $\alpha$ - aminophosphonate  
et l'étude de son activité biologique*

Préparé par : Nor El Imane KHAMED

Devant le jury :

Président:	<b>Khelladi Mohamed Redha</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Université de Bordj Bou Arreridj</b>
Rapporteur:	<b>Mehri Mouna</b>	<b>M.A.B</b>	<b>Université de Bordj Bou Arreridj</b>
Examineur:	<b>Tennah Farid</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Université de Bordj Bou Arreridj</b>

**Année Universitaire 2019-2020**

# Remerciements

*Je remercie tout d'abord ALLAH qui m'a donné le courage pour réaliser ce modeste travail et le mener jusqu'au bout.*

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à M<sup>elle</sup> **MEHRI Mouna**, enseignante à l'université de Bordj Bou-Argeridj pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.*

*Je tiens particulièrement à remercier Miss **Moumeni Ouahiba** maître assistante à l'université Ferhat ABBAS Sétif-1 pour sa confiance, son soutien ainsi que ses précieux conseils qui ont contribué à la réalisation de la partie de synthèse.*

*Ensuite, je tiens à remercier les membres de jury : **Khelladi Mohamed Redha** maître de conférence à l'université de Bordj Bou-Argeridj et*

*Pour leur consentement à lire ce manuscrit et à nous donner leur point de vue sur notre travail.*

*Je tiens également à remercier ma famille pour leur soutien durant toute ma vie.*

*À tous mes collègues.*

*À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.*

# DEDICACE

*Avec un grand respect, je tiens à dédier ce travail :*

*À mon père, qui m'a encouragé toute au long de ma vie.*

*À ma mère, qui a toujours consenti pour moi les plus durs sacrifices.*

*À ma chère sœur Khaoula.*

*À mon cher frère Ayoub.*

*Pour son soutien indéfectible durant toutes ces années.*

*À toute ma famille, tous mes amis et mes collègues et toutes les personnes qui se reconnaîtront.*

*...Nor El Imane KHAMED...*

## TABLE DES MATIERES

<i>Table des matières</i> .....	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>vii</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>viii</i>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>01</b>
<i>Références bibliographiques</i> .....	<i>3</i>

### Chapitre I : Rappels bibliographique

I.1. Généralité sur les phosphonates .....	05
I.1.1. Le phosphore .....	05
I.1.2. Les composés organophosphorés .....	06
I.1.3. Les phosphonates .....	06
I.1.3.1. Propriétés des phosphonates .....	07
I.1.3.2. Synthèse des phosphonates .....	08
I.1.3.3. Dérivés des phosphonates .....	08
a) Les $\alpha$ -aminophosphonates .....	08
b) Les bisphosphonates .....	08
c) Les nucléosides phosphonates .....	09
d) Les $\alpha$ -hydroxyphosphonates .....	09
e) Les alkyles-phosphonates et les aryles-phosphonates .....	09
f) Les polyphosphonates .....	10
I.1.3.4. Domaines d'application des phosphonates .....	10
a) La biologie, médecine et pharmacologie .....	10
b) Industrie agriculture .....	12
c) Inhibiteur de corrosion .....	13
d) Traitement des eaux et protection de l'environnement .....	13
e) Détergent .....	14
f) Dans l'industrie des catalyseurs .....	14
I.1.4. Les $\alpha$ -aminophosphonates .....	14
I.1.4.1. Propriétés des $\alpha$ -aminophosphonates .....	14

I.1.4.2.. Synthèse des $\alpha$ -Aminophosphonates .....	15
a) La réaction de Kabachnik–Fields .....	15
b) La réaction Pudovik .....	16
c) Réactions pour l’obtention des acides $\alpha$ -aminophosphoniques .....	16
I.2. Activité antibactérienne .....	17
I.2.1. Morphologie et structure fine des bactéries .....	18
I.2.2. Les Antibiotiques .....	20
I.2.2.1. Définition .....	21
I.2.2.2. Critères de Classification .....	21
a) Origine.....	21
b) Mode d’action .....	21
c) Spectre d’activité.....	21
d) Nature chimique.....	21
e) Modalités d’action.....	21
I.2.2.3. Les cibles bactériennes des antibiotiques.....	22
a) Action sur la paroi bactérienne .....	22
b) Action sur la membrane cellulaire .....	22
c) Action sur la synthèse protéique .....	22
d) Action sur la synthèse de l’ADN .....	22
I.2.2.4. Résistance bactérienne .....	23
a) Résistance naturelle.....	23
b) Résistance acquise .....	23
<i>Références bibliographiques</i> .....	25

## **Chapitre II : Analyses et méthodes expérimentales**

II.1.La chromatographie sur couche mince .....	29
II.1.1. Principe de la technique.....	29
II.1.2. Les étapes de la technique .....	30
II.1.3. Analyse du produit synthétisé par CCM.....	31
II.2. Point de fusion .....	31
II.3. Méthodes spectrales.....	32
II.3.1. Spectrophotométrie UV-Visible .....	32
II.3.1.1. Principe.....	32

II.3.1.2. Le domaine spectral (UV- Visible).....	34
II.3.1.3. Appareillage.....	34
II.3.1.4. Spectre d'absorption UV- Visible .....	34
II.3.1.5. Utilisation de la spectroscopie UV- Visible .....	34
II.3.1.6. Analyse du produit synthétisé par UV- Visible.....	35
II.3.2. Spectroscopie infrarouge .....	35
II.3.2.1. Principe.....	35
II.3.2.2. Vibrations dans l'infrarouge .....	35
II.3.2.3. Le domaine spectral (IR) .....	36
II.3.2.4. Loi de Hooke .....	36
II.3.2.5. Spectre IR .....	37
II.3.2.6. Application de spectroscopie infrarouge .....	37
II.3.2.7. Analyse du produit synthétisé par spectroscopie IR.....	37
II.4. Méthode utilisée pour l'évaluation des propriétés antibactériennes.....	37
II.4.1. Méthodes d'étude sur milieu solide.....	38
II.4.2. Préparation de l'inoculum .....	38
II.4.3. Ensemencement .....	38
II.4.4. Dépôt des disques .....	39
II.4.5. Incubation et lecture .....	39
<i>Références bibliographiques</i> .....	40

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Réactifs et solvants utilisés .....	42
III.2. Montage utilisé pour la synthèse et la séparation.....	43
III.3. Synthèse de la molécule ciblée.....	44
III. 4. Mécanisme réactionnel.....	45
III.5. Caractérisation des produits synthétisés.....	46
III.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	46
III.5.2. Rendements .....	47
III.5.3. Aspect et couleur .....	47
III.5.4. Teste de solubilité.....	48
III.5.5. Point de fusion.....	48
III.6. Caractérisation spectrales .....	49
III.6.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis .....	49

III.6.2. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FT-IR).....	50
III.7. Evaluation des propriétés antibactériennes .....	52
<i>Références bibliographiques</i> .....	55
<b>Conclusions général</b> .....	<b>56</b>

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I.

<b>Figure I. 1 :</b> Composés organique contenant le phosphore .....	05
<b>Figure I. 2 :</b> Principales familles des composés organophosphorés.....	06
<b>Figure I. 3 :</b> Comparaison phosphate-phosphonate.....	07
<b>Figure I. 4 :</b> La formule chimique de Ciliatine .....	07
<b>Figure I. 5 :</b> Les étapes de la réaction de Michaël Arbusov .....	08
<b>Figure I. 6 :</b> Structures des $\alpha$ -aminophosphonates .....	08
<b>Figure I. 7 :</b> La différence entre les structures des biphosphonates (a) et pyrophosphates (c). .....	09
<b>Figure I. 8 :</b> Structures des nucléosides phosphonates(a) et nucléosides (b).....	09
<b>Figure I. 9 :</b> Structure chimique des $\alpha$ -hydroxyphosphonates. ....	09
<b>Figure I. 10 :</b> Structure chimique des alkyles-phosphonates et des aryles-phosphonates.....	09
<b>Figure I. 11 :</b> Structure chimique des polyphosphonates. ....	10
<b>Figure I. 12 :</b> Exemples des médicaments à base des phosphonates utilisés dans le traitement du cancer. ....	11
<b>Figure I. 13 :</b> Exemples des médicaments antiviraux à base des phosphonates. ....	11
<b>Figure I. 14 :</b> Structures chimiques des phosphonates utilisés comme antibiotiques. ....	12
<b>Figure I. 15 :</b> Structures chimiques des anti-inflammatoires contenant des groupements phosphonates .....	12
<b>Figure I. 16 :</b> La formule chimique de fosinopril.....	12
<b>Figure I. 17 :</b> Structures des composés phosphonates utilisés dans l'agriculture. ....	13
<b>Figure I. 18 :</b> Structure des inhibiteurs de corrosions de type phosphonate. ....	13
<b>Figure I. 19 :</b> Structures des $\alpha$ -aminophosphonates, acides $\alpha$ -aminophosphoniques et des acides $\alpha$ -aminés.....	14
<b>Figure I. 20 :</b> La réaction de Kabachnik-Fields. ....	15
<b>Figure I. 21 :</b> Le mécanisme de réaction de Kabachnik-Fields.....	16
<b>Figure I. 22 :</b> La réaction de Pudovik. ....	16
<b>Figure I. 23 :</b> Réaction de préparation des acides $\alpha$ -aminométhylphosphoniques d'après Moedritzer-Irani. ....	17
<b>Figure I. 24 :</b> Synthèse des acides $\alpha$ -aminophosphoniques. ....	17
<b>Figure I. 25 :</b> Différentes formes des bactéries. ....	18
<b>Figure I. 26 :</b> Exemple d'une structure bactérienne. ....	19

<b>Figure I. 27</b> : Mode d'action des antibiotiques .....	23
---	----

## **Chapitre II.**

<b>Figure II. 1</b> : Surface d'un grain de silice. ....	29
<b>Figure II. 2</b> : Échelle de polarité relative de divers solvants utilisés comme éluant en CCM. ....	30
<b>Figure II. 3</b> : Appareillage servant à la chromatographie sur couche mince. ....	31
<b>Figure II. 4</b> : Fusiomètre .....	32
<b>Figure II. 5</b> : Spectre électromagnétique.....	32
<b>Figure II. 6</b> : Modes vibrationnels du groupement méthylène (CH <sub>2</sub> ). ....	36
<b>Figure II. 7</b> : Quelques domaines d'absorption correspondant à divers types de liaison chimique..	37

## **Chapitre III :**

<b>Figure III. 01</b> : Montage expérimental de synthèse .....	43
<b>Figure III. 02</b> : Rotavapeur .....	44
<b>Figure III. 03</b> : Procédure de synthèse de l'ester diethyl [(dodecylamino)(phenyl)méthyl] phosphonate ( $\alpha$ -EDAPMP). ....	45
<b>Figure III. 04</b> : Mécanisme proposé pour la formation de l'ester ( $\alpha$ -EDAPMP). ....	46
<b>Figure III.05</b> : Spectres UV-Vis enregistrés en milieu méthanol (1) Dodécamine; (2) Benzaldéhyde ; (3) $\alpha$ -EDAPMP.....	49
<b>Figure III. 06</b> : Spectre IR caractéristique du dodécamine. ....	50
<b>Figure III. 07</b> : Spectre IR caractéristique du benzaldéhyde. ....	50
<b>Figure III. 08</b> : Spectre IR caractéristique de l'ester synthétisé $\alpha$ -EDAPMP.....	50
<b>Figure III.09</b> : Effet inhibiteur de la gentamicine sur les souches bactériennes étudiées.....	53
<b>Figure III.10</b> : Effet inhibiteur de l'ester $\alpha$ -aminophosphonate sur les souches bactériennes étudiées. ....	53

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre II.

<b>Tableau II.1 :</b> Absorptions typiques du chromophore simple. ....	33
--	----

### Chapitre III :

<b>Tableau III. 01 :</b> Caractères physicochimiques principaux des réactifs utilisés. ....	42
<b>Tableau III. 02 :</b> Caractères physicochimiques des solvants utilisés.....	43
<b>Tableau III. 03 :</b> Rapports frontaux des produits de départ et le composé synthétisé. ....	47
<b>Tableau III. 04 :</b> Aspects et couleur des produits de départ et le composé synthétisé .....	47
<b>Tableau III. 05 :</b> Test de solubilité du produit synthétisé dans différents solvants à chaud et à froid .....	48
<b>Tableau III. 06 :</b> Points de fusion des réactifs et de l'ester $\alpha$ -EDAPMP. ....	48
<b>Tableau III.08 :</b> Principaux pics caractéristiques des vibrations IR du produit synthétisé et leurs produits de départ correspondants. ....	52
<b>Tableau III. 09:</b> Caractéristiques des souches bactériennes utilisées. ....	52
<b>Tableau III.10:</b> Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne au tour des disques en présence de $\alpha$ -EDAPMP et du standard. ....	54

## ABREVIATION

**ADN** : **A**cide **D**ésoxyribo**n**ucléique.

**ARN** : Acide **r**ibo**n**ucléique.

**ATP** : **A**dénosine-**T**riphos**P**hate.

**BPs**: **B**is**p**hos**p**honates.

**CMI** : **c**oncentration**m**inimale **i**nhibitrice.

**CMB** : **c**oncentration **m**inimale **b**actéricide.

**RX** : Halogénure d'alkyle.

**EDTMP** : **é**thylène **d**iamine **t**étra**m**éthylène**p**hosphonate.

**CCM**: **C**hromatographie sur **C**ouche **M**ince.

**UV-Vis** : **U**ltravio**l**et**V**isible.

**IR** : **I**nfrar**o**uge.

**R<sub>f</sub>** : **R**apport **f**rontal.

**OM** : **O**rbitale **m**oléculaire.

$\lambda_{\max}$  : Longueurs d'onde.

**nm** : **N**an**m**ètre.

**A** : **A**bsorbance.

**I<sub>0</sub>** : **I**ntensité de la lumière incidente.

**I** : **I**ntensité de la lumière transmise.

$\epsilon$  : Coefficient d'extinction molaire.

**c** : **C**oncentration de la solution en mol/l.

**l** : L'épaisseur de la cuve.

$\bar{\nu}$  : Fréquence de vibration ( $\text{cm}^{-1}$ ).

**C** : vitesse de la lumière ( $\text{cm}/\text{sec}$ ).

**K**: constante de force de liaison ( $\text{dyne cm}^{-2}$ ).

**M<sub>x</sub>** et **M<sub>y</sub>** : masses (g) des atomes x et y.

**%** : Pourcentage.

**MH** : Muller-Hinton.

**EDAPMP** : l'ester, Diethyl ((dodecylamino)(phenyl)methyl)phosphonate.

**DMSO** : **D**iméthyl**s**ulfo**o**xyde

**ATCC** : **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection.

**E. coli** : **E**scherichia **c**oli.

**P. aeruginosa** : **P**seudomonas **a**eruginosa.

**B. subtilis** : **B**acillus **s**ubtilis.

**S. aureus**: **S**taphylococcus **a**ureus.

# **Introduction générale**

### Introduction générale

L'organisme humain, toujours exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, champignons....), il est doté d'un système complexe de défense qui lui permet d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, ces microbes peuvent entraîner une maladie infectieuse grave. Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes à l'économie. Un grand nombre de médicaments ont été découverts jusqu'à maintenant pour lutter contre ces infections.

Ces médicaments, qui ont sauvé des vies et soulagé des souffrances de millions de personnes durant des années. Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'avère nécessaire car, l'usage extensif des agents antibactériens dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux conduites à la sélection des souches microbiennes résistantes [1].

Les phosphonates d'une façon générale sont des analogues des phosphates naturels ont des propriétés chimiques et biologiques différentes, ce qui leur confère des applications biologiques et médicales [2, 3]. Dans ces composés la liaison P-O est remplacée par une liaison P-C, cette substitution permet d'accéder à des composés capables de résister à l'hydrolyse enzymatique [4].

Les  $\alpha$ -aminophosphonates en particulier, sont considérés comme une catégorie importante des dérivés phosphonates en raison de leurs applications biologiques exceptionnelles. Ils ont des structures analogues à ceux des acides aminés [5], c'est pourquoi les  $\alpha$ -aminophosphonates se trouvent en compétition avec leurs analogues d'acides aminés pour accéder aux centres actifs d'enzymes ou d'autres cibles cellulaires. Ceci, ajouté à leur faible toxicité, fait des  $\alpha$ -aminophosphonates une source potentielle de composés médicamenteux [6].

Jusqu'à maintenant, les  $\alpha$ -aminophosphonates ont vu des applications en tant qu'agents antibactériens [7], inhibiteurs d'enzymes [8]; tels que synthase[9], protéase du VIH [10], l'activité phosphatase [11], antifongiques [12], herbicides [13], antitumoraux [14], ils ont été aussi utilisé comme haptènes pour la génération d'anticorps catalytiques[15], et incorporés dans des analogues peptidiques [16].

## Introduction générale

---

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne d'un ester  $\alpha$ -aminophosphonate synthétisé.

Le manuscrit est subdivisé en trois chapitres:

**Le premier chapitre** présente des notions générales sur les phosphonates, leurs dérivées, leurs méthodes de synthèse et une brève synthèse bibliographique sur les agents antibactériens.

**Le deuxième chapitre** décrit les procédés expérimentaux appliqués dans la synthèse et les méthodes physicochimiques d'analyses exploitées pour la caractérisation de la molécule synthétisée, ainsi que la méthode utilisée pour étudier l'activité antibactérienne.

**Dans le troisième chapitre** nous présentons et nous discutons les différents résultats expérimentaux obtenus.

Comme tout travail nous terminons par une conclusion générale qui résumera l'ensemble des résultats obtenus.

