



HAL
open science

Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro.

C. Prouillac

► To cite this version:

C. Prouillac. Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro.. Autre. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT: . tel-00191910

HAL Id: tel-00191910

<https://theses.hal.science/tel-00191910>

Submitted on 26 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Présentée

Devant l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE III

En vue de l'obtention du

DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Chimie – Biologie – Santé

Par

Caroline PROUILLAC

Intitulée

**Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques
et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants.
Etude de leur mécanisme d'action *in vitro*.**

Soutenue le 16 octobre 2006 devant la commission d'examen :

Mr.	R. MARTINO , Professeur Université Paul Sabatier	Président
Mr.	Y. CHANCERELLE , Pharmacien en Chef Département de Radiobiologie et de Radiopathologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA), La Tronche	Rapporteur
Mr.	J. BALOSSO , Professeur, Service de Radiothérapie, CHU Grenoble, La Tronche	Rapporteur
Mr.	P. MARTIN , Pharmacien en Chef du Service de Santé des Armées à la DGA (SPNuM/DGA)	Examineur
Mme	C. AMOURETTE , Pharmacien en Chef, Unité de Neuroradiobiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA), La Tronche	Examinatrice
Mr.	C. MIOSKOWSKI , Directeur de Recherche au CNRS, CEA Saclay	Examineur
Mr.	C. LION , Directeur de Recherche au CNRS Université Paris VII	Examineur
Mr.	G. RIMA , Chargé de Recherche au CNRS, Université Paul Sabatier	Directeur de Thèse

A mes parents, mon frère,

A Sylvie et Pascal,

A ma grand mère,

A Eric.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée, UMR-5069 de l'Université Paul Sabatier, dirigé par Monsieur Guy Bertrand puis Monsieur Antoine Baceiredo.

Je tiens tout d'abord à remercier pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur Monsieur Yves Chancerelle, Pharmacien en Chef du Département de Radiobiologie et de Radiopathologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées et Monsieur Jacques Balosso, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble et radiothérapeute au CHU de Grenoble.

J'exprime également ma reconnaissance envers Monsieur Robert Martino, Professeur à l'Université Paul Sabatier, pour avoir accepté de présider ce jury.

Je souhaite également remercier Monsieur Pierre Martin, Pharmacien en Chef du Service de Santé des Armées à la DGA, et Madame Christine Amourette, Pharmacien en Chef, unité de Radiobiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, pour leur participation à ce jury en tant qu'examineurs.

Je voudrais également témoigner toute ma sympathie à Monsieur Claude Lion, Directeur de Recherche au CNRS à l'Université Paris VII, et Monsieur Charles Mioskowski, Directeur de Recherche au CNRS au CEA de Saclay, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je souhaite remercier Monsieur Ghassoub Rima, Chargé de Recherche au CNRS, pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Les difficultés ont été nombreuses mais m'ont permis d'apprendre énormément de choses pour la non chimiste que j'étais...

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail :

- Madame Patricia Vicendo, chargé de Recherche au CNRS, pour m'avoir permis de réaliser l'étude *in vitro* au sein de son laboratoire
- Madame Sabine Soonckindt et Monsieur Pierre David de l'ONERA de Toulouse pour leur disponibilité dans la réalisation des irradiations gamma
- Monsieur Jean Christophe Garrigues, Ingénieur de Recherche au CNRS, pour m'avoir appris toutes les astuces du QSAR et pour sa bonne humeur et son optimisme.
- Monsieur Romuald Poteau, Professeur à l'Université Paul Sabatier, pour son initiation à la chimie théorique et la réalisation des calculs de DFT.
- Monsieur Heinz Gornitzka, Professeur à l'Université Paul Sabatier, pour la réalisation des études par diffraction des rayons X.

Je témoigne toute ma gratitude aux personnes du service commun de spectrométrie de Masse (Suzy, Cathy, Nathalie et Eric) ainsi qu'aux personnes du service commun de RMN (Yannick, Pierre) pour leur gentillesse et toute leur aide.

Je souhaite remercier Monsieur Gustave Tayebi, Maître verrier, pour tout le travail qu'il a réalisé pour moi.

Je remercie vivement Messieurs Pierre Hernandez et Olivier Volpato, pour toute leur aide pendant ces trois années, pour leur gentillesse et pour leur bonne humeur quotidienne qui m'ont rendu certains jours un peu moins difficiles.

En parlant de bonne humeur quotidienne, je ne peux m'empêcher de penser à Monsieur Benoît Célariès. Je te dédis ce travail et je te dois un grand merci pour ton soutien permanent pendant ces trois années. Malgré la distance, tu as toujours su trouver les mots pour me réconforter. Tu nous as maintenant quitté, je n'oublierai pas ta joie de vivre, tes jeux de mots, ton amitié...tu nous manques...

Enfin, je garde le meilleur pour la fin, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont partagé ces trois années avec moi : Sabine G. (pour ton amitié, ton soutien et surtout tes « sabinades » inoubliables...), Cyril I. (pour ton amitié, ta gentillesse, ton soutien ...), Romain B. (fournisseur officiel en ADN et en humour), Angélique D., Maxime C., Sonia G.A., Fabien C., Nelly P., Cédric B., Clément B., Nicolas C., Gégé, Jérôme T., Gérôme B., Sophie M., Caroline L., Laurent C., Elodie P. ... pour tous ces bons moments...et vive les apéros et surtout les cachalots !!!

Eric, je te l'ai souvent dit, je n'ai pas fait de grandes découvertes scientifiques au cours de cette thèse, mais j'ai trouvé une personne formidable avec qui je partage maintenant ma vie. Il paraît que « l'amour est comme la rougeole, plus on l'attrape tard, plus le mal est sérieux. » (Douglas Jerrold), je crois que c'est vrai... Merci pour ton soutien, tes conseils et pour croire en moi...

Je voudrais terminer en remerciant ma famille, pour le soutien et les encouragements qu'ils m'ont donné malgré mon pessimisme récurrent... Un gros merci pour tout.

*« Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas :
voilà la véritable intelligence. »*

Confucius

*« L'intelligence, c'est la chose la mieux répartie chez les hommes, parce que, quoiqu'il en soit
pourvu, il a toujours l'impression d'en avoir assez, vu que c'est avec ça qu'il juge. »*

Descartes

*« Mieux vaut fermer sa bouche et se faire passer pour un «con» que l'ouvrir et ne
laisser aucun doute à ce sujet. »*

Coluche

« L'amitié double les joies et réduit de moitié les peines. »

François Bacon

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	7
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
Chapitre I : Introduction - Généralités	13
I. LA RADIOACTIVITE	15
I.1. Qu'est-ce que la radioactivité?	15
I.2. Interaction des rayonnements avec la matière	17
I.3. Quelles sont les utilisations de la radioactivité?	22
I.4. Unités utilisées en radiobiologie et radioprotection	25
I.5. Sources d'exposition de l'Homme aux rayonnements ionisants	28
II. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS	31
II.1. Effets moléculaires des rayonnements ionisants	31
II.2. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et sur les chromosomes	38
II.3. Effets des rayonnements sur les autres molécules cibles	46
II.4. Effets des rayonnements ionisants sur l'organisme	51
III. LA RADIOPROTECTION	55
III.1. Historique et fondements de la radioprotection	55
III.2. La radioprotection chimique	56
Chapitre II : Synthèse de nouveaux radioprotecteurs	79
I. INTRODUCTION	81
I.1. Synthèse des amides (1-5)	83
I.2. Synthèse des thiols et aminothiols (6-15)	84
I.3. Synthèse des acides thiosulfoniques (31-35)	87
I.4. Synthèse des phosphorothioates (36,37)	95
I.5. Conclusion	99
II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES	100
II.1. Solvants et réactifs	100
II.2. Enregistrement des spectres et mesures physico-chimiques	100
II.3. Partie expérimentale	101
Chapitre III : Activité Antioxydante et Radioprotectrice in vitro	133
I. INTRODUCTION	135
II. ETUDE DE LA NAPHAZOLINE	136
II.1. Introduction	136
II.2. Mise en évidence de la protection de l'ADN en présence de la Naphazoline après une irradiation gamma	137

II.3.	Mise en évidence des dommages de l'ADN après réaction de Fenton en présence et en absence de la Naphazoline (NP)	142
II.4.	Etude par Résonance Paramagnétique Electronique du mécanisme de capture des radicaux hydroxyles par la Naphazoline	149
II.5.	Conclusion	152
III.	ETUDE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DES COMPOSES SYNTHETISES	153
III.1.	Test au 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	153
III.2.	Test au radical cation, l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)	176
III.3.	Conclusion	184
IV.	ETUDE DU POUVOIR RADIOPROTECTEUR DES THIOLS ET AMINOTHIOLS	185
IV.1.	Etude du pouvoir protecteur vis-à-vis de l'ADN des composés synthétisés après réaction de Fenton	185
IV.2.	Evaluation du pouvoir radioprotecteur vis-à-vis de l'ADN plasmidique <i>in vitro</i> après irradiation gamma	193
V.	CONCLUSION	200
	Chapitre IV : Etude theorique	205
I.	ETUDE DE LA THEORIE FONCTIONNELLE DE LA DENSITE	207
I.1.	Introduction	207
I.2.	Méthodes de calculs	208
I.3.	Resultats – Discussion	209
I.4.	Conclusion	215
II.	ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE	217
II.1.	Introduction	217
II.2.	Principe	217
II.3.	Résultats	228
III.	DISCUSSION	243
IV.	CONCLUSION	248
	Conclusion	249
	Perspectives	249
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	255
	<i>TABLES DES MATIERES</i>	271
	<i>TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX</i>	276
	ANNEXES	279
	<i>ANNEXE 1 : Tableau récapitulatif des différents composés obtenus</i>	281
	<i>ANNEXE 2 : Données cristallographiques</i>	285

ABBREVIATIONS

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ADN : acide désoxyribonucléique
Bq : Becquerel
CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique
DFT : Density Functional Theory
DMF : diméthylformamide
DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique
Et₃N : triéthylamine
FRD : Facteur de Réduction de Dose
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé
Gy : Gray
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation Experiment
HSQC : heteronuclear single quantum correlation
ICRU : International Commission on Radiation Units and Measurements
MEA : 2-mercaptoéthylamine
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ONERA : Office National d'Etudes et de Recherches Aérospatiales
ppm : partie par million
QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPE : résonance paramagnétique électronique
SOD : superoxyde dismutase
Sv : Sievert
THF : tétrahydrofurane
TLE : Transfert Linéique d'Energie
TMS : triméthylsilane
NP : Naphazoline
WR-2721 : *N*-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate
WR-1065 : *N*-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylthiol

INTRODUCTION

La découverte des rayonnements ionisants ne date que d'un siècle et la reconnaissance de leur danger suivit de peu la diffusion de leur utilisation en médecine. En effet, la découverte des rayons X en 1895, du radium et du polonium par Pierre et Marie Curie trois ans plus tard, et celle de la radioactivité de l'uranium en 1896 par Becquerel ont annoncé le début de progrès considérables dans le domaine de la médecine du début du 20^{ème} siècle. Dès 1896, sont décrits les premières pathologies, les premiers risques et les lésions radio-induites. En 1898, Becquerel recense soixante cas de radiodermites. Les premiers décès attribués aux rayons X sont rapportés en 1904.

Parallèlement à ces mises en évidence de pathologies associées aux rayonnements ionisants, apparaît la radiothérapie sous l'impulsion de Despeignes puis la dosimétrie biologique utilisant comme référence l'apparition de l'érythème cutané suite à l'exposition aux rayonnements. Petit à petit, la nécessité d'une protection se fait sentir amenant à la création d'organismes nationaux et internationaux de radioprotection.

En 1928, est créée la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) concernant initialement les travailleurs exposés aux rayonnements ionisants : la radioprotection devait leur garantir que le risque encouru du fait de cette exposition resterait acceptable en regard des autres risques professionnels et des risques acceptés par chaque individu dans la vie courante. Progressivement et notamment avec l'utilisation de l'énergie nucléaire exposant aux rayonnements ionisants non plus uniquement les travailleurs ou les malades mais également le public, le champ d'action de la radioprotection s'est étendu à l'ensemble de la population et se définit alors selon la CIPR comme l'ensemble des moyens permettant « *d'assurer un niveau de protection adéquat pour l'homme, sans pénaliser indûment les pratiques bénéfiques qui exposent aux rayonnements ionisants* ». Les principes de cette radioprotection reposent essentiellement à l'heure actuelle sur des moyens physiques. En effet, les mesures préconisées consistent à s'éloigner au maximum de la source, se munir d'écrans et diminuer la durée d'exposition. Ces méthodes peuvent être mises en place dans le domaine médical ou par exemple dans celui de la production d'électricité où l'exposition est connue, voire quantifiée.

Cependant, il ne faut pas oublier que l'exposition aux rayonnements ionisants peut être accidentelle avec par exemple l'accident de Tchernobyl. Elle peut avoir lieu dans d'autres circonstances non accidentelles comme dans le cas des attaques nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki. Ces événements, encore très présents dans la mémoire, ont constitué l'amorce vers un autre type de radioprotection faisant appel à « *une chimioprophylaxie des effets des irradiations* » et amorce le début d'une recherche dans la conception de composés organiques visant à protéger des effets agressifs des rayonnements ionisants. Ainsi, en 1949, Patt [1] a démontré l'activité radioprotectrice de la cystéine par ingestion ou par voie intraveineuse chez le rat, pour des doses allant de 175 à 575 mg/kg. Pour ces doses, il observe 75 à 89 % de survie après une irradiation à la dose de 8 Gy. Depuis, plusieurs radioprotecteurs ont été synthétisés et étudiés sans pour autant avoir des résultats très concluants.

A l'heure actuelle, le *N*-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SPO}_3\text{H}_2$ (ou WR 2721) [2,3] a fait l'objet de nombreux travaux en raison de son activité radioprotectrice très intéressante. Il est commercialisé pour un usage clinique en radiothérapie sous le nom « *Amifostine* » ou « *Ethyol*[®] ». Cependant malgré une activité radioprotectrice remarquable, il présente de nombreux effets indésirables non négligeables. Quelques dérivés organométalliques et phosphorés étudiés par notre groupe de recherche, ont démontré une activité radioprotectrice importante [4,5].

Notre travail s'inscrit dans un vaste programme de recherche visant à synthétiser de nouveaux composés possédant un rapport activité/toxicité convenable.

Avant de présenter la synthèse et l'étude de ces nouveaux dérivés, nous aborderons dans un premier chapitre les rayonnements ionisants (leur définition, leur utilisation et leurs effets) puis nous traiterons ensuite de la radioprotection chimique et des principaux radioprotecteurs connus.

¹ Patt H.M. et al. *Science*, **110**, 213, 1949.

² Kuna P. et al. *J. Appl. Biomed.*, **2**, 43-49, 2004.

³ Müller A.C. et al. *Strahlenther Onkol.*, **8**, 517-525, 2004.

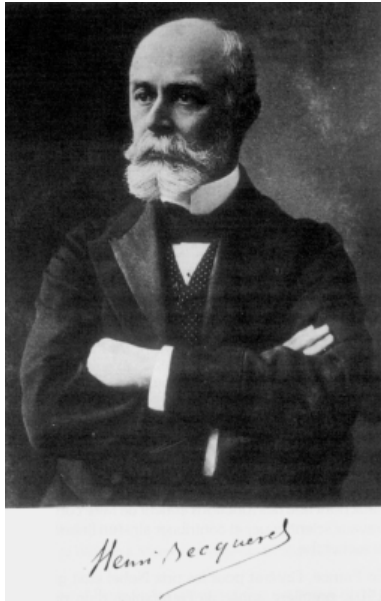
⁴ Célariès B., Amourette C., Lion C., Rima G. *Radioprotection*, **40**, 57-71, 2005.

⁵ Rima G., et al. *Appl. Organometal. Chem.* **13**,1-12, 1999.

CHAPITRE I :

INTRODUCTION - GENERALITES

I. LA RADIOACTIVITE



La radioactivité n'a pas été inventée par l'Homme mais découverte en 1896, par Henry Becquerel, physicien français, au cours de ses recherches sur l'existence d'une relation entre le phénomène de fluorescence des sels d'uranium et les rayons X découverts par Wilhem Röntgen. Becquerel cherchait à savoir si les corps fluorescents émettaient un rayonnement capable d'impressionner une plaque photographique à travers un papier noir. Cependant, il fallut attendre 1934 pour qu'Irène et Frédéric Joliot Curie mettent en évidence la radioactivité artificielle.

Depuis, nombreuses sont les utilisations de cette radioactivité tant dans le domaine médical que dans le domaine agroalimentaire ou la production d'électricité. Parallèlement à son utilisation massive sont apparus les effets biologiques délétères de ces rayonnements et l'augmentation des risques d'accidents dus à leur importante utilisation. La radiobiologie a ainsi pour objectif une meilleure compréhension des effets biologiques des rayonnements afin d'établir des règles d'utilisation et de protection.

I.1. Qu'est-ce que la radioactivité?

La matière est faite d'atomes, la plupart du temps assemblés sous forme de molécules. Au cœur de chacun de ces atomes, se trouve un noyau, 10 000 à 100 000 fois plus petit. La radioactivité est un phénomène qui se produit dans ce noyau. Certains noyaux sont instables, soit naturellement soit par suite de réactions nucléaires artificielles. Les deux principales causes d'instabilité sont un trop grand nombre de nucléons ou un déséquilibre entre les nombres de protons et de neutrons. Dans le premier cas, le noyau recherche la stabilité en émettant un noyau d'hélium ou particule alpha. Dans le second cas, un proton se transforme en un neutron (ou l'inverse), avec émission d'un électron ou d'un positron, c'est la radioactivité bêta. Quelle que soit le type d'émission cette évolution correspond à une transformation radioactive qui elle même correspond à l'élimination d'une énergie excédentaire sous forme d'un rayonnement, soit de particules, soit de photons.

On distingue ainsi quatre types de rayonnements :

- **le rayonnement alpha (α) :**

Lors d'une désintégration alpha, une particule alpha est éjectée à très grande vitesse (environ 20 000 km/s) hors du noyau qui se désintègre. Cette particule correspond à un noyau d'hélium et se compose de deux protons et de deux neutrons. Le rayonnement alpha a une portée de quelques centimètres dans l'air et ne pénètre que de quelques fractions de millimètres dans le corps humain. Les émissions alpha surviennent par exemple lors de la désintégration du radon 222, de l'uranium 238 et du plutonium 239.

- **le rayonnement bêta (β) :**

Lors d'une désintégration β un électron (émission β^-) ou un positron (émission β^+) est éjecté du noyau qui se désintègre. Les rayons β sont plus pénétrants mais moins ionisants que les rayons α . Ils ont une portée de quelques mètres dans l'air (6 mètres) et pénètrent de quelques millimètres dans le corps humain. Les rayons β sont produits par exemple lors de la désintégration du tritium, du carbone 14, du phosphore 32, du potassium 40, du césium 134 et 137.

- **le rayonnement gamma (γ) :**

Une désintégration α ou β s'accompagne souvent de la production de rayons γ qui sont des rayonnements électromagnétiques comme les rayons X et la lumière du soleil. Ce type de rayonnement a été mis en évidence par Paul Villard en 1900. En règle général, les rayons γ sont plus pénétrants que les rayons α et β . Ce rayonnement ne s'atténue que progressivement lors de son passage à travers la matière. Les rayons γ de haute énergie traversent des centaines de mètres d'air et pénètrent profondément dans le tissu humain. Ils sont d'autant plus énergétiques que la longueur d'onde est courte. Les rayons γ sont émis par exemple lors de la désintégration β de l'iode 125 et du césium 134 et 137.

- **les neutrons :**

Les **neutrons** sont des particules n'ayant aucune charge et qui ont une force très pénétrante. Ces neutrons sont généralement présents dans les réacteurs nucléaires. Ils sont, comme les rayonnement γ et X, indirectement ionisants, car c'est leur capture par les noyaux ou leur interaction qui génère des rayonnements γ et/ou diverses particules.

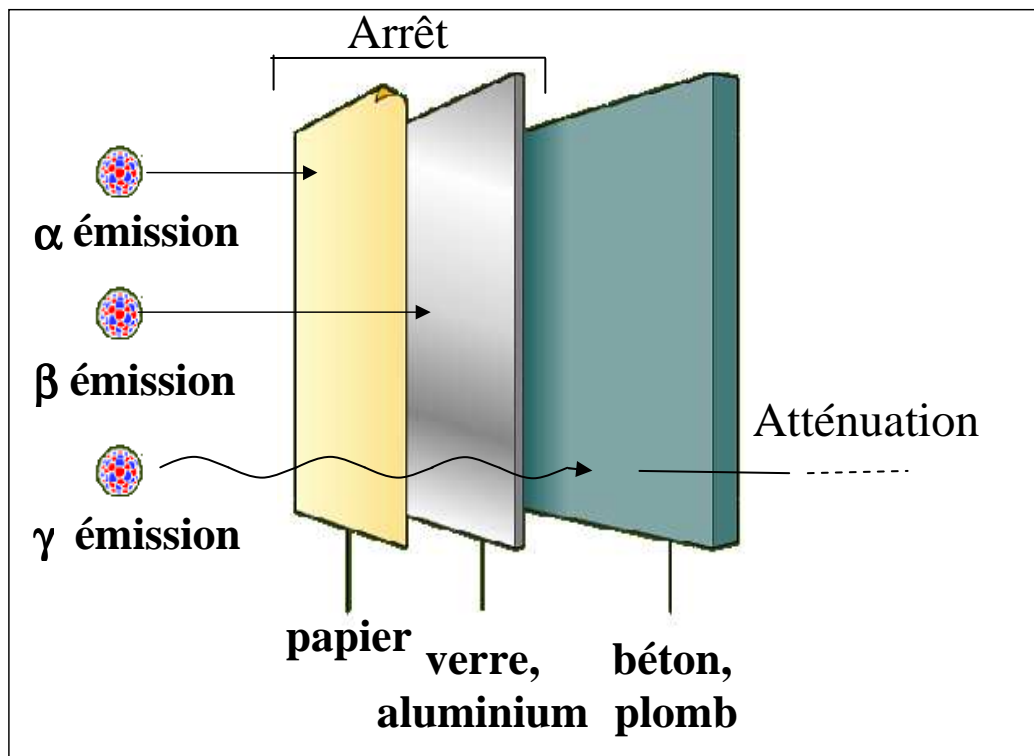


Figure 1 : *Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants.*

Malgré un pouvoir de pénétration différent pour chacun dans la matière (figure 1), *ces rayonnements produisent des ions lorsqu'ils la traversent directement (rayons α et β) ou indirectement (rayons γ ou neutrons) : ce sont des rayonnements ionisants.*

I.2. Interaction des rayonnements avec la matière

Les rayonnements sont constitués, soit de particules (rayonnement alpha, bêta, neutrons) soit d'ondes électromagnétiques (rayonnement UV, gamma, X). Un rayonnement ionisant est un rayonnement dont l'énergie est suffisante pour ioniser les atomes ou molécules qu'il rencontre sur son chemin, c'est à dire pour leur arracher un ou plusieurs électrons. Dans les paragraphes suivants, nous détaillerons brièvement les processus d'ionisations et d'excitations au sein de la matière en fonction des différents types de rayonnements.

I.2.1. Interactions des particules avec la matière

I.2.1.1. Cas des particules lourdes : les particules alpha

Le rayonnement alpha est constitué d'un noyau d'hélium. Ce rayonnement interagit principalement avec les électrons des atomes cibles, engendrant une ionisation ou une excitation. Les interactions avec les noyaux sont secondaires. Les particules alpha ont une masse 1800 fois plus importante que celle des électrons. Elles ont une trajectoire rectiligne. La perte d'énergie lors des chocs avec des électrons est faible et la déviation subie lors des collisions est petite.

Le parcours dans l'air d'une particule alpha ne dépasse pas quelques centimètres. Elle est arrêtée par une simple feuille de papier ou par la peau. Le rayonnement alpha n'affecte l'organisme que dans le cas d'une contamination interne ou cutanée.

La densité d'ionisation produite étant très élevée, l'effet biologique des rayons alpha est très important, notamment dans l'ADN car la proximité des effets successifs peut endommager simultanément les deux brins de la chaîne.

I.2.1.2. Cas des particules chargées : les électrons

Les électrons interagissent de manière prépondérante avec les électrons des atomes constituant le milieu traversé.

- Si l'énergie transférée par l'électron incident est supérieure à l'énergie de liaison ($E > 30$ eV) d'un électron de l'atome cible, celui-ci est expulsé du cortège et il y a **ionisation** de l'atome. L'électron ainsi arraché possède une énergie cinétique qu'il va alors à son tour transférer au milieu en interagissant lui-même avec d'autres électrons.
- Si l'énergie transférée par l'électron incident est exactement égale à la différence entre les énergies de liaison de 2 couches électroniques de l'atome cible, un électron de cet atome saute sur une couche moins liée et il y a **excitation**. Les électrons atomiques concernés sont les électrons faiblement liés des couches externes.
- Si l'énergie transférée par l'électron est très faible, elle ne peut que contribuer à augmenter l'énergie de translation, rotation et vibration de la molécule portant l'électron cible. Il s'agit de la forme thermique de l'énergie. Elle est donc dissipée sous forme de chaleur.

Seules les ionisations et les excitations sont à l'origine des lésions biologiques radio-induites.

En résumé, les particules β ont un parcours dans l'air qui va de quelques millimètres à quelques mètres. Elles sont moins ionisantes que les particules alpha.