### Références bibliographiques

- [1] K. Rhayour, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences DharMehraz - Fès-. (2002).
- [2] M. Attolini, G. Iacazo, G. Peiffer, Y. Charmasson, M. Maffei, *Enzymatic resolution of diethyl 3-hydroxycycloalkenyl phosphonates*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 15 (2004) 827.
- [3] G. M. Blackburn, D. A. England, F. Kolkmann, *Monofluoro-and difluoro-methylenebisphosphonic acids: isopolar analogues of pyrophosphoric acid*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 134 (1981) 930-932.
- [4] E. Breuer, *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*, vol. 4, John Wiley & Sons, New York, New Y., USA, 1996.
- [5] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, *The Kabachnik –Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism*, *Russ. Chem. Revol.* 67 (1998) 857–882.
- [6] P. Kafarski, B. Lejczak, *Aminophosphonic acids of potential medical importance*, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 1 (2001) 301–312.
- [7] J. G. Allen, F. R. Artherton, M. J. Hall, C. H. Hassall, S. W. Holmes, R. W. Lambert, L.J. Nisbert, P. S. Ringrose, *Phosphonopeptides, a new class of synthetic antibacterial agents*, *Nature*. 272 (1978) 56–58.
- [8] (a) O. I. Kolodiazhnyi, *Asymmetric synthesis of hydroxyphosphonates*, *Tetrahedron: Asymmetry* 15(2005)3295–3340.
- (b) W. W. Smith, P. A. Bartlett, *Macrocyclic inhibitors of penicillopepsin. 3. Design, synthesis, and evaluation of an inhibitor bridged between P2 and P1', J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 4622–4628.
- [9] M. Emgenbroich, G. Wulff, *A new enzyme model for enantioselective esterases based on molecularly imprinted polymers*, *Chem. A Eur. J.* 9 (2003) 4106–4117.
- [10] B. Stowasser, K-H. Budt, Li Jian-Qi, A. Peyman, D. Ruppert, *New hybrid transition state analog inhibitors of HIV protease with peripheric C2-symmetry*, *Tetrahedron Lett*, 33 (1992) 6625–6628.
- [11] S. A. Beers, C. F. Schwender, D. A. Loughney, E. Malloy, K. Demarest, J. Jordan, *Phosphatase inhibitors—III. Benzylaminophosphonic acids as potent inhibitors of human prostatic acid phosphatase*, *Bioorg. Med. Chem.* 4(1996) 1693–1701.
- [12] M.S. Bhatia, P. Pawanjit, *Phosphorus containing heterocycles as fungicides: synthesis of 2,2'-diphenylenechlorophosphonate and 2,2' diphenylenechlorothiophosphonate*, *Experientia* 32 (1976) 1111.

## Introduction générale

---

- [13](a) K. M. Yager, C. M. Taylor, A. B. Smith III, *Asymmetric Synthesis of. alpha.-Aminophosphonates via Diastereoselective Addition of Lithium Diethyl Phosphite to Chelating Imines*, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 9377–9378.
- (b) I. A. Natchev, *Synthesis, enzyme—substrate interaction, and herbicidal activity of phosphoryl analogues of glycine*, LiebigsAnn. Chem. (1988) 861–867.
- [14] G. Lavielle, P. Hautefaye, C. Schaeffer, J.A. Boutin, C.A. Cudennec, A. Pierré, *New  $\alpha$ -amino phosphonic acid derivatives of vinblastine: chemistry and antitumor activity*, J. Med. Che. 34 (1991) 1998–2003.
- [15] R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P.G. Schultz, *At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies*, Science. 252 (1991) 659-667.
- [16]P. Kafarski, B. Lejczak, *Biological activity of aminophosphonic acids*, Phosphorus, Sulfur, and Silicon, 63(1991) 193-215.

# **Chapitre I**

## **Rappels bibliographique**

## I.1. Généralités sur les phosphonates

### I.1.1. Le phosphore

Le phosphore est un des éléments les plus répandus sur terre : il constitue environ 0.04 % du nombre total d'atomes de l'écorce terrestre et on lui connaît un seul isotope stable. Le minéral le plus abondant est l'apatite, elle a pour formule générale:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ , où X peut être F (fluorapatite), OH (hydroxyapatite) ou Cl (chlorapatite) [1,2].

Le phosphore joue un rôle de tout premier plan dans la chimie du vivant, entrant aussi bien dans la composition des acides nucléiques (ADN et ARN). Les phosphates jouent également un rôle majeur dans le contrôle de l'énergie chimique à l'intérieur des cellules, essentiellement par l'hydrolyse de la molécule d'ATP (Adénosine-Triphosphate). Ils sont également indispensables à la formation des phospholipides (constituants des membranes cellulaires) et de l'apatite des os [3].

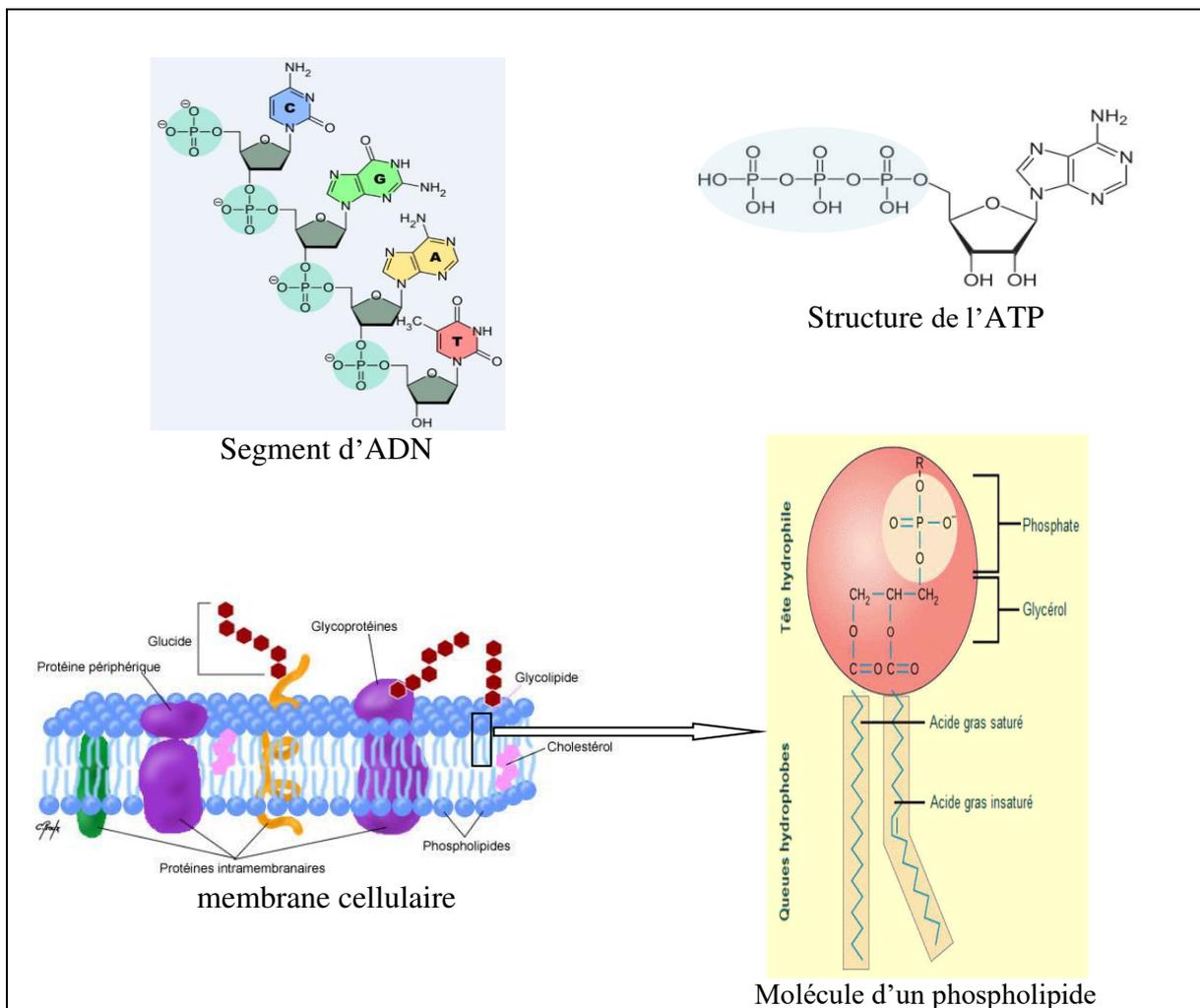
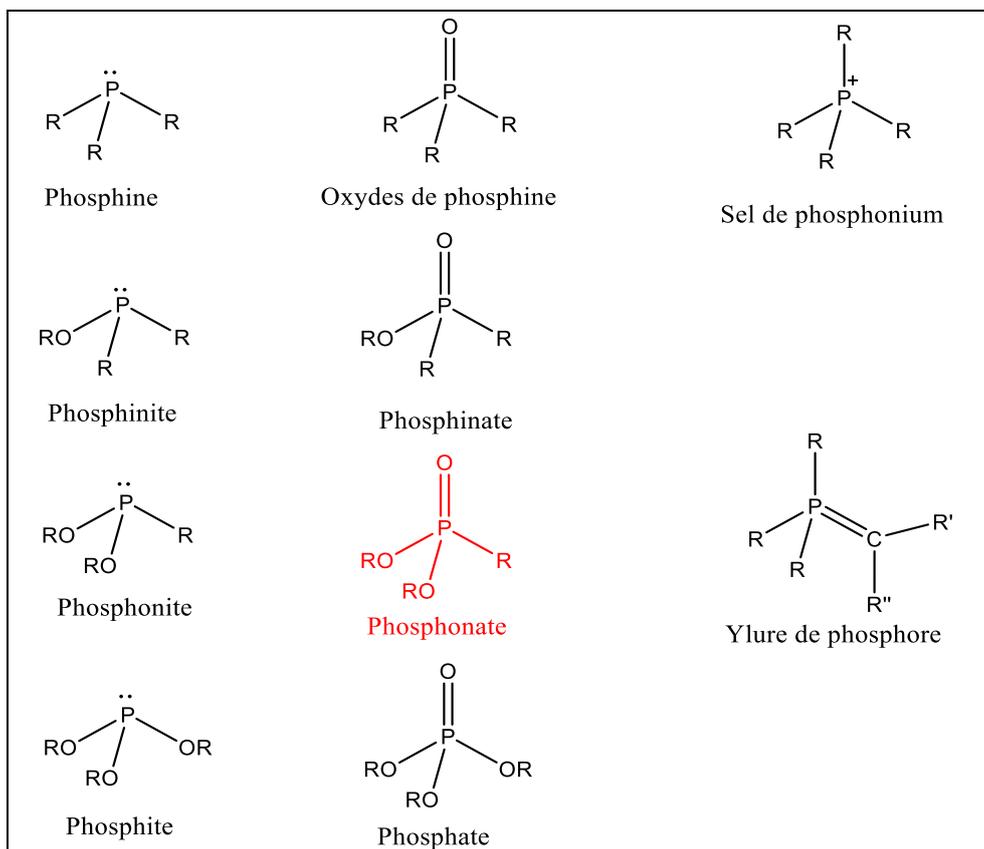


Figure I.1: Composés organique contenant le phosphore.

## I.1.2. Les composés organophosphorés

Un composé organophosphoré est un type de composé organique comportant au moins un atome de phosphore lié directement à un carbone.

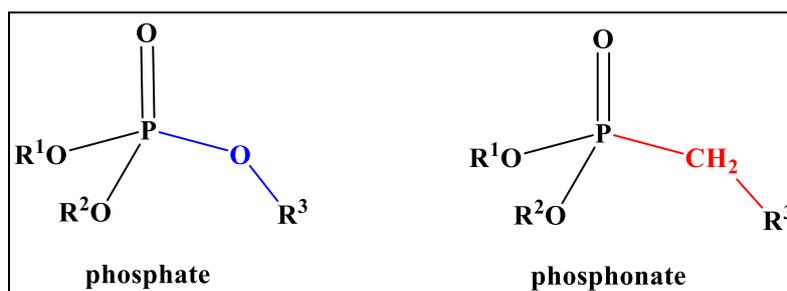
Ces composés se répartissent en différentes classes selon le degré d'oxydation du phosphore et la nature des substituants [4].



**Figure I. 2: Principales familles des composés organophosphorés [5].**

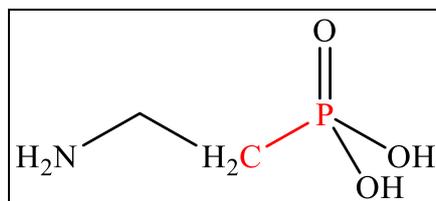
## I.1.3. Les phosphonates

Phosphonates ou acides phosphoniques sont des composés organiques contenant un ou plusieurs groupements  $\text{C-PO(OR)}_2$  ou  $\text{C-PO(OH)}_2$  avec ( $\text{R}=\text{alkyl, aryle}$ ). Ils sont des analogues des phosphates naturels (phosphates glycosidiques, nucléotidiques, phospholipides, phosphates produits par la glycolyse) où la liaison  $\text{P-O}$  est remplacée par une liaison  $\text{P-C}$  plus stable, ce qui empêche leur hydrolyse par les phosphatases (figure I. 3).



**Figure I. 3: Comparaison phosphate-phosphonate.**

Les composés naturels porteurs d'une liaison phosphore carbone sont très peu répandus dans la nature, et leur découverte remonte seulement aux années soixante. Le premier exemple isolé de ce type de composés a été la ciliatine ((2-aminoéthyl) phosphonate) que l'on trouve dans la flore du rumen de mouton [6]. Ce composé est biologiquement intéressant car il possède des propriétés neuromodulatrices [7].



**Figure I. 4: La formule chimique de Ciliatine.**

### I.1.3.1. Propriétés des phosphonates

L'importance marquante des phosphonates dans tous les domaines scientifiques résulte de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes, telles qu'ils :

- Sont des agents efficaces de chélation qui se lient fortement aux ions métalliques di- et trivalents, la stabilité des complexes de métal augmente avec le nombre croissant de groupes phosphonates [8].
- Sont très solubles dans l'eau. Ils ne sont pas volatiles et sont peu solubles dans les solvants organiques.
- Sont des produits très stables dans les conditions chimiques rigoureuses [9].
- Sont moins toxiques pour l'environnement.
- Sont des composés biologiquement très actifs [10].

### I.1.3.2. Synthèse des phosphonates

La méthode la plus communément utilisée est la réaction de Michaëlis-Arbuzov [11]. C'est une réaction chimique entre un phosphite et un halogénure d'alkyle qui conduit à la formation d'un phosphonate (figure I. 5) [12].

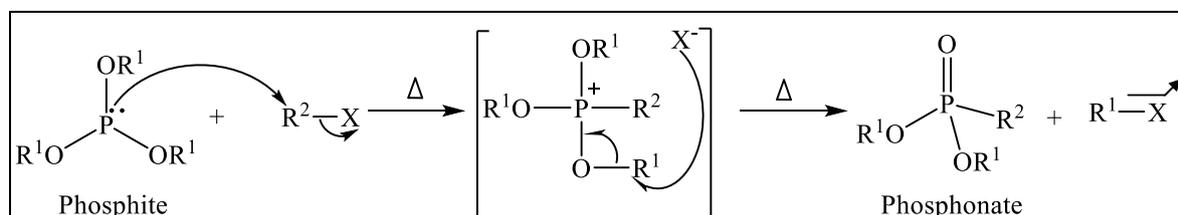


Figure I. 5: Les étapes de la réaction de Michaël-Arbuzov.

Il peut y avoir compétition entre l'halogénure d'alkyle utilisé comme réactif et celui produit lors de la réaction. Il est donc préférable de :

- Utiliser un halogénure d'alkyle  $R^2X$  plus réactif que  $R^1X$ .
- Utiliser un phosphite (méthyle, éthyle) qui forme un halogénure  $R^1X$  qui est gazeux à la température de réaction.
- Mener la réaction sous vide de façon à retirer le plus rapidement possible l'halogénure  $R^1X$  du milieu réactionnel.

### I.1.3.3. Dérivés des phosphonates

Les principales catégories des phosphonates sont:

**a) Les  $\alpha$ -aminophosphonates :** sont des phosphonates où l'atome  $\alpha$ -carbone lié au phosphore est substitué par le groupement amine (figure I. 6).

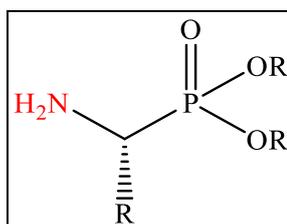
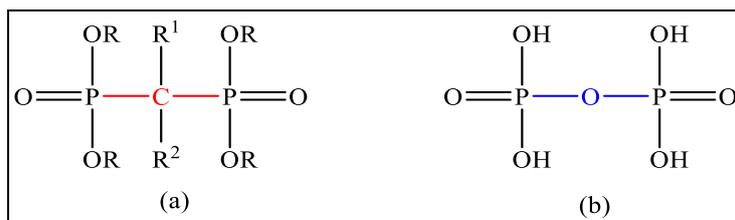


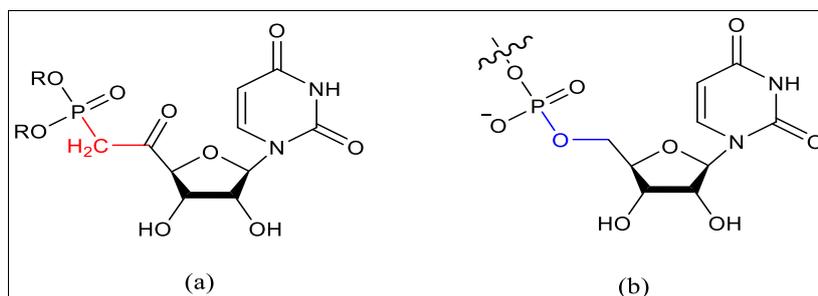
Figure I. 6: Structures des  $\alpha$ -aminophosphonates.

**b) Les biphosphonates:** sont des composés organiques synthétiques, caractérisés par une structure contenant le groupement P-C-P. La première biphosphonates a été synthétisée au 19<sup>ème</sup> siècle [13]. Les biphosphonates (BPs) et les acides biphosphoniques sont des analogues structuraux des pyrophosphates inorganiques dans lesquels un atome d'oxygène a été remplacé par un atome de carbone (figure I. 7).



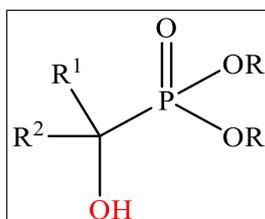
**Figure I.7: La différence entre les structures des bisphosphonates (a) et pyrophosphates (c).**

c) **Les nucléosides phosphonates:** les nucléosides phosphonates présentent des structures moléculaires analogues aux celles des nucléosides naturels (figure I.8).



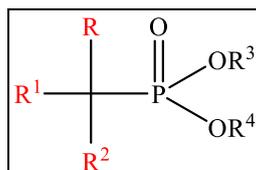
**Figure I. 8: Structures des nucléosides phosphonates (a) et nucléosides (b).**

d) **Les  $\alpha$ -hydroxyphosphonates:** sont des phosphonates où l'atome  $\alpha$ -carbone lié au phosphore est substitué par le groupement hydroxyle (figure I. 9).



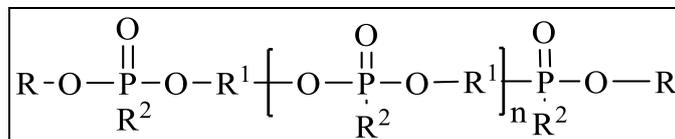
**Figure I. 9: Structure chimique des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates.**

e) **Les alkyles-phosphonates et les aryles-phosphonates :** sont des composés organophosphoré dont le groupement phosphonates est lié à un radicales alkyle ou aryle (figure I. 10).



**Figure I. 10: Structure chimique des alkyles-phosphonates et des aryles-phosphonates.**

**f) Les polyphosphonates :** sont des macromolécules organophosphorées dont on note une répétition d'un ou plusieurs types de motifs monomères qui portent un ou plusieurs groupements phosphoniques (figure I.11).



**Figure I. 11: Structure chimique des polyphosphonates.**

### I.1.3.4. Domaines d'application des phosphonates

Au cours de la dernière décennie, les phosphonates ont fait l'objet de recherches accrues dans les domaines de la médecine, de la chimie bioorganique et de la chimie organique grâce à leurs diverses activités.

**a) La biologie, médecine et pharmacologie:** les phosphates ont tendance à s'hydrolyser notamment au contact des phosphatases digestives, et par conséquent cela en fait de mauvais candidats en tant que médicaments. La substitution d'un atome d'oxygène (dans les phosphates) par un atome de carbone (dans les phosphonates) permet généralement d'accéder à des composés aussi actifs, mais plus stables, ce qui empêche leur hydrolyse par les phosphatases [14].

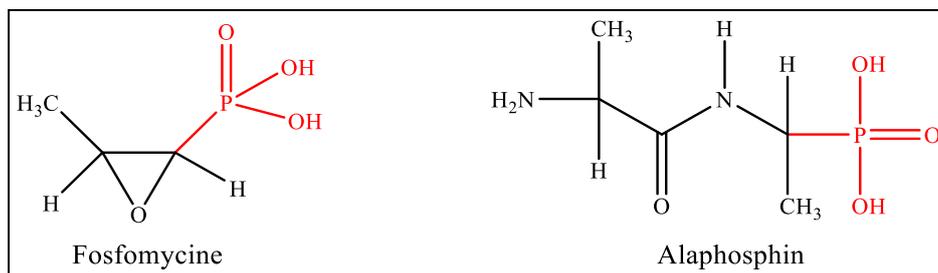
\* Des compositions pharmaceutiques constitués des dérivés de **N-(phosphonométhyl) glycine** (figure I.12) utilisées pour inhiber la croissance des cancers et autres tumeurs par l'administration d'une quantité efficace soit par voie orale, rectale, ou par voie parentérale [15].

\* Les bisphosphonates contenant de l'azote comme **pamidronate**, **aledronate**, **risendronate**, et **zolendronate**, (figure I.12), représente une classe importante des drogues actuellement employées pour traiter l'ostéoporose, la maladie de paget et l'hypercalcémie [16].

\* **Samarium-153-éthylène diamine tétraméthylène phosphonate** (figure I.12) abrégé **Samarium-153 EDTMP**, nom commercial (Quadramet) est un complexe d'un radio-isotope du samarium élément de lanthanide avec chélateur EDTMP. Il est utilisé pour traiter la douleur quand le cancer s'est propagé à l'os [17,18].

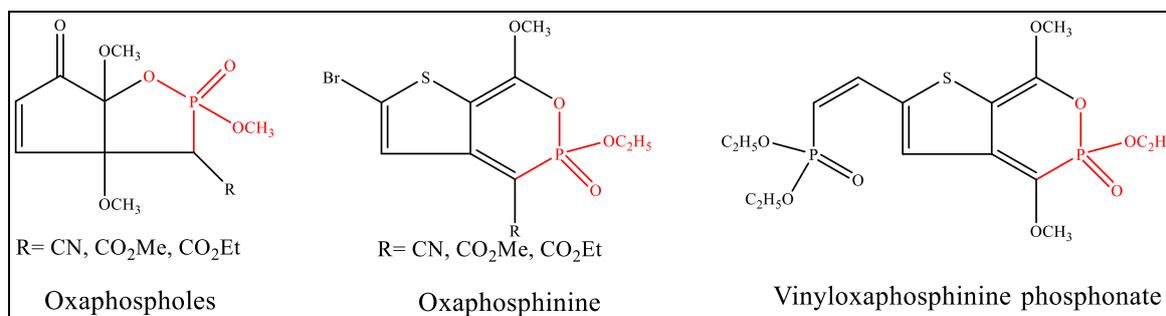


dans la chimie du phosphore [20]. **Alaphosphin**, (figure I.14) est un antibiotique qui bloque la formation de la paroi bactérienne [21].



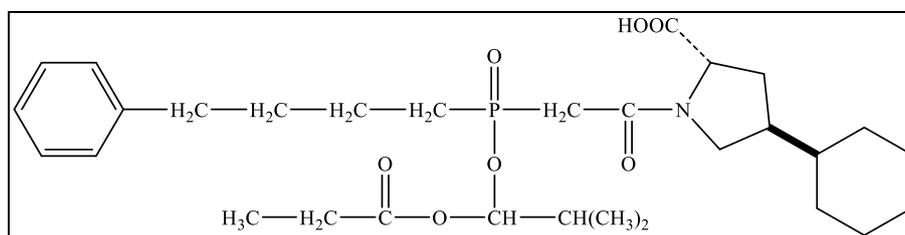
**Figure I. 14: Structures chimiques des phosphonates utilisés comme antibiotiques.**

\* Les composés phosphorés contenant des hétérocycles tel que : les **oxaphospholes**, l'**oxaphosphinine** et le **vinylloxaphosphininephosphonate** (figure I.15) ont été décrits comme des anti-inflammatoires [22, 23].



**Figure I. 15: Structures chimiques des anti-inflammatoires contenant des groupements phosphonate.**

\* Le **fosinopril** (figure I.16) est utilisé comme antihypertenseur car il bloque la transformation d'angiotensine I en angiotensine II en inhibant l'enzyme de conversion [24].

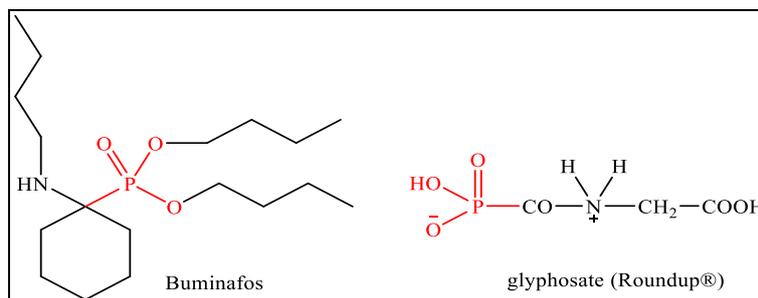


**Figure I. 16: La formule chimique de fosinopril.**

### b) Industrie agricole

\* Dans l'agriculture, l'herbicides le plus utilisés au monde (**le glyphosate -N (phosphonométhyl) glycine** (Round up ©)) (figure I. 17) est un acide aminophosphonique [25].

\* Le **Buminafos** (figure I. 17) est utilisé comme régulateur de la croissance des plantes [8].

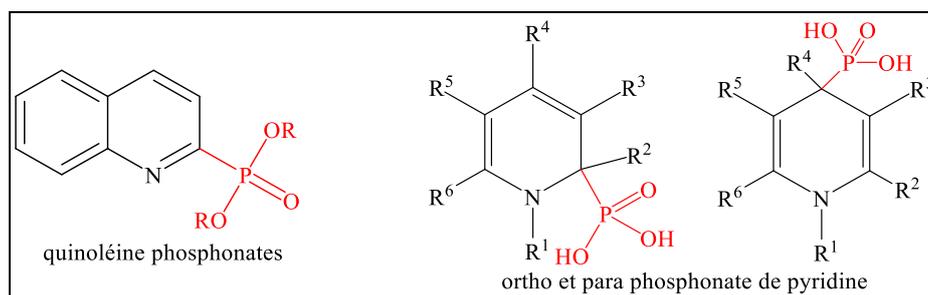


**Figure I. 17: Structures des composés phosphonates utilisés dans l'agriculture.**

**c) Inhibiteurs de corrosion:** l'utilisation de composés organophosphorés comme inhibiteurs de corrosion du métal et des alliages est largement appliquée en raison de leur faible toxicité, de leur haute stabilité et leur adsorption sur la surface du métal. Les phosphonates bien que d'utilisation constante depuis un certain nombre d'années, ce sont des composés dont la mise au point est toujours d'actualité [26].

\* La quinoléine phosphonates (figure I. 18) préparée par la réaction entre la quinoléine et un dialkyle phosphite est utilisée comme un inhibiteur de corrosion et possède des propriétés inhibitrices intéressantes.

\* Les dérivées de pyridine substituées en position ortho ou para par un groupement phosphonique (figure I. 18) sont largement utilisées comme des inhibiteurs de corrosion. Ils sont efficaces dans la protection des surfaces métalliques contre l'humidité, l'eau, les acides inorganiques, les acides organiques, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S [8].



**Figure I. 18: Structure des inhibiteurs de corrosions de type phosphonate.**

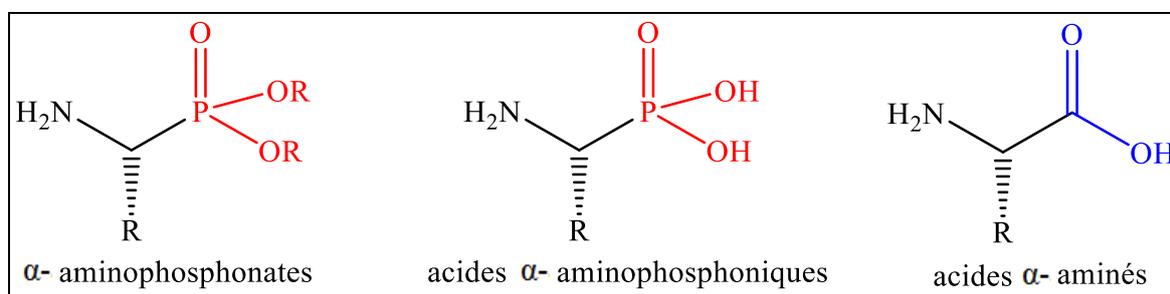
**d) Traitement des eaux et protection de l'environnement :** les phosphonates sont utilisés dans le traitement des eaux comme des agents de chélation et de précipitation des métaux surtout les métaux lourds et toxiques, ceci permet d'éliminés ces métaux d'une façon très facile [27].

e) **Dans les détergents:** les phosphonates sont fréquemment utilisés parce qu'ils empêchent la précipitation des sels de calcium, stabilisent les agents blanchissants et empêchent l'accumulation de dépôt calcaire [28].

f) **Dans l'industrie des catalyseurs :** les phosphonates sont utilisés généralement dans la préparation des catalyseurs hétérogènes, cocatalyseur dans la préparation du polypropylène isotactique, les complexes des phosphonates avec l'Ir sont utilisés comme catalyseurs dans l'hydrogénation des oléfines [29].

### I.1.4. Les $\alpha$ -aminophosphonates

Les  $\alpha$ -aminophosphonates et les acides  $\alpha$ -aminophosphoniques occupent une place importante parmi les divers composés contenant une liaison P-C et un groupe amino, en raison de leur large spectre d'activité biologique [14,30]. Leurs structures sont des analogues aux acides  $\alpha$ -aminés (des unités de peptides et des protéines) dans lesquels le groupe acide carboxylique est remplacé par un groupe acide phosphonique  $P(O)(OH)_2$  (ou  $P(O)(OR)_2$  pour les  $\alpha$ -aminophosphonates), ils ont suscité un intérêt particulier et ont atteint une position éminente dans les domaines de la recherche concernant la découverte, la compréhension, et la modification des processus physiologiques dans les organismes vivants [31,32].



**Figure I. 19: Structures des  $\alpha$ -aminophosphonates, acides  $\alpha$ -aminophosphoniques et des acides  $\alpha$ -aminés.**

#### I.1.4.1. Propriétés des $\alpha$ -aminophosphonates

➤ Premièrement, étant des analogues structuraux des acides aminés, les acides  $\alpha$ -aminophosphoniques peuvent agir en tant que leurs antimétabolites et concurrencer leurs contreparties carboxyliques pour les sites actifs des enzymes et d'autres récepteurs cellulaires.

Les groupes carboxyliques et phosphoniques diffèrent essentiellement à bien des égards, y compris la taille (la fonction phosphonique est considérablement plus grande), la forme (carboxylate plane et phosphonate tétraédrique), la basicité (le phosphonate est plus

basique que carboxylate) et la charge (le phosphonate est binegative, alors que carboxylate est mononégative) [11].

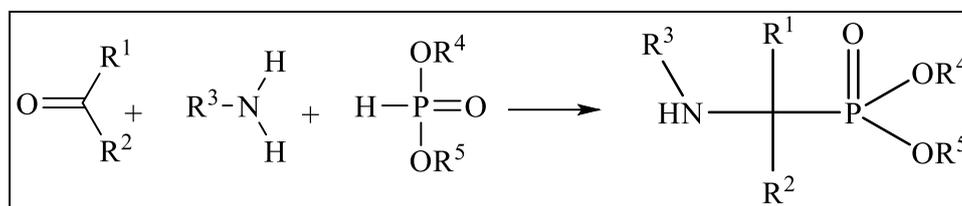
La configuration tétraédrique de phosphore a des implications importantes dans la conception de l'état de transition d'inhibiteurs l'enzyme-analogique, qui a un potentiel de grande envergure dans la chimie médicinale [12,33].

➤ Deuxièmement, les aminopolyphosphonates et les polyaminopolyphosphonates, y compris les chaînes ouvertes et les dérivés cycliques, contenant des donneurs fort peuvent chélater les ions métalliques essentiels ou toxiques assez fortement et entre en concurrence avec des métalloenzymes ou d'autres métallo-récepteurs, pour enlever les ions métalliques toxiques des systèmes vivants, ou pour assurer leur prise par l'organisme [11].

### I.1.4.2. Synthèse des $\alpha$ -Aminophosphonates

Parmi les voies de synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates, nous citerons les méthodes les plus utilisées.

**a) La réaction de Kabachnik–Fields :** selon cette réaction les  $\alpha$ -aminophosphonates ont été obtenu on faisant réagir les composés carbonylés (aldéhydes ou cétones), amine et di-ou trialkyl phosphite en une seule étape. Beaucoup de recherches ont été effectuées sur le mécanisme de cette réaction à trois composants [12,33].



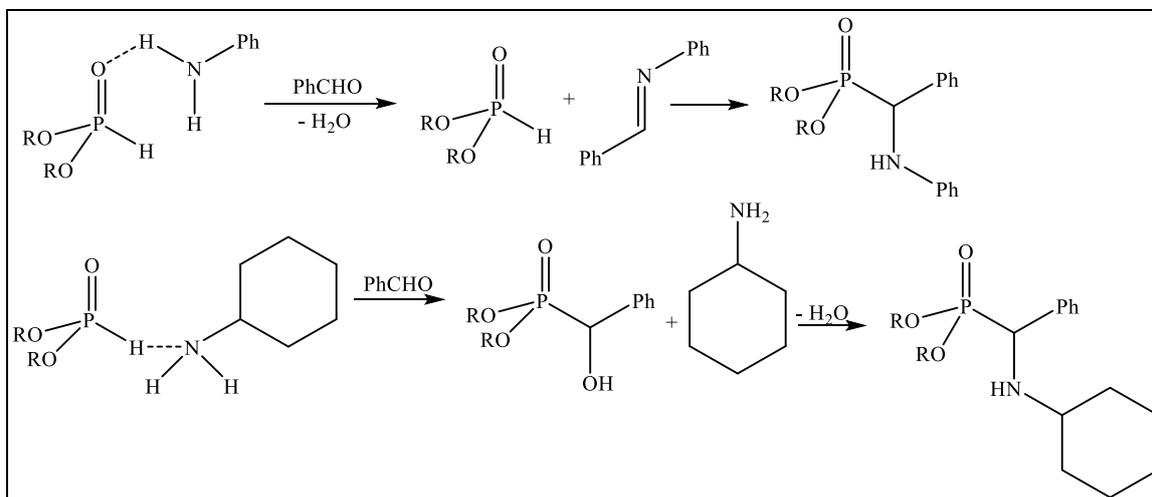
**Figure I. 20: La réaction de Kabachnik-Fields.**

Cette procédure de synthèse est en quelque sorte similaire à la réaction de Manich qui est une aminométhylation des aldéhydes et des cétones ayant un atome d'hydrogène  $\alpha$ -labile avec des amines primaires ou secondaires [8].



Basés sur les données expérimentales, Petrov et al ont suggéré que la voie de la réaction Kabachnik-Fields dépend de la nature des substrats. L'amine et le composé hydrphosphoryl forment un complexe dont lequel l'un ou l'autre de ces deux partenaires réagissent avec les composés carbonylés. Souvent, la basicité de l'amine détermine la voie de réaction. Les amines faiblement basiques tels que l'aniline, qui peuvent agir comme donneurs

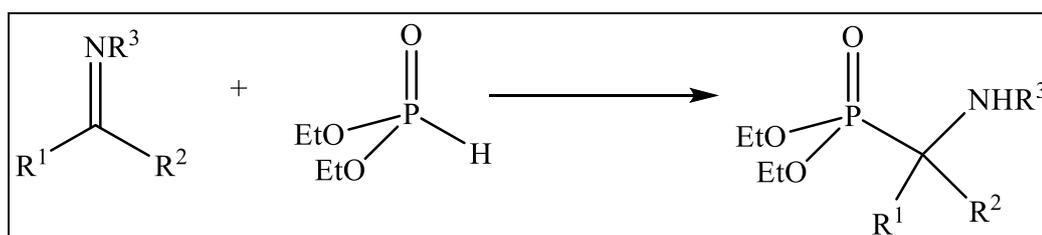
des protons, favorisent la formation d'une imine, tandis que les alkylamines tels que cyclohexylamine ne donnent pas d'imes. Le processus réactionnel représenté dans la (figure I. 21).



**Figure I. 21: Le mécanisme de réaction de Kabachnik-Fields.**

La vitesse de réaction peut être influencée par l'ajout des catalyseurs, comme les acides et les bases. Les inconvénients de cette méthode sont souvent les rendements modérés et parfois la portée limitée de la réaction [12,33].