I.2.1.3. Conclusion

Une particule chargée pénétrant dans un écran matériel interagit essentiellement avec les électrons périphériques des atomes. Les interactions pouvant conduire à des modifications de la structure du noyau sont donc peu probables. Il faudrait pour cela que la particule incidente ait une énergie suffisante pour passer au travers du cortège électronique et du champ électrique engendré par le noyau.

Bien que l'énergie transférée à un électron périphérique lors de l'interaction soit généralement faible, elle suffit pour placer un électron sur un niveau d'énergie supérieur ; il y a excitation de l'atome voire ionisation de celui-ci. La particule incidente peut également perdre de l'énergie par émission d'un rayonnement électromagnétique. A chaque interaction l'énergie de la particule diminue et elle est peu à peu ralentie.

Les ionisations et les excitations sont à l'origine des effets qui se produisent dans les milieux traversés par le rayonnement.

I.2.2. Interactions des rayonnements électromagnétiques avec la matière

Il s'agit de « grains » de rayonnement de masse et charge électrique nulles. Ce sont des rayonnements électromagnétiques dont les longueurs d'ondes se placent entre les ultraviolets et les rayons cosmiques (figure 2).

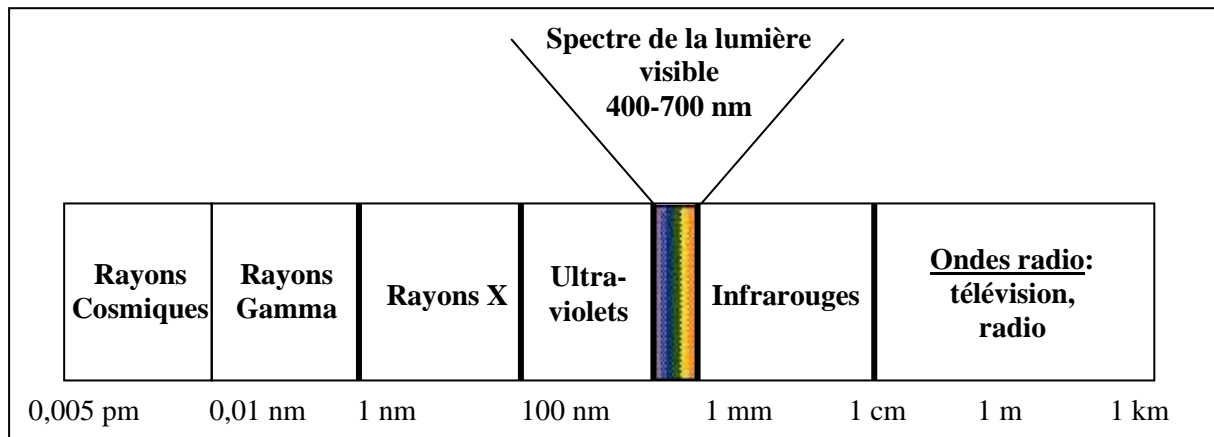


Figure 2 : Spectre électromagnétique.

I.2.2.1. Les photons X

Les rayons X résultent soit du freinage des particules bêta dans la matière, soit du changement de niveaux d'énergie des électrons dans les atomes. Les photons X intéressent la zone périphérique, alors que les photons γ concernent le noyau de l'atome.

I.2.2.2. Les rayonnements gamma

En général l'émission des photons γ suit une désintégration α ou β et correspond à un changement dans les niveaux d'énergie à l'intérieur du noyau.

Lorsqu'un faisceau de rayons gamma pénètre dans la matière on constate une diminution progressive du nombre de photons, l'énergie de ceux qui restent dans le faisceau n'en est pas affectée. Cette disparition des photons incidents, appelée atténuation, est due à l'interaction des photons avec les particules matérielles, notamment avec les électrons atomiques. Lors d'une interaction entre un photon et un électron, l'énergie du photon est au moins en partie transférée à l'électron qui est de ce fait accéléré. L'énergie cinétique de cet électron secondaire diminue progressivement en raison des ionisations induites dans le milieu. L'énergie des électrons secondaires ainsi absorbée par la matière est à l'origine des effets des rayonnements γ . Une partie de l'énergie des photons qui entrent en interaction avec la matière se retrouve sous forme de photons dont l'énergie et la direction diffèrent de celles des photons incidents, ce sont les photons diffusés. Le photon peut subir essentiellement les trois types d'interactions suivants :

□ Effet photoélectrique

Lorsqu'un photon entre en collision avec les électrons des couches internes d'un atome, on parle d'effet photoélectrique. Dans ce cas, la totalité de l'énergie du photon incident est absorbée par l'atome. Cette énergie est transférée à un électron qui est éjecté de sa couche électronique et emporte l'excédent sous forme d'énergie cinétique. Cette énergie cinétique du photoélectron est ensuite absorbée par le milieu par des phénomènes d'ionisations qui sont à l'origine des radiolésions.

□ Effet Compton

Le photon incident interagit avec un électron mais celui-ci a une énergie de liaison beaucoup plus faible que celui impliqué dans l'effet photoélectrique. La diffusion Compton concerne donc des électrons moins liés. L'électron cible est expulsé dans une direction donnée : c'est l'électron Compton. Le photon incident est quant à lui diffusé dans une direction qui fait un certain angle avec la direction de l'électron Compton. Pour des photons de faible énergie ($< 0,5$ MeV), la majeure partie de l'énergie est emportée par le photon. Au contraire, lorsque l'énergie du photon incident croît (> 2 MeV), l'énergie emportée par l'électron Compton devient de plus en plus importante par rapport à celle du photon diffusé.

□ Création de paires

Ce processus se produit pour des photons très énergétiques passant à proximité du noyau. En effet, le champ électrique intense qui entoure un noyau peut transformer ce photon en négatron et positron : c'est l'effet de production de paires. Le négatron et le positron créés perdent leur énergie par phénomène d'ionisation dans le milieu. Enfin, le positron s'annihile avec un électron du milieu et il en résulte un rayonnement de deux photons gamma à 180° l'un de l'autre.

I.2.2.3. Conclusion

Contrairement aux particules chargées qui épuisent toute leur énergie sur une faible distance par des interactions coulombiennes, les photons X et γ peuvent traverser de grandes quantités de matière. Après une interaction la totalité ou une partie de l'énergie du photon est communiquée à un électron du milieu. Cet électron mis en mouvement va alors épuiser son énergie de la même façon que les rayons β .

C'est pourquoi les photons sont classés dans les rayonnements indirectement ionisants. Ce n'est qu'après interaction du photon qu'il va y avoir des ionisations sur la trajectoire de l'électron mis en mouvement.

I.3. Quelles sont les utilisations de la radioactivité?

I.3.1. Le domaine médical

La principale source d'exposition aux rayonnements en dehors de la radioactivité naturelle est due aux *diagnostics médicaux et aux thérapies*. Dans les pays développés, elle représente environ 30 % en moyenne de l'exposition totale et pratiquement toute l'exposition hors radioactivité naturelle. Dans les pays en voie de développement, la part des examens médicaux tombe à 1,5 %. L'irradiation en médecine est due bien davantage à l'utilisation des rayons X pour les radiographies (scanners à rayons X) qu'à la radioactivité proprement dite. Toutefois, les rayons X issus des couches profondes de l'atome produisent dans la matière vivante des effets analogues (avec une énergie moindre) aux rayons gamma, également utilisés en médecine notamment en radiothérapie. Tous les rayonnements, quelle que soit leur origine, finissent par déposer leur énergie en "ionisant" la matière. En radiothérapie, cette propriété « d'ioniser la matière » est utilisée afin de détruire les cellules cancéreuses.

D'autre part, la radioactivité est également l'outil essentiel des *radiodiagnostics* permettant l'exploration de l'organisme et le dépistage de certaines maladies grâce aux radioéléments (scintigraphie...). Les radionucléides sont dans ce cas utilisés comme traceurs. Ils participent au métabolisme de la même façon que les éléments naturels auxquels ils sont mélangés. Par exemple, l'iode 131 va être absorbée au même titre que l'iode naturel. On peut alors observer le fonctionnement ou la morphologie d'un organe rendu radioactif par fixation d'un radioélément.

Enfin, les rayonnements ionisants sont utilisés à des fins de stérilisations du matériel. Des milliers d'articles (seringues, pansements, prothèses...) sont stérilisés à l'aide de rayonnements gamma.

I.3.2. Le domaine de la biologie

La principale utilisation de la radioactivité dans le domaine de la biologie provient de l'usage de radioéléments à des fins de *marquages radioactifs* de molécules biologiques. L'intérêt d'utiliser des isotopes radioactifs réside dans le fait qu'ils possèdent des propriétés électroniques, chimiques et donc biologiques semblables à celles de l'isotope non radioactif correspondant. L'avantage est que ces isotopes radioactifs sont détectables ; ils peuvent être localisés et dosés dans un milieu biologique tel qu'une cellule ou un organe. Cette technique de marquage a permis à Avery en 1943 de montrer que l'ADN est le support de l'hérédité.

Seule la radioactivité artificielle a donné la possibilité de suivre des molécules biologiques (hormones, protéines ...) depuis leur lieu de production jusqu'à celui de leur action, d'isoler les récepteurs et d'étudier la transmission du message à l'intérieur des cellules.

I.3.3. Le domaine culturel

Avant d'être exposés dans les musées, les vestiges des civilisations passées doivent être identifiés, analysés, étudiés, afin de pouvoir en garantir l'authenticité, d'en tirer le maximum d'informations de nature archéologique ou historique et ainsi nous renseigner sur la manière dont nos ancêtres ont vécu.

Les méthodes de datation sont aujourd'hui fondées sur la décroissance progressive de la radioactivité contenue dans les vestiges que l'on souhaite dater. Concernant *la datation au carbone 14*, les divers échanges (respiration, photosynthèse, alimentation) qui se produisent entre l'atmosphère et le monde "vivant" ont pour effet d'équilibrer le rapport entre la quantité de carbone 14 et celle de carbone 12.

Mais, dès qu'un organisme meurt, le carbone 14 qu'il contient n'est plus renouvelé puisque les échanges avec le monde extérieur cessent. Sa proportion se met alors peu à peu à diminuer. Le rapport carbone 14 /carbone 12 permet donc de connaître la date de la mort d'un organisme bien après que celle-ci ait eu lieu. Moins il reste de carbone 14 dans un échantillon à dater, et plus sa mort est ancienne.

I.3.4. Le domaine industriel

La principale application de la radioactivité dans ce domaine est la **production d'électricité**. L'énergie nucléaire est due à la fission qui est un mode de désintégration propre à certains atomes lourds comme l'uranium. La fission générant elle-même des éléments radioactifs, l'énergie nucléaire est doublement liée à la radioactivité. En France, 80 % de l'électricité est d'origine nucléaire.

Les traceurs radioactifs interviennent dans le contrôle de nombreux procédés de fabrication industriels. Ils servent notamment à détecter les fuites de liquide ou de gaz dans les canalisations enterrées ou inaccessibles grâce à la facilité de détection des radioéléments. La radioactivité est également utilisée pour **modifier**, par l'emploi de doses d'irradiations beaucoup plus intenses, **les propriétés mécaniques et chimiques** d'un matériau.

Enfin, comme en médecine, il existe la **radiographie industrielle** qui permet de déceler les défauts internes d'un objet sans en modifier le matériau en enregistrant l'image de la perturbation d'un faisceau.

I.3.5. Le domaine agroalimentaire

L'ionisation des denrées alimentaires est un traitement qui permet d'assainir les aliments et d'accroître la durée de conservation (inhibition de la germination, destruction des micro-organismes et des insectes).

La radiostérilisation d'insectes parasites est une méthode de lutte qui consiste à lâcher dans la population naturelle d'insectes une forte proportion de mâles rendus stériles par irradiations, ce qui diminue fortement, jusqu'à quasi-disparition, la descendance des femelles. Cela permet de lutter à grande échelle contre le développement d'un insecte nuisible sans utiliser de produits toxiques.

Les rayonnements gamma et leurs actions à fortes doses sur les organismes vivants sont utilisés pour provoquer des mutations afin d'augmenter la variabilité d'espèces végétales cultivées et faciliter les processus de **sélection des variétés**.

L'utilisation de traceurs, a permis de faire progresser les connaissances en matière d'absorption ou de transport de minéraux. Par exemple, des atomes de phosphore radioactif incorporés dans un engrais se comporteront de la même façon que les atomes stables de phosphore. Il est ainsi possible de suivre à la trace l'assimilation de l'engrais par la plante et d'en déduire son efficacité, la date la plus favorable pour le répandre sur le sol, etc.

I.4. Unités utilisées en radiobiologie et radioprotection

[6]

I.4.1. L'activité

Une source est caractérisée par l'activité du radioélément, c'est-à-dire le nombre de noyaux qui se désintègrent spontanément par unité de temps. L'unité qui mesure l'activité d'un radioélément est le becquerel (Bq). On dit qu'une substance radioactive (une source radioactive) présente une radioactivité (une activité) d'un becquerel (1 Bq), lorsque dans cette source un noyau se désintègre chaque seconde.

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ désintégration par seconde}$$

I.4.2. Le transfert linéaire d'énergie

Le transfert linéique d'énergie (TLE) correspond à l'énergie transférée de la particule incidente au milieu considéré par unité de longueur de matière traversée. L'unité la plus couramment utilisée est le keV/ μm . Même si le TLE d'une particule n'est qu'une quantité moyenne peu représentative, elle permet une classification radiobiologique des particules en fonction de leur énergie et de leur nature.

I.4.3. La dose absorbée

C'est la quantité d'énergie communiquée par le rayonnement à la matière traversée par unité de masse. Elle se mesure en Gray (Gy) au moyen d'un dosimètre. 1 Gy correspond à la dose absorbée par une masse de 1 kg à laquelle les rayonnements communiquent une énergie de 1 J.

⁶ Cordoliani Y.S. Feuilletts de radiologie, **42**, 248-252, 2002.

$$1 \text{ gray} = 1 \text{ joule par kg} \quad (1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg})$$

Dans les milieux biologiques, une dose égale déposée par différents types de radiations n'aura pas le même effet biologique. Un Gray déposé par des particules alpha produit plus de dégâts qu'un Gray déposé par des photons X. La différence provient notamment de la géométrie du dépôt d'énergie à l'échelle microscopique.

I.4.4. Dose équivalente - Dose efficace

L'énergie cédée par les rayonnements aux tissus crée des dégâts qui dépendent de :

- la quantité d'énergie délivrée, donc de la dose absorbée
- la nature du rayonnement
- la nature des tissus irradiés c'est à dire de leur radiosensibilité

Afin de refléter les différents effets biologiques selon la dose et le type de rayonnement, deux autres notions sont introduites : la dose équivalente et la dose efficace.

Aux différents types de radiation, un facteur de qualité (FQ) reflétant leur pouvoir pathogène est attribué. La dose équivalente est la grandeur utilisée en radioprotection. Elle correspond au produit de la dose par le facteur de qualité correspondant au rayonnement. Son unité est le Sievert (Sv). Les facteurs de qualité des différents types de radiations ionisantes sont donnés par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) et par L'International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) (tableau 1) [7].

$$\text{Dose équivalente (Sv)} = \text{Dose (Gy)} * \text{FQ}$$

⁷ ICRU Report 60, ICRU Publications: Bethesda (1998).

Type de radiation et énergie	Facteur de qualité
Photons toutes énergie	1
Electrons toutes énergies	1
Neutrons	
< 10 keV	5
De 10 keV à 100 keV	10
De 100 keV à 2 MeV	20
De 2 MeV à 20 MeV	10
20 MeV	5
Protons (autres que les protons de recul) d'énergie >2 MeV, particules alpha, fragments de fission, ions lourds	20

Tableau 1 : Facteurs de qualité des différents types de radiation en fonction de leurs énergies [7].

La sensibilité aux différents effets spécifiques varie également d'un tissu à un autre et afin de prendre en compte cette radiosensibilité différentes des tissus, la CIPR a introduit la notion de facteur de pondération tissulaire représentant la contribution relative de chaque tissu ou organe à l'effet total induit par une irradiation uniforme du corps dans sa totalité (tableau 2). La dose efficace est le produit de l'équivalent de dose par ce facteur de pondération tissulaire (FP).

$$\text{Dose efficace (Sv)} = \text{Equivalent de Dose (Sv)} * \text{FP}$$

Tissu ou organe	Facteur de pondération tissulaire
Gonades	0,20
Moelle	0,12
Colon	0,12
Poumon	0,12
Estomac	0,12
Vessie	0,05
Sein	0,05
Foie	0,05
Œsophage	0,05
Thyroïde	0,05
Peau	0,01
Os	0,01
Reste du corps	0,05

Tableau 2 : Facteurs de pondération correspondant aux différents types de tissus [7].

I.5. Sources d'exposition de l'Homme aux rayonnements ionisants

L'exposition aux rayonnements peut se faire de deux façons : il peut s'agir d'une **exposition externe** lorsque la source est à l'extérieur de l'organisme ou **d'une exposition interne** si la source est absorbée à l'intérieur de l'organisme. L'exposition dite externe peut elle même se produire de différentes manière. En effet, si la source radioactive est située à distance de l'organisme (exposition globale ou localisée) l'irradiation est alors en rapport avec le pouvoir de pénétration dans le corps des divers rayonnements émis par la source.

Dans ce cas, l'exposition diminue si l'on s'éloigne de la source et disparaît si celle-ci est supprimée ou si un écran efficace est interposé. C'est le principe de la radioprotection physique. D'autre part, l'exposition externe peut se produire par contact cutané. Par rapport au cas précédent, le contact cutané avec un radioélément peut induire une exposition interne par pénétration du radioélément à travers la peau (altération cutanée, plaie, ou plus rarement à travers une peau saine). Il y alors contamination.

L'exposition interne peut se produire de différentes façons : par inhalation de substances radioactives dans l'air, par ingestion de produits contaminés (par exemple des aliments), par pénétration transcutanée d'une contamination externe, lors d'un examen médical : diagnostic, scintigraphie (dans ce cas, l'image de l'organe est obtenue grâce à l'émission γ du radioélément injecté), radiothérapie métabolique avec injection de substances radioactives. Après pénétration dans l'organisme, l'exposition interne se poursuivra tant que la substance radioactive n'aura pas été éliminée naturellement par l'organisme et que celle-ci continuera d'émettre des particules ionisantes.

Concernant les sources d'exposition, on en dénombre deux principales : une exposition naturelle et une exposition artificielle résultant de l'activité humaine. En France, l'exposition annuelle humaine moyenne aux rayonnements ionisants d'origine naturelle est d'environ deux millisieverts. En plus de cette radioactivité naturelle, nous sommes exposés à des rayonnements ionisants provenant de sources artificielles. Ces rayonnements sont du même type que ceux émis par des sources naturelles et leurs effets sur la matière vivante sont, à doses égales, identiques.

I.5.1. L'exposition naturelle

- **Les rayonnements cosmiques** : le rayonnement cosmique provient des réactions nucléaires dans les étoiles de forte activité ou des explosions de supernovas. En Europe, ils se traduisent pour tous ceux qui vivent à une altitude voisine du niveau de la mer, par une irradiation moyenne d'environ 0,4 millisievert par an. Lorsqu'on s'élève en altitude, l'exposition aux rayonnements augmente. Le rayonnement cosmique entraîne une exposition externe directe et interagit avec des éléments terrestres ou atmosphériques pour former des radionucléides secondaires (tritium ^3H , carbone ^{14}C).
- **Les éléments radioactifs contenus dans le sol** : C'est la source principale de l'exposition de tous les êtres vivants, et elle est actuellement inférieure à ce qu'elle était lors de l'apparition de la vie. Tous les éléments dont la période était inférieure au milliard d'années ont disparu alors que seuls persistent encore les radionucléides à période longue. Il s'agit principalement de l'uranium, du thorium ou du potassium.

Ces éléments provoquent en moyenne pour chacun de nous en France une irradiation d'environ 0,35 millisievert par an. Il faut noter que dans certaines régions de France et du monde, dont le sol contient des roches radioactives comme le granit, ces irradiations sont plus fortes.

- **Les éléments radioactifs naturels que nous absorbons en respirant ou en nous nourrissant :** des émanations gazeuses de certains produits issus de la désintégration de l'uranium contenu dans le sol tels que le radon ou le potassium des aliments dont nous fixons une partie dans notre organisme, provoquent, chez chacun d'entre nous, en moyenne, une irradiation de 1,55 millisievert par an.

I.5.2. L'exposition artificielle

- **Les irradiations médicales :** il s'agit des activités de radiodiagnostic, médecine nucléaire et radiothérapie. Elle ajoute annuellement environ 30 % à l'irradiation naturelle de chaque individu dans les pays développés, soit 1,2 millisievert en France.
- **Les activités industrielles nucléaires :** les centrales nucléaires, les usines de retraits des déchets radioactifs, les retombées des anciens essais nucléaires atmosphériques et de Tchernobyl, etc... Elles exposent chaque être humain en moyenne à 0,02 millisievert par an.

II. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS

IONISANTS

Les effets des radiations sur la matière vivante sont le résultat final des événements physiques initiaux, développés précédemment, par les rayonnements sur le milieu. Il existe une disproportion entre le nombre de ces événements (excitations et ionisations) ou l'énergie mise en jeu et l'effet biologique produit. Cet effet résulte d'une chaîne d'événements physiques et de transformations chimiques qui est déclenchée par ces ionisations initiales et aboutit à endommager les macromolécules indispensables à la vie des cellules.

Dans cette partie, nous commencerons par l'étude de ces réactions qui constituent la « chimie sous rayonnement ». Nous verrons ensuite leurs conséquences au niveau des principales structures cellulaires (ADN, chromosomes), au niveau de la cellule puis au niveau d'une population cellulaire (tissus, organes) et enfin nous développerons les effets de ces rayonnements sur l'organisme.

II.1. Effets moléculaires des rayonnements ionisants

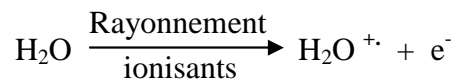
II.1.1. Radiolyse de l'eau

Les effets biologiques des rayonnements ionisants résultent pour une large part de leur action sur l'eau qui représente environ 80 % du poids des organismes vivants. En effet, les rayonnements sont capables de décomposer l'eau par des processus complexes.

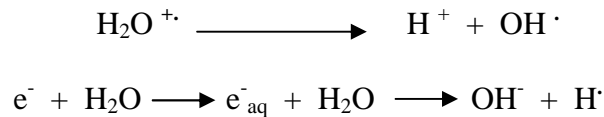
II.1.1.1. Formation des radicaux

Tout d'abord, un radical libre se définit comme une espèce portant sur sa couche électronique externe un ou plusieurs électrons célibataires (non apparié à un électron de spin opposé). Cette configuration confère à l'entité radicalaire une très haute réactivité chimique : les radicaux tendent à capturer un électron pour compléter leur couche électronique.

Le phénomène initial de la formation de ces espèces radicalaires est l'ionisation de la molécule d'eau nécessitant une énergie d'environ 13 eV.



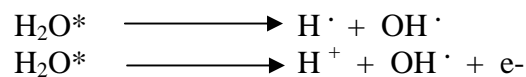
On obtient la formation d'un radical cation, extrêmement instable (durée de vie 10^{-10} s) qui donne naissance à un radical neutre très réactif OH^\cdot (10^{-5} s). En effet, cette espèce radicalaire cationique se décompose de la manière suivante :



Le radical hydroxyle OH^\cdot est un agent oxydant puissant possédant une grande réactivité chimique malgré une durée de vie très courte. Il est considéré comme l'espèce principale à l'origine des radiolésions.

Les électrons arrachés lors de l'ionisation de molécules d'eau perdent progressivement leur énergie par « collisions » (à l'origine de la formation de radicaux H^\cdot) pour être finalement piégés par des molécules d'eau et donner des électrons aqueux qui sont des réducteurs puissants. Parmi les molécules d'eau étroitement liées aux électrons aqueux, certaines d'entre elles vont se dissocier pour donner naissance à des radicaux H^\cdot et HO^\cdot (figure 3). Dans les systèmes biologiques, les électrons aqueux peuvent à leur tour réagir avec le dioxygène dissous ou des molécules organiques.

Enfin, il est envisageable qu'une molécule d'eau soit simplement excitée sous l'effet des rayonnements ionisants. Cette molécule va ainsi ou bien se dissocier en radicaux HO^\cdot et H^\cdot ou bien se dissocier en radical OH^\cdot et ion H^+ avec émission d'un électron et formation d'un ion H^+ .



En résumé la radiolyse de l'eau aboutit à la formation d'espèces radicalaires telles que les radicaux H^\cdot et OH^\cdot (figure 3). Ces espèces vont pouvoir diffuser dans le milieu et être à l'origine de lésions au niveau des macromolécules biologiques telles que les protéines, les lipides et surtout l'ADN. 10^{-10} à 10^{-9} secondes après l'interaction avec le rayonnement ionisant, l'eau est donc devenue une solution plus ou moins concentrée en radicaux OH^\cdot et H^\cdot et en molécules de dihydrogène issues de la réaction :

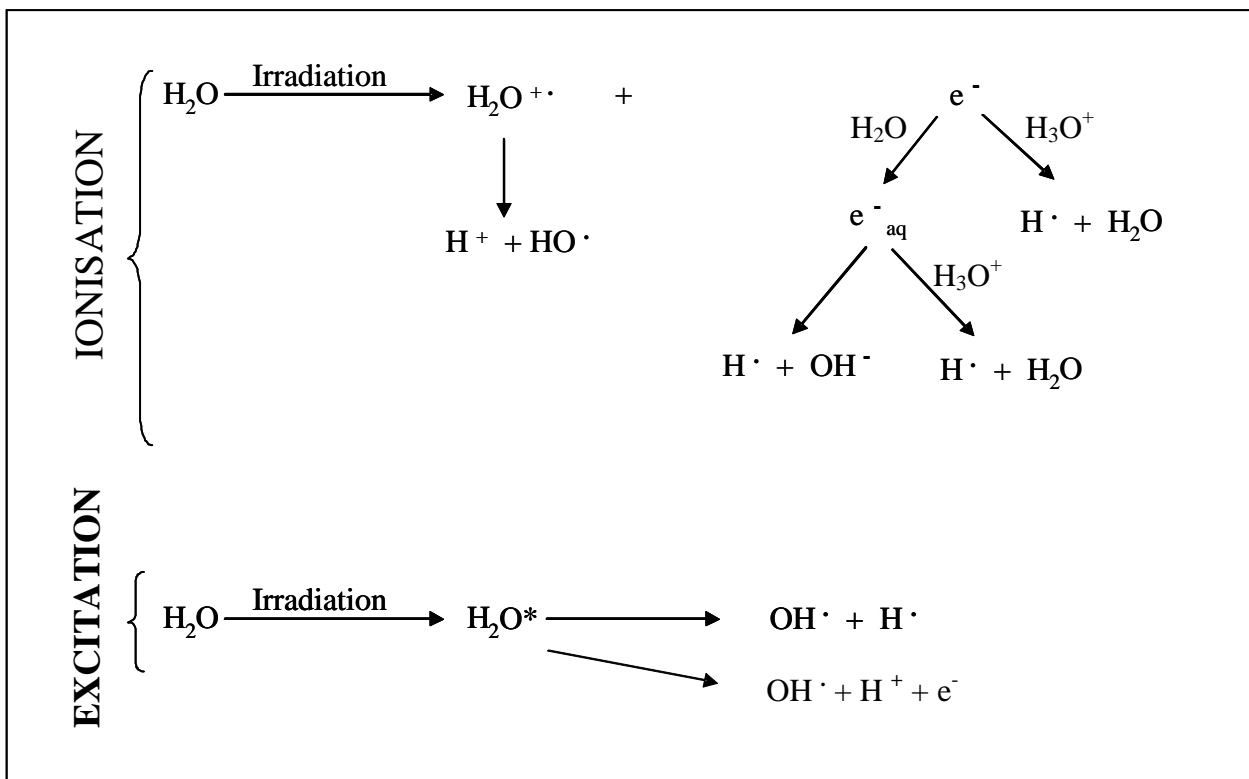


Figure 3 : Radiolyse de l'eau.

II.1.1.2. Devenir des radicaux et décomposition de l'eau

Après la radiolyse de l'eau, il existe une deuxième phase impliquant les molécules organiques présentes dans les milieux biologiques ; il s'agit d'une phase de décomposition moléculaire. Cette phase aboutit essentiellement à la formation de nouvelles molécules organiques. En effet, à partir de leur lieu de naissance les radicaux formés lors de la première phase radicalaire vont pouvoir diffuser et réagir entre eux : il y a alors recombinaison et formation de molécules d'eau, de peroxyde d'hydrogène et de dihydrogène. Il faut noter que la formation de peroxyde d'hydrogène est un phénomène important dans la mesure où il s'agit d'une espèce dotée d'un fort pouvoir oxydant à l'origine de lésions et plus particulièrement dans la cellule avec le phénomène de peroxydation lipidique aboutissant à la destruction des membranes. La probabilité qu'un type donné de réaction se produise dépend de la distribution spatiale des radicaux concernés. D'autres facteurs, tels que la pureté de l'eau et la présence ou l'absence de dioxygène dissous, comptent également.

II.1.2. Effet des rayonnements en solution aqueuse

Les milieux biologiques sont constitués d'environ 80 % d'eau, par conséquent une cellule peut être considérée comme une solution aqueuse de molécules organiques essentielles à son bon fonctionnement. Partant de cette schématisation, les rayonnements ionisants peuvent avoir deux actions :

- ***Une attaque directe des macromolécules.*** C'est l'effet direct des rayonnements. Cet effet est classiquement considéré comme relativement peu important (15 à 20 % des lésions) mais aboutit à des lésions de ces molécules.
- ***Une attaque de l'eau,*** aboutissant à sa radiolyse avec la création d'espèces radicalaires puis moléculaires qui interagiront avec les molécules du soluté. C'est l'effet indirect, prépondérant en biologie (80 % des lésions).

II.1.2.1. Effet direct

Les molécules ionisées et excitées présentent un excédent d'énergie et sont par conséquent très instables. Afin de retrouver leur stabilité, ces molécules vont dissiper leur excédent d'énergie selon deux modalités :

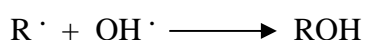
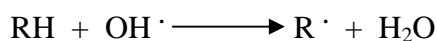
- Emission d'un photon (fluorescence) avec retour à l'état fondamental
- Par rupture homolytique d'une liaison de covalence en deux radicaux dont la durée de vie est très courte (10^{-5} s en moyenne).

II.1.2.2. Effet indirect

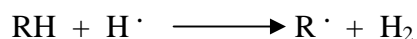
L'effet indirect résulte de l'interaction des produits de la radiolyse de l'eau avec les molécules présentes dans la solution aqueuse. Les radicaux diffusent dans la solution et réagissent avec les molécules organiques entraînant leur modification chimique.

Pour une molécule organique notée R-H, il est possible d'observer :

- une déshydrogénation suivie d'une hydroxylation par les radicaux OH^\cdot



- une déshydrogénation par les radicaux H^\cdot et la formation de composés d'addition

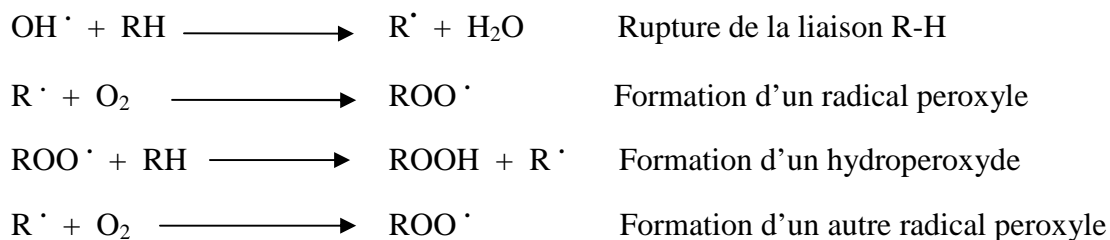


- une ouverture des doubles liaisons par l'électron aqueux suivie de la formation de composés d'addition

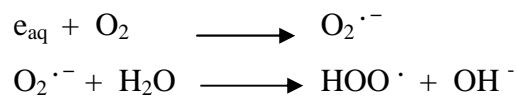
Au total quel que soit le type d'effet direct ou indirect (ou quel que soit le mécanisme impliqué) toutes les molécules de la solution finiront par revenir à l'état stable mais certaines auront été modifiées chimiquement.

II.1.3. L'effet oxygène

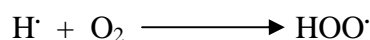
Il est connu depuis longtemps que le dioxygène rend les cellules plus vulnérables au rayonnement. Bien que les mécanismes soient multiples et complexes, une des causes de cette radiosensibilisation est la réaction des radicaux libres organiques avec le dioxygène pour former un radical peroxyde. Si un composé organique est symbolisé par la formule R-H, R représentant le radical organique, les réactions s'écrivent :



L'électron aqueux peut également réagir avec le dioxygène dissous pour former l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ lequel peut réagir à son tour avec une molécule d'eau formant le radical $\text{HOO} \cdot$ et l'ion OH^- [8].



Le dioxygène est un radiosensibilisateur puissant : présent au moment de l'irradiation, il augmente les effets initiaux du radical hydroxyle et contribue à fixer les radiolésions qui autrement seraient réparables.



⁸ Les clés du CEA.43, 2000.

II.1.4. Conclusion

L'interaction physique des rayonnements ionisants avec la matière constitue l'événement initiateur d'une longue séquence de processus chimiques puis biologiques pouvant entraîner une modification du patrimoine génétique ou la mort cellulaire. Entre cette interaction primaire et l'apparition d'effets biologiques, il se succède cinq étapes de durées inégales :

- Une étape « physique » très courte ($< 10^{-15}$ s) correspondant aux tous premiers instants après l'irradiation. Elle entraîne la création d'espèces excitées dans le plasma cellulaire et l'ADN. Elle engendre ainsi une première altération des biomolécules par « effet direct ».
- Une étape « physico-chimique » (10^{-15} s $< t < 10^{-12}$ s) au cours de laquelle les différents produits de l'interaction des rayonnements avec le plasma cellulaire atteignent la température du milieu : c'est le processus de thermalisation qui conduit à la formation de produits radicalaires tels que OH^\cdot , H^\cdot , ainsi que des électrons hydratés e^-_{aq} qui sont de puissants réducteurs.
- Une étape « chimique » (10^{-12} s $< t < 10^{-6}$ s), au cours de laquelle les différentes espèces créées diffusent et réagissent entre elles.
- Une étape « biochimique » qui débute lorsque les espèces radicalaires produites altèrent chimiquement les biomolécules présentes dans le milieu environnant (effet indirect) et entraînent leur dégradation.
- Une étape « biologique » suivant les altérations des biomolécules qui correspond à la prise en charge des dommages par les systèmes de réparation cellulaire. Cette réparation (plus ou moins fidèle) peut durer plusieurs heures et se traduit par l'apparition ou non de lésions moléculaires graves [8,9].

⁹ Boissière A. Thèse de troisième cycle, Université Paris VI, 2004..

II.2. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et sur les chromosomes

De nombreuses expériences ont clairement mis en évidence que l'acide désoxyribonucléique (ADN) situé à l'intérieur du noyau cellulaire est la cible privilégiée des irradiations et que les dommages subis par cette macromolécule sont en relation avec les effets biologiques consécutifs. Par exemple en 1977, Warters *et al.* montrent que la toxicité de ^{125}I (un émetteur Auger radioactif) est fortement dépendante de son site d'incorporation : celui-ci est 300 fois plus efficace s'il est incorporé directement dans l'ADN des cellules plutôt que dans leur membrane. Depuis de nombreux travaux ont confirmé ces données et même si aujourd'hui il n'est pas encore prouvé que l'ADN est la seule cible critique, il demeure par sa taille, son unicité et sa fonction la cible la plus pertinente à étudier [10].

Le bon fonctionnement d'une cellule, c'est à dire la transmission fidèle de l'information génétique d'un individu, ou d'une cellule, à ses descendants dépend du maintien de l'intégrité structurale de chaque molécule d'ADN. Ce dernier est soumis à de multiples attaques inévitables de la part du milieu intracellulaire mais aussi de l'environnement provoquant la formation de plusieurs milliers de lésions par jour et par cellule. Des changements dans la séquence des nucléotides ou des altérations de structure des bases ou des sucres qui composent la double hélice de l'ADN peuvent interférer avec la réplication ou la transcription du génome cellulaire. L'intégrité du génome face à ces agressions est assurée par des protéines mettant en jeu des mécanismes de réparation de l'ADN efficaces et fidèles [11].

II.2.1. Structure de l'acide désoxyribonucléique - Généralités

L'organisme est constitué de milliard de cellules, unités de bases agencées pour former des organes. L'acide désoxyribonucléique est présent dans toutes les cellules et constitue le patrimoine génétique d'une espèce.

¹⁰ Corde S. Thèse de troisième cycle, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2002.

¹¹ Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Radiobiologie. Hermann, Paris, 1997.

En effet, l'ADN assure la pérennité d'une espèce par une transmission fidèle des caractères héréditaires et possède les informations nécessaires au développement de chaque cellule, et ce notamment par la production continue de protéines.

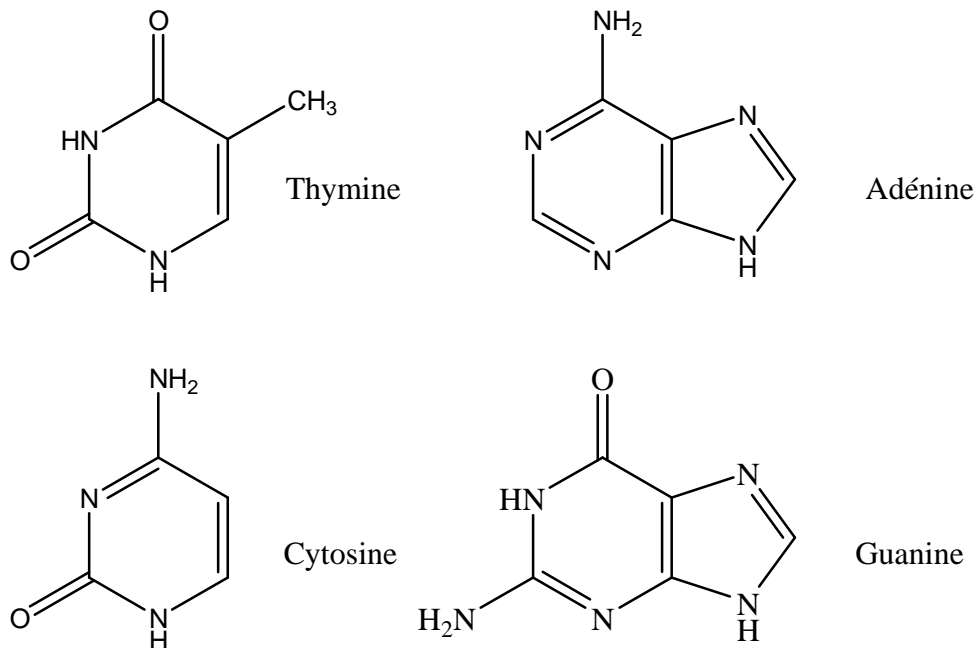


Figure 4 : Structure des quatre bases de l'ADN.

La molécule d'ADN est un polymère constitué de deux chaînes de nucléotides formant une double hélice pouvant atteindre jusqu'à 1,60 m de long chez l'Homme lorsqu'il est déroulé. Chaque nucléotide est composé d'un phosphate relié à un sucre, le 2-désoxyribose, lui même relié par une liaison *N*-glycosidique à l'une des quatre bases suivantes : l'adénine et la guanine qui sont des bases puriques, la thymine et la cytosine qui sont des bases pyrimidiques (figure 4).

Les principaux dommages radio-induits de la molécule d'ADN se répartissent en deux groupes (figure 5) :

- les lésions aboutissant à des cassures simples ou doubles brins de l'ADN consécutives à la rupture de la chaîne sucre-phosphate liant les bases de l'ADN entre elles. Les cassures simples brins représentent une part importante des dégâts engendrés par l'irradiation (environ 1000 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma). Les cassures doubles brins sont plus rares (40 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma) et correspondent à deux cassures sur les brins opposés situées à moins de dix paires de base l'une de l'autre [11].

Elles peuvent conduire dans certains cas à la perte définitive de l'information génétique contenue dans cette zone.

- les dommages localisés sur le cytosquelette de l'ADN : altération de bases, destruction de bases, destruction de sucres, pontage et formation de dimères, addition de produits de la peroxydation lipidique.... Ces dégâts sont largement prépondérants (environ 1500 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma). Leur réparation est rapide.

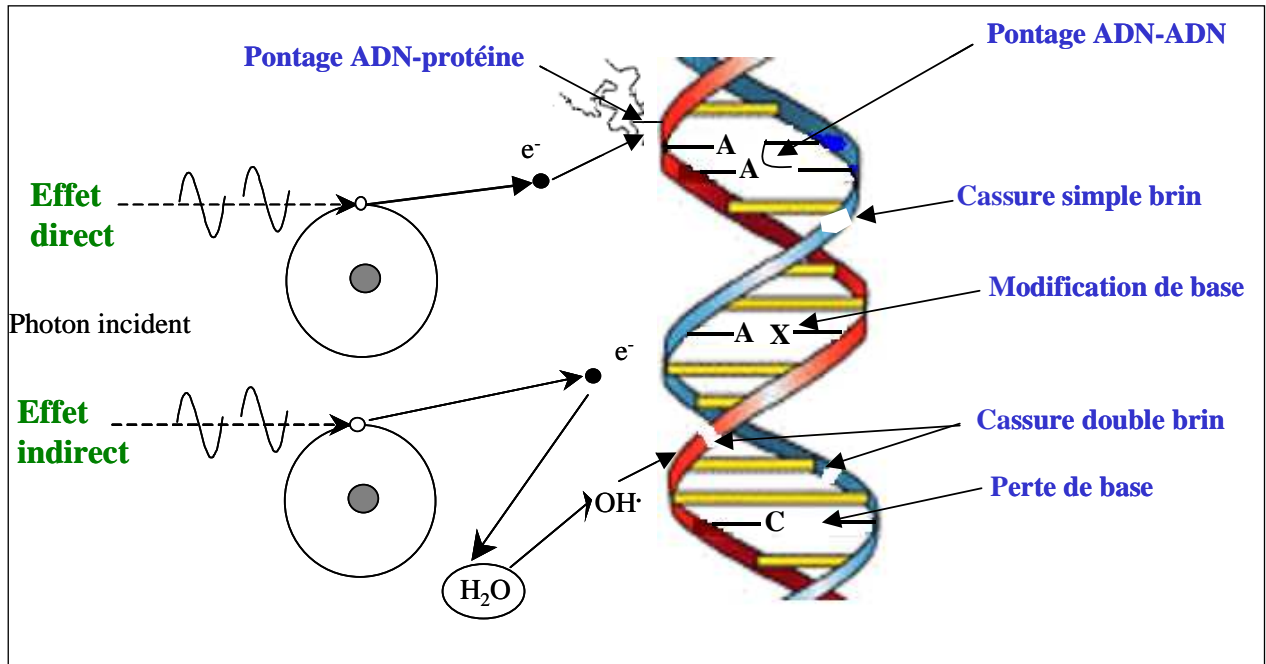


Figure 5 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants.

La nature des dommages ainsi que leur nombre dépendent du type de rayonnement. De plus, la complexité de ces dommages s'accroît avec la densité des ionisations reflétée par le transfert linéique d'énergie (TLE) [12].

Les conséquences de l'irradiation dépendent de la gravité des dommages et de leur nombre. Pour une atteinte mineure, les enzymes réparatrices de la cellule peuvent agir et réparer les lésions. Cependant si la réparation n'est pas fidèle, la séquence des gènes sera modifiée et il en résulte l'apparition de mutation génique. Pour une atteinte plus importante, l'irradiation conduit à la mort cellulaire immédiate ou différée.

¹² Moustacchi E. Mutat. Res., **464**, 35-40, 2000.

II.2.2. Les ruptures de chaînes

II.2.2.1. Les coupures simples brins

Une grande proportion des ruptures simples brins résulte de l'attaque du radical hydroxyle sur la liaison sucre phosphate par arrachement d'un proton au niveau du 2-désoxyribose. Elles peuvent également être produites après l'action de ce même radical sur les bases pyrimidiques. Le nombre de rupture simple brin est 3 à 4 fois plus élevé dans les cellules de mammifères oxygénées que dans les cellules hypoxiques [11]. Le taux de cassures augmente linéairement avec la dose et est d'autant plus faible que le TLE du rayonnement augmente [13]. L'énergie requise pour provoquer une rupture simple brin est de 10-20 eV. Il s'agit de lésions relativement vite réparées et qui ont peu d'impact en matière de létalité cellulaire.

II.2.2.2. Les coupures doubles brins

Il s'agit d'une catégorie de lésions parmi les plus délétères. Une rupture double brin résulte de la cassure des deux brins d'ADN à une distance de moins de dix paires de base. Elle peut être produite soit par une particule seule, soit par la combinaison de deux ruptures simples sur les chaînes complémentaires dues à deux particules traversant la même région avant que la première cassure ait été réparée. Elle est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases, et dite hétérologue dans le cas contraire. Les ruptures hétérologues sont les plus fréquentes [11].

II.2.3. Altération des bases

Les bases de l'ADN peuvent à la fois subir des altérations de leur structure par les effets directs des rayonnements et par l'action des radicaux formés lors de la radiolyse de l'eau : les bases pyrimidiques sont plus radiosensibles que les bases puriques. Les altérations des bases résultent essentiellement de l'addition du radical hydroxyle sur les doubles liaisons des bases, généralement en position C₅ et C₆ des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et C₄ et C₈ des bases puriques (adénine, guanine).

¹³ Pouget J.P. Thèse de troisième cycle, Université Paris XI, 2000.

Certaines de ces bases modifiées sont stables alors que d'autres plus instables se décomposent. Pour certaines, il a été montré leur rôle mutagène *in vitro* [14,15].

II.2.4. Pontage ADN-protéine

Des pontages intra ou inter chaînes ou entre l'ADN et les protéines environnantes peuvent aussi se former sous l'effet du rayonnement ionisant. Dans ce cas, les radicaux peuvent aussi être impliqués dans les pontages ADN-protéines et notamment le radical hydroxyle. Ces pontages peuvent être générés lorsque deux radicaux sont produits à la fois dans les protéines et l'ADN. Les pontages ADN-protéines impliquent principalement les acides aminés tyrosine des protéines et les bases pyrimidiques de l'ADN.

II.2.5. Altération des sucres

L'attaque du 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles qui se traduit initialement par un arrachement d'un atome d'hydrogène peut conduire à :

- une libération du sucre entraînant la coupure d'un brin
- un sucre altéré mais toujours relié en 3' ou 5' au squelette phosphodiester (site abasique)
- un sucre altéré et seulement relié en 3' ou 5' au squelette phosphodiester (formation d'une coupure de brin)

¹⁴ Cadet J. et al. *Mutat. Res.*, **424**, 9-21, 1999.

¹⁵ Wallace S. *Radiat. Res.*, **150**, S60-S79, 1988.

II.2.6. Les aberrations chromosomiques

L'irradiation de cellules induit une déstabilisation du génome accompagnée d'une forte mortalité cellulaire dès les premières mitoses après l'exposition aux rayonnements. Une instabilité chromosomique radio-induite a été observée dans des cellules humaines (cellules hématopoïétiques, fibroblastes primaires et lymphocytes). Les cellules survivantes à l'irradiation produisent des descendants qui ont une forte capacité à former de nouvelles aberrations chromosomiques. Ainsi des dommages stables induits par l'irradiation sont longs à se manifester [8].

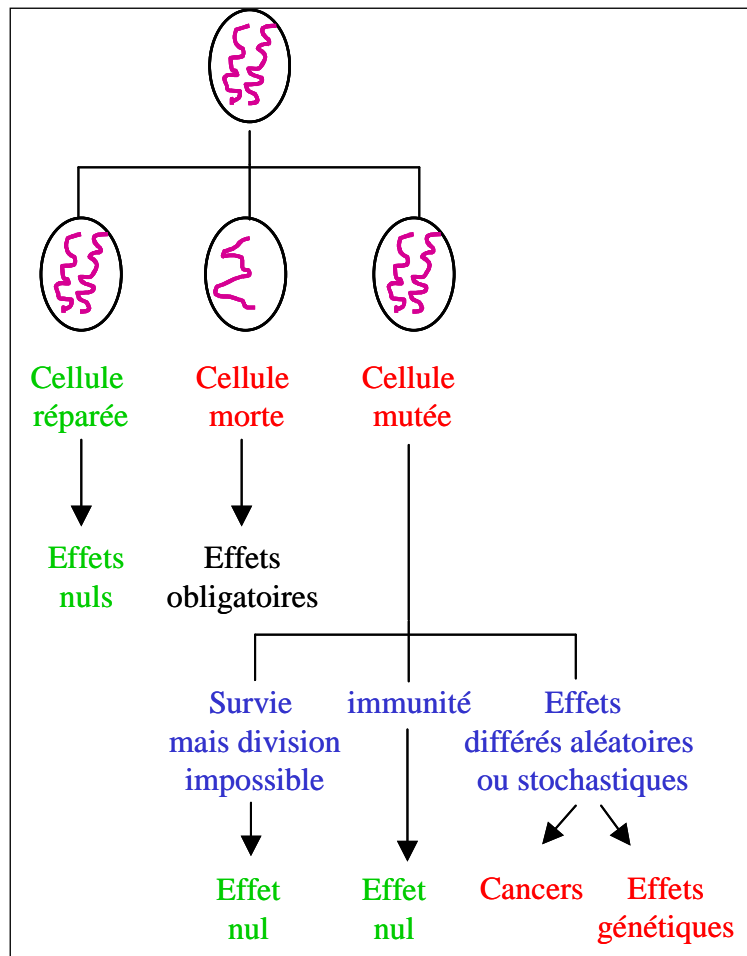


Figure 6 : Conséquences cellulaires de l'irradiation.

On distingue parmi les aberrations chromosomiques produites par les radiations ionisantes des anomalies soit de nombre, soit de structure (effets clastogènes), visibles au microscope. Il existe en outre des aberrations qui échappent à l'examen microscopique mais qui peuvent avoir des conséquences fonctionnelles graves (mutations géniques).

Aucune corrélation entre la dose de radiations et des anomalies de nombre de chromosomes n'a pu être établie. C'est pourquoi, il n'est pris en compte que les anomalies de structure qui peuvent être de différents types à savoir des aberrations chromosomiques ou chromatidiques selon le moment au cours du cycle cellulaire où l'irradiation a lieu. Ces anomalies sont d'ailleurs utilisées comme dosimètres biologiques.

II.2.7. Les mécanismes de réparation de l'ADN [16,17,18,19]

II.2.7.1. Réparation par excision et resynthèse [20]

Ce mécanisme ubiquiste opère sur une large variété de lésions. Il existe deux types de mécanisme : la réparation par excision du nucléotide et la réparation par excision de base.