**b) La réaction de Pudovik :** la seconde voie est la réaction de Pudovik, où dialcyle phosphite sont ajoutés à des composés contenant une liaison imine. De nombreuses variétés de cette réaction existent en utilisant des catalyseurs soit des bases ou des acides de Lewis ( $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{Me}_2\text{AlCl}$ ,  $\text{BF}_3$ ,  $\text{SnCl}_4$  et  $\text{ZrCl}_4$ ,.....[34].

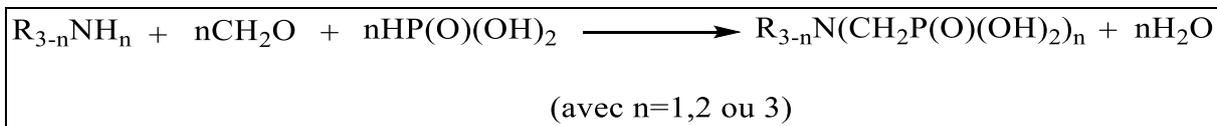


**Figure I. 22: La réaction de Pudovik.**

**c) Réactions pour l'obtention des acides  $\alpha$ -aminophosphoniques :** parmi les méthodes les plus intéressantes on cite les travaux de Kabachnik-Fields qui décrivent la synthèse des acides  $\alpha$ -aminophosphoniques par l'hydrolyse de leur ester.

Après la préparation des acides et esters de mono- et poly-méthylène-diphosphoniques en 1966, Moedritzer et Irani ont développé une nouvelle procédure pour la synthèse des

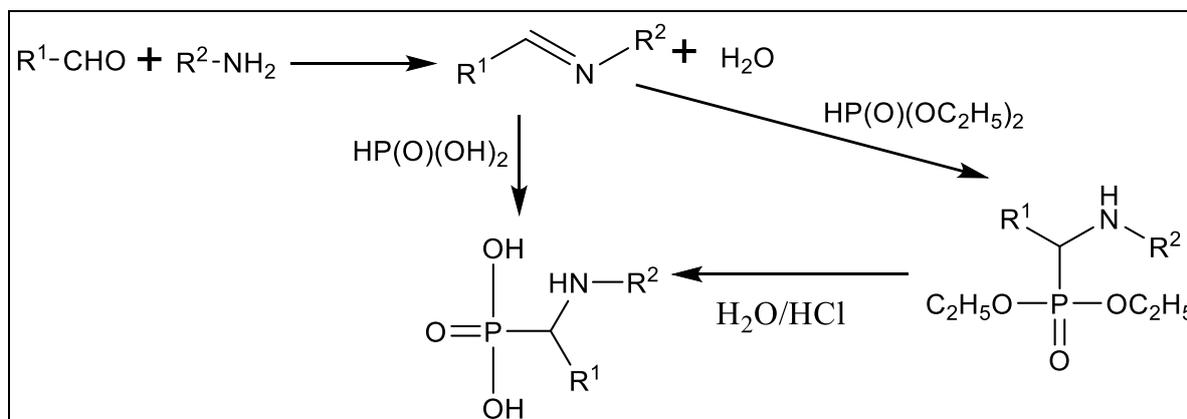
acides  $\alpha$ -aminophosphoniques en se basant sur la réaction de Kabachnik-Fields. Ils ont préparé des acides  $\alpha$ -aminométhylphosphoniques en impliquant un acide phosphoreux, formaldéhyde et une série d'amines (figure I. 23) [35].



**Figure I. 23: Réaction de préparation des acides  $\alpha$ -aminométhylphosphoniques d'après Moedritzer-Irani.**

En 1970, une autre procédure générale a été mise en vue par Roman Tyka pour la synthèse d'une série d'acides N-benzyle- $\alpha$ -aminophosphoniques à partir d'une réaction d'addition entre une série de bases de Schiff et du diéthylphosphite (figure I. 24) [36].

En 1978, une série d'acides  $\alpha$ -aminophosphoniques a été synthétisée par Derek Redmore, en réagissant l'acide phosphoreux avec une série d'imines qu'a été préparée en premier temps à partir d'une condensation de quelques amines avec une série d'aldéhydes (figure I. 24) [37].



**Figure I. 24: Synthèse des acides  $\alpha$ -aminophosphoniques.**

## I.2. Activité antibactérienne

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes qui sont présents dans l'air, dans le sol, dans les eaux douces, dans les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'arbre respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites ; Ils sont soit des hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes.

L'infection est la conséquence du développement, dans un organisme sain, des microorganismes pathogènes. Elle résulte de la rupture d'équilibre qui existe entre le germe et l'homme (hôte). Ce déséquilibre provient donc soit d'une diminution des défenses du sujet (congénitale ou acquise), soit d'un accroissement de virulence de germes [38,39].

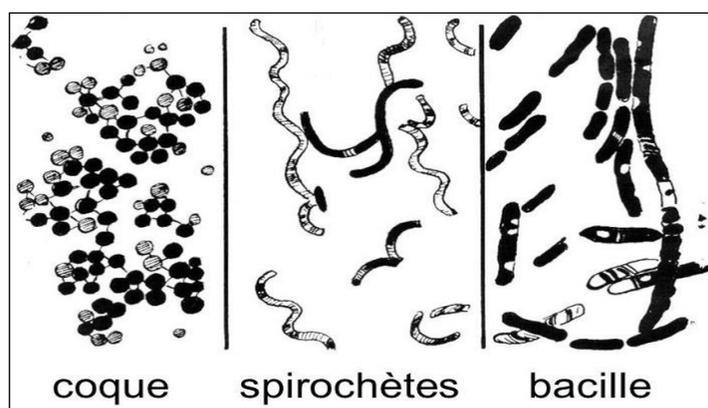
Le monde bactérien, qui sera traité dans ce travail, comprend plusieurs milliers d'espèces mais, seulement près d'une centaine sont pathogènes pour l'homme et l'animal. Une bactérie pathogène est susceptible d'induire, lorsqu'elle infecte un hôte, une maladie se traduisant par des signes anormaux, l'un des plus constants étant la fièvre [40].

### I.2.1. Morphologie et structure fine des bactéries

Les bactéries sont parmi les plus anciens et les plus abondants êtres vivants sur terre. Ce sont des micro-organismes unicellulaires, d'une taille de l'ordre du micron.

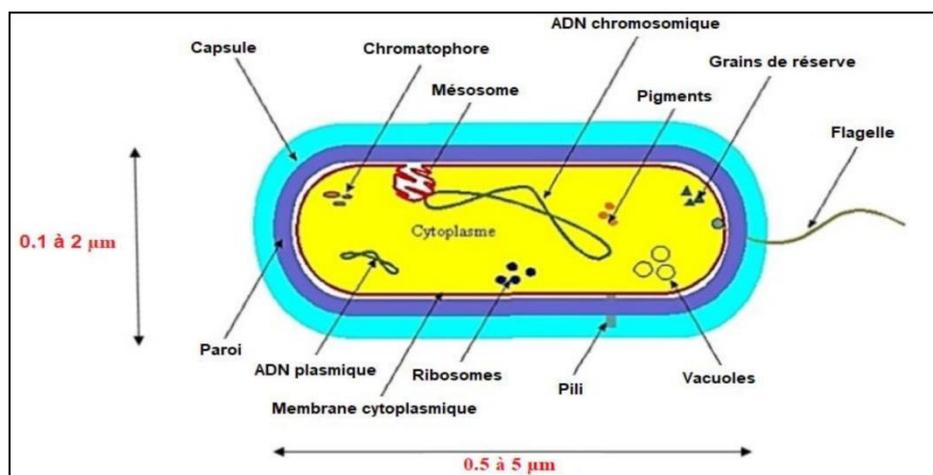
Durant de longues années, la bactérie a été considérée comme "un sac d'enzymes" car le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de structure.

L'observation des bactéries, alors, permet seulement de reconnaître la forme des cellules (sphérique ou coccoïde, cylindrique ou bâtonnet, spiralée ou hélicoïdale), leurs dimensions et les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles (en grappe, en chaînette, en paire ou diplocoque, en palissade ou paquet d'épingles).



**Figure I. 25: Différentes formes des bactéries.**

C'est la microscopie électronique avec ses différents modes d'exploitation qui a mis en lumière l'architecture interne de la bactérie telle qu'elle est représentée par la figure I. 26 :



**Figure I. 26: Exemple d'une structure bactérienne.**

La cellule est enveloppée par une **paroi** rigide, qui lui donne sa forme et sa résistance; la paroi entoure une **membrane cytoplasmique**, plus fine et plus délicate.

Les bactéries sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un **ADN chromosomique** circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomique, appelée plasmide, qui portent des informations génétiques spécifiques (exemple résistance à certains antibiotiques).

D'autres composants peuvent être présents (éléments facultatifs), comme le glycocalyx (polymère de surface polysaccharidique), la capsule, les flagelles (mobilité), les fimbriae (fixation sur d'autres cellules), les pili sexuels (interviennent au cours des processus de conjugaison).

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est "la coloration de Gram" « Découverte par le médecin danois Hans Christian Joachim Gram en 1884 ». Elle consiste à traiter des bactéries fixées à la chaleur, par un colorant basique (violet de gentiane) puis une solution iodo-iodurée (mordantage), toutes les cellules se colorent en violet. Soumises ensuite à l'action de l'alcool éthylique elles se répartissent en: cellules qui conservent la coloration violette dites à **gram positif** et qui sont décolorées, appelées à **gram négatif**. Pour mieux distinguer ces deux catégories, le frottis bactérien est finalement traité par de la fuchsine basique, les bactéries à gram négatif sont roses et celles à gram positif restent violettes.

Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs: bactéries à gram positif (colorées en violet), bactéries à gram négatif (colorées en rose). Cette distinction de réponse à la coloration de

gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir [40, 41,42].

La paroi est l'enveloppe externe de la cellule bactérienne. Elle joue un rôle essentiel dans la protection des bactéries contre les agents extérieurs et le maintien d'une pression osmotique intracellulaire élevée, ceci grâce à la présence d'une substance complexe appelée « peptidoglycane ». La paroi des bactéries à Gram positif est composée d'épaisses couches de peptidoglycane, les bactéries à Gram négatif possèdent une couche plus fine de peptidoglycane [43].

### **I.2.2. Les Antibiotiques**

L'organisme humain possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces bactéries sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave.

Les maladies infectieuses causées par les bactéries affectent des millions de personnes dans le monde entier; Les principales infections bactériennes sont la tuberculose, la pneumonie, l'angine, la bronchite, infections urinaires, les abcès, l'acné... [44].

Les bactéries ne sont pas seulement nuisibles pour l'homme et l'animal, mais d'autres produits, substances ou matériaux peuvent être détruits ou altérés sous l'effet de leur multiplication: détérioration des produits alimentaires; plusieurs monuments d'un grand intérêt historique sont dégradés; les canalisations aussi peuvent être perforées.

Alors, il est devenu indispensable à l'homme de mener une lutte contre l'envahissement des microorganismes, pour conserver ses biens, son potentiel industriel, son patrimoine artistique et pour protéger son existence même.

Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température, rayonnements...), les agents chimiques (métaux lourds, chlore et dérivés, alcools...) sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales. Mais il y a d'autres agents, possédant une "*toxicité sélective*": ils s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, et sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les "*Antibiotiques*" [40].

### I.2.2.1. Définition

Le mot antibiotique signifie au sens étymologique: **contre** (anti) les **organismes vivants** (biotiques), le mot biotique signifie ici plus précisément contre les bactéries, terme créé par Waksman [45].

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries), mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales. Le cadre des antibiotiques était limité d'abord à des substances d'origine biologique produites par des champignons, s'est élargi plus tard et comprend actuellement d'autres produits possédant la même action antibactérienne, mais obtenus par synthèse ou semi synthèse par modification chimique d'une molécule de base naturelle [46].

### I.2.2.2. Critères de Classification

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

**a) Origine :** élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).

**b) Mode d'action :** paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.

**c) Spectre d'activité :** chaque antibiotique possède un spectre d'action, qui est la liste des espèces sur lesquelles il exerce son activité, il est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre [46].

**d) Nature chimique :** très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse [43].

**e) Modalités d'action :** Quand l'antibiotique inhibe seulement la croissance des bactéries, on parle ici de l'effet bactériostatique, mais lorsque l'antibiotique provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide [47].

**L'effet bactériostatique :** C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît. En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne étudiée, exprime en mg/L.

**L'effet bactéricide :** C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'antibiotique utilisées in vivo ou in vitro; s'il persiste moins de 0,01% de survivants après 18 h de culture. Donc arrêt de la croissance et mortalité quantifiable en termes de CMB, (concentration minimale bactéricide) plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,99 % [43].

### I.2.2.3. Les cibles bactériennes des antibiotiques

A la différence des antiseptiques, les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises, à des concentrations mille à dix mille fois plus faibles que les antiseptiques. En générale on peut classifier les mécanismes d'action des antibiotiques en quatre catégories selon la molécule et le lieu d'action.

**a) Action sur la paroi bactérienne :** l'antibiotique bloque la synthèse de la paroi, ce qui empêche la formation de nouvelles bactéries et peut entraîner la destruction de celles déjà existantes. Les  $\beta$ -lactames (famille à laquelle appartient la pénicilline) et la fosfomycine (acide phosphonique) agissent suivant ce mode d'action.

**b) Action sur la membrane cellulaire :** d'autres antibiotiques altèrent la membrane cytoplasmique, provoquant des troubles létaux de perméabilité, exemple: **la polymyxine**.

**c) Action sur la synthèse protéique :** ce groupe d'antibiotiques inhibe de façon sélective la synthèse des protéines bactériennes ont pour cible le ribosome bactérien, l'organite cellulaire qui est responsable de la synthèse des protéines. Les tétracyclines (auréomycine) et les macrolides (érythromycine) agissent suivant ce mode d'action.

**d) Action sur la synthèse de l'ADN :** la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) peut aussi être perturbée par les antibiotiques: cas des sulfamides, des quinolones, des rifamycines et des nitroimidazoles.

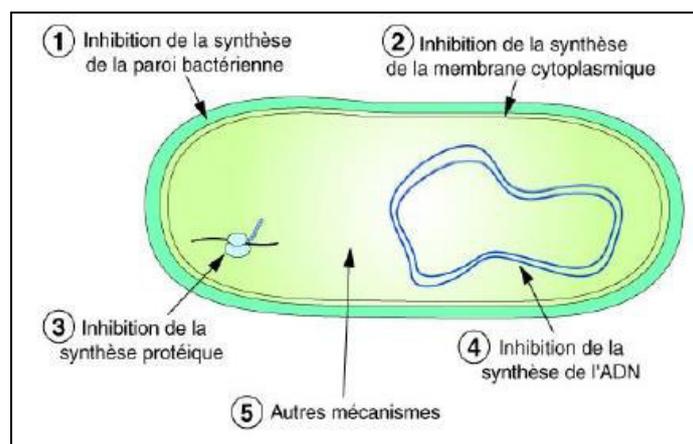


Figure I. 27: Mode d'action des antibiotiques [40, 48, 49].

### I.2.2.4. Résistance bactérienne

L'utilisation massive des antibiotiques en médecine depuis plus de 60 ans et comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale [50] est la cause principale de l'apparition et de la multiplication de souches bactériennes résistantes, c'est-à-dire capables de se multiplier en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe normalement les souches de cette même espèce [51].

Ensuite, chaque fois qu'a été mis au point un nouvel antibiotique, les bactéries s'y sont adaptées plus ou moins vite. La compréhension de ces mécanismes est aujourd'hui une priorité afin d'éviter un basculement vers une situation médicale similaire à celle de la période antérieure à la découverte des antibiotiques.

Il faut distinguer la résistance innée ou naturelle, de la résistance acquise apparaissant chez des bactéries sensibles aux antibiotiques.

**a) Résistance naturelle :** caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne, elle est toujours transmissible à la descendance. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien.

**b) Résistance acquise :** le terme de résistance acquise est utilisé pour désigner des processus permettant à des bactéries appartenant à une espèce naturellement sensible de devenir résistante à un ou plusieurs antibiotiques [52,40].

Trois grandes catégories de mécanismes rendent compte de la résistance acquise des bactéries aux antibiotiques :

***L'inactivation enzymatique:*** l'antibiotique est modifié par la production d'une enzyme bactérienne et ne reconnaît plus sa cible.

***Résistance par défaut d'affinité entre la cible bactérienne et l'antibiotique:*** altération ou modification de la cible sur laquelle se fixe l'antibiotique, ou la synthèse de molécules ayant une faible affinité pour les antibiotiques [45, 40].

***La diminution de perméabilité ou l'apparition de système d'efflux:***

➤ La diminution de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique par modification de structure des porines ou plus simplement une diminution du nombre de porines sur la membrane externe va permettre à certaines bactéries d'acquérir une résistance à certains antibiotiques.

➤ Il existe chez les bactéries des systèmes permettant d'excréter certains antibiotiques. Ces systèmes jouent un rôle dans la résistance naturelle, sous l'effet de mutation, leur niveau d'expression peut augmenter et faire apparaître une résistance acquise pouvant toucher simultanément plusieurs familles d'antibiotiques, le phénomène été décrit surtout chez le gram négatif [40].

### Références bibliographiques

- [1] R. Dubrisay, P. Pascal, *Nouveau traité de chimie minérale*, 10, 715-717 (1956).
- [2] Handbook of chemistry and physics -1971, 51, B23 (1970).
- [3] B. K. Singh, A. Walker, D. J. Wright, *Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds*, *Soil Biology & Biochemistry*, 37(2005) 1675-1682.
- [4] P.J. Murphy, *Organophosphorus Reagents: A Practical Approach in Chemistry*, Oxford University Press Inc., Oxford UK (2004).
- [5] M. Kaid, *Synthèse d'acides phosphoniques et préparation de catalyseurs : applications à la catalyse et à l'extraction du Zn (II), Cu (II) et La (III)*, thèse de doctorat en catalyse et environnement, université Abou bekr Belkaid- Tlemcen (2009).
- [6] M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa*, *Nature*, 184 (1959) 901-902.
- [7] M. Tamari, A. Cassaigne, A-M. Lacoste, E. Neuzil, *In vivo incorporation of cytidine-monophosphate-ciliatine into rat liver lipids*, *Biochimie*, 57 (1975) 97-103.
- [8] K. D. Troev, *Chemistry and Application of H-Phosphonates*, Elsevier Science (2006).
- [9] S. Goumain, *Monosaccharides des hémicelluloses: Matière première pour la chimie organique fine*, Université de Reims Champagne-Ardenne 51687 Reims cedex 2 France, (1996).
- [10] V.P. Kukhar, H. R. Hudson, *Amonophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity*, Wiley: New York, (2000).
- [11] A. K. Bhattacharya, G. Thyagarajan, *Michaelis-arbuzov rearrangement*, *Chem. Rev.* 81(1981) 415-430.
- [12] a) A. Michaelis, R. Kaehne, *Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine*, *Berichte*. 31 (1898) 1048–1055.  
b) A.E. Arbuzov, *Reactions of alkyl halides with phosphites*, *J. Russ. Phys. Chem. Soc.* 38 (1906) 687.
- [13] M. D. Francis, R. Graham, G. Russell, H. Fliesch, *Diphosphonates Inhibit Formation of Calcium Phosphate Crystals in vitro and Pathological Calcification in vivo*, *Science*, 165 (1969) 1264-1266.
- [14] R. Engel, *Phosphonates as analogues of natural phosphates*, *Chem. Rev.* 77 (1977) 349-367.