Dans le premier, les bases modifiées sont reconnues par des ADN-glycosylases relativement spécifiques qui coupent la liaison *N*-glycosidique entre la base altérée et le sucre produisant un site apurinique ou apyrimidique. Une endonucléase AP clive ensuite l'ADN au niveau de ce site et une brèche peut être créée par l'activité de l'exonucléase. Une phosphodiesterase élimine le phosphate de déoxyribose correspondant et une ADN polymérase permet la reconstitution de la chaîne lésée en prenant le brin complémentaire intact comme modèle. L'étape terminale consiste en l'intervention d'une ligase.

Dans le second type de mécanisme, une endonucléase clive l'ADN en un nombre précis de bases sur chaque côté de la lésion et un oligonucléotide contenant la lésion est supprimé.

¹⁶ Averbeck D. *Cancer/Radiother*, **4**, 335-354, 2000.

¹⁷ Boiteux S. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, **26**, 126-132, 2002.

¹⁸ Frankenberg-Schwager M. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**, 273-292, 1990.

¹⁹ Ikushima T., Aritomi H., Morisita J. *Mutat. Res.*, **358**, 193-198, 1996.

²⁰ Nilsen H., Krokan H.E. *Carcinogenesis*, **22**, 987-998, 2001.

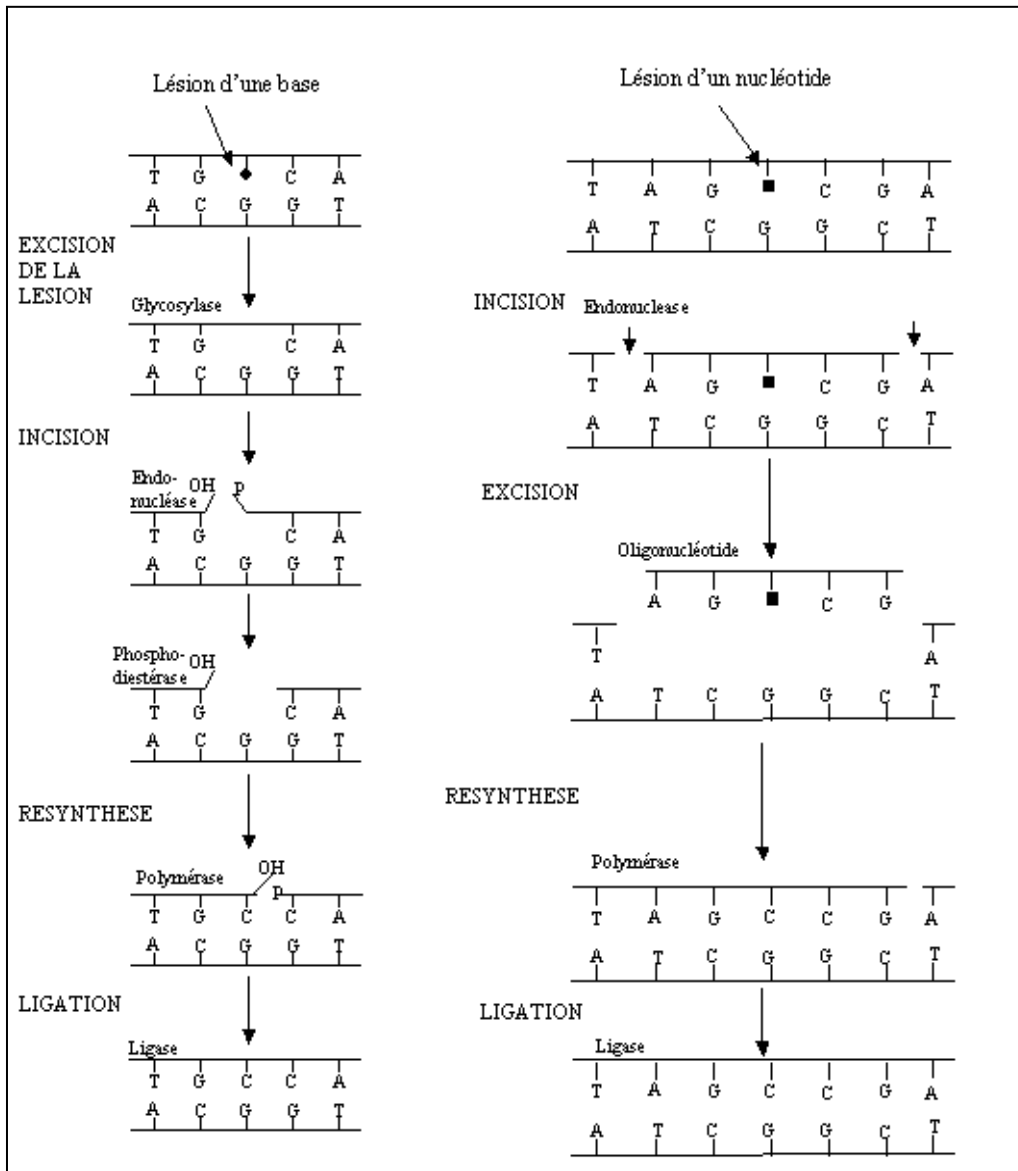


Figure 7 : Réparation par excision et resynthèse.

Les bases endommagées peuvent aussi être réparées par des mécanismes spécifiques visant à réaliser une réparation chimique telle qu'une trans-alkylation. Ces mécanismes mettent en jeu des protéines spécifiques de la lésion pouvant recevoir par transfert chimique les groupes organiques inadéquats sur la base lésée.

II.2.7.2. Recombinaison homologue et non homologue

Contrairement aux cassures simples brins dont la réparation par excision-resynthèse est efficace et rapide, les cassures doubles brins sont plus délicates à être réparées. Cette réparation peut s'effectuer par recombinaison homologue : un échange de l'un des deux brins de l'hélice non lésée avec celui de la chaîne lésée permet la reconstitution de la double hélice. La réparation est fidèle.

La recombinaison non homologue consiste en la suture des deux extrémités de l'ADN ; ce mode de réparation semble être majoritaire chez les mammifères mais conduit souvent à des erreurs au niveau de la séquence de l'ADN.

Les mécanismes brièvement évoqués ci-dessus, sont les principaux mécanismes connus de réparation.

En conclusion, il est bon de retenir que les lésions radio-induites de l'ADN sont diverses de par leur nature. Il n'en reste pas moins que les cassures double-brins de l'ADN sont les plus dangereuses. Cependant elles sont plus rares par rapport aux coupures simples brins qui sont plus facilement réparées. En effet, il est reconnu que d'une manière générale chez l'homme, ce sont l'absence ou les défauts de réparation des cassures double brins qui induisent la létalité des radiations ionisantes. Enfin, il est indispensable pour la cellule de mettre en place des systèmes de réparation efficaces afin de préserver l'information génétique au fil des générations.

II.3. Effets des rayonnements sur les autres molécules

cibles

II.3.1. Les protéines

Quatre vingt dix pour cent des lésions produites par les rayonnements ionisants sont dues à l'attaque des radicaux oxygénés issus de la radiolyse de l'eau. Même si l'ADN représente la principale cible de ces radicaux, il ne faut pas négliger leurs effets sur les protéines constitutives de la cellule. Ces derniers entraînent essentiellement des réactions d'oxydation des protéines.

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement thiol (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées les rendant inactives.

Par exemple, les résidus cystéines des protéines sont très sensibles à l'oxydation et lorsque deux résidus cystéines sont proches, ces derniers forment par oxydation des ponts disulfures aboutissant à l'inactivation de la ou des protéines porteuses de ces résidus. Ces ponts peuvent être réduits par des enzymes présentes dans la cellule.

D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leurs fluorescences, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes et vont pouvoir former des amas dans et autour des cellules.

En résumé, l'attaque oxydante des radicaux sur les protéines se traduit essentiellement par une modification de la structure secondaire et tertiaire de ces dernières (dénaturation, fragmentation, formation d'agrégats). Dans tous les cas les protéines ne sont plus fonctionnelles et peuvent s'agréger sans être détruites par le protéasome.

II.3.2. Les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un proton sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui conduit ainsi à un nouveau radical diène. Les hydroperoxydes peuvent être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en acides aldéhydiques et en alcanes. Le radical peroxyde peut lui même libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonéal.

II.3.3. Effets cellulaires des rayonnements ionisants

Parmi les lésions élémentaires produites par une irradiation au niveau de la cellule on distingue trois types de lésions :

- *les lésions létales*, qui touchent les fonctions vitales de la cellule et sont irréparables
- *les lésions sublétales*, qui ne sont pas individuellement létales, et sont donc réparables ; leur accumulation peut tout de même conduire à la mort cellulaire
- *les lésions potentiellement létales* si la division cellulaire intervient avant leur réparation mais qui peuvent aussi être réparées si les conditions et l'environnement cellulaire post-irradiation le permettent.

II.3.4. La mort cellulaire

En radiobiologie, le terme de mort cellulaire ne concerne que les cellules qui ont perdu leur capacité à se diviser quasi-indéfiniment c'est-à-dire celles pour lesquelles la descendance n'existe plus. En effet, pour des doses d'irradiations faibles, certaines cellules vont encore être capables de synthétiser des protéines ou de l'ADN mais elles auront perdu leur capacité de prolifération. Au contraire, pour des doses d'irradiations élevées, de quelques centaines de grays, nous observons l'arrêt de toutes fonctions cellulaires et la cytolysse : il s'agit alors d'une mort immédiate par opposition à la mort différée causée par des doses d'irradiation plus faibles.

La notion de mort différée ne s'applique pas aux cellules différenciées qui ne se divisent plus dans les conditions normales telles que la plupart des cellules musculaires ou les cellules sécrétrices. Ces dernières sont très résistantes aux rayonnements.

II.3.5. Facteurs influençant l'effet biologique des radiations

ionisantes

II.3.5.1. La radiosensibilité

La radiosensibilité est le degré de sensibilité aux radiations ionisantes d'une population cellulaire normale ou tumorale. Elle varie d'un type cellulaire à l'autre et en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation.

En 1906, Bergonié et Tribondeau ont montré que la radiosensibilité d'une cellule varie proportionnellement à sa capacité de division et de façon inversement proportionnelle à son degré de différenciation.

On distingue classiquement deux types de cellules :

- les cellules à faible capacité de restauration radiosensibles (par exemple les cellules souches pluripotentes de la moelle hématopoïétique ou les cellules souches de la lignée germinales).
- les cellules à forte capacité de réparation, radiorésistantes.

Les différences de radiosensibilité peuvent être appréciées en comparant les courbes de survie obtenues avec le même rayonnement. Les courbes de survie des cellules cancéreuses ne présentent pas de différence systématique par rapport à celles des cellules normales.

La radiosensibilité des cellules dépend certes de la nature même des cellules mais aussi de la phase du cycle cellulaire au cours de laquelle est réalisée l'irradiation. En effet, il a été montré sur des cultures cellulaires Hela synchrones une plus grande radiosensibilité des cellules en phase M et G2 alors qu'en phase S, les cellules sont plus radiorésistantes. Ce phénomène est observé pour d'autres types cellulaires avec quelques légères variations. Dans tous les cas, il existe une variabilité de la radiosensibilité au cours du cycle cellulaire.

II.3.5.2. Effet oxygène

En l'absence de dioxygène les cellules sont moins sensibles aux radiations ; la dose nécessaire pour tuer une cellule en hypoxie est 2,5 à 3 fois plus importante que celle nécessaire pour détruire la même cellule oxygénée. Ainsi si une cellule tumorale est hypoxique, donc peu sensible aux radiations, la dose nécessaire à sa stérilisation sera plus élevée que si cette cellule tumorale était oxygénée. C'est pourquoi les tumeurs sont réoxygénées pour les rendre plus radiosensibles dans certains protocoles de radiothérapie.

II.3.5.3. Le temps

Le taux de survie cellulaire dépend de la distribution de la dose dans le temps en raison de la réparation partielle des lésions qui peut survenir. Cette distribution de la dose comprend l'étalement, le fractionnement et la dose totale. En effet, les premières études de la réponse cellulaire *in vitro* à une irradiation fractionnée ont été menées par Elkind et Sutton en 1959 [21]. Elles ont révélé qu'une irradiation en deux fractions séparées par un intervalle de temps induit un taux de létalité inférieur à celui obtenu avec une irradiation à la même dose totale délivrée en une seule fois. La dose totale nécessaire pour provoquer un taux de mortalité donné est donc plus élevée quand l'irradiation est réalisée en deux fractions qu'en une seule fois.

En cas d'irradiation continue, le taux de survie varie en fonction du débit de la dose. Dans la plupart des lignées cellulaires, pour les hauts débits la radiosensibilité est constante et indépendant du débit. Par contre pour les faibles débits, les cellules deviennent plus radiosensibles.

²¹ Elkind M.M., Sutton H. Radiat. Res. **13**, 556-593, 1960.

II.4. Effets des rayonnements ionisants sur l'organisme

[22, 23]

Les risques liés à l'irradiation sont de deux ordres : un risque aléatoire ou stochastique et un risque direct, déterministe. On considère que le risque aléatoire peut survenir après toute irradiation même s'il n'est démontré que pour les fortes doses. Une fois apparu, sa gravité est indépendante de l'irradiation initiale. La probabilité d'apparition d'effets néfastes pour l'individu ou pour sa descendance est fonction de l'intensité de l'irradiation selon une relation linéaire. Le risque direct (déterministe) est dû à l'effet physique de l'irradiation. Il apparaît toujours au delà d'une certaine dose mais sa gravité augmente avec la dose reçue.

II.4.1. Les effets déterministes [24]

Les effets déterministes apparaissent de façon inéluctable lorsque la dose reçue est supérieure à un seuil et généralement peu après une irradiation. Le délai d'apparition des effets est d'autant plus court que la dose est élevée. Le seuil d'apparition de ces effets est variable selon l'individu ; certaines maladies touchant les mécanismes de réparation de l'ADN rendent les personnes atteintes plus sensibles aux effets des radiations (xeroderma pigmentosum). D'autre part, le seuil d'apparition des effets augmente avec le débit de dose et l'étalement de la dose dans le temps. Lors d'une irradiation globale, les effets se manifesteront en premier lieu au niveau des organes les plus radiosensibles (tissu hématopoïétique, cellules intestinales). Lors d'une irradiation partielle les effets dépendent de la région irradiée.

²² Jarrett C.D.G. Medical Management of Radiological Casualties, 1999.

²³ Keith S., Murray E., Spoo W. Toxicological profile for ionizing radiation, 1999.

²⁴ Cordoliani Y.S. Feuilles de radiologie, **43**, 80-86, 2002.

II.4.1.1. Irradiation globale : le syndrome d'irradiation aiguë [25]

Le syndrome d'irradiation aiguë est l'exemple caractéristique des effets déterministes ; lorsque l'organisme est soumis à une courte et forte irradiation, des symptômes caractéristiques apparaissent dont la gravité dépend de la dose reçue. Ce syndrome ne peut donc être observé que lors d'accident nucléaire tel que celui de Tchernobyl ou d'explosion de bombes atomiques (Hiroshima, Nagasaki). Généralement, ce syndrome se décline en trois phases : une phase dite prodrome (vomissements, nausées, céphalées) suivie d'une phase de latence puis de la réapparition de signes cliniques évoqués qui caractérisent la phase d'état.

Il est possible de distinguer les différents effets cliniques en fonction de la dose comme suit :

- Dose inférieure à 0,5 Gy

Aucun effet clinique n'est réellement mesurable, seule une légère modification dans la numération formule peut être observée (baisse du nombre de lymphocytes).

- Dose de 1 à 2 Gy

A partir de 1 Gy apparaissent les premiers signes digestifs caractéristiques de la phase prodromique tels que des nausées et des vomissements. Ces signes apparaissent rapidement et sont suivis de ce qu'on appelle « le mal des rayons » (malaise, asthénie, anorexie).

- Dose de 2 à 4 Gy

L'atteinte du système hématopoïétique (baisse importante des leucocytes, thrombocytopenie) nécessite une surveillance étroite afin de mettre en place une antibiothérapie rapide le cas échéant.

- Dose de 4 à 6 Gy

La dose létale 50 % chez l'adulte est estimée à 4,5 Gy en l'absence de traitement. Le tableau clinique correspond à une modification sévère de la numération formule témoignant d'une atteinte importante du système hématopoïétique.

²⁵ Cervený T.J., MacVittie T.J., Young R.W. Textbook of Military Medicine - Medical Consequences of Nuclear Warfare:17-36.

- Dose de 6 à 10 Gy

En l'absence de traitement la dose de 6 Gy représente la dose mortelle dans 100 % des cas. En plus des manifestations digestives, dès 8 Gy les manifestations cliniques se caractérisent par une atteinte du système pulmonaire. Le pronostic dépend de l'âge, des lésions associées ou préexistantes et du traitement.

- Dose de 10 à 20 Gy

Le décès est inéluctable dans un délai inférieur à une semaine. Les signes cliniques sont digestifs, respiratoires avec une granulopénie et une thrombocytopénie sévères.

- Doses supérieures à 30 Gy

Dès 50 Gy, des désordres neurologiques importants apparaissent. La mort survient dans les 48 heures.

II.4.1.2. Effets sur la peau

Aucun effet n'est observé pour une dose inférieure à 3 Gy. Par contre entre 3 et 5 Gy, il peut apparaître une épidermite sèche dans un délai de 3 semaines. L'érythème précoce (« coup de soleil ») apparaît dans les premières heures d'une exposition à 5 Gy. Pour une dose supérieure à 30 Gy, apparaît une nécrose cutanée dont le seul traitement est la greffe.

II.4.1.3. Effets sur les gonades

Une irradiation à une dose voisine de 0,15 Gy peut provoquer une stérilité transitoire chez l'homme. Cependant une exposition à une dose de 4 à 6 Gy entraîne une stérilité définitive sans atteinte des capacités et caractères sexuels.

Chez la femme, pour une dose de 3 à 6 Gy, il y a stérilité définitive avec modifications des caractères sexuels (ménopause précoce).

II.4.2. Les effets stochastiques

Les effets stochastiques ou aléatoires résultent de la modification du matériel génétique qui induit des cancers si ces modifications affectent des cellules somatiques ou des modifications phénotypiques de la descendance si elles touchent les cellules germinales. Ces effets n'ont pas de seuil et sont observables par des études épidémiologiques très longtemps après l'exposition. La gravité de l'effet ne dépend pas de la dose. Cependant même si la relation dose-effet est plus difficile à établir que pour les fortes doses, il n'existe pas de dose seuil en dessous de laquelle il n'y a pas d'effet.

L'exemple le plus connu de données épidémiologiques mettant en évidence l'apparition de cancers radio-induits est celui du suivi des survivants des bombardements atomiques de Hiroshima et Nagasaki. En effet, le 6 août 1945 la première bombe atomique a explosé à 580 mètres au dessus d'Hiroshima tuant immédiatement 45 000 personnes, 15 000 dans les 3 premières semaines et 60 000 au cours de la première année. Lors de l'explosion de Nagasaki, 31 000 personnes sont décédées immédiatement, 32 000 dans les 3 premières semaines et 17 000 dans l'année qui suivit. Suite à ces deux événements, diverses études ont été mises en place pour évaluer l'effet des rayonnements.

Globalement, ces études montrent clairement l'implication des radiations dans la survenue de cancers chez les survivants des deux explosions atomiques japonaises dans les années suivantes : sur une population de 86000 personnes surveillées, 75 cas supplémentaires imputables aux radiations de leucémies entre 1950 et 1985 et 306 cas de cancers ont été observés [26].

D'autres études concernant des circonstances non accidentelles d'exposition aux radiations ont été réalisées : par exemple, l'utilisation jusque dans les années 50-60 de la radiothérapie dans le traitement d'affections non malignes, telle que la spondylarthrite ankylosante, a provoqué l'augmentation de l'incidence du risque de cancers secondaires pour certaines de ces maladies. Dans le cas de la spondylarthrite ankylosante, la probabilité de développer une leucémie a été multiplié par cinq [26].

²⁶ Cosset J.M. Cancer/Radiother. **1**, 823-835, 1997.

L'augmentation du risque de cancer pour une population exposée est plus importante pour les cancers de la moelle osseuse (leucémie), de la thyroïde, du sein et des os. Les enfants sont plus sensibles aux cancers radio induits que les adultes (Tchernobyl). L'effet des radiations sur l'embryon et le fœtus dépend du stade de développement.

III. LA RADIOPROTECTION

III.1. Historique et fondements de la radioprotection

L'Homme est exposé aux rayonnements depuis toujours. Ils sont une réalité quotidienne et omniprésente. La découverte de ces rayonnements ne date que d'un siècle et la reconnaissance de leur danger suivit de peu la diffusion de leur utilisation en médecine. Les premiers érythèmes et leucémies radio induits mis en évidence chez les utilisateurs de rayons X conduisent en 1928 à la mise en place d'un comité pour la protection contre les rayonnements X et le radium. Après la Seconde Guerre Mondiale, en 1950, ce comité fut restructuré et prit le nom de Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR). Alors que le comité ne se consacrait qu'aux problèmes hospitaliers, la CIPR traite de toutes les utilisations des rayonnements ionisants. Elle évalue le risque radiologique et indique comment le gérer. En effet, concernant uniquement les travailleurs exposés aux rayonnements ionisants la radioprotection devait leur garantir que le risque encouru du fait de leur exposition reste acceptable au regard des autres risques professionnels et des risques acceptés par chaque individu.

Progressivement et notamment avec l'utilisation de l'énergie nucléaire exposant aux rayonnements ionisants non plus uniquement les travailleurs ou les malades mais également le public, le champ d'action de la radioprotection s'est étendu à l'ensemble de la population amenant à une portée plus générale du concept de la radioprotection exprimée ainsi par la CIPR : *assurer un niveau de protection adéquat pour l'Homme sans pénaliser indûment les pratiques bénéfiques qui exposent aux rayonnements ionisants*. En 1952, l'Assemblée Générale des Nations-Unies crée un comité scientifique chargé d'étudier les conséquences radiologiques des retombées des tirs nucléaires aériens.

III.2. La radioprotection chimique

La radioprotection chimique est une approche pharmacologique de la protection vis-à-vis des radiations ionisantes ayant pour vocation de chercher diverses substances, drogues ou produits biologiques, qui, administrés avant l'exposition, sont capables de réduire les dommages dus aux radiations. L'effet protecteur de certains composés contre les effets délétères des rayonnements ionisants a été découvert pour la première fois par W.M. Dale en 1942. Ses travaux n'ont été publiés qu'en 1949 [27]. En 1951, l'importance de la fonction thiol dans ce type de composés a été démontrée par Bacq et al. [28], qui ont synthétisé la 2-mercaptoéthylamine (MEA) dérivé non carboxylé de la cystéine. Ce composé s'est avéré être un meilleur agent protecteur chez la souris que tous les composés précédemment testés. La présence de la fonction amine est aussi considérée comme essentielle dans l'activité radioprotectrice. Tous les composés synthétisés par la suite sont donc caractérisés par la présence de ces deux fonctions : il s'agit de l'essor des aminothiols dans le domaine de la radioprotection chimique [29]. En 1959, l'armée américaine lance son programme de développement de drogues utilisées contre les dommages créés par les irradiations : Antiradiation Drug Development Program. Ce programme a permis la synthèse et l'évaluation de nouveaux types de composés qui sont les phosphorothioates. Le principal composé synthétisé est l'acide S-[2-(3-aminopropyl)aminoéthyl]phosphorothioïque (WR-2721 ou Ethiofos) : il s'agit d'une prodrogue convertie en thiol par une alcaline phosphatase membranaire [30].

Depuis, d'autres types de structures chimiques ont montré une activité radioprotectrice notable. Cependant les composés efficaces restent le plus souvent des aminothiols et des phosphorothioates. Les mécanismes selon lesquels les cellules mammifères sont protégées des effets néfastes des radiations ionisantes ne sont pas encore totalement connus même si certaines hypothèses sont en voie de confirmation.

²⁷ Dale W.M., Gray L.H., Meredith W.J. Phil. Trans. Roy. Soc., **242A**, 33-62, 1949.

²⁸ Bacq Z.M. et al. Arch. Int. Physiol. **LIX**, 442-446, 1951.

²⁹ Bump E.A., Malaker K. Radioprotectors: Chemical, Biological, and Clinical Perspectives. CRC, 1998.

³⁰ Popisil M. Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation Pharmacological radiation protection, 411-420, 1999.

III.2.1. Mécanismes de radioprotection chimique

Il est important de noter que d'autres mécanismes que ceux évoqués par la suite peuvent entrer en jeu dans la protection des cellules et que pour un composé plusieurs mécanismes sont envisageables.

III.2.1.1. Les systèmes de défenses anti-oxydantes endogènes

L'exposition aux rayonnements ionisants est à l'origine de la production d'espèces radicalaires oxygénées. En raison des dommages potentiels que peuvent engendrer ces radicaux sur les différentes biomolécules (ADN, lipides, protéines) plusieurs systèmes de défenses cellulaires antioxydants physiologiques sont présents dans les cellules. Ces systèmes de défenses sont de différentes natures. La protection de la cellule vis-à-vis de ces espèces radicalaires est assurée soit par des enzymes spécifiques se comportant comme des piègeurs de radicaux soit par des composés naturels endogènes ou bien présent dans l'alimentation (vitamines...). Tout déséquilibre de la balance antioxydant/pro-oxydants par surproduction de radicaux, par exemple lors d'une exposition aux rayonnements ionisants, entraîne une rupture de cet équilibre d'où l'intérêt de développer des radioprotecteurs à visée antioxydante [31].

- *Les systèmes enzymatiques*

Les enzymes les plus connues sont les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathion peroxydases.

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloprotéines catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier peut ensuite être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase (glutathion peroxydase ...) ou par la catalase.

Les glutathion peroxydases font partie d'un système complet qui joue un rôle important dans le mécanisme d'élimination du peroxyde d'hydrogène. Elles nécessitent la présence de glutathion réduit (GSH), donneur d'électron. Le glutathion oxydé (GSSG) produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) comme donneur d'électron.

La catalase catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. La glutathion peroxydase et la catalase permettent ainsi l'élimination du peroxyde d'hydrogène.

³¹ Goudable J., Favier A. Nutr. Clin. Metabol. **11**(2), 115-120, 1997

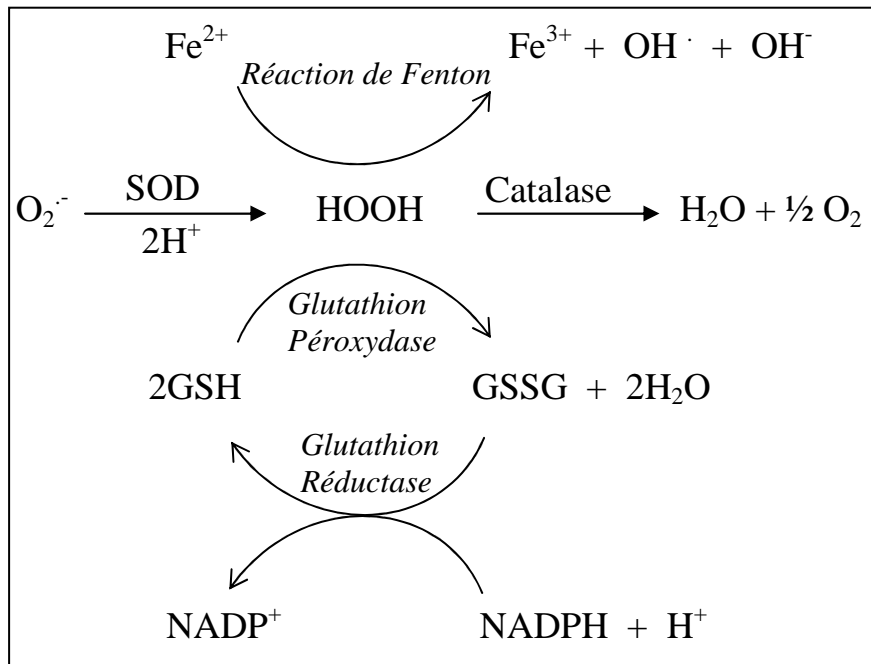


Figure 8 : Représentation schématique des différents systèmes antioxydants enzymatiques.

Les peroxyrédoxines ou *thiorédoxine réductases* ont été découvertes récemment et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs propriétés antioxydantes [32]. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant au sein de la cellule à travers une activité peroxydase. Le peroxyde d'hydrogène, le peroxonitrite, et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Malgré leur plus faible efficacité catalytique que la glutathion peroxydase et la catalase, elles sembleraient jouer un rôle important dans l'élimination des hydroperoxydes de par leur large distribution dans la cellule et leur quantité importante.

- *Les systèmes non enzymatiques*

Le glutathion (GSH) est un tripeptide possédant au niveau de la cystéine, un groupement thiol lui conférant des propriétés réductrices et nucléophiles. Le glutathion réduit est abondant dans la plupart des cellules ce qui fait de lui un antioxydant majeur de la cellule grâce à sa concentration élevée. Son activité antioxydante s'exerce :

- soit directement en piégeant les radicaux libres pour former le disulfure GSSG par oxydation.

³² Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J., Poole L.B. Trends Biochem. Sci. **28(1)**, 32-40, 2003.

- soit en participant à la réduction des hydroperoxydes lipidiques ROOH comme cosubstrat des glutathions peroxydases. Au cours de cette réaction, le GSH est oxydé en GSSG lui-même régénéré en GSH grâce à l'oxydation du NADPH par la glutathion réductase. Le NADPH est ensuite régénéré par la glucose-6-phosphate deshydrogénase.

L'*α-tocophérol* (vitamine E) est un antioxydant ayant pour rôle de stopper la chaîne de réaction de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde (LOO[•]). La vitamine E devient alors à son tour une espèce radicalaire, moins réactive que le radical LOO[•], qui peut être pris en charge par une autre molécule antioxydante telle que la vitamine C, le glutathion [33,34]...Cependant, à forte concentration, la vitamine E oxydée peut avoir une activité pro-oxydante [35].

La *vitamine C* est un antioxydant majeur présent dans tous les organes. Excellent donneur d'électrons, l'anion ascorbate AH⁻ piège les radicaux et donne un radical ascorbyle A[•]. La vitamine C peut ensuite être régénérée par d'autres antioxydants... Cependant, comme la vitamine E, l'acide ascorbique peut avoir un effet pro-oxydant en réduisant le fer ferrique en fer ferreux. A son tour, le fer ferreux peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène et induire la production de radicaux hydroxyles (réaction « Fenton-like ») [36,37].

Les métaux de transition sont essentiels pour certaines enzymes antioxydantes. En effet, le cuivre, le zinc et le manganèse entrent dans la composition du site actif des différentes superoxydes dismutases. Le sélénium est présent sous forme de sélénocystéine dans les sélénoprotéines telles que la glutathion peroxydase [38].

A ces composés, nous pouvons ajouter de nombreux autres composés antioxydants non enzymatiques tels que l'acide urique, le β-carotène, les polyphénols ...

³³ Vatassery G.T., Smith W.E., Quach H.T. *Lipids*. **24(12)**, 1043-1047, 1989.

³⁴ Chan A.C. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71(9)**, 725-731, 1993.

³⁵ Cillard J., Cillard P. *Ann. Nutr. Aliment.* **34(3)**, 579-591, 1980.

³⁶ Samuni A., Aronovitch J., Godinger D., Chevion M., Czapski G. *Eur. J. Biochem.* **137(1-2)**, 119-124, 1983.

³⁷ Chepda T., Perier C., Chamson A., Frey J. *Nutr. Clin. Metabol.* **11(2)**, 115-120, 1997.

³⁸ Arteel G.E., Sies H. *Env. Toxicol. Pharmacol.* **10(4)**, 153-158, 2001.

III.2.1.2. Protection par hypoxie ou anoxie

Cette théorie est basée sur l'effet oxygène des rayonnements : l'intensité des effets des radiations est d'autant plus grande que la pression partielle de dioxygène dans le système irradié est plus élevée. La formation d'espèces réactives oxygénées peut être inhibée par l'hypoxie. Un certain nombre de radioprotecteurs, tels que les catécholamines et l'histamine [39], possèdent la propriété d'induire une anoxie ou une hypoxie dans certains tissus. Pour certain, une corrélation entre l'effet vasoconstricteur et l'effet radioprotecteur a pu être établie (indolamines). D'autres composés peuvent induire une hypoxie systémique en modifiant l'hémodynamique cardiovasculaire, en interférant avec l'hémoglobine, en augmentant l'utilisation de dioxygène et en entraînant une dépression du système respiratoire.

III.2.1.3. Inhibition des processus radicalaires - Capture des radicaux libres

Le mécanisme de protection par capture des radicaux libres est basé sur le principe que les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau sont la principale cause des dommages cellulaires provoqués par les radiations. Il repose sur la capacité de certains composés à réagir avec les radicaux issus de la radiolyse de l'eau afin de prévenir les dommages.

Ce phénomène de capture des radicaux libres est connu plus particulièrement pour les thiols. En effet, dans un premier temps, ils peuvent piéger un radical hydroxyle en donnant un radical H[•] avec formation d'une molécule d'eau et du radical RS[•].

Ce dernier n'est pas assez réactif pour participer à la dégradation des macromolécules biologiques et peut se dupliquer en donnant le disulfure, facilement éliminé par l'organisme.

III.2.1.4. L'hypothèse des disulfures mixtes

L'hypothèse des disulfures mixtes a été émise pour la première fois par Eldjarn et Phil [40] en 1956 dans l'étude par marquage du soufre du devenir dans l'organisme de la cystéine et de la cystéamine. Cette étude révèle clairement la formation d'une liaison disulfure de ces composés avec des protéines intra et extracellulaires.

³⁹ Foye W.O. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 1981.

⁴⁰ Eldjarn L., Pihl A. *J. Biol. Chem.* **223**(1), 341-352, 1956.

Cette liaison temporaire serait réduite par les systèmes réducteurs de disulfures endogènes tels que la glutathion-transférase. Les radioprotecteurs sont ensuite métabolisés et excrétés. La transformation d'un groupe SH en SS ou disulfure mixte apporte une protection partielle de l'atome de soufre contre l'action directe des radiations. Quand la liaison disulfure est attaquée par un radical libre, un des atomes de soufre est oxydé en acide sulfonique ou sulfinique, l'autre est réduit en groupement SH. La liaison disulfure mixte sert de source d'électron pour réparer les ionisations créées par action directe des radiations.

Cette hypothèse reste encore controversée dans la mesure où tous les thiols ne sont pas des radioprotecteurs, alors qu'ils forment tous des disulfures.

III.2.1.5. Réparation par transfert d'hydrogène

La réparation par transfert d'hydrogène, comme son nom l'indique, intervient lorsque la lésion est déjà présente contrairement aux précédents mécanismes évoqués. L'attaque directe ou indirecte des radiations conduit à la transformation de molécules biologiques cibles en espèces radicalaires. Sous cette forme, ces molécules sont susceptibles de réagir avec d'autres radicaux ou avec du dioxygène. Cependant si à proximité de ces radicaux organiques se trouvent des composés capables de céder un atome d'hydrogène, elles peuvent compenser les dommages subis. Il s'agit d'une réaction rapide permettant de restaurer la molécule avant que le dommage ne persiste.

III.2.1.6. Choc biochimique

L'administration de certains radioprotecteurs, plus particulièrement des thiols, peut induire certaines réactions telles que l'hypotension, l'hypothermie ou l'hypoxie. Il a été noté, chez le rat, une élévation du taux de sérotonine après injection d'aminothiols.

L'induction d'une phase d'hypothermie permet de réduire les réactions métaboliques et de réparer les dommages [41].

⁴¹ Copeland E.S. Photochem. Photobiol. **28**, 839-844, 1978.

III.2.1.7. Conclusion

Selon Bacq Z.M. : « *un radioprotecteur donné peut agir sur des systèmes différents par des mécanismes variés ; les divers mécanismes connus de radioprotection peuvent opérer simultanément en synergie sur le même système ; chaque système doit être étudié pour lui-même (...) il semble que les divers tissus et cellules d'un même animal puissent être protégés par la même substance selon des mécanismes différents.* »

III.2.2. Essai de classification des radioprotecteurs

Depuis la mise en évidence des propriétés radioprotectrices de la cystéine et de la cystéamine et la découverte du WR-2721, nombreuses ont été les recherches ayant pour objectif de trouver le meilleur radioprotecteur. De nombreux composés ont été synthétisés, isolés et testés dans ce domaine. Il n'est pas dans notre propos de dresser une liste exhaustive de l'ensemble des composés testés, d'autant que certains auteurs s'y sont déjà attachés [42]. Il s'agit plutôt de dresser un bilan des connaissances dans ce domaine. La classification établie est purement arbitraire dans un but synthétique. L'efficacité relative des différents radioprotecteurs est donnée par la détermination *in vivo* du Facteur de Réduction de Dose (FRD) : il s'agit du rapport des doses d'irradiation qui provoquent 50 % de mortalité à 30 jours, respectivement chez les animaux protégés et chez les animaux non protégés. Chacune de ces doses d'irradiation sont déterminées préalablement.

$$\text{FRD} = \frac{\text{DL}_{50/30} \text{ jours d'irradiation animaux protégés}}{\text{DL}_{50/30} \text{ jours d'irradiation animaux non protégés}}$$

Ce rapport doit être supérieur à 1,2 pour envisager un usage médical et supérieur à 2 pour un usage militaire.

⁴² Foye W.O. J. Pharm. Sci. **58**, 283-300, 1969.

III.2.2.1. Les radioprotecteurs « naturels »

Entrent dans ce groupe, les composés issus des plantes, des bactéries, des champignons et des algues. On y trouve des vitamines, des caroténoïdes, des polyphénols, des polysaccharides, des acides aminés, des lipides, des amines et polyamines, des hormones, protéines et peptides [43]... Les mécanismes d'action de ces composés sont divers :

- la capture des radicaux libres
- induction de radioprotecteurs cellulaires tels que la superoxyde dismutase, le glutathion...
- la restauration hématopoïétique et des fonctions immunitaires
- l'activation des enzymes de réparation de l'ADN
- faciliter la réparation par donation d'hydrogène
- induction d'une hypoxie
- formation des disulfures mixtes

Selon Venkatachalam et al. [43] la majeure partie de ces dérivés est spécifique d'un organe. Par exemple, le système hématopoïétique est mieux protégé avec la vitamine E, la vincristine ou l'acide lipoiq. La réparation de l'ADN est favorisée par la mélatonine, l'huile d'olive, la nicotinamide...L'association de certains d'entre eux, comme le 5-hydroxytryptophane, avec d'autres composés issus d'autres classes, tel que le WR-2721 améliore considérablement l'effet radioprotecteur [44].

L'intérêt porté à ces radioprotecteurs naturels provient du fait que malgré une efficacité moindre par rapport aux composés issus de la synthèse chimique, ils possèdent en général une faible toxicité. Weiss et al. [45] dressent un bilan des connaissances actuelles concernant l'utilisation d'antioxydants présent dans l'alimentation et dans certaines plantes.

Pour la plupart de ces radioprotecteurs naturels, plus particulièrement pour les polyphénols, leur FRD n'est jamais très élevé, de l'ordre de 1,3 mais ils présentent l'avantage d'être pratiquement dénués de toxicité et de pouvoir constituer de bons adjuvants.

⁴³ Venkatachalam S.R., Chattopadhyay S. *Curr. Org. Chem.* **9**, 389-404, 2005.

⁴⁴ Maisin J.R., Albert C., Henry A. *Radiat. Res.* **135**, 332-337, 1993.

⁴⁵ Weiss J.F., Landauer M. *RM Toxicology*, **189**, 1-20, 2003.

III.2.2.2. Les cytokines et immunostimulants

Les cytokines sont des molécules polypeptidiques, glycosylées ou non, libérées plus ou moins spécifiquement par certaines cellules et qui régulent le fonctionnement du système immunitaire. Elles interviennent dans l'inflammation et l'hématopoïèse. L'intérêt porté aux cytokines et immunostimulants dans le domaine de la radioprotection chimique réside dans leur capacité à restaurer le système immunitaire et hématopoïétique, principales cibles des rayonnements.

Concernant les cytokines, Singh et al. dressent un bilan complet des études réalisées [46]. Toutes les cytokines et même les facteurs de croissance (G-CSF, M-CSF ...) présentent une activité radioprotectrice par un mécanisme souvent spécifique. Par exemple, l'interleukine 1 protège les souris de l'irradiation en stimulant la moelle pour surmonter la myélodépression [47].

L'exemple le plus connu concernant les immunostimulants est celui du Ribomunyl[®], commercialisé par les laboratoires Pierre Fabre Médicament en tant qu'immunomodulateur. Une étude menée par Vavrova J. a montré pour la première fois l'effet radioprotecteur de ce médicament avec un FRD de 1,2 lorsqu'il est injecté 24 heures avant l'irradiation par voie intrapéritonéale ou sous cutanée chez la souris [48]. Son mécanisme d'action semble passer par l'intervention de l'interleukine 1 et de l'interféron.

La même année, une étude concernant un immunomodulateur en cours d'étude clinique, le AS101 (ammonium trichloro(dioxyéthylène-O,O')tellurate), révèle ses propriétés radioprotectrices [49] en protégeant les souris de la létalité radio-induite et en favorisant la restauration des cellules de la moelle et de la rate. En l'absence de FRD, on ignore s'il est un radioprotecteur supérieur aux autres immunomodulateurs.

⁴⁶ Singh V.K., Yadav V.S. *Exp. Mol. Pathol.* **78**, 156-169, 2005.

⁴⁷ Constine L.S. et al. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **20**, 447-456, 2005.

⁴⁸ Vavrova J. *Folia Biol.* **41**, 23-30, 1995.

⁴⁹ Kalechmana Y. et al. *Immunopharmacology*, **29**, 149-158, 1995.

III.2.2.3. Les complexes métalliques

Certains complexes métalliques ont été testés dans le domaine de la radioprotection. Un des exemples est celui du complexe Zn-desferrioxamine. Ce complexe possède un FRD chez la souris de 1,3 lorsqu'il est injecté 30 minutes avant une irradiation. Cet effet protecteur n'est pas observé lorsqu'on injecte la desferrioxamine seule [50]. Son mécanisme d'action est inconnu.

Une autre étude concernant des complexes de cuivre, montre la contribution importante du métal dans les propriétés radioprotectrices ; il s'agit de complexes cuivre II avec des dérivés bis(méthylthio) et méthylthio amine et des dérivés méthylpyridinium [51].

III.2.2.4. Les dérivés hydroxylés

Globalement, les dérivés hydroxylés présentent un effet radioprotecteur moindre par rapport aux dérivés soufrés (thiols et dérivés thiols). Cependant un certain nombre de dérivés alcools et phénols ont montré une activité significative tels que le glycérol, l'éthylène glycol et le méthanol. Cependant la plupart de ces dérivés se révèlent être toxiques. Les acides organiques ne donnent qu'une très faible voire aucune protection.

III.2.2.5. Les radioprotecteurs non soufrés, hétérocycliques

Il est connu qu'un large groupe de composés hétérocycliques présente une activité radioprotectrice intéressante : l'imidazole, les dérivés de l'imidazole, le benzimidazole et la naphthylméthylimidazoline sont les plus représentatifs de ce groupe [52, 53, 54].

Concernant la naphthylméthylimidazoline, elle s'avère être un bon radioprotecteur avec un FRD de 1,5 chez la souris à une dose de 30 mg/kg par voie intrapéritonéale 15 minutes avant l'irradiation.

⁵⁰ Samuni Y. et al. *Cancer Res.* **59**, 405-409, 1999.

⁵¹ Foye W.O., Chatterji S. *J. Pharm. Sci.* **85**, 811-814, 1996.

⁵² Mourret A., Agnius-Delord C., Rinaldi R. *C.R. Série D*, **275**, 2985-2988, 1972.

⁵³ Mourret A., Agnius-Delord C., Rinaldi R. *C.R. Série D*, **275**, 1575-1578, 1972.

⁵⁴ Mourret A., Rinaldi R. CEA, Rapport 25, 1971.

III.2.2.6. Les radioprotecteurs soufrés : thiols et dérivés

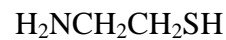
- **les aminothiols**

Depuis les travaux de Patt et de Bacq une centaine de dérivés d'analogues de la mercaptoéthylamine ont été synthétisés et testés. Des éléments structuraux indispensables pour l'activité ont pu être étudiés. La présence d'une fonction basique (amine, amidine ou guanidine) située à deux carbones de distance de la fonction thiol semble indispensable. En effet, l'activité diminue considérablement au delà de trois carbones de distance. D'autre part, la présence d'une fonction thiol libre ou d'une fonction capable d'être convertie en thiol dans l'organisme est indispensable pour une activité significative. Ainsi, certains acides thiosulfuriques, phosphorothioiques ont été étudiés. L'alkylation de la fonction amine ou de la fonction thiol semble faire perdre de l'activité. Concernant l'alkylation de la chaîne carbonée les effets sont variables. La présence de groupements thiols supplémentaires diminue l'activité radioprotectrice.

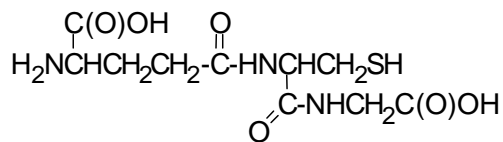
Les aminothiols les plus connus sont la cystéine, la cystéamine, le glutathion et le WR-1065.



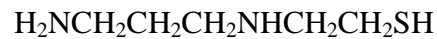
Cystéine



Cystéamine



Glutathion



WR-1065

Patt en 1949 [1], démontre l'activité de la **cystéine** en injection intraveineuse ou en ingestion chez le rat. 75 à 89 % des rats irradiés à 8 Gy survivaient avec des doses de 175 à 575 mg/kg. L'activité reste la même que la cystéine soit injectée 5 minutes ou 1 heure avant l'irradiation.

En 1951, Bacq [28] montre que la forme décarboxylée de la cystéine est encore plus active. A quantité équimolaire elle est environ 5 fois plus efficace que la cystéine. Chez la souris, la **cystéamine** injectée à des doses de 150 à 250 mg/kg, par voie intrapéritonéale, protège 66 à 95 % des animaux [55, 56]. La cystéamine n'est cependant pas dépourvue de toxicité qui se manifeste par un état de choc biochimique, deux minutes après l'injection : choc cardiovasculaire et hypotension, hypoprotéinémie, diminution de la consommation d'oxygène et de l'utilisation du pyruvate, inhibition temporaire de la synthèse d'ADN et d'ARN [57].

Le **glutathion** est un tripeptide physiologique dont la structure correspond à l'association d'une molécule de cystéine et d'une molécule de glycine et d'acide glutamique. De nombreuses études montrent son implication dans la réponse des cellules aux radiations [58, 59, 60].

Le **WR-1065** est un des métabolites avec le disulfure WR-33278, du meilleur radioprotecteur actuellement connu, le WR-2721. L'étude des propriétés radioprotectrices de ce dérivé a été réalisée par Savoye et al. en 1997 [61] sur de l'ADN plasmidique soumis à une irradiation par des neutrons. Sous anoxie, le WR-1065 protège efficacement l'ADN par piégeage des radicaux OH[•] et par réparation chimique par donation d'un hydrogène de sa fonction thiol. Il a été montré que la liaison du WR-1065 à l'ADN intervenait pour beaucoup dans la protection de ce dernier [62,63]. Le WR-1065 intervient dans d'autres processus intracellulaires tels que la synthèse de l'ADN ou le cycle cellulaire [64, 65,66]. Par ailleurs, il possède des propriétés anti-clastogènes diminuant ainsi l'apparition d'aberrations chromosomiques radio-induites [67].

⁵⁵ Hansen B., Sorbo B. Acta radiol. **56**, 141-144, 1961.

⁵⁶ Doherty D.G., Brunett W.T., Shapira R. Radiat. Res., **7**,13-21, 1957.

⁵⁷ Bacq Z.M. et al. Br. J. Pharmacol., **34**, 202-203, 1968.

⁵⁸ Bhatia A.L., Jain M. Phytomedecine, **11**, 607-615, 2004.

⁵⁹ Biaglow J. E. et al. Drug Metab. Rev. **20**(1),1-12, 1989.

⁶⁰ Kojima S., Nakayama K., Ishida H. J. Radiat. Res. **45**, 33-39, 2004.

⁶¹ Savoye C. et al. J. Chem. Phys. **94**, 337-341, 1997.

⁶² Hamza A., Broch., H., Vasilescu, D. J. Mol. Struct. **491**, 237-247, 1999.

⁶³ Broch H., Hamza, A., Vasilescu, D. J. Mol. Struct. **538**, 117-132, 2001.

⁶⁴ Marzatico F. et al. Cancer Chemother. Pharmacol. **45**(2), 172-176, 2000.

⁶⁵ Grdina D.J. et al. Mil. Med. **167**, 51-53, 2002.

⁶⁶ Santini V., Giles F.J. Haematologica, **84**,1035-1042, 1999.

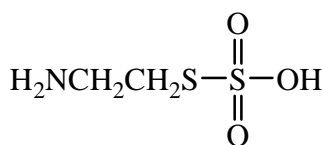
⁶⁷ Schwartz J.L. et al. Radiat. Res., **113**, 145-154, 1988.

Les aminothiols restent les composés les plus étudiés dans le domaine de la radioprotection de part leur efficacité reconnue. Une publication de Brown [68] rapporte les principaux mécanismes d'action de ces aminothiols. Parmi ces mécanismes, la capture des radicaux libres, le transfert d'hydrogène et la formation de disulfures mixtes sont les plus connus.

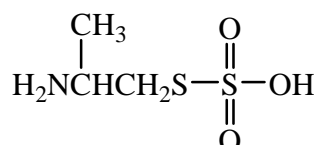
- **les thiosulfates**

Généralement les thiosulfates sont plus efficaces que les aminothiols correspondants [69,70,71] et moins toxiques que les disulfures. Ces dérivés présente les avantages de résister à l'oxydation, d'avoir une solubilité aisée et une forte réactivité avec les molécules sulfurées, pour donner des disulfures asymétriques [72]. Holmberg et Sörbo [69] ont obtenu 73% de survie chez des souris irradiées à dose létale, par l'administration de 150 mg.kg⁻¹ d'*acide 2-aminoéthanthiosulfonique*, en injection intrapéritonéale.

L'*acide 2-aminopropanethiosulfonique* est moins actif que la cystéamine, il protège 80 % des souris irradiées à dose létale lorsque le produit est administré par vie intrapéritonéale à une dose de 350 mg.kg⁻¹.



Acide 2-aminoéthanthiosulfonique



Acide 2-aminopropanethiosulfonique

- **Les dithiocarbamates**

Un certain nombre de ces composés sont de bons radioprotecteurs. Il semble que, pour la structure la plus simple, le *N,N*-dialkyl est plus actif que le dérivé monoalkylé.

Le mécanisme d'action de ces composés est différent de celui des aminothiols. Les dithiocarbamates sont connus pour être d'excellents chélateurs de métaux. Un dithiocarbamate cyclique, le tétrahydro-1H, 3H-triazolo-[4,3-c]-1,4-triazine-3-thione possède une bonne activité [73].