- [15] R.Y. Chen, L.J. Mao, *The synthesis and antitumor activity of novel 1,3,5,2-triazaphosphorines linked with nitrogen mustards*, *Heteroatom Chemistry*, 5 (1994) 125-129.
- [16] S. P. Luckman, D. E. Hughes, F. P. Coxon, R. Graham, G. Russell, M. J. Rogers, *Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent posttranslational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras*, *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 581-589.
- [17] S. Saker, N. Aliouane, H. Hammache, S. Chafaa, G. Bouet, *Tetraphosphonic acid as ecofriendly corrosion inhibitor on carbon steel in 3 % NaCl aqueous solution*, *Ionics* 21 (2015) 2079–2090.
- [18] C.B. Verma, A. Singh, G. Pallikonda, M. Chakravarty, M.A. Quraishi, I. Bahadur, E.E. Ebenso, *Aryl sulfonamidomethylphosphonates as new class of green corrosion inhibitors for mild steel in 1 M HCl: Electrochemical, surface and quantum chemical investigation*, *Journal of Molecular Liquids* 209 (2015) 306–319.
- [19] E. De Clercq, *Acyclic nucleoside phosphonates: Past, present and future: Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: The phosphonate bridge*, *Biochemical Pharmacology* 73 (2007) 911– 922.
- [20] D. Hendlin, E.O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A.K. Miller, F.J. Wolf, T.W. Miller, L. Chaiet, F.M. Kahan, E.L. Foltz, H.B. Woodruff, J.M. Mata, S. Hernandez, S. Mochales, *Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces*, *Science* 166 (1969) 122-123.
- [21] F.R. Atherton, M.J. Hall, C.H. Hassall, R.W. Lambert, W.J. Lloyd, P.S. Ringrose, *Phosphonopeptides as antibacterial agents: mechanism of action of alaphosphin*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 15 (1979) 696-705.
- [22] W. M. Abdou, A. A. Kamel, A. A. Shaddy, *Use of phosphonylcarbanions in the synthesis of anti-inflammatory active phosphorus-containing fused heterocycles and relevance phosphonates*, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5217-5224.
- [23] S. Kirkiacharian, *Guide de chimie médicinale et médicaments*, édition TEC & DOC, Paris, Lavoisier, 2010.
- [24] <https://en.wikipedia.org/wiki/Fosinopril>, consulter 30-08-2020.
- [25] J. Emsley, D. Hall, *The chemistry of phosphorus*, Harper and Row, Wiley, New York, 1976.
- [26] (C.C.), NATHAN. –*Corrosion Inhibitors*. . s.l. : NACE, (1973).

- [27] T.P. Knepper, H. Weil, *Iodierte Röntgenkontrastmittel im anthropogen beeinflussten Wasserkreislauf*, Vom Wasser 97 (2001) 103-114.
- [28] Rapport d'HERA, Phosphonates, Human & Environmental Risk Assessment (HERA) on ingredients of European household cleaning products, CAS 6419-19-8; 2809-21-4; 15827-60-8, (2004).
- [29] Ger. Offen, 2,602,182 (1977); C.A., **87**, 136642q (1977).
- [30] K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, *Synthetic Methods for Azaheterocyclic Phosphonates and Their Biological Activity*, Chem. Rev, 104 (2004) 6177-6276.
- [31] M. Mikołajczyk, *Acyclic and cyclic aminophosphonic acids: asymmetric syntheses mediated by chiral sulfinyl auxiliary*, Organometallic Chemistry, 690 (2005) 2488-2496.
- [32] F. Palacios, J. Vicario, A. Maliszewska, D. Aparicio, *Synthesis of  $\alpha$ -Phosphorylated  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Imines and Their Selective Reduction to Vinylogous and Saturated  $\alpha$ -Aminophosphonates*, J. Org. Chem. 72 (2007) 2682-2685.
- [33] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, *The Kabachnik–Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism*, Russ. Chem. Rev. 67 (1998) 857 -882.
- [34] E. Van Meenen, K. Moonen, D. Acke, C.V. Stevens, *Straightforward continuous synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates under microreactor conditions*, Arkivoc. 1(2006) 31-45.
- [35] R.R. Irani, K. Moedritzer, *The direct synthesis of  $\alpha$ -aminomethylphosphonic acids, Mannich-Type reaction with Organophosphorus acid*, J Org Chem 31 (1966) 1603-1607.
- [36] R. Tyka, *Novel synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonic acids*, Tetrahedron Letters 11 (1970) 677-680.
- [37] D. Redmore, *Chemistry of phosphorus acid: new routes to phosphonic acids and phosphate esters*, J. Org. Chem 43 (1978) 992-996.
- [38] M. Khiati, *Guide des maladies infectieuses et parasitaires*. OPU, Alger (1998).
- [39] R. Naganawa, N. Iwata, K. Ishikawa, H. Fukuda, T. Fujino, A. Suzuki, *Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic*, Applied and Environmental Microbiology, 62(1996) 4238-4242.
- [40] H. Leclerc, J.-L. Gaillard, M. Simonet, *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris (1995).
- [41] M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International Editions (1997).
- [42] <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html>.
- [43] D. Yala, A. S. Merad, D. Mohamedi, M.N. Ouar–Korichi, *classification et mode d'action des antibiotiques*, Médecine du Maghreb 91 (2001) 5-12.

- [44] K. Rhayour, *Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Escherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, (2002).
- [45] P. Berche, J-L. Gaillard, M. Simonet, *Bactériologie: bactéries des infections humaines*, Flammarion médecine-sciences Paris (1988).
- [46] Garnier Delamare Dictionnaire des termes de médecine, Editions Maloine, Paris (1992).
- [47] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. J.Appl. Microbiol. 86 (1999) 985-990.
- [48] J. Duval, C.Y. Soussy, *Abrégé Antibiothérapie. 3<sup>ème</sup> édition*, Masson M, Paris(1985).
- [49] Y. Qin, N. Polacek, O. Vesper, E. Staub, E. Einfeldt, D.N. Wilson, K.H. Nierhaus, *The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome*, Cell. 127 (2006) 721–733.
- [50] M. Lipsitch, R. S. Singer, B. R. Levin, *Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door?* Proc.Natl.Acad. Sci.USA.99 (2002)5752-5754.
- [51] S.B. Levy; *Nontransferable resistance: still a problem. In The antibiotic paradox*, Plenum PublishingCo.New-York(1992).
- [52] M. Andreu, J-L. Mainardi, *Que doit-on connaître de la microbiologie pour prescrire un antibiotique ?* Rev Prat.53 (2003) 1545-1553.

**Chapitre II**  
**Analyses et méthodes**  
**expérimentales**

Dans ce chapitre nous présentons les différentes méthodes d'analyse physico-chimiques appliquées pour identifier le produit synthétisé ainsi que la méthode utilisée pour évaluer son activité antibactérienne.

### II.1. La chromatographie sur couche mince

Les techniques de chromatographie se sont développées avec une telle rapidité au cours de ces dernières années que leur utilisation en chimie analytique est devenue incontournable tant en laboratoire de recherche qu'en laboratoire de contrôle. A l'origine utilisée pour la séparation de substances colorées (d'où son nom), la chromatographie est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative.

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode simple et rapide qui permet d'identifier un composé, de vérifier sa pureté ou de suivre l'avancement d'une réaction en analysant des prélèvements successifs du milieu réactionnel afin de mettre en évidence l'apparition de produits et/ou la disparition de réactifs.

#### II.1.1. Principe de la technique

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants, elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- *Phase stationnaire (adsorbant)* : elle est le plus souvent constituée de silice  $\text{SiO}_2$ , déposée sur un support rigide en verre, en aluminium ou en plastique. Chaque grain de silice présente en surface des groupements silanols  $\text{Si-OH}$  : c'est donc un matériau polaire et protique.

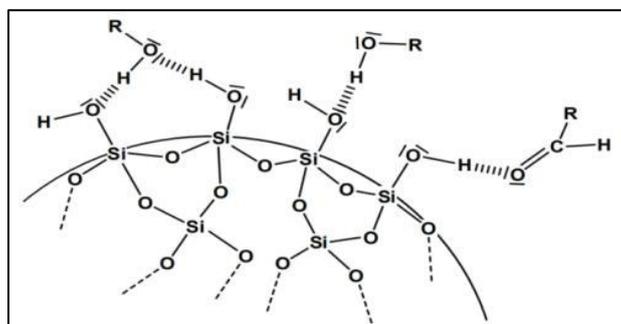
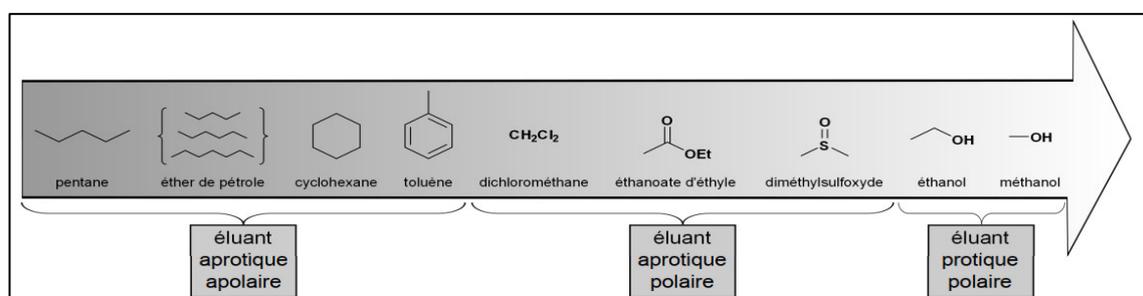


Figure II.1: Surface d'un grain de silice.

- *Phase mobile (éluant)* : c'est un solvant pur ou un mélange des solvants. Un éluant est caractérisé par sa polarité et sa proticité. Il n'est pas toujours aisé de comparer la polarité des éluants entre eux : on a généralement recours à une échelle empirique représentée ci-dessous [1].



**Figure II.2: Échelle de polarité relative de divers solvants utilisés comme éluant en CCM.**

- *L'échantillon* : environ un microlitre ( $\mu\text{l}$ ) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé sur la phase stationnaire en point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.

- *La cuve chromatographique* : le récipient qui contient l'éluant, c'est un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

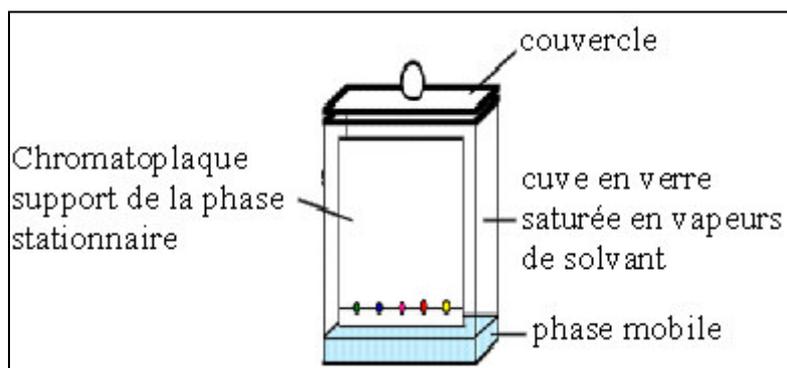
### II.1.2. Les étapes de la technique

On dépose sur la phase fixe une petite quantité de mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, essentiellement par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange.

Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. L'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en CCM, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires [2,3].

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal  $R_f$  qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule ( $d_{\text{substance}}$ ) sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) ( $d_{\text{solvant}}$ ) et qui peut donc être compris entre 0 et 1 [4].

$$R_f = \frac{d_{\text{substance}}}{d_{\text{solvant}}} \dots\dots\dots(\text{II.1})$$



**Figure II.3: Appareillage servant à la chromatographie sur couche mince.**

### II.1.3. Analyse du produit synthétisé par CCM

Elle a été réalisée sur des plaques **CCM** (Silice déposée sur plaque d'aluminium Alufolien, gel de silice 60 F-254Merck de 0.2 mm d'épaisseur), et développé par un éluant mélange de l'hexane/acétate d'éthyle de rapport 8/2; en volume, la révélation des taches est réalisée par observation sous lumière ultraviolette à (254 nm, 365nm).

### II.2. Point de fusion

Le point de fusion est la température à laquelle un corps passe de l'état solide à l'état liquide. Il s'agit d'une propriété physique caractéristique de la matière qui fournit des informations essentielles sur la composition et la pureté des matériaux [5]. Cette analyse peut s'effectuer par différents appareils de mesure reposant tous sur la restitution d'un gradient de température. Dans le travail au laboratoire on utilise des appareils de mesure de point de fusion automatique, ils sont faciles à manier, fonctionnent plus vite, fournissent des résultats reproductibles et qui ne dépendent pas de l'habileté d'un utilisateur.

La prise du point de fusion du produit obtenu s'est faite par un Fusiomètre BÜCHI Melting point B-540, est un appareil de mesure présentant un gradient de température, varie de 40°C à 500°C. La substance est placée directement dans des tubes capillaires sans avoir besoin d'aucun accessoire, lors du chauffage à partir d'un point donné, un changement de texture apparaît dans l'échantillon.



L'énergie absorbée dans la région UV de la radiation électromagnétique, produit des variations dans l'énergie électronique de la molécule résultant de transition d'électrons de valence dans celle-ci. Ces transitions consistent en l'excitation d'un électron d'une orbitale moléculaire (OM) liante  $\sigma$ ,  $\pi$  ou non liante  $n$  (niveau d'énergie bas ou état stable), vers l'orbitale antiliante,  $\pi^*$  ou  $\sigma^*$  (niveau d'énergie plus élevée ou état excité). La différence d'énergie entre les deux états concernés correspond à la fréquence d'irradiation  $\Delta E = h\nu$  [3].

Les diverses transitions possibles sont:

**-Transition  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ :** La grande stabilité des liaisons  $\sigma$  des composés organiques fait que la transition d'un électron d'une OM liante  $\sigma$  vers une OM antiliante  $\sigma^*$  demande beaucoup d'énergie: elle est située dans le lointain UV, vers 130 nm ( $\lambda_{\max}$  de l'éthane = 135 nm). C'est pourquoi les hydrocarbures saturés, qui ne présentent que des liaisons de ce type, sont transparents dans la région de l'UV proche.

**-Transition  $n \rightarrow \sigma^*$ :** elle se produit habituellement à des longueurs d'onde voisines de 200 nm et sont observables dans de nombreux composés présentant des hétéroatomes simplement liés, comme les alcools, les éthers, les amines, les dérivés halogénés, ...etc.

**-Transition  $n \rightarrow \pi^*$ :** ce type de transition se rencontre dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé. La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle facilement observable, située entre 270 et 280 nm. Exemple  $\lambda_{\max}$  de l'éthanal située à 293 nm.

**-Transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ :** les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée, conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm dont la position dépend de la présence des substituants hétéroatomique [7].

**Tableau II.1 : Absorptions typiques du chromophore simple [8].**

Class	Transition	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\log \epsilon$	Class	Transition	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\log \epsilon$
R-OH	$n \rightarrow \sigma^*$	180	2.5	R-NO <sub>2</sub>	$n \rightarrow \pi^*$	271	<1.0
R-O-R	$n \rightarrow \sigma^*$	180	3.5	R-CHO	$\pi \rightarrow \pi^*$	190	2.0
R-NH <sub>2</sub>	$n \rightarrow \sigma^*$	190	3.5		$n \rightarrow \pi^*$	290	1.0
R-SH	$n \rightarrow \sigma^*$	210	3.0	R <sub>2</sub> CO	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	3.0
R <sub>2</sub> C=CR <sub>2</sub>	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	3.0		$n \rightarrow \pi^*$	280	1.5
R-C≡C-R	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	3.0	RCOOH	$n \rightarrow \pi^*$	205	1.5
R-C≡N	$n \rightarrow \pi^*$	160	<1.0	RCOOR'	$n \rightarrow \pi^*$	205	1.5
R-N=N-R	$n \rightarrow \pi^*$	340	<1.0	RCONH <sub>2</sub>	$n \rightarrow \pi^*$	210	1.5

### II.3.1.2. Le domaine spectral (UV-Visible)

Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées ; proche UV (185-400 nm), visible (400-700 nm) et très proche infrarouge (700-1100 nm).

La plus part du spectre des spectromètres vont de 185 à 900 la limite inférieure des appareils dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet optique de l'air ambiant, sachant que le dioxygène et la vapeur d'eau absorbent de manière intense en dessous de 190 nm [9].

### II.3.1.3. Appareillage

Le spectrophotomètre UV-Vis comporte: une source de rayonnement, un dispositif monochromatique et un récepteur associé à un système de lecture de la mesure (microordinateur). Le compartiment réservé aux échantillons est habituellement placé entre le monochromateur et le récepteur. Les cuves contenant l'échantillon en solution et le solvant pur utilisé comme référence sont donc éclairées en lumière monochromatique. Les cuves sont normalement en verre, en quartz ou en silice [3].

### II.3.1.4. Spectre d'absorption UV-Visible

Un spectre d'absorption UV-Visible est le tracé de l'absorbance (A) en fonction de longueur d'onde ( $\lambda$  en nm). Il présente des bandes qui résultent des transitions électroniques.

Les spectres sont toujours tracés pour des solutions diluées et la nature de solvant employé doit être précisée, car elle peut influencer les valeurs de  $\lambda_{\max}$  et de  $\epsilon_{\max}$ . Les solvants utilisés ne doivent pas absorber dans cette zone [3].

### II.3.1.5. Utilisation de la spectroscopie UV-Visible

Le plus souvent on se sert des spectres UV-Visible pour déterminer :

- La pureté des substances chimiques.
- La composition d'un mélange dont les composants et leurs caractéristiques spectrales sont connus.
- La constante d'un équilibre chimique dans les solutions.
- La constante de dissolution des substances absorbantes.
- La constante d'acidité ou basicité des substances chimiques [10].
- Les concentrations inconnues.