⁶⁸ Brown P.E. Nature, **58**, 363-364, 1967.

⁶⁹ Holmberg B., Sörbo B. Nature, **183**, 832, 1959.

⁷⁰ Klayman D.L., Gilmore W.F. J. Org. Chem. **7**, 823-824, 1964.

⁷¹ Klayman D.L., Grenan M.M., Jacobus D.P. J. Med. Chem. **12**, 510-512, 1969.

⁷² Klayman D.L., White J.D., Sweeney T.R. J. Org. Chem. **29**, 3737-3738, 1964.

⁷³ Van Bekkum D.W., Nieuwerkerk T.M. Int. J. Radiat. Biol. **7**, 473, 1963.

Plus récemment, le diéthylthiocarbamate [74,75,76] a fait l'objet de plusieurs études montrant qu'il s'agit d'un radioprotecteur de faible intérêt.

- **Les thiazolidines**

Enfin, les thiazolidines représentent une autre série de composés soufrés hétérocycliques. Analogues cycliques de la cystéamine, elles sont obtenues par réaction d'un aldéhyde ou d'une cétone avec la cystéamine qui peut être *N*-substituée. Roberts [77] a testé de nouvelles thiazolidines issues de la condensation de la L-cystéine ou de la cystéamine avec le D-ribose et le D-glucose. Celles-ci ont montré une bonne protection vis-à-vis de la létalité radio-induite. Les thiazolidines ont fait l'objet de nombreuses études car, dans l'ensemble, elles possèdent une bonne activité radioprotectrice. Contrairement aux aminothiols linéaires, elles présentent souvent un effet très significatif si le délai entre l'injection et l'irradiation est augmenté (effet prolongé).

Ceci peut s'expliquer par une libération progressive de molécules de cystéamines du fait d'une hydrolyse lente du cycle. Elles peuvent être considérées comme des prodrogues des aminothiols.

- **Les radioprotecteurs phosphorés**

- Le 2-aminoéthylphosphorothioate de sodium



La forme S-phosphorylée de la cystéamine est un puissant radioprotecteur (WR 638) de très faible toxicité, qui donne une protection supérieure à 95 %, chez la souris irradiée à dose létale [78]. Son activité est supérieure à celle de la cystéamine quand le WR-638 est administré *per os* et elle est maximale lorsque l'administration précède l'irradiation de 30 minutes, chez la souris, et de 60 à 90 minutes chez le rat. Son FRD serait de l'ordre de 2.

⁷⁴ Fuentes J.L. et al. *Mutat. Res.* **422**, 339-345, 1998.

⁷⁵ Gandhi N.M., Nair C.K.K. *J. Radiat. Res.* **45**, 175-180, 2004.

⁷⁶ Kent C., Blekkenhorst G. *Free. Rad. Res. Comm.* **12-13**, 595-599, 1991.

⁷⁷ Roberts J.C. et al. *Radiat. Res.*, **143**, 203-213, 1995.

⁷⁸ Akerfeldt S. *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.* **45**, 465-469, 1963.

- Le WR-2721



Une série de composés de formule $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{SPO}_3\text{H}_2$ ($m = 2$ à 6 ; $n = 2$ ou 3) s'est révélée d'une très haute activité (86 à 100 % de survie) [79,80] pour une dose d'irradiation de 10 Gy. Parmi eux, le WR-2721 ($m = 3$; $n = 2$) a fait l'objet de nombreux travaux en raison de son activité radioprotectrice très élevée. Il est actuellement le meilleur parmi les radioprotecteurs connus.

Le WR-2721 est un composé pouvant être considéré comme une prodrogue. En effet, sous l'action d'une enzyme membranaire, la phosphatase alcaline, il y a libération de l'aminothiols correspondant, le WR-1065. Le groupement phosphorothioate permet une meilleure vectorisation intracellulaire de la forme active du radioprotecteur. Le FRD du WR-2721 est de 2,12. Il passe à 2,42 lorsque le composé est injecté 20 minutes avant l'irradiation [81].

Un des avantages du WR-2721 est son activité différentielle sur les tissus sains et les tissus tumoraux [82] : augmentant la radio-résistance des tissus sains, il ne confère qu'une protection minime aux tissus tumoraux [83,84,85], par suite d'une faible absorption du composé par les tumeurs [86,87].

Ce dérivé, malgré une activité radio-protectrice remarquable, présente de nombreux effets secondaires aux doses radio-protectrices ; il est toutefois utilisé cliniquement. Ces effets indésirables sont variés : baisse de la tension artérielle, nausées, ...[88].

⁷⁹ Piper J.R. et al. *J. Med. Chem.*, **12**, 236-243, 1969.

⁸⁰ Piper J.R. et al. *J. Med. Chem.*, **1**, 244-253, 1969.

⁸¹ Sedlmeier H, Messerschmidt O. *Strahlentherapie*. **156 (8)**, 572-578, 1980.

⁸² Rasey J.R. et al. *Pharmacol. Ther.* **39**, 33-43, 1988.

⁸³ Yuhas J. *Radiat. Res.*, **44**, 621-628, 1970.

⁸⁴ Yuhas J. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 69-78, 1973.

⁸⁵ Capizzi R.L. *Eur. J. Cancer*, **32A**, S5-S16, 1996.

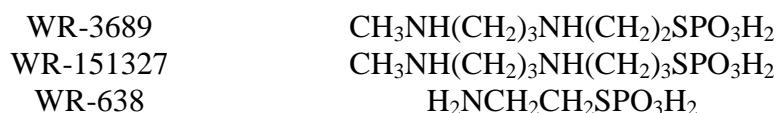
⁸⁶ Washburn L.C., Rafter J.J., Hayes R.L. *Radiat. Res.* **66**, 100-105, 1976.

⁸⁷ Murley J.S., Gridna, D.J. In: *Radioprotectors*. 1998.

⁸⁸ Kligerman M.M. et al. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **10**, 1773-1776, 1984.

- analogues du WR-2721

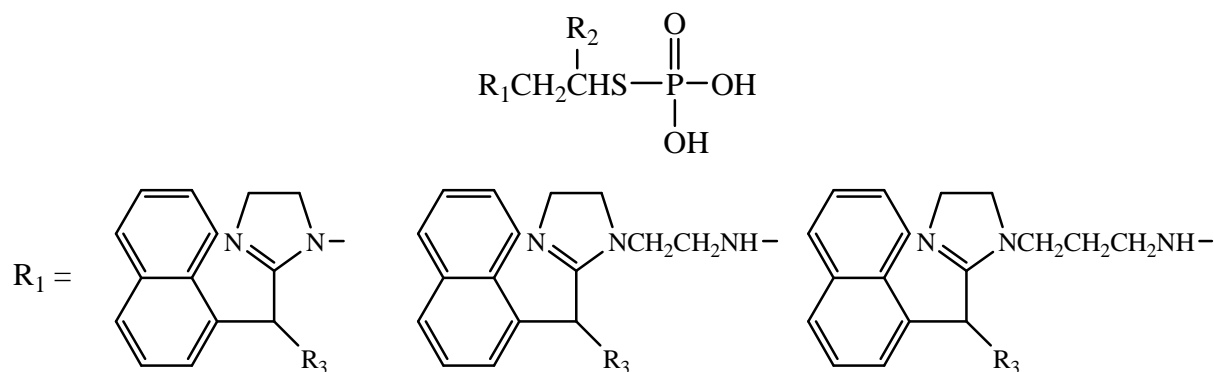
D'autres dérivés phosphorés analogues du WR-2721 ont été synthétisés et testés dans le domaine de la radioprotection. Cependant, aucun d'entre eux ne témoigne d'une efficacité comparable au WR-2721.



- les phosphorothioates dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline [89,90]

Notre groupe a développé des phosphorothioates possédant une activité radioprotectrice intéressante.

La structure de ces dérivés phosphorés est la suivante :



Avec R₂ = R₃ = H ou CH₃

L'addition d'un motif phosphorothioate aux structures organiques permet la libération retardée ou prolongée *in vivo* d'une substance organique possédant des propriétés radioprotectrices, à savoir l'aminothiols correspondant et entraîne une modification fondamentale des propriétés chimiques ou biologiques de ces produits de base.

⁸⁹ Célariès B. Thèse d'Université, Toulouse, 2003.

⁹⁰ Célariès B., Prouillac C., Amourette C., Lion C., Rima G. Phosphorus, Sulfur and Related Element, in press

Ces composés phosphorés agissent donc principalement comme des prodrogues, le groupement phosphorothioate n'étant là que pour vectoriser le composé actif au sein de l'organisme. Cependant, il a été montré que la présence du phosphore n'a pas d'influence sur la toxicité. En effet, les phosphorothioates et leurs équivalents aminothiols ont sensiblement la même DL₅₀. En revanche, les prodrogues phosphorées, en comparaison avec les aminothiols correspondants, possèdent une excellente activité radioprotectrice. Ces molécules présentent vraisemblablement un bon compromis entre leur caractère lipophile et hydrophile.

Nous avons reporté dans le tableau suivant les principaux composés pour lesquels nous avons déterminé un FRD.

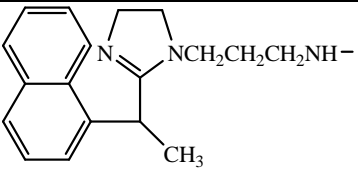
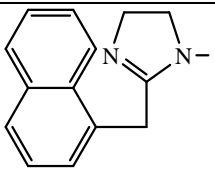
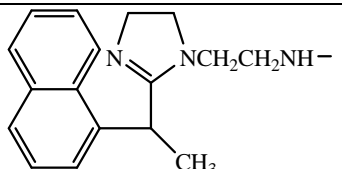
$ \begin{array}{c} R_2 \\ \\ R_1CH_2CHS-P-OH \\ \\ OH \end{array} $			
R ₁	R ₂	DL ₅₀ irradiation (Gy)	FRD
	H	10,10 ± 0,25	1,62
	CH ₃	11,44 ± 0,03	1,84
	CH ₃	9,90 ± 0,04	≈1,60

Tableau 3: Détermination des FRD de phosphorothioates dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CD1.

III.2.2.7. Les radioprotecteurs organométalliques :

métallathiazolidines, métalladithioacétals

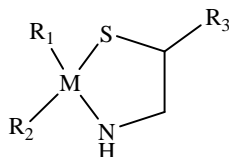
Notre équipe, en collaboration avec le Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA) montre, que les dérivés germaniés, séléniés ou siliciés sont moins toxiques et plus efficaces que les dérivés carbonés correspondants [5]. Les résultats obtenus montrent la contribution très importante du silicium et du germanium dans l'activité radioprotectrice. Les germadithioacétals sont meilleurs radioprotecteurs que les germathiazolidines alors que leur toxicité est voisine. A l'inverse, les silathiazolidines sont moins toxiques et leur pouvoir radioprotecteur est supérieur à celui des siladithioacétals.

L'intérêt de ces structures organométalliques, cycliques ou non, est multiple :

- la libération *in vivo* d'une ou de plusieurs substances reconnues pour leurs propriétés radioprotectrices
- une libération retardée ou prolongée des substances actives

Une modification fondamentale de la structure électronique de ce nouveaux dérivés, par l'incorporation d'un métal peut être à l'origine de propriétés chimiques ou biologiques nouvelles, propres à ces composés organométalliques. Les principaux résultats sont représentés ci dessous :

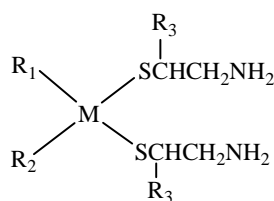
Métallathiazolidines



M	R ₁	R ₂	R ₃	DL ₅₀ (mg.kg ⁻¹)	FRD
Si	CH ₃	C ₆ H ₅	H	800	1,6
	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃	750	1,5
	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	1000	1,4
	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	H	1500	1,4
	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃ O-C ₆ H ₄	H	1500	1,4
Ge	CH ₃	C ₆ H ₅	H	600	1,6
	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃	500	1,75
	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	H	1000	1,4
	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	CH ₃	700	1,4
	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	CH ₃	800	1,45

Tableau 4 : Détermination des FRD de métallathiazolidines dérivées de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CDI.

Métalladithioacétals



M	R ₁	R ₂	R ₃	DL ₅₀ (mg.kg ⁻¹)	FRD
Si	CH ₃	CH ₃	H	800	1,4
Ge	CH ₃	C ₆ H ₅	CH ₃	600	> 1,5
	<i>n</i> - C ₅ H ₁₁	<i>n</i> - C ₅ H ₁₁	CH ₃	800	1,4
	<i>i</i> - C ₅ H ₁₁	<i>i</i> - C ₅ H ₁₁	H	800	1,4
	<i>i</i> - C ₅ H ₁₁	<i>i</i> - C ₅ H ₁₁	CH ₃	600	> 1,6
	CH ₃	<i>p</i> - CH ₃ -C ₆ H ₄	CH ₃	800	1,5

Tableau 5 : Détermination des FRD de métalladithioacétals dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CD1.

III.2.3. Combinaisons de radioprotecteurs

L'idée visant à combiner plusieurs agents protecteurs ayant des mécanismes d'action différents pour améliorer la protection voire diminuer la toxicité de l'un d'eux est apparue dans les années cinquante et soixante. Dans la plupart des combinaisons testées, un effet synergique a été montré. Par exemple, un travail rapporte l'étude de différentes combinaisons de 5 composés : cystéine, β-mercaptoéthylamine, aminoethylisothiuronium, glutathion et sérotonine. La combinaison des 5 agents confère un FRD de 2,8 supérieur aux FRD respectifs de chaque composé. Cette combinaison permet, de plus, de diminuer les doses de la β-mercaptoéthylamine et de l' aminoethylisothiuronium [91]. Maisin et al. [44], en 1993, ont étudié l'association de différents aminothiols (cystéine, glutathion, WR-2721) avec le 16,16-diméthyl PGE₂ (PGE₂) ou la 5-hydroxytryptamine (sérotonine). Les résultats montrent, pour la plupart des combinaisons, un effet radioprotecteur plus grand ; il existe un effet synergique dans les associations WR-2721/5-hydroxytryptamine et WR-2721/PGE₂. Pour les autres associations, on parle plutôt d'effet additif.

⁹¹ Maisin J.R. et al. Radiat. Res. 35, 26-44, 1968.

	Référence	Composé	Activité radiopharmacologique
130	Weiss J.F. et al. Toxicology, 189, 1-20, 2003.	Vitamine E	FRD = 1,11 chez la souris en sc à la dose de 100 UI/kg 15 min avant irradi.
39	Vatrova J. Folia Biol. 41, 23-30, 1995	Ribomunyl®	FRD = 1,2 chez la souris en ip ou sc 24 heures avant irr.
40	Kalechman Y. et al. Immunopharmacology, 29, 149-158, 1995.	AS101 (ammonium trichloro(dioxoéthylène-O,O')tellurate)	Favorise la restauration des cellules de la moelle et de la rate chez la souris. Pas de FRD.
41	Samuni Y. et al. Cancer Res. 59, 405-409, 1999	Complexe ZN-desferioxamine	FRD = 1,3 à la dose de 100 µmol/kg chez la souris en ip 30 min avant irradi.
42	Foye W.O. et al. J. Pharm. Sci. 85, 811-814, 1996	Dérivés bis(méthylthio) et méthylthio amino du 1-méthylpyridinium- et de l'acide 1-méthylquinolinium-2-dithioacétique	Mirment l'activité de la superoxyde dismutase
95	Laval J.D. et al. Eur. J. Med. Chem. 28, 709-713, 1993.	Naphthylméthylimidazoline	FRD = 1,5 chez la souris à la dose de 30 mg/kg en ip 15min avant irradi.
1	Patt et al. Science, 110, 213, 1949.	Cystéine	75 à 89 % de survie chez le rat avec des doses de 175 à 575 mg/kg à 8 Gy
28	Bacq Z.M. et al. Arch. Int. Physiol. LIX, 442-446, 1951.	Cystéamine	66 à 95 % de survie chez la souris avec des doses de 150 à 250 mg/kg à 8 Gy
60	Holmberg B. et al. Nature, 183, 832, 1959.	Acide 2-aminoéthanethiosulfonique	73 % de survie chez la souris à la dose de 150 mg/kg en ip après irradiation à la dose létale
72	Sedlmeier H, Messerschmidt O. Strahlentherapie. 156 (8), 572-578, 1980	WR-2721	FRD = 2,42 chez la souris 20 minutes avant irradi.
79	Célaris B. Thèse d'Université, Toulouse 2003	Phosphorothioates dérivés de la naphthylméthylimidazoline	1,60 < FRD < 1,84 chez la souris
79	Célaris B. Thèse d'Université, Toulouse 2003	Méthylthioazolidines dérivées de la naphthylméthylimidazoline	1,40 < FRD < 1,75 chez la souris
79	Célaris B. Thèse d'Université, Toulouse 2003	Méthylthioacétals dérivés de la naphthylméthylimidazoline	1,40 < FRD < 1,60 chez la souris

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différents exemples de radioprotecteurs connus

III.2.4. La recherche de radioprotecteurs efficaces, quelques contraintes...

L'usage de radioprotecteurs peut avoir lieu essentiellement dans deux types de circonstances prévisibles ou non : lors d'une exposition accidentelle ou dans le domaine médical (radiothérapie). Il est important d'avoir conscience que les critères auxquels doivent répondre ces composés sont nombreux. En effet, un certain nombre de données inconnues existent lors d'une irradiation accidentelle, qui n'existent pas en radiothérapie : la dose, sa distribution non homogène, stress, autres blessures...Par conséquent, un radioprotecteur idéal en cas d'accident devrait avoir différentes caractéristiques :

- présenter une activité radioprotectrice suffisamment grande pour protéger l'organisme de la formation de dommages radio-induits ou pour les réparer
- être facilement administrable, de façon répétée
- avoir le minimum d'effets secondaires
- être efficace pour tout type d'irradiation
- avoir un effet prolongé
- être stable chimiquement dans le temps

Pour couvrir toutes les circonstances, un radioprotecteur devrait pouvoir être administré de façon chronique, avant ou après l'exposition.

A l'heure actuelle, les principaux radioprotecteurs connus sont injectés avant l'exposition. Certains d'entre eux ont une efficacité intéressante et spécifique mais parfois avec des effets secondaires non négligeables.

Depuis quelques années notre équipe étudie l'influence de certains groupements organiques ou organométalliques dans l'efficacité et dans la toxicité de certains composés. A partir de motifs connus et variés, nous apportons certaines modifications structurales afin d'avoir le meilleur rapport efficacité/toxicité. Ces dernières années les modifications ont été réalisées sur la naphthylméthylimidazoline, connue pour avoir un pouvoir radioprotecteur intéressant. Dans ce travail nous rapportons la synthèse de nouveaux dérivés de benzothiazole et du thiadiazole et l'étude *in vitro* de l'activité antioxydante et radioprotectrice de certains d'entre eux. Ces deux motifs sont des hétérocycles soufrés.

Le thiadiazole et certains de ses dérivés ont déjà fait l'objet d'études dans ce domaine [92,93]. Par contre, concernant le benzothiazole, aucune étude dans ce domaine n'a encore été réalisée.

Cependant, par analogie de structure avec le benzimidazole, connu pour avoir une activité *in vivo*, nous avons choisi d'étudier ce motif [94,95,96].

Dans ce travail, nous présentons au chapitre suivant la synthèse de nouveaux radioprotecteurs dérivés du benzothiazole et du thiadiazole. Ces nouveaux dérivés appartiennent à différentes classes ; il s'agit d'amides (**1-5**), de thiols (**11-15**), d'aminothiols (**16-20**), d'acides thiosulfoniques (**31-35**) et de phosphorothioates (**36-37**). Les caractéristiques physico-chimiques de chaque composé sont décrites dans le chapitre II et en annexe concernant les données cristallographiques.

Dans un troisième chapitre, nous présentons les résultats de l'étude *in vitro* de l'activité radioprotectrice et antioxydante des différents composés synthétisés.

Enfin, nous proposons également une étude théorique de relation structure-activité encore peu développée dans ce domaine. En effet, très peu d'études visant à rationaliser l'apport de certains groupements ou certaines structures dans l'activité radioprotectrice sont connues. C'est pourquoi, nous avons mis à contribution des calculs théoriques de Density Functional Theory (DFT) et de Quantitative Relation Structure Activity (QSAR) afin d'établir un modèle de corrélation entre les résultats expérimentaux et certaines caractéristiques physico-chimiques des composés synthétisés.

⁹² Krutovskikh G.N. et al. Pharm. Chem. J. **11**(4), 484-488, 1977.

⁹³ Georgieva R. et al. J. Med. Chem., **45**, 5797-5801, 2002.

⁹⁴ Vladimirov V.G. et al. Radiobiologiya, **23**, 616-619, 1983.

⁹⁵ Vladimirov V.G. et al. Radiobiologiya, **14**, 766-770, 1974.

⁹⁶ Vladimirov V.G. et al. Radiobiologiya, **14**, 607-610, 1974.

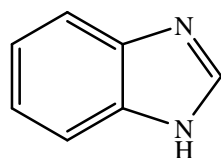
CHAPITRE II :

SYNTHESE DE NOUVEAUX

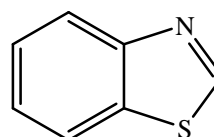
RADIOPROTECTEURS

I. INTRODUCTION

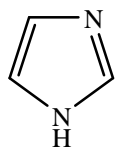
Les noyaux imidazole et benzimidazole font l'objet de nombreux travaux dans le domaine de la radioprotection chimique [97,98]. En particulier, notre équipe s'est intéressée à l'étude des modifications structurales de la naphthylméthylimidazoline. Nous avons modifié la structure de ce composé afin d'augmenter l'activité radioprotectrice et de diminuer la toxicité. Certains de ces dérivés ont montré une activité radiopharmacologique intéressante. Récemment, des travaux concernant la synthèse de dérivés du benzimidazole et l'étude de leur pouvoir radioprotecteur [99] sont rapportés. Dans cet esprit, nous avons modifié les structures du benzothiazole et du thiadiazole. En effet, les noyaux benzimidazole et benzothiazole ne diffèrent entre eux que par la présence d'un atome de soufre ; en revanche, les noyaux benzothiazoles et thiadiazoles diffèrent entre eux essentiellement par la présence d'un noyau benzénique et la présence d'un atome d'azote supplémentaire.



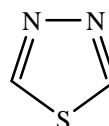
Benzimidazole



Benzothiazole



Imidazole



1, 3, 4-thiadiazole

Actuellement, aucune étude de l'activité radioprotectrice de dérivés du benzothiazole n'est rapportée. Quelques travaux rapportent l'étude des dérivés du thiadiazole dans le domaine de la radioprotection. En particulier, une étude de Petrova et al. [100] a montré une toxicité quasi-nulle de dérivés du thiadiazole ; cependant ces mêmes composés possèdent une activité radioprotectrice également nulle. Une autre étude concernant des dérivés du thiadiazole substitués uniquement en position 2 et 5, rapporte une très faible activité radioprotectrice de ces derniers (pourcentage de survie à 7 Gy compris entre 0 et 45 %) [92].

⁹⁷ Caravel J.P., Luu Duc C. *Il Farmaco*, **36**, 49-57, 1981.

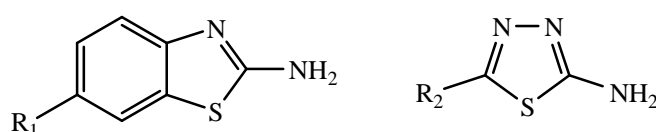
⁹⁸ Mourret A., Rinaldi R. *Commis. Energ. At. Rapp.* **25**, 1971.

⁹⁹ Anisimova V.A. et al. *Pharm. Chem. J.* **39**, 476-483, 2005.

¹⁰⁰ Petrova L.L. et al. *Pharm. Chem. J.* **28**, 99-102, 1994.

Lors d'études antérieures, nous avons démontré que la modification d'une structure peut améliorer l'activité radioprotectrice et diminuer les effets secondaires, notamment la toxicité aiguë.

Nous avons donc entrepris cette recherche afin de fonctionnaliser les motifs aminobenzothiazole et aminothiadiazole dans le but d'étudier l'influence de certains groupements sur l'efficacité antioxydante et radioprotectrice. Nous allons présenter ici les différentes synthèses de composés organiques réalisées à partir des dérivés suivants :



Avec $R_1 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{OCH}_2\text{CH}_3$

et $R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3$

Un récapitulatif de l'ensemble des structures obtenues se trouve en annexes (p 281)

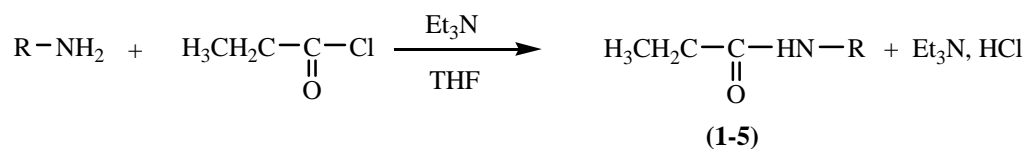
Dans le tableau 7, sont représentées les différentes familles de composés synthétisés :

Page	Famille	Dérivés du benzothiazole	Dérivés du thiadiazole
101	Amides	1, 2, 3	4, 5
105	Dérivés chlorés	6, 7, 8	9, 10
109	Thiols	11, 12, 13	14, 15
113	Aminothiols	16, 17, 18	19, 20
116	Aminoalcools	21, 22, 23	24, 25
120	Dérivés bromés	26, 27, 28	29, 30
124	Acides Thiosulfoniques	31, 32, 33	34, 35
128	Phosphorothioates		36, 37

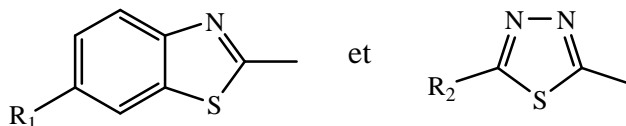
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes familles de composés synthétisés.

I.1. Synthèse des amides (1-5)

L'action d'une mole de chlorure d'acide, le chlorure de propyle, sur l'aminobenzothiazole et l'aminothiadiazole, dans le tétrahydrofurane (THF), induit une réaction de déshydrohalogénéation conduisant ainsi à la formation des dérivés attendus. Cette déshydrohalogénéation est assistée par la présence de triéthylamine en quantité stœchiométrique.



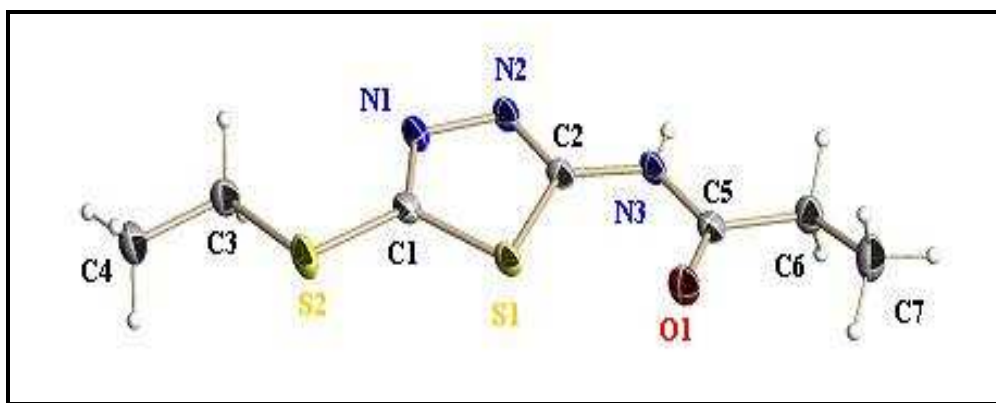
Avec R =



Avec $R_1 = H$ (1), CH_3 (2), OCH_2CH_3 (3)

et $R_2 = SCH_2CH_3$ (4), CH_2CH_3 (5)

Ces composés ont été cristallisés dans le méthanol et nous avons pu confirmer la structure par une étude de diffraction des rayons X du composé **4**.



Longueurs de liaisons (Å)		Angles (°)	
S(1)-C(2)	1,733(2)	N(2)-C(2)-S(1)	115,20(15)
N(2)-C(2)	1,300(3)	N(2)-C(2)-N(3)	121,99(18)
N(3)-C(2)	1,380(3)	C(5)-N(3)-C(2)	123,13(18)
N(3)-C(5)	1,369(3)	O(1)-C(5)-N(3)	121,20(19)
O(1)-C(5)	1,221(3)		

Figure 9 : Structure du *N*-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (**4**).

Les longueurs de liaisons obtenues confirment les liaisons doubles entre N(2) et C(2) et entre C(5) et O(1). En revanche, entre les atomes C(2) et N(3) et entre N(3) et C(5), il s'agit de liaisons intermédiaires entre une simple et une double. Pour comparaison, il existe une liaison simple entre les atomes C(2) et S(1). Les données cristallographiques sont rassemblées en annexe p 286.

I.2. Synthèse des thiols et aminothiols (6-15)

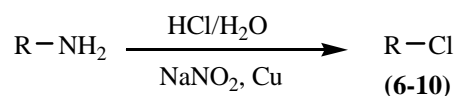
Afin d'étudier l'influence d'une chaîne alkyle sur l'activité et la toxicité de nos composés, nous avons synthétisé deux familles de produits qui sont des thiols et des aminothiols.

I.2.1. Synthèse des thiols (11-15)

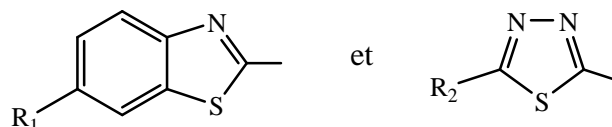
La synthèse de ces composés a été réalisée en deux étapes :

- première étape :

L'action de l'acide chlorhydrique sur l'amine en présence de cuivre en quantité catalytique et de nitrite de sodium conduit à la formation des composés chlorés correspondants [101]. Il s'agit d'une réaction de Sandmeyer dont le mécanisme est de type radicalaire et passe par la formation d'un diazonium.



Avec R =

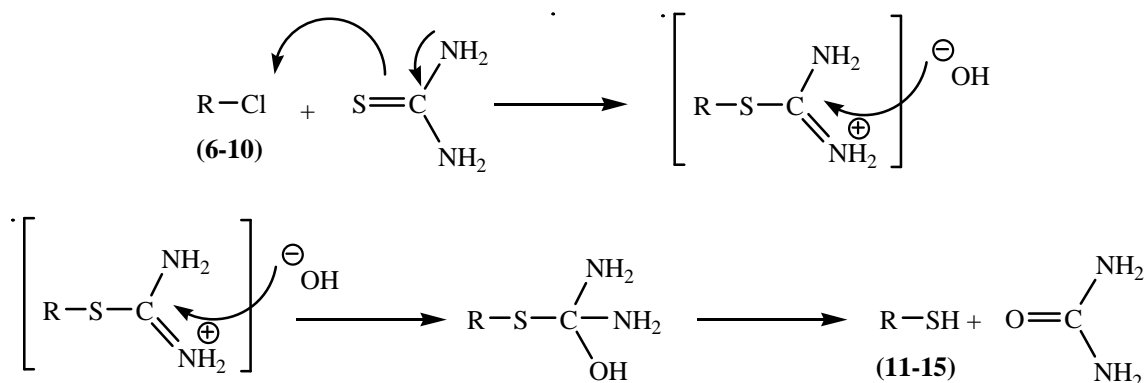


Avec $R_1 = \text{H}$ (6), CH_3 (7), OCH_2CH_3 (8)

et $R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_3$ (9), CH_2CH_3 (10)

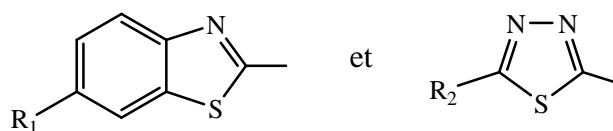
- deuxième étape :

La synthèse des thiols a été réalisée dans l'éthanol par action de la thiourée sur les dérivés chlorés obtenus précédemment selon le mécanisme réactionnel suivant [101] :



¹⁰¹ Foroumadi A., Kiani Z., Soltani F. Il farmaco, 58, 1073-1076, 2003.

Avec R =

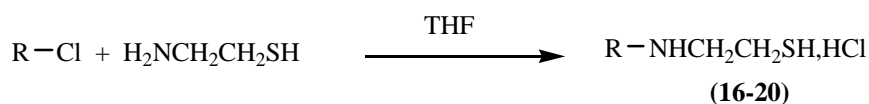


Avec $R_1 = \text{H}$ (**11**), CH_3 (**12**), OCH_2CH_3 (**13**)

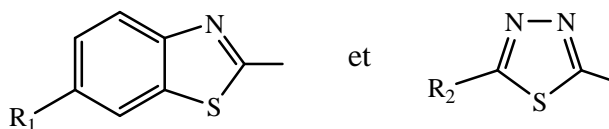
et $R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_3$ (**14**), CH_2CH_3 (**15**)

I.2.2. Synthèse des aminothiols (**16-20**)

L'action de la cystéamine, en quantité stœchiométrique, dans le THF à reflux, sur les dérivés chlorés cités précédemment, conduit aux dérivés aminothiols *N*-substitués selon l'équation suivante :



Avec R =



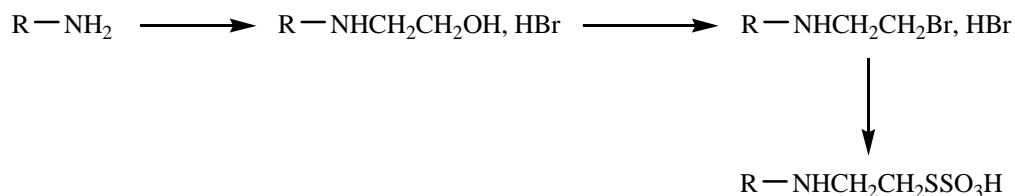
Avec $R_1 = \text{H}$ (**16**), CH_3 (**17**), OCH_2CH_3 (**18**)

et $R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_3$ (**19**), CH_2CH_3 (**20**)

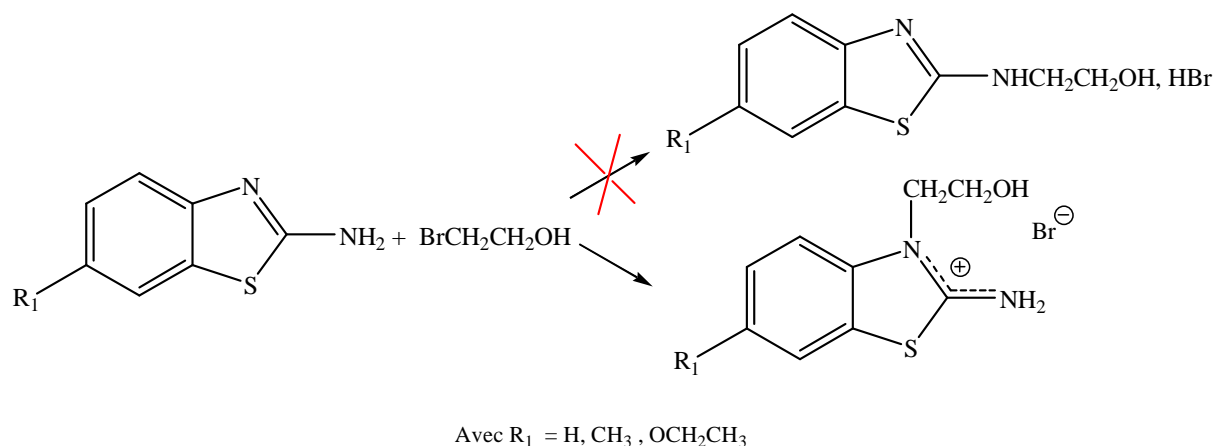
Ces composés présentent l'intérêt d'être des dérivés *N*-substitués de la cystéamine. Ils ont été obtenus sous forme de chlorhydrate afin d'améliorer la solubilité de ces dérivés en milieu aqueux en vue des tests d'activité antioxydante et radioprotectrice.

I.3. Synthèse des acides thiosulfoniques (31-35)

La stratégie de synthèse adoptée a été la suivante :



Trois étapes sont nécessaires à l'obtention des thiosulfates attendus. La première étape consiste en l'obtention de l'aminoalcool par action de l'amine sur le 2-bromoéthanol. Cette réaction ne permet pas l'alkylation de l'amine primaire mais celle de l'azote endocyclique, comme il est représenté ci-dessous avec un dérivé de la famille du benzothiazole :



Pour les cinq dérivés de base utilisés, l'alkylation a toujours eu lieu sur l'azote endocyclique. Ces structures ont été confirmées par résonance magnétique nucléaire en 2 dimensions (RMN 2D), notamment grâce à la technique de l'HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivities). Un spectre caractéristique obtenu avec le composé **22** est représenté figure 9 :

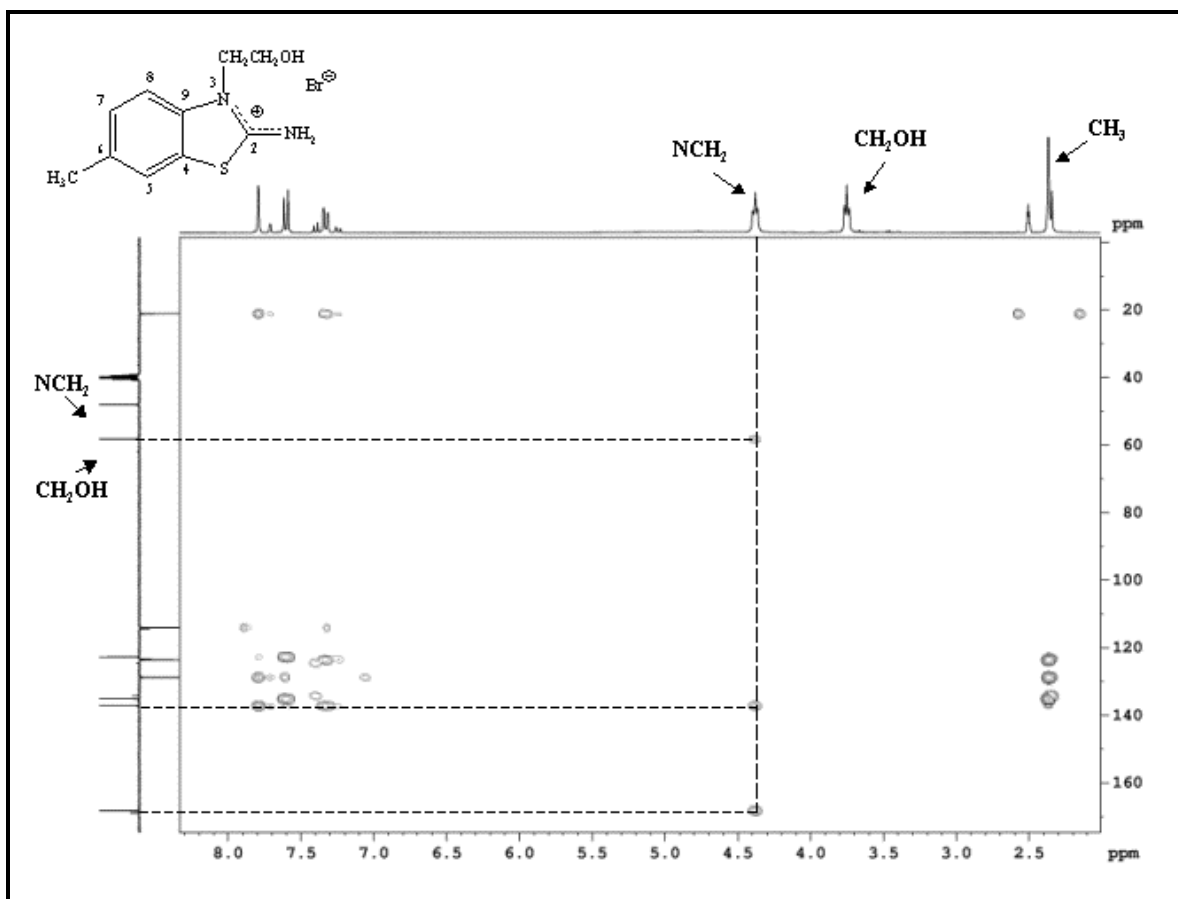
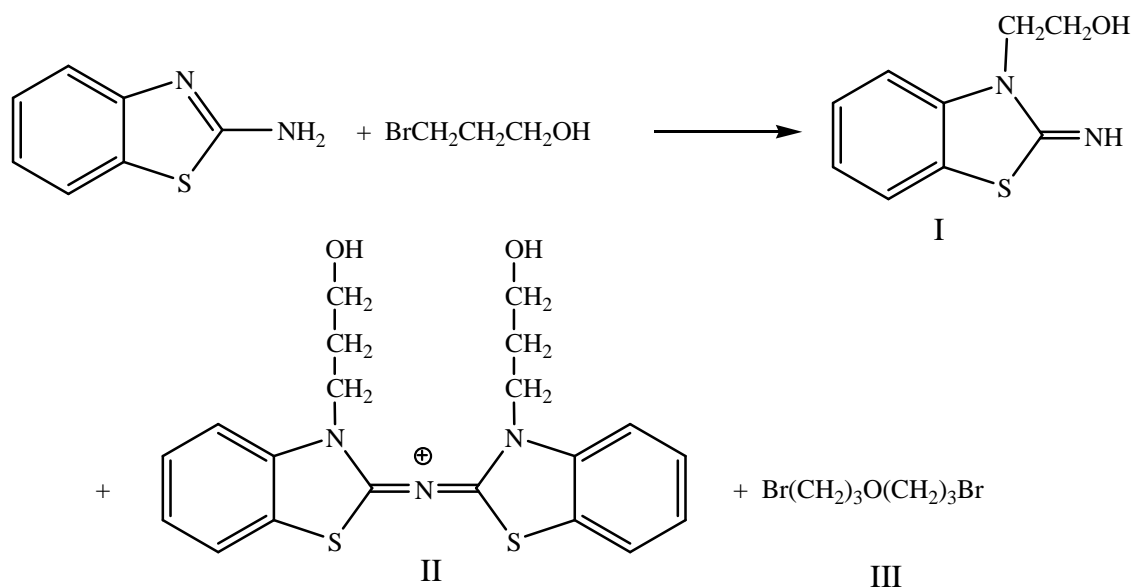


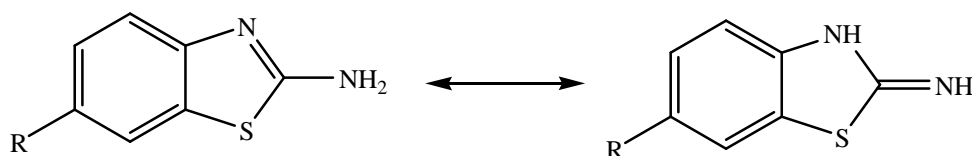
Figure 10 : Spectre RMN en HMBC du (2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol (22).

Ce spectre permet de confirmer sans équivoque l'alkylation en position 3 et non sur l'amine exocyclique. En effet, nous observons deux tâches de corrélation en $^3J_{C-H}$ entre les protons portés par le carbone aliphatique en alpha de l'azote et les carbones 2 et 9. La troisième tâche de corrélation entre ces mêmes protons et le carbone voisin correspond à un couplage $^2J_{C-H}$. Une alkylation sur la fonction amine exocyclique se serait traduite par une seule tâche de corrélation entre les protons portés par le carbone en alpha de l'amine et le carbone 2. Le carbone 9 étant trop éloigné de ces protons, il ne pourrait y avoir un couplage de type $^3J_{C-H}$.

Ces résultats sont en accord avec une étude de Ambartsumova [102] rapportant la réactivité du 2-aminobenzothiazole avec les dérivés halogénés. Ce travail montre qu'il se forme un mélange de plusieurs produits lorsqu'on utilise le 3-bromo-propan-1-ol selon les conditions de réactions. Les proportions de chacun d'entre eux varient en fonction des conditions de réaction. Le produit I reste majoritaire, le produit III résulte de la déshydratation du 3-bromo-propan-1-ol.

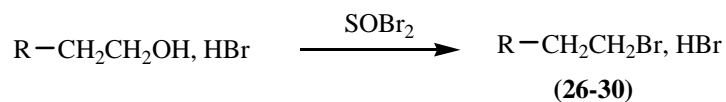


Quelque soient nos dérivés de base, nous n'avons jamais obtenu ce type de mélange. L'alkylation sur l'azote endocyclique résulte vraisemblablement de l'existence de deux formes tautomères pour l'ensemble des composés de base et d'une basicité plus grande de l'azote intracyclique.

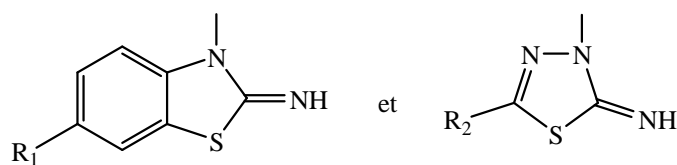


¹⁰² Ambartsumova R.F. Chemistry of Heterocyclic Compounds, **35**, 860-865, 1999.

Nous avons poursuivi la synthèse en vue de l'obtention des bromhydrates correspondants. Ces derniers ont été obtenus par l'action du bromure de thionyle sur l'aminoalcool obtenu précédemment.



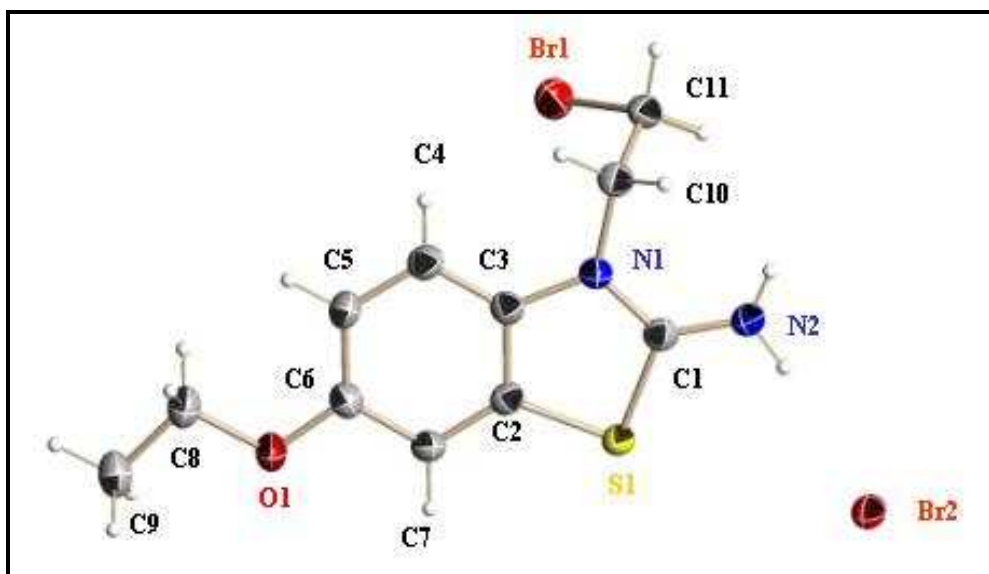
Avec R =



Avec $R_1 = \text{H}$ (**26**), CH_3 (**27**), OCH_2CH_3 (**28**)

et $R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_3$ (**29**), CH_2CH_3 (**30**)

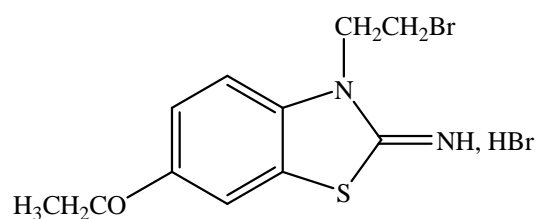
Nous avons confirmé la structure d'un de ces dérivés par une étude de diffraction des rayons X. Cette technique nous a également permis de vérifier la position de la chaîne alkyle. Figure 11 est représenté la structure du dérivé **28**. Les données cristallographiques sont rassemblées en annexe p 287.



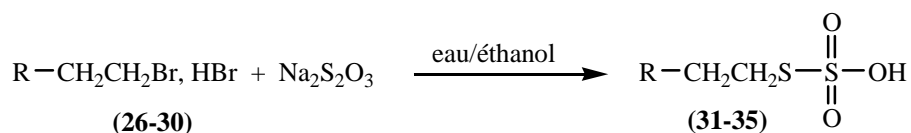
Longueurs de liaisons (Å)		Angles (°)	
N(1)-C(1)	1,342(3)	N(2)-C(1)-N(1)	125,2(3)
N(1)-C(3)	1,416(3)	C(3)-N(1)-C(10)	123,9(2)
N(1)-C(10)	1,469(3)		
N(2)-C(1)	1,310(4)		

Figure 11 : Structure du (2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthanol (**28**).

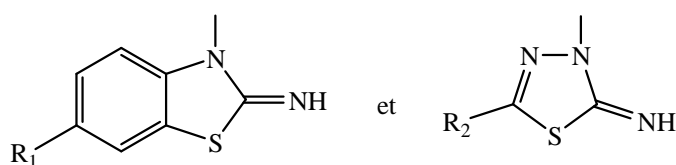
Les liaisons C(1)-N(1) et C(1)-N(2) ont un fort caractère de double liaison de par leur distance inter atomique. Ceci témoigne de l'existence d'une délocalisation du doublet entre les deux atomes d'azote N(1) et N(2) et par conséquent la présence d'une fonction imine. Par la suite, pour simplifier, nous représenterons donc nos composés de la façon suivante :



Enfin, la troisième étape consiste en l'obtention des acides thiosulfoniques par action du thiosulfate de sodium sur les bromhydrates précédemment cités dans un mélange eau/éthanol (1/5). Les dérivés obtenus ont été cristallisés ensuite dans l'éthanol.