La relation entre la concentration d'un composé et son absorbance dans le domaine d'UV-Vis est exprimée par la loi de Beer Lambert :

$$A = \log I_0/I = \epsilon c l \dots\dots\dots (II.2)$$

**A**: absorbance ; **I<sub>0</sub>**: intensité de la lumière incidente ; **I**: intensité de la lumière transmise; **ε**: coefficient d'extinction molaire; **c**: concentration de la solution en mol/l. **l**: l'épaisseur de la cuve [3].

### II.3.1.6. Analyse du produit synthétisé par UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Vis du produit synthétisé ont été enregistrés dans la région 200-800 nm avec un spectrophotomètre JASCO V-650 à température ambiante et dans méthanol, en utilisant des cellules en quartz de 1 cm de largeur.

### II.3.2. Spectroscopie infrarouge

#### II.3.2.1. Principe

Comme toute méthode spectroscopique la spectroscopie infrarouge met en jeu des échanges d'énergie entre une molécule et un rayonnement électromagnétique.

En spectroscopie infrarouge, on n'observe pas la transition des électrons comme dans le cas de la spectrophotométrie ultraviolet/visible, mais l'énergie associée à la vibration des liaisons chimiques [3,11].

#### II.3.2.2. Vibrations dans l'infrarouge

On distingue deux types de vibration :

**Vibrations d'élongation** (ou *stretching*) : on les appelle aussi vibrations de valence. Elles ont lieu lorsque deux atomes s'éloignent ou se rapprochent périodiquement le long de leur axe commun. On distinguera le mode symétrique et le mode antisymétrique.

**Vibrations de déformation angulaire** (ou *bending*) : elles correspondent à une modification des angles de liaison.

Quand il y a plus de deux atomes dans la molécule, les atomes peuvent vibrer ensemble selon une variété d'élongation et de déformations [12].

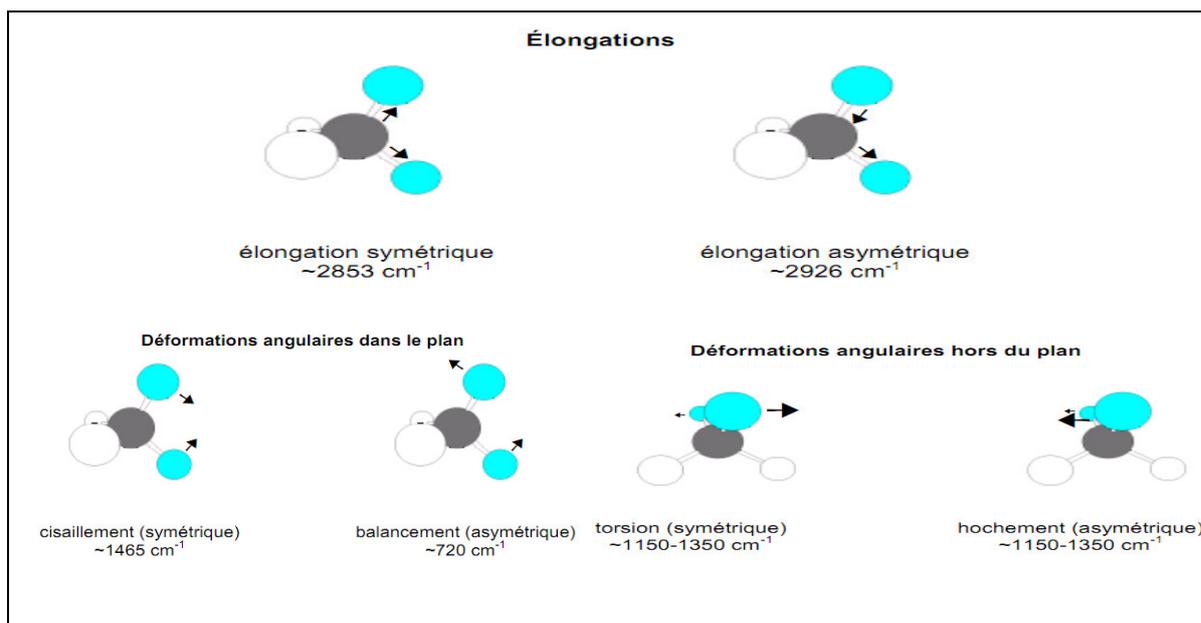


Figure II.6: Modes vibrationnels du groupement méthylène (CH<sub>2</sub>).

### II.3.2.3. Le domaine spectral (IR)

Les radiations infrarouges se situent dans la partie du spectre électromagnétique comprise entre la région du visible et celle des micro-ondes. La région limitée entre 4000 et 400 cm<sup>-1</sup> est la plus utile d'un point de vue pratique pour le chimiste organicien.

Les radiations infrarouges dont les longueurs d'onde dépassent 100 μm, sont absorbées par les molécules en modifiant leur énergie de rotation. Cette absorption est quantifiée. En revanche, les longueurs d'ondes comprises entre 1 et 100 μm correspondent à des transitions dans les énergies de vibrations moléculaires. Ces transitions sont aussi quantifiées mais le spectre de vibration présentera des bandes plus larges du fait qu'à chaque transition d'énergie de vibration peuvent s'associer diverses transitions d'énergie de rotation [13].

### II.3.2.4. Loi de Hooke

En spectroscopie infrarouge, on effectue un balayage de fréquence; Lorsque la fréquence de la radiation infrarouge est égale à la fréquence de résonance de la liaison, il y a absorption de l'énergie lumineuse et amplification des vibrations.

La fréquence de vibration entre deux atomes dépende de la force de leur liaison et de leur masse atomique selon la loi de **Hooke** qui décrit les mouvements d'un ressort:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K(M_x + M_y)}{M_x M_y}} \dots\dots\dots (II.2)$$

$\bar{\nu}$  : Fréquence de vibration ( $\text{cm}^{-1}$ );  $C$  : vitesse de la lumière ( $\text{cm}/\text{sec}$ ).

$K$  : constante de force de liaison ( $\text{dyne cm}^{-2}$ ) ;  $M_x$  et  $M_y$  : masses (g) des atomes x et y.

Chaque type de liaison possède une fréquence de vibration qui lui est propre [3,11].

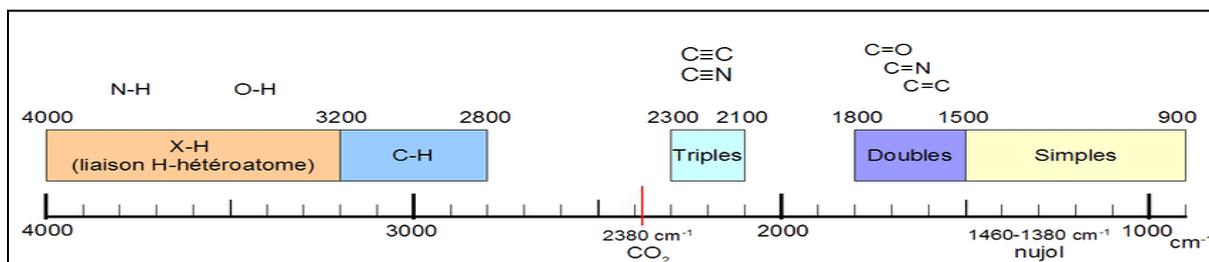
### II.3.2.5. Spectre IR

Un spectrophotomètre IR conduit à un document de base appelé spectre infrarouge. Habituellement, on enregistre les spectres IR en portant en abscisse l'inverse de la longueur d'onde (nombre d'onde) exprimée en  $\text{cm}^{-1}$ . En ordonnée, est reportée, pour chaque radiation, la transmittance, ou son pourcentage (%T).

Chaque bande est caractérisée par sa valeur de au maximum d'absorption; on précise également son intensité relative (F : forte, m : moyenne, f : faible....) [12].

### II.3.2.6. Application de spectroscopie infrarouge

Le spectre infrarouge est extrêmement important pour l'identification de groupements fonctionnelle. On peut consulter les tableaux pour connaître les bandes d'absorptions des principales liaisons et fonctions de différents composés [14].



**Figure II.7 : Quelques domaines d'absorption correspondant à divers types de liaison chimique.**

### II.3.2.7. Analyse du produit synthétisé par spectroscopie IR

La caractérisation infrarouge du produit synthétisé a été effectuée grâce à un spectromètre IR de type JASCO FT/IR-4200 en mode réflexion totale atténuée (ATR).

## II.4. Méthode utilisée pour l'évaluation des propriétés antibactériennes

L'activité antibactérienne du composé  $\alpha$ -aminophosphonate synthétisé est évaluée par la méthode de la diffusion en milieu solide par la méthode de disque, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012).

### II.4.1. Méthodes d'étude sur milieu solide

C'est une méthode de mesure qualitative permettant de tester l'existence du pouvoir antimicrobien. C'est l'équivalent d'un antibiogramme où les disques d'antibiotiques sont remplacés par d'autre imprégnés de produit a testé.

Il s'agit d'une méthode réalisée en milieu gélosé d'agar dans des boîtes de pétri. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque produit diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition.

La méthode des disques est choisie dans cette étude pour sa fiabilité et sa simplicité. Cette méthode nous fournit des résultats préliminaires sur l'activité antibactérienne du produit, grâce aux diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques mesurés en millimètres [15, 16, 17].

### II.4.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 heures sur milieu gélose nutritive, une suspension bactérienne a été préparée par le prélèvement de 2 à 3 colonies bactériennes à l'aide d'une pipette pasteur. Ces colonies ont été mises dans un tube d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) de façon à obtenir un inoculum de densité optique de 0.08 à 0.1, lue à 625 nm.

### II.4.3. Ensemencement

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Muller-Hinton (MH). Ce milieu permet la croissance de nombreuses bactéries et ne contient pas d'inhibiteurs des antibiotiques.

Le milieu MH a été coulé dans des boites de pétrie sur une épaisseur de 4 mm et laissé solidifier.

Ensuite, un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension bactérienne puis légèrement essoré en le pressant (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger le surplus.

L'écouvillon a été frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées.

L'opération a été répétée 2 à 3 fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, l'ensemencement était fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Laisser sécher les boîtes 10 minutes avant de déposer les disques.

#### **II.4.4. Dépôt des disques**

Pour chaque souche testée, des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre stériles ont été déposés sur la surface de la boîte de pétri contenant des géloses ensemencées puis imprégnés de 10µL du produit testé à différentes concentrations. D'autre disque chargé de 10 µL de DMSO ont été déposés pour servir des témoins négatifs. Un disque de l'antibiotique gentamicine est utilisé comme control positif.

#### **II.4.5. Incubation et lecture**

Après l'incubation des boîtes à l'étuve à 37°C durant 24 heures, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à produit testé, par contre, plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

### Références bibliographiques

- [1] A.S. Benard, S. Clède, M. Emond, H. Monin-Soyer, J. Quérard, *Techniques expérimentales en chimie*, Dunod (2014).
- [2] G. Burgot, J.L. Burgot, *Méthode instrumentale d'analyses chimiques et applications*, Editions médicales internationales - Lavoisier (EM Inter) (2002).
- [3] M. Chavanne, A. Jullien, G.J. Beaudoin, E. Flamand, *Chimie organique expérimentale*, Belin (1998).
- [4] K. Randerath, *Chromatographie sur couches minces*, Gauthier-Villars, Paris (1971).
- [5] L. Gattermann, H.E.I Nrichwieland, W. McCartney, *Laboratory methods of organic chemistry*, University of Edinbur, New York, the macmillan company (1937).
- [6] C. Chiter, Synthèse et étude électrochimique de furile, quinoxaline et ses dérivés, thèse de magister, université Ferhat Abbas Sétif (2007).
- [7] R.M. Silverstein, G.C. Basler, T.C. Morill, *Identification spectrométrique de composés organique*, Paris Bruxelles (1998).
- [8] H. Manfred, M. Herbert, Z. Bernd, *Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique*, Masson, Paris (1997).
- [9] F. Rouessac, A. Rouessac, *Analyse chimique méthode et technique instrumentales modernes*, Dunod (2004).
- [10] L. Lamiri, Analyse des propriétés électrochimiques et spectroscopiques des films de polymères conducteurs issus de l'électrocopolymérisation d'hétérocycles pentagonaux (thiophène, pyrrole, furanne), Université Ferhat Abbas Sétif 1 (2011).
- [11] H. H. Willard, L. L. Jr. Merritt, J. A. Dean, F. A. Jr. Settle, *Instrumental Methods of Analysis*, Wadworth Publishing Co., New York, 1981.
- [12] A. D. Cross, R. Alan Jones, *Introduction to Pratical Infrared Spectroscopy*, Butterworth, London (1969).
- [13] D. R. Browning, *Methodes spectroscopiques*, Masson, Paris, (1975).
- [14] N. Maouche, *Caractérisation et étude des protéine électrochimiques et spectroscopiques des polymere organiques conducteurs conjugues dopage par des métaux de transition d'oligo et polyoligothiophenes*, Université Ferhat Abbas Sétif 1 (2009).
- [15] S. Benkherara, O. Bordjiba, A.B. Djahra, *Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Saugé officinalis: SalviaofficinalisL. Sur quelques entérobactéries pathogènes*, Revue Synthèse 72 (2011) 72-80.

[16] M. Lis-Balchin, S.L. Hart , S.G. Deans, *Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (Melaleuca alternifolia, Leptospermum scoparium or Manuka and Kunzea ericoides or Kanuka), originating in Australia and New Zealand*, *Phytotherap. Research.* 14 (2000) 623-629.

[17] S.A. Burt, R.D. Reinders, *Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7*, *Lett. Appl. Microbiol.* 36 (2003) 162-167.

***Chapitre III***  
***Résultats et discussion***

De nombreuses recherches ont été consacrées à la préparation et à l'étude des activités biologiques de structures comportant un motif phosphorique. C'est pourquoi nous sommes intéressés à ce type de composés et plus particulièrement à l'étude des activités antimicrobiennes des  $\alpha$ -aminophosphoniques.

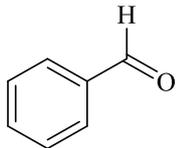
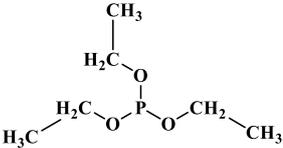
Pour cette raison, l'objectif de ce travail est de synthétiser un composé de la famille des  $\alpha$ -aminophosphonates et d'appliquer ce composé dans des tests biologiques préliminaires.

Donc pour ce chapitre, on va site d'abord la méthode de synthèse suivi par la caractérisation par les méthodes spectrales et après l'interprétation de cette dernière, pour confirmer la structure de ce composé, on a évalué son propriété antibactérienne.

### III.1.Réactifs et solvants utilisés

Les marques des produits chimiques employés dans ce mémoire sont: Sigma -Aldrich, et Fluka. Pour les solvants ils sont utilisés sans traitement préalable.

**Tableau III. 01: Caractères physicochimiques principaux des réactifs utilisés.**

<i>Réactifs</i>	<i>Pureté</i>	<i>Formule brute</i>	<i>M(g/mol)</i>	<i>Densité</i>	<i>Structure chimique</i>
Dodécamine	99%	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> N	185.35	0.804	CH <sub>3</sub> —(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> —NH <sub>2</sub>
Benzaldéhyde	98%	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106,121	1.049	
Triéthylphosphite	98%	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> P	166.155	0.969	
Chlorure de cobalt		CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	237,839		
Sulfate de magnésium		MgSO <sub>4</sub>	120,366		

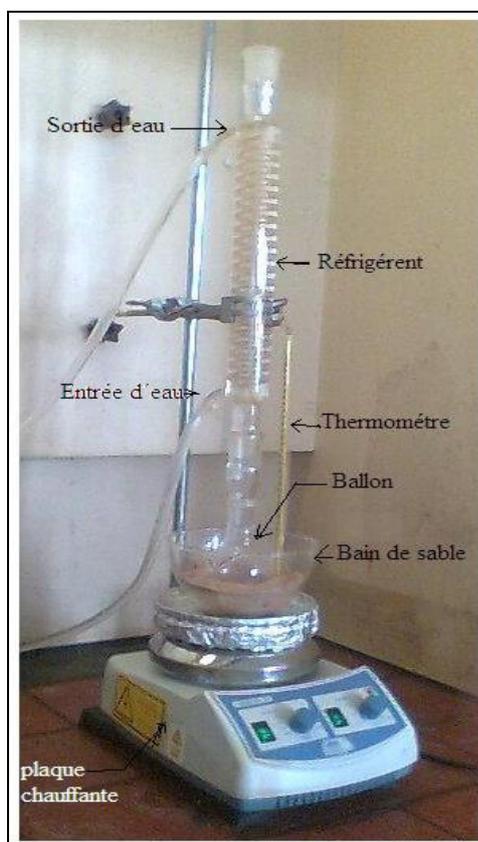
**Tableau III. 02 : Caractères physicochimiques des solvants utilisés.**

<i>Solvants</i>	<i>Formule brute</i>	<i>M (g/mol)</i>	<i>Pureté%</i>	<i>T d'ébullition (°C)</i>
L'eau distillée	H <sub>2</sub> O	18.00		100
L'acétate d'éthyle	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88.11	99.4	77
<i>n</i> -hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86.18	95	69
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	119.38	99	61.2
Méthanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	99.8	65
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	78.13	98	189

### III.2.Montage utilisé pour la synthèse et la séparation

Le montage expérimental de synthèse, est constitué des éléments suivants, figure III. 01:

- Une plaque chauffante.
- Un bain de sable équipé par une sonde de température.
- Un réfrigérant serpentant.
- Un ballon de 50 ml.
- Un barreau magnétique.



**Figure III. 01:Montage expérimental de synthèse.**

Pour la séparation de la molécule synthétisée on utilise un Rotavapeur (Laborota 4000 Heidolph).