Avec R =

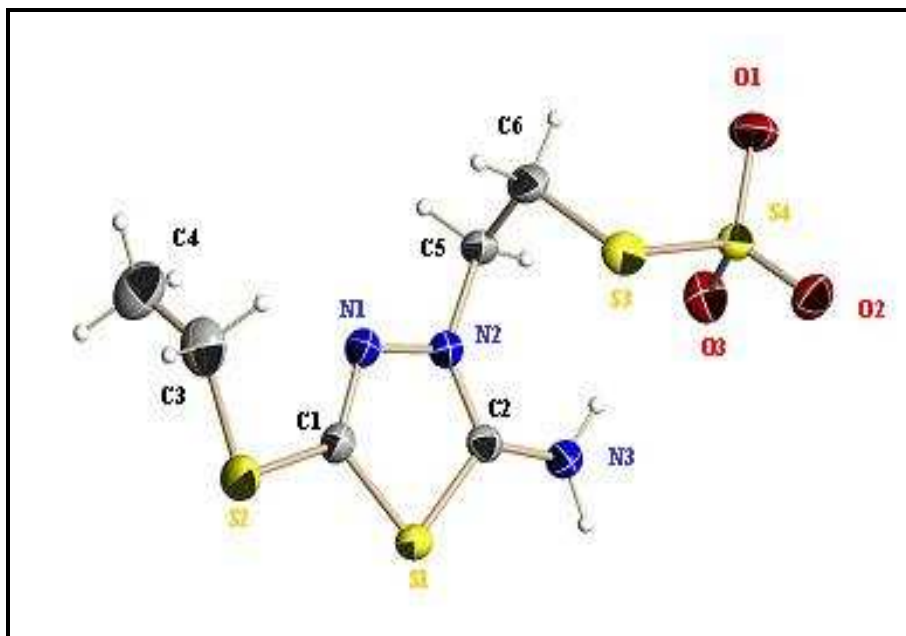


Avec R₁ = H (**31**), CH₃ (**32**), OCH₂CH₃ (**33**)

et R₂ = SCH₂CH₃ (**34**), CH₂CH₃ (**35**)

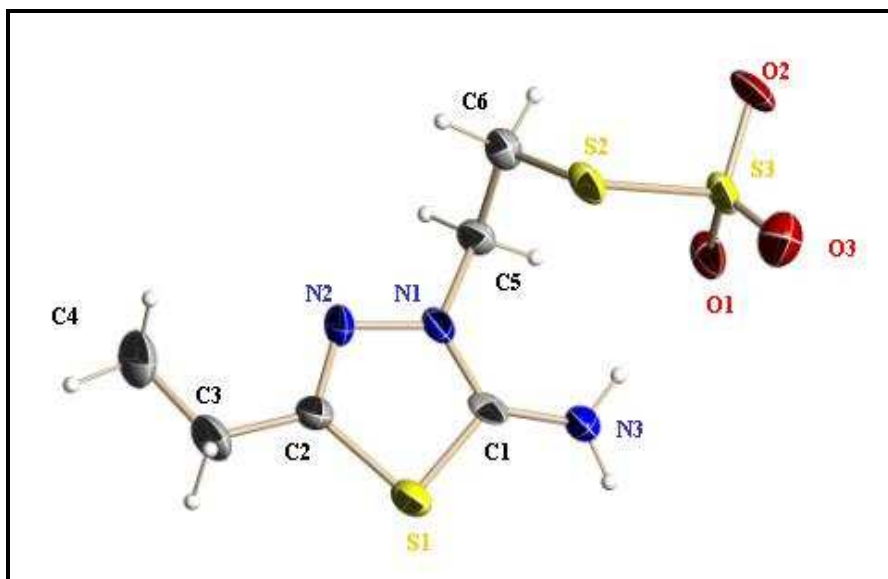
Les structures des dérivés du thiadiazole *N*-substitués ont pu être confirmées par diffraction des rayons X, confirmant l'alkylation de l'azote intracyclique.

Les données cristallographiques des composés (34-35) sont rassemblées en annexe p 288-289.



Longueurs de liaisons (Å)		Angles (°)	
N(1)-N(2)	1,385(3)	C(2)-N(2)-C(5)	126,6(2)
N(2)-C(2)	1,327(3)	N(3)-C(2)-N(2)	125,3(2)
N(2)-C(5)	1,464(3)	N(2)-C(2)-S(1)	109,9(2)
N(3)-C(2)	1,312(3)	N(2)-C(5)-C(6)	111,4(2)
S(3)-S(4)	2,0897(10)	C(5)-C(6)-S(3)	114,1(2)
S(4)-O1	1,432(2)		
S(4)-O2	1,449(2)		
S(4)-O3	1,451(2)		

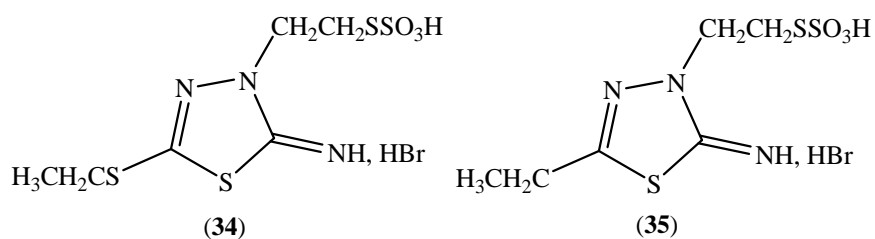
Figure 12 : Structure de l'acide S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl sulfonique (34).



Longueurs de liaisons (Å)		angles (°)	
N(1)-N(2)	1.376(8)	C(1)-N(1)-C(5)	125.7(6)
N(1)-C(1)	1.318(9)	N(3)-C(1)-N(1)	126.6(6)
N(1)-C(5)	1.464(8)	N(1)-C(1)-S(1)	110.2(5)
C(1)-N(3)	1.307(9)	N(1)-C(5)-C(6)	113.4(6)
S(2)-S(3)	2.087(3)	C(5)-C(6)-S(2)	113.8(5)
S(3)-O1	1.447(5)		
S(3)-O2	1.407(6)		
S(3)-O3	1.456(5)		

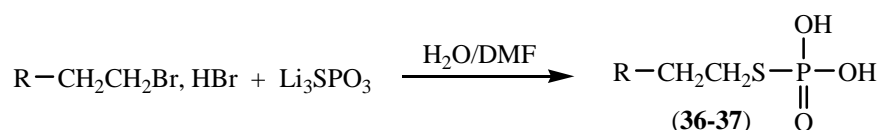
Figure 13 : Structure de l'acide *S*-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl sulfonique (35).

Comme pour les dérivés du benzothiazole, les liaisons C(1)-N(1) et C(1)-N(3) ont un fort caractère de double liaison de par leur distance inter atomique. Ceci témoigne de l'existence d'une délocalisation du doublet entre les deux atomes d'azote N(1) et N(3) et par conséquent la présence d'une fonction imine. De la même façon, nous représenterons ces dérivés de la façon suivante :

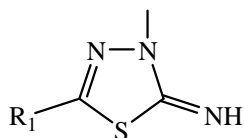


I.4. Synthèse des phosphorothioates (36,37)

Les phosphorothioates ont été obtenus par réaction du thiophosphate de lithium sur les bromohydrates du benzothiazole et du thiadiazole *N*-substitués (**26-30**) dans un mélange eau/diméthylformamide (DMF) à température ambiante. L'évolution de la réaction a été suivie en RMN du phosphore. L'utilisation du thiophosphate de lithium au lieu de thiophosphate de sodium a permis d'isoler plus facilement et en plus grande quantité les dérivés phosphorés attendus **36** et **37**.



Avec R =



R₁ = SCH₂CH₃ (**36**), CH₂CH₃ (**37**)

Seuls les phosphorothioates de la famille du thiadiazole (**36-37**) ont pu être obtenus de cette façon. Concernant les dérivés de la famille du benzothiazole, le suivi en RMN du phosphore de la réaction témoigne de la formation du phosphorothioate attendu ainsi que de celle de l'intermédiaire réactionnel et d'un autre composé.

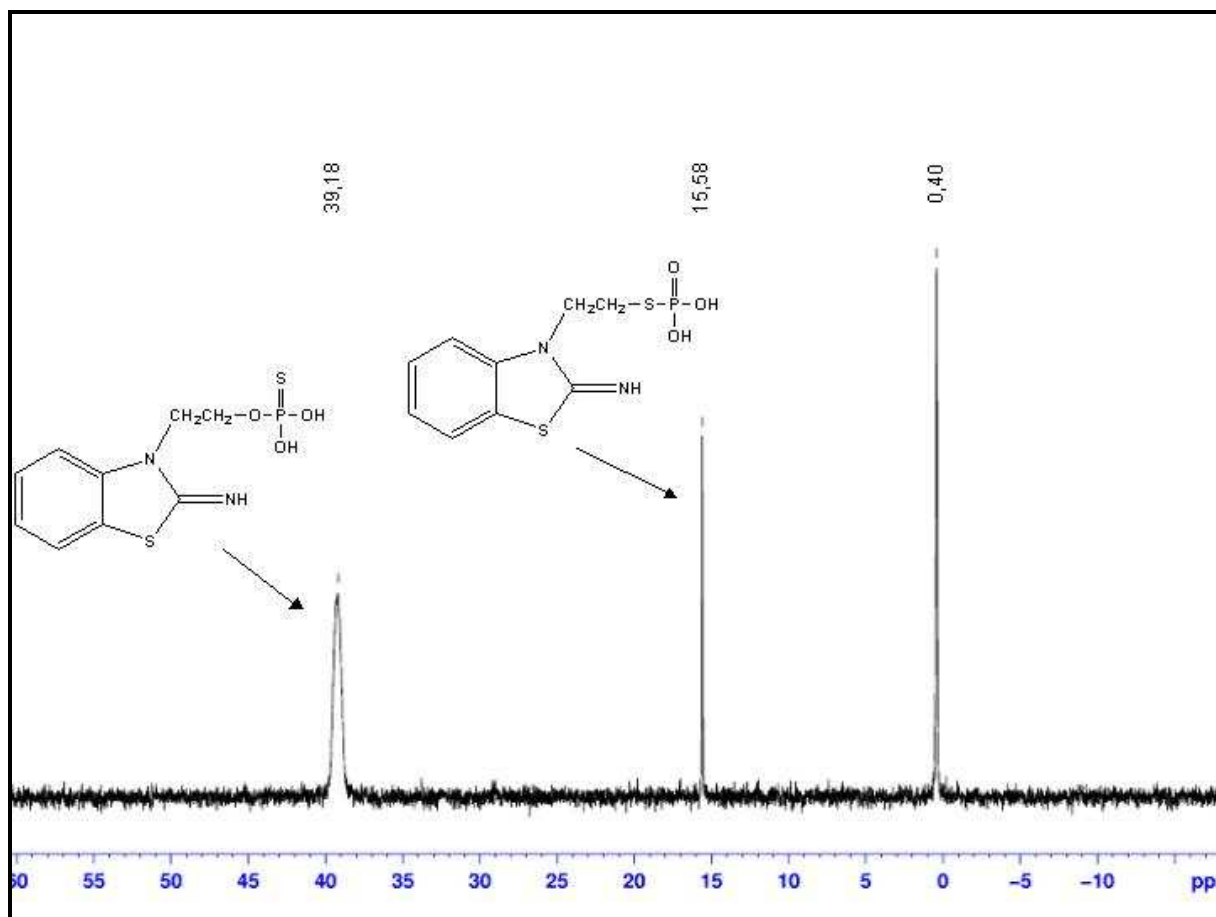


Figure 14 : Spectre RMN ^{31}P d'un phosphorothioate dérivé du benzothiazole.

Les déplacements chimiques de 39,18 et de 15,58 ppm sont caractéristiques des dérivés O-alkylphosphorothioate et S-alkylphosphorothioate [103]. La réaction évolue ensuite vers la disparition de ces deux composés. En effet, en RMN du phosphore, nous observons un seul pic à 0,40 ppm correspondant à une forme tricyclique chargée positivement et ayant pour contre ion, un thiophosphate. Ce composé a été caractérisé par une étude de diffraction des rayons X et confirmé par spectrométrie de masse.

¹⁰³ Meade T.J., Iyengar R., Frey P.A. J. Org. Chem. **50**, 936-940, 1985.

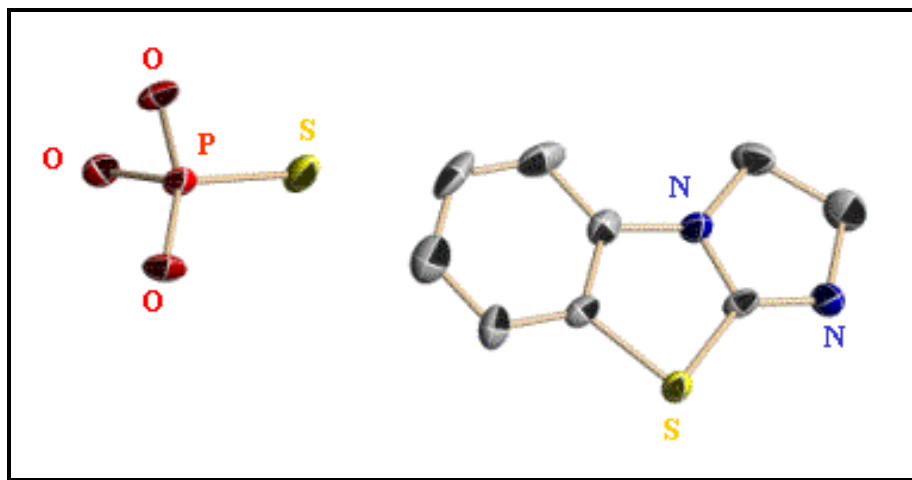
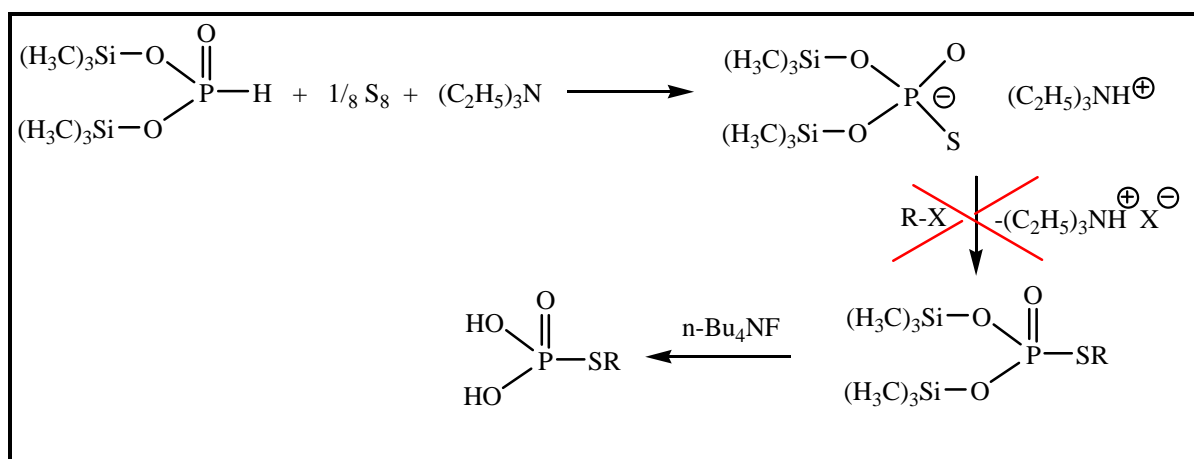


Figure 15 : Structure du dérivé tricyclique.

Pour ce composé, nous n'avons pas pu déterminer les paramètres cristallographiques (la taille du cristal étant trop petite).

Le chauffage du milieu réactionnel entraîne une évolution plus rapide vers la formation de ce dérivé.

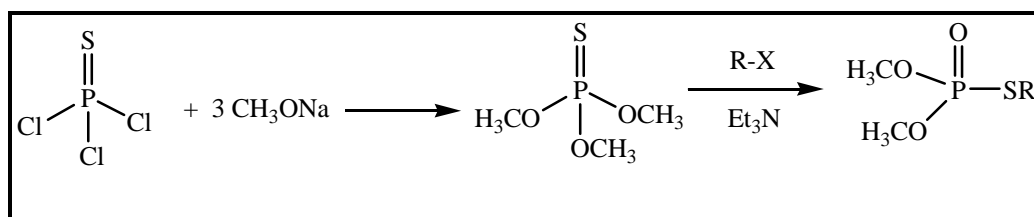
D'autres voies de synthèse ont été envisagées visant à protéger les groupements oxygénés, ne laissant disponible que l'atome de soufre. La première voie de synthèse est la suivante :



Voie de synthèse N°1

Cette synthèse passe par l'obtention d'un S-alkyl-O,O-bis[trimethylsilyl]phosphorothioate à partir d'un sel de triéthylammonium O,O-bis[trimethylsilyl]phosphorothioate. Ce dernier est obtenu par réaction du bis-triméthylsilyl phosphite avec du soufre élémentaire en présence de triéthylamine dans le toluène. Le bis-triméthylsilyl phosphite est lui même obtenu par réaction de l'acide orthophosphorique avec du chlorure de triméthylsilane. Nous avons pu obtenir le sel de triéthylammonium O,O-bis[trimethylsilyl]phosphorothioate mais la réaction de ce dernier avec nos dérivés bromés n'a pas conduit au dérivé phosphoré attendu.

La deuxième voie de synthèse consiste en la réaction du O,O,O-triméthyl phosphorothioate avec un dérivé halogéné en présence de triéthylamine. Le O,O,O-triméthyl phosphorothioate est obtenu par réaction du méthanolate de sodium sur du trichlorothiophosphate. Cette deuxième voie ne nous a pas permis d'obtenir le composé attendu. L'inconvénient de cette méthode est l'obtention d'un dérivé dont les fonctions alcools restent protégées.

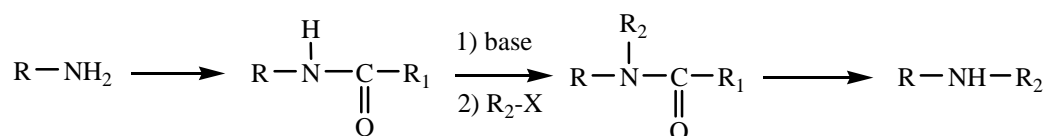


Voie de synthèse N°2

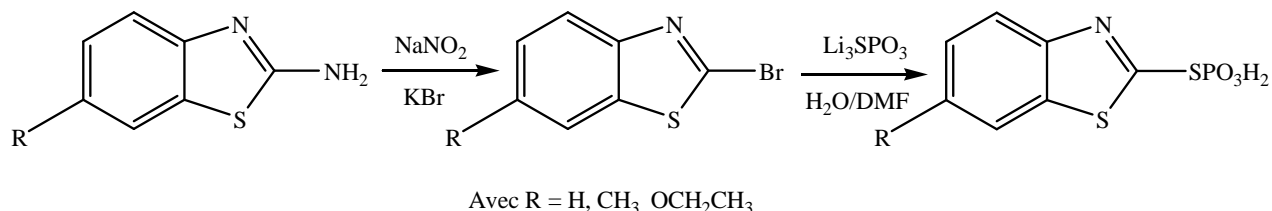
I.5. Conclusion

En conclusion, il semble que d'une manière générale, la réactivité du noyau thiadiazole est meilleure que celle du benzothiazole. Cette meilleure réactivité se traduit notamment par des rendements plus importants.

Les résultats obtenus montrent que l'alkylation de ces composés est plus favorable en position 3 que sur l'amine exocyclique. Dans le but de favoriser la fixation d'une chaîne alkyle sur cette dernière, afin d'obtenir par exemple les phosphorothioates correspondants aux aminothiols **16-20**, nous pouvons envisager une voie de synthèse qui est la suivante :



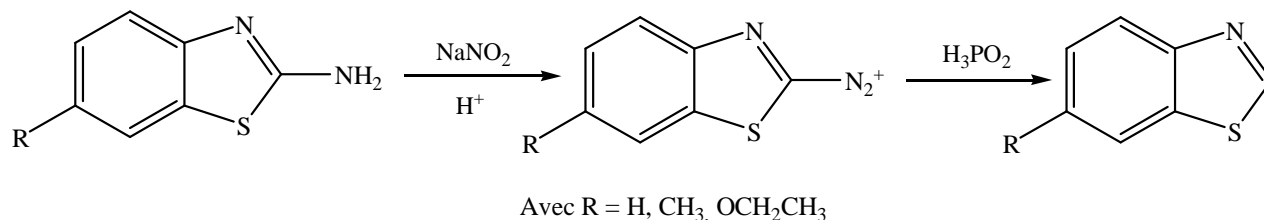
Par ailleurs, la synthèse des phosphorothioates correspondants aux thiols **11-15** peut être envisagée. Pour cela, la voie de synthèse proposée est la suivante avec par exemple le motif benzothiazole :



Les premiers résultats montrent la faisabilité de la première étape qui consiste en la substitution de la fonction amine par un atome de brome, meilleur nucléofuge que le chlore. Concernant la deuxième étape, nous avons pu mettre en évidence, en RMN du phosphore, la formation dans le milieu réactionnel du composé attendu.

Enfin, il semble que l'obtention des phosphorothioates à partir des bromhydrates **26-28** reste délicate vraisemblablement par la présence de la fonction imine en position 2. Il est envisageable de penser que l'absence de cette fonction ou la fixation d'une chaîne alkyle plus longue permettrait d'obtenir des dérivés phosphorés.

L'élimination de la fonction amine peut être réalisée en milieu acide, en présence de nitrite de sodium et d'acide hypophosphoreux. En effet, le groupement diazonium formé en présence de nitrite de sodium peut être remplacé par un atome d'hydrogène en utilisant un agent réducteur tel que l'acide hypophosphoreux.



II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

II.1. Solvants et réactifs

Certains des composés décrits ou des réactifs utilisés sont sensibles à l'hydrolyse et nécessitent de travailler sous atmosphère inerte d'argon à l'aide d'une rampe à vide.

Les solvants devant être rigoureusement anhydres dans certaines réactions sont distillés sur le desséchant approprié.

Les amines commerciales sont distillées sur de la potasse anhydre avant d'être utilisées.

II.2. Enregistrement des spectres et mesures physico-chimiques

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ont été réalisés sur un spectromètre AC200 BRUKER et sur un Avance 300 BRUKER, à la fréquence de 200,13 MHz et de 300,13 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence.

La multiplicité des signaux est désignée par : s (singulet) ; d (doublet) ; dd (doublet dédoublé) ; t (triplet) ; q (quadruplet) ; qt (quintuplet) ; m (multiplet).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone ont été réalisés sur un spectromètre Avance 300 BRUKER, à la fréquence de 75,46 MHz, en J-Mod. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant le TMS comme référence. La résolution de certaines structures a été réalisée par RMN 2D (Cosy, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) et HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivities)).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du phosphore ont été réalisés sur un spectromètre Avance 300 BRUKER, à la fréquence de 121,49 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant l'acide orthophosphorique comme référence.

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés avec un spectrophotomètre PERKIN ELMER IRFT 1760 entre des lames de KBr.

Les spectres de masse ont été effectués à l'aide d'un spectromètre Nermag R10-10H pour l'impact électronique, d'un spectromètre type Qtrap et API365 pour l'électrospray et la technique dite Fast Atom Bombardment (FAB) (Applied Biosystems).

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le laboratoire de microanalyse de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse.

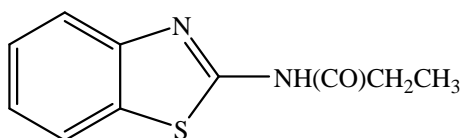
Les points de fusion ont été mesurés en tube capillaire, à l'aide d'un appareil digital, ELECTROTHERMAL.

II.3. Partie expérimentale

Les synthèses et les caractérisations de l'ensemble des dérivés obtenus sont décrites ci-dessous.

II.3.1. Synthèse des amides (1-5)

II.3.1.1. Synthèse du N-benzothiazol-2-yl-propylamide (1)



A une solution de 2-aminobenzothiazole (1,54 g, 10,26 mmol) et de triéthylamine fraîchement distillée (2,02 g, 20,00 mmol) dans 40 ml de THF anhydre sont ajoutés 1,85 g (20,00 mmol) de chlorure de propyle en solution dans 20 ml de THF. Le mélange réactionnel est agité pendant trois heures à température ambiante puis il est concentré sous vide. Le résidu visqueux est repris par 60 ml d'un mélange eau/hexane (1/1). Le précipité obtenu est filtré. La recristallisation dans le méthanol conduit à 0,74 g (3,6 mmol ; Rdt : 36 %) du composé **1**.

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,12 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 2,50 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 7,27 - 7,98 (m, 4H, C_6H_4), 12,29 (s, 1H, NH).

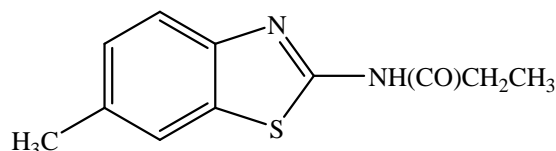
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 9,42 (CH_2CH_3), 28,93 (CH_2CH_3), 120,90 (C_6 -aryl), 122,13 (C_8 -aryl), 123,87 (C_5 -aryl), 126,51 (C_7 -aryl), 131,90 (C_4 -aryl), 149,04 (C_9 -aryl), 158,44 (C_2 -aryl), 173,47 (C=O).

Spectre de masse : $m/z = 206$ [M-56] $^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$) : Calc. % : C, 58,23 ; H, 4,89 ; N, 13,58. Exp.% : C, 57,47 ; H, 4,64 ; N, 13,29.

Point de fusion: 198-190 °C.

II.3.1.2. N-(6-méthylbenzothiazol-2-yl)propylamide (**2**)



A une solution de 2-amino-6-méthylbenzothiazole (1,67 g, 10,84 mmol) et de triéthylamine fraîchement distillée (2,02 g, 20,00 mmol) dans 40 ml de THF anhydre sont ajoutés 1,85 g (20,00 mmol) de chlorure de propyle en solution dans 20 ml de THF. Le mélange réactionnel est agité pendant trois heures à température ambiante puis il est concentré sous vide. Le résidu visqueux est repris par 60 ml d'un mélange eau/hexane (1/1). Le précipité obtenu est filtré. La recristallisation dans le méthanol conduit à 1,15 g (5,23 mmol ; Rdt : 52 %) du composé **2**.

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,11 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 2,40 (s, 3H, CH_3), 2,45 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 7,22 - 7,74 (m, 3H, C_6H_3), 12,21 (s, 1H, NH).

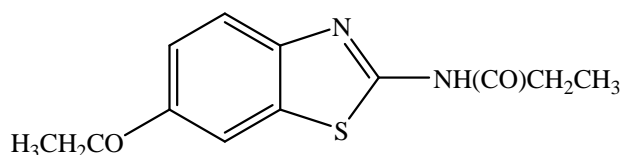
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 9,46 (CH