**Figure III. 02: Rotavapeur**

### III.3. Synthèse de la molécule ciblée

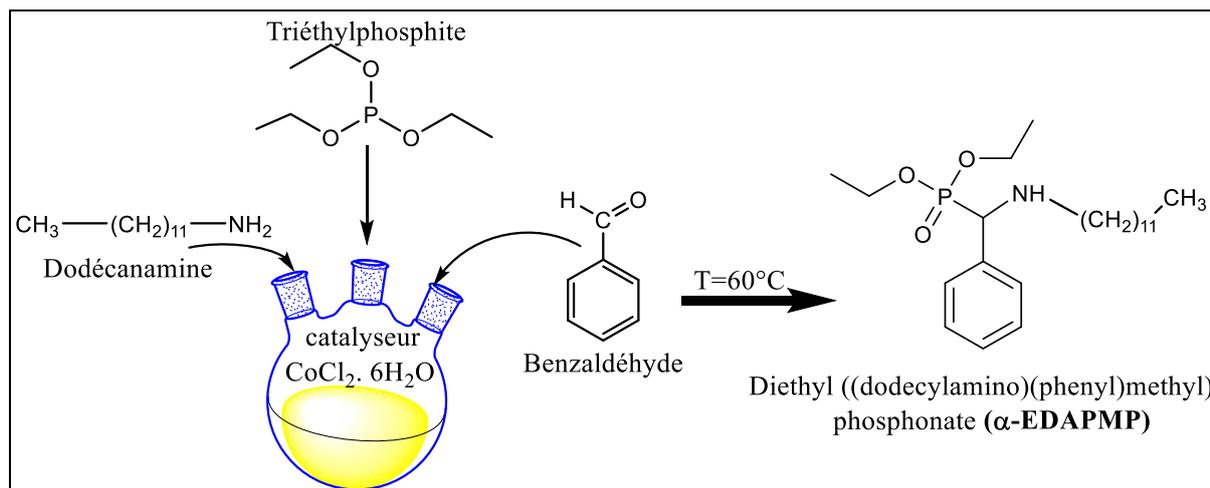
Plusieurs méthodes sont citées dans la littérature pour la synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates et leur dérivé, chacune de ces méthodes possède une certaines limite d'utilisations [1].

Parmi les méthodes les plus intéressantes, on a choisi la méthode de Kabachnik-Fields pour la synthèse de la molécule ciblée, vue la simplicité de cette méthode, le rendement élevé et dans une courte durée on conduisant directement aux  $\alpha$ -aminophosphonates pure sans passé à la séparation et avec la possibilité de récupérer le catalyseur utilisé [2].

#### *\*Mode opératoire*

Pour la préparation de l'ester, Diethyl ((dodecylamino)(phenyl)methyl)phosphonate ( $\alpha$ -EDAPMP) on fait réagir à la fois trois composés : 1 mmol de dodécylamine, 1 mmol de benzaldéhyde et 1 mmol du triéthylphosphite en présence de 0.5 mmol de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  comme catalyseur, ensuite le mélange est mis sous agitation magnétique à la température  $60^\circ\text{C}$  pendant 1 h. L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM en utilisant un système d'élution constituée n-hexane / acétate d'éthyle (8/2), à la fin de la réaction on obtient un mélange de couleur beige. A ce mélange on a ajouté 10 ml de chloroforme pour faire précipité le catalyseur, puis on a filtré sur un papier filtre. Le filtrant est traité par l'eau distillée, afin d'extraire la phase minérale ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), et de récupérer la phase organique, celle-ci a été séchée par l'ajout du  $\text{MgSO}_4$  pour absorber les traces de l'eau, puis on filtre.

Le filtrat est concentré par l'élimination du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Après purification et séchage à l'aire libre, on obtient un produit final solide de couleur jaune. La séquence réactionnelle est présentée par la figure III.03.

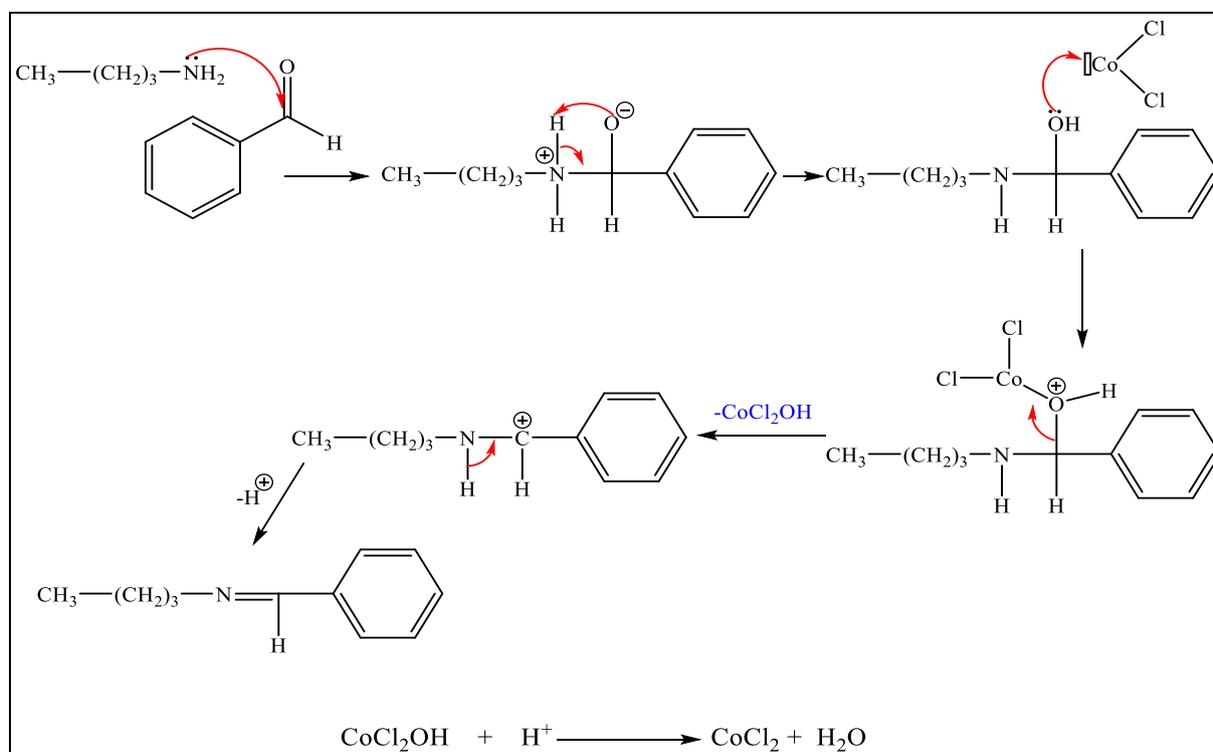


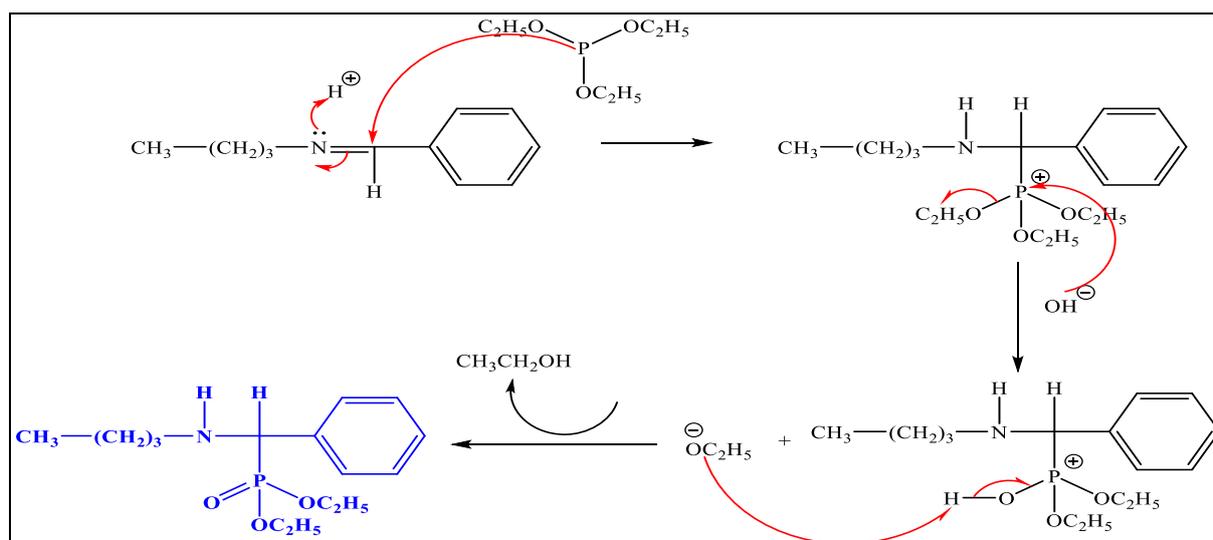
**Figure III.03: Procédure de synthèse de l'ester diéthyl [(dodecylamino)(phenyl)méthyl] phosphonate ( $\alpha$ -EDAPMP).**

### III. 4. Mécanisme réactionnel

Pour bien comprendre la réaction est la formation du ester, un mécanisme proposé pour illustré les étapes de la réaction de Kabachnick.

La figure III.04 montre que la 1<sup>er</sup> étape est la formation de l'imine qui se caractérise par la liaison (C=N), ensuite l'attaque du groupement phosphite et la formation du ester  $\alpha$ -aminophosphonate.





**Figure III.04: Mécanisme proposé pour la formation de l'ester ( $\alpha$ -EDAPMP).**

On pense que le mécanisme de cette réaction implique la formation d'une imine activée par le catalyseur, de sorte que l'addition du phosphite est facilitée pour donner un intermédiaire phosphonium, qui subit ensuite une réaction avec l'eau générée pendant la formation de l'imine pour donner l' $\alpha$ -aminophosphonate et le méthanol comme illustre la figure III. 04.

### III.5. Caractérisation des produits synthétisés

#### III.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Durant cette synthèse, on a utilisé la CCM qui peut assurer la fin de la réaction et la pureté du mélange réactionnel, pour cette raison les plaques de CCM utilisés sont des petites plaques CCM (8X3 cm) sur lesquelles on dépose des petites taches pour trois produits:

- \* Une tache pour l'aldéhyde (Benzaldéhyde).
- \* Une deuxième pour l'amine (Dodécanamine).
- \* La troisième tache est celle du mélange réactionnel.

Pour le triéthylphosphite vu son odeur on n'a pas fait.

L'éluant utilisé pour cette réaction a été cherché d'abord on ce basons sur la bonne migration de échantillon à analysé sur la plaque de CCM. Le mélange entre l'acétate d'éthyle (moyennement polaire) et le n-Hexane (apolaire) avec un rapport (2/8, V/V) est l'éluant convenable pour une migration claire. La révélation de ces plaques a été faite par une lampe UV réglée sur [254, 365 nm].

D'après les plaques CCM on observe la disparition totale des taches de l'amine et l'aldéhyde dans la tache du mélange réactionnel et l'apparition d'une nouvelle tache

différente des spots des produits de départ se qui confirme la fin de la réaction et aussi la formation d'un nouveau composé.

On outre on constate que la réaction a donné une seule tache, cela confirme bien la pureté de notre produit synthétise.

D'après les plaques de CCM, nous avons calculé le rapport frontal ( $R_f$ ), et le tableau III.03 rassemble les rapports frontaux des produits de départ et le composé de synthèse.

**Tableau III. 03: Rapports frontaux des produits de départ et le composé synthétisé.**

Produits	Rapports frontaux
Dodécanamine	0.70
Benzaldéhyde	0.92
$\alpha$ -EDAPMP	0.4

D'après les valeurs de  $R_f$  on observe la faible migration de l'amine par rapport à l'aldéhyde ce qui explique que l'amine est plus polaire que l'aldéhyde, par contre le composé  $\alpha$ -EDAPMP se trouve en bas sur la plaque donc il est plus polaire que les produits de départ.

### III.5.2. Rendements

Après la récupération de produit finale et après le séchage on a calculé le rendement de la réaction selon l'équation III.1:

$$R(\%) = \frac{\text{Masse expérimentale}}{\text{Masse théorique}} \times 100 \dots \dots \dots (III. 1).$$

Le rendement de  $\alpha$ -aminophosphonate ( $\alpha$ -EDAPMP) est 90%.

### III.5.3. Aspect et couleur

Un autre signe de la marche de la réaction est le changement d'état et la couleur du produit finale, l'aspect et la couleur de tous les produits est rassemblé dans le tableau III. 04:

**Tableau III. 04:Aspects et couleur des produits de départ et le composé synthétisé.**

Produits	Aspects	Couleur
Dodécanamine	Solide	Blanc
Benzaldéhyde	Liquide	Transparent
Triéthylphosphite	Liquide	Transparent
$\alpha$ -EDAPMP	Solide	Jaune

### III.5.4. Teste de solubilité

Les tests de solubilité ont été réalisés au laboratoire, ces tests sont qualitatifs et ils ont été faits dans les deux cas à chaud et à froid pour avoir une idée sur sa solubilité. Les tests sont regroupés dans le tableau III. 05 ci-dessous:

**Tableau III. 05: Test de solubilité du produit synthétisé dans différents solvants à chaud et à froid.**

Composé synthétisé	A chaud	A froid
Eau	-	-
Méthanol	++	++
Ethanol	++	++
Dichlorométhane	++	++
Acétate d'éthyle	+	++
Chloroforme	++	++
DMF	++++	++++
DMSO	++++	++++

(++++ Très soluble ; +++ Soluble ; ++ Peu soluble ; + Très peu soluble ; non soluble).

### III.5.5. Point de fusion

Le point de fusion est la valeur thermique la plus utilisée pour caractériser les matériaux. Une fois le point de fusion est déterminé, celui-ci est hautement dépendant de la pureté du matériel testé.

Pour la détermination du point de fusion des produits de départ on n'a pas fait puisque c'est des produits commerciaux et leurs points de fusion sont cités sur l'étiquette. Les résultats sont résumés dans le tableau III. 06.

**Tableau III. 06: Points de fusion des réactifs et de l'ester  $\alpha$ -EDAPMP.**

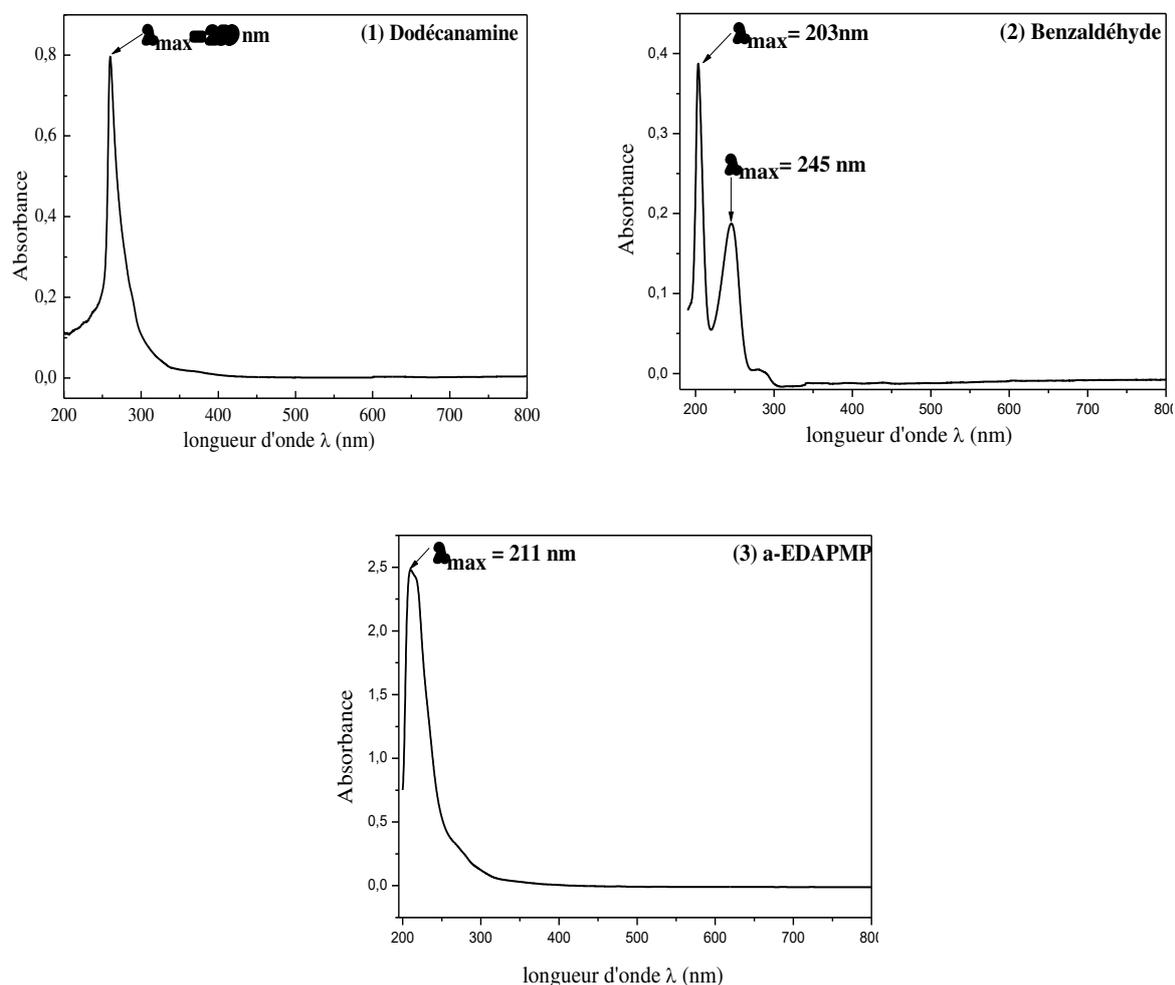
Produits	Points de fusion (°C)
Dodécamine	28.3
Benzaldéhyde	-26
Triéthylphosphite	-70
$\alpha$ -EDAPMP	113

### III.6. Caractérisation spectrales

Les produits de départ et le produit synthétisé, sont caractérisés par les méthodes spectroscopiques: UV-Vis et IR.

#### III.6.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-Vis

Dans cette partie, l'enregistrement des spectres UV-Vis de tous les produits (le produit synthétisé et les réactifs) a été réalisé en méthanol à la température ambiante dans le domaine allant de 200 nm à 900 nm. Les figures III. 5 (a, b, c) illustre les spectres UV-Vis des produits de départ et du composé synthétisé.



**Figure III.5 : Spectres UV-Vis enregistrés en milieu méthanol**

**(1) Dodécanamine; (2) Benzaldéhyde ; (3)  $\alpha$ -EDAPMP.**

On remarque d'après ces figures, une différence nette entre le spectre du produit obtenu et les spectres des réactifs. Notamment des déplacements significatifs de  $\lambda_{\text{max}}$  des bandes. D'après les résultats tirés de ces spectres on conclut que:

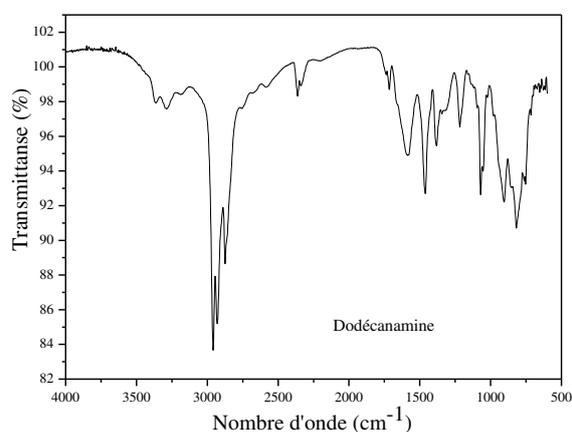
✓ Les spectres d'absorption UV-Vis de l'amine dodécaneamine est caractérisé par une forte bande d'absorption située dans l'ultraviolet aux alentours de 259 correspondant à la transition électronique  $n \rightarrow \sigma^*$ .

✓ Le spectre de benzaldéhyde représente deux bandes d'absorption situées à: Une forte bande à  $\lambda_{\max} = 203$  nm et une bande d'intensité moyenne à  $\lambda_{\max} = 245$  nm.

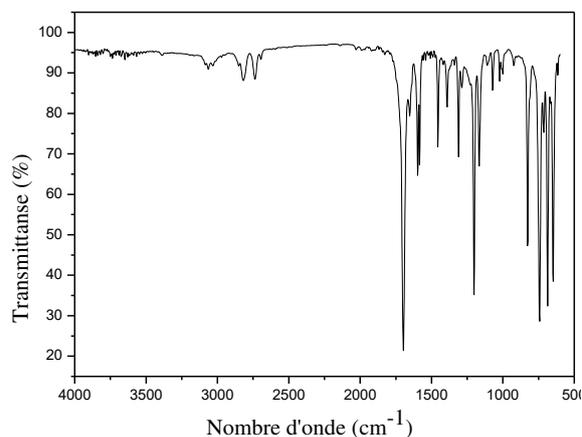
✓ Le spectre UV-Vis du  $\alpha$ -EDAPMP représente une bande d'absorption situées à:  $\lambda_{\max} = 211$  nm.

### III.6.2. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FT-IR)

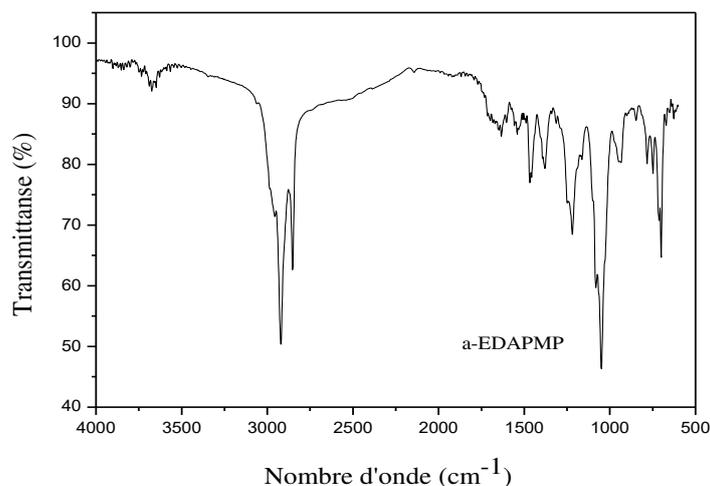
L'obtention de l'ester  $\alpha$ -EDAPMP a été confirmée par l'analyse IR. Les figures III. 06, III. 07 et III. 08 présentent les spectres IR de la molécule synthétisée et leurs produits de départ. Ces spectres sont enregistrés dans le domaine de fréquences allant de 4000 à 500  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure III. 06: Spectre IR caractéristique du dodécaneamine.**



**Figure III. 07: Spectre IR caractéristique du benzaldéhyde.**



**Figure III. 08: Spectre IR caractéristique de l'ester synthétisé  $\alpha$ -EDAPMP.**

La figure III. 08 représente le spectre IR de l'ester  $\alpha$ -EDAPMP synthétisé, elle montre des pics correspondants aux différents groupements et indiquent les vibrations d'allongement ou de déformation. Ce spectre a été comparé avec ceux des produits de départ, dodécamine et benzaldéhyde, les figures (III. 06, III. 07) respectivement.

On peut observer sans difficultés des modifications très nettes entre les spectres des produits de départ et ce de l'ester synthétisée tel que la disparition de la bande empreinte de l'amine primaire (dodécamine) et le pic caractéristique du groupement carbonyle C=O du benzaldéhyde. On peut noter également l'apparition des bandes d'absorption attribuables aux groupements P-C, P=O et P-O dans le spectre du produit synthétisé.

La zone d'empreinte digitale pour les élongations des liaisons simples comme C-C elle ne s'interprète pas généralement  $< 900$ . Dans ce cas on peut discuter :

- Le spectre IR du composé dodécamine, figure III. 06, montre une bande d'intensité moyenne constituée de deux pics, un situés à  $3361\text{ cm}^{-1}$  et l'autre à  $3284\text{ cm}^{-1}$  attribuées à l'amine primaire. Ces bandes représentent, respectivement, les modes d'élongation symétrique et asymétrique de la liaison N-H. On observe un pic de forte intensité vers  $1467\text{ cm}^{-1}$  dû aux vibrations de déformation angulaire du lien N-H (cisaillement) de l'amine primaire.

- Les aldéhydes aromatiques présentent un pic de fort intensité pour l'élongation du groupe C=O entre  $1715$  et  $1695\text{ cm}^{-1}$ , le benzaldéhyde absorbe ainsi à  $1696\text{ cm}^{-1}$ , figure III. 07. De plus les aldéhydes présentent une absorption due à l'élongation de la liaison C-H du groupe CHO entre  $2900$  et  $2820\text{ cm}^{-1}$ , elle est sous forme de doublet (ici  $2815$  et  $2740$ ) au dessous des  $\bar{\nu}_{\text{C-H}}$  aliphatiques.

- L'ester  $\alpha$ -aminophosphonate est caractérisé par les fonctions P=O, P-O-C et P-C à  $1049\text{ cm}^{-1}$ ,  $939\text{ cm}^{-1}$  et  $704\text{ cm}^{-1}$  respectivement.

Le tableau III. 08 suivant présente les principaux pics d'absorption du composé synthétisé comparé avec celles des produits de départ.

**Tableau III.08 : Principaux pics caractéristiques des vibrations IR du produit synthétisé et leurs produits de départ correspondants.**

	<b><math>\alpha</math>-EDAPMP</b>	<b>Benzaldéhyde</b>	<b>Dodécamine</b>
N-H	3665	-	3361- 3284
C-H arom	3010	3067	-
C-H alph	2925-2849	-	2964 -2929- 2869
C=O	-	1696	-
C=C arom	1461	1596	-
C -N	1217	-	1213
P=O	1049	-	-
P-O	939	-	-
P-C	704	-	-

#### IV.7.Evaluation des propriétés antibactériennes

Les quatre souches bactériennes choisies au cours de cette étude ont été fournies par l'ATCC (American Type Culture Collection).

Ces souches sont à l'origine de plusieurs infections (urinaire, intestinale, respiratoire, etc.) (Tableau III. 9).

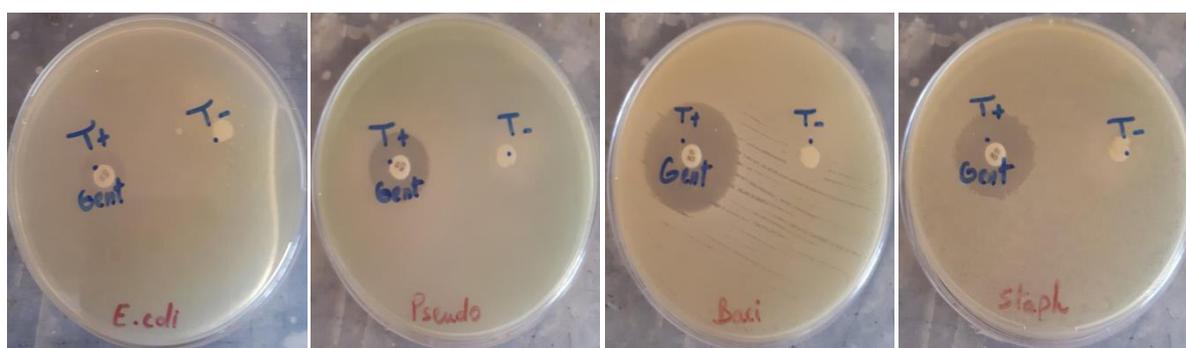
**Tableau III. 09: Caractéristiques des souches bactériennes utilisées [3-6].**

<b>Bactéries</b>	<b>Souches</b>	<b>Références</b>	<b>Pouvoir pathogène</b>
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC-10239	Infections des tissus profonds, diarrhée...etc.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC-2758	Sont souvent à l'origine d'infections nosocomiales.
Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC-10110	Infections oculaires, toxi-infection alimentaire...etc.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC-11949	Causer des infections cutanées légères, telles que des furoncles ou des anthrax, ou des infections plus graves, comme des pneumonies ou des bactériémies.

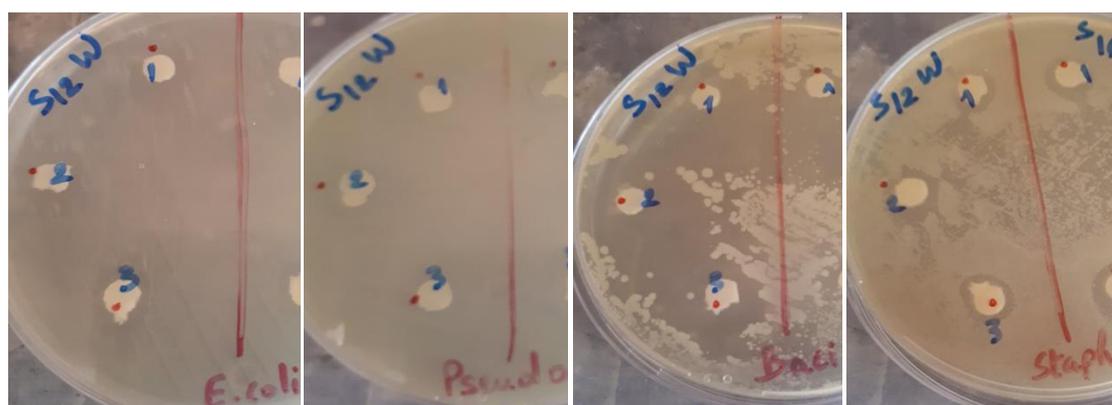
L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée dans le DMSO qui représente un solvant stérile, ne favorisant pas la croissance des bactéries [7-0].

Au cours des tests effectués dans ce travail, l'activité antibactérienne du l'ester synthétisé a été déterminée à trois doses différentes (5; 2.5 ; et 1.25 mg/mL) contre quatre types des bactéries causant pour la plupart des infections urinaires et des maladies nosocomiales (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) en utilisant la méthode de diffusion sur milieu de Mueller-Hinton gélosé.

Les résultats ont été comparés avec l'antibiotique standard **gentamicine** qui a été utilisés comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies pour cet antibiotique et en raison de leur spectre d'action assez large et de leur utilisation fréquente en milieu hospitalier pour le traitement des infections causées par la plupart des germes de notre étude et selon aussi leur disponibilité. Le DMSO utilisées comme contrôle négatif.



**Figure III.09 : Effet inhibiteur de la gentamicine sur les souches bactériennes étudiées.**



**Figure III.10 : Effet inhibiteur de l'ester  $\alpha$ -EDAPMP sur les souches bactériennes étudiées.**

Le DMSO n'a aucune zone d'inhibition, c'est-à-dire il n'a pas d'effet significatif, alors que l'ester  $\alpha$ -aminophosphonate synthétisé a montré une activité inhibitrice plus ou moins importante.

Les résultats de mesures des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne au tour des disques, en présence de la molécule  $\alpha$ -EDAPMP et du standard sont rassemblés dans le tableau III.10.

**Tableau III.10: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne au tour des disques en présence de  $\alpha$ -EDAPMP et du standard.**

<i>Souches bactériennes</i>		<i>C (mg /mL)</i>	<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>	
			<i><math>\alpha</math>-EDAPMP</i>	<i>gentamicine</i>
<i>Gram négatif</i>	<i>Escherichia coli</i>	1.25	10	14
		2.5	13	
		5	16	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.25	-	18
		2.5	-	
		5	-	
<i>Gram positif</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	1.25	18	31
		2.5	21	
		5	32	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	10	24
		2.5	10	
		5	10	

*E. coli* : *Escherichia coli* ; *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *B. subtilis* : *Bacillus subtilis* ; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.

Toutes les souches se sont révélées sensibles à la gentamicine avec des diamètres variés. Le plus grand a été enregistré sur *B. subtilis* avec une zone de 31 mm, et le plus petit est de 14 mm enregistré sur *E. coli*.

Les résultats obtenus indiquent que le micro-organisme le plus sensible à l' $\alpha$ -EDAPMP était *B. subtilis* (Gram positif), dont le diamètre d'inhibition est égal à 32 mm.

L' $\alpha$ -EDAPMP montre une activité inhibitrice faible vis-à-vis de *S. aureus* et n'a montré aucune activité sur *P. aeruginosa*.

On peut conclure, que la molécule synthétisée possède une activité antibactérienne contre les souches testées - qui sont des microbes pathogènes – quoique les diamètres des zones d'inhibition soient relativement faibles.

### Références bibliographiques

- [1] R. T. Claunch, The syntheses and spectral properties of diethyl  $\alpha$ -aminoalkylphosphonates, diethyl  $\alpha$ -aminoalkylphosphonate hydrochlorides and  $\alpha$ -aminoalkylphosphonic acids. The aluminum-amalgam reduction and spectral properties of oximes of diethyl acylphosphonates. Master of Science, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee 1960.
- [2] N.S. Zefirov, E.D. Matveeva, Catalytic Kabachnik-Fields reaction: new horizons for old reaction, Special Issue Reviews and Accounts ARKIVOC i (2008) 1-17.
- [3] C. Baliere. Les Escherichia Coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC, Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale, 2016.
- [4] A. Philippon, *Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques*, Lett. Infectiol. 10 (1995) 619-630.
- [5] R. Teyssou, P. Hance, E. Nicand, J.Y. Nizou, Y. Buisson. *Les infections à Bacillus cereus: bactériologie, clinique et traitement*. Lett Infect, 13(3) (1998) 99-104.
- [6] H. F. Chambers, *Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications*, Clin. Microbiol. Rev. 10 (1997) 781-791.
- [7] R. Cruickshank, J. P. Duguid, B. P. Marmion, R. H. A. Swain, Medical Microbiology, Vol. II. Longman Group Ltd.. Churchill Livingstone. Edinburgh. London & New York (1975).
- [8] A. H. Collins, *Microbiological Methods*, 2nd ed., Butterworth, London (1976).
- [9] C. Perez, M. Pauli, P. Bazerque, *An Antibiotic Assay by Agar Well Diffusion Method*, Acta Biol Med Exp 15 (1990) 113-115.

# **Conclusion générale**

### Conclusion générale

L'objectif visé dans ce travail est la synthèse et l'évaluation de l'activité antibactérienne de nouveau dérivé  $\alpha$ -aminophosphonates à partir de dodécanamine par la réaction de Kabachnik-Field. C'est une réaction à trois composants à une seule étape.

L'ester, Diethyl((dodécylamino)(phényl)méthyl)phosphonate symbolisé ( $\alpha$ -EDAPMP) synthétisé a été caractérisé par les méthodes spectral UV-Vis et IR.

- ❑ Les spectres IR de ( $\alpha$ -EDAPMP) et des produits de départ sont nettement différents, en plus, la disparition de deux bandes qui caractérisent la fonction amine primaire et l'apparition des bandes qui caractérisent les groupements phosphonates, notamment P=O, P-C, P-O-H,...etc. confirme l'obtention de ce produit.
- ❑ On ajoutant aux résultats de la spectroscopie IR ceux de spectrophotométrie, UV-Vis qu'ont montrés des différences nettes entre les longueurs d'ondes des produits de départ et ce de produit synthétisé.

Ces résultats donnés des informations importantes qui peuvent prouver la modification et l'obtention du composé désiré, et malgré ça, la caractérisation par l'RMN et SM reste indispensable pour confirme bien la réussite de la synthèse et la structure de ce composé.

Les testes biologiques effectués sur la molécule synthétisée, on appliquant la technique de la diffusion en milieu solide pour évaluer leur prospérité antibactérienne, montrent que  $\alpha$ -aminophosphonate préparé ( $\alpha$ -EDAPMP) a une bon activité antibactérienne.

A partir de ces résultats, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

- La poursuite de la synthèse de ces molécules et de leurs chélates avec des métaux d'intérêt biologique.
- Caractériser les produits obtenus par DRX, RMN, SM...etc.
- Elargissement de l'évaluation de l'activité biologique des molécules synthétisées.

## ملخص المذكرة:

خصص هذا العمل في المرحلة الأولى لاصطناع مركب من مشتقات أمينوفوسفونات، كما تم تحديد خصائص هذا المركب بواسطة طرق التحليل الكروماتوغرافي والتحليل الطيفي.

في المرحلة الثانية قمنا بدراسة بيولوجية تطبيقية من خلال تقييم فعاليته المضادة للبكتيريا.

هذه الدراسة أدت إلى استنتاج، أن المركب له نشاط جيد وفعاليته تزداد مع زيادة التركيز.

**الكلمات المفتاحية:** ألفا امينوفوسفونات، اصطناع ، خصائص، مضاد للبكتيريا

## ABSTRACT:

This work aims as a first step at the synthesis of  $\alpha$ - aminophosphonate compound; by the Kabachnik-Fields method. The product obtained was characterized by chromatographic and spectroscopic methods (UV.Vis and IR).

In the second step, the prepared compound was subjected to a biological application study by evaluating their antibacterial activities.

**Key words:** antibacterial,  $\alpha$ -aminophosphonate, characterization, synthesis.

## RESUME:

Ce travail vise en première étape la synthèse d'un composé  $\alpha$ - aminophosphonate, par la méthode de Kabachnik-Fields. Le produit obtenu a été caractérisé par les méthodes chromatographiques et spectroscopiques (UV. Vis et IR).

Dans la deuxième étape on a soumis le composé préparé à une étude d'application biologique via l'évaluation de son activité antibactérienne. Les résultats indiquent que le composé étudié a une bonne activité et leur efficacité augmente avec l'augmentation de la concentration.

**Mots clés:** antibactérien,  $\alpha$ - aminophosphonate, caractérisation, synthèse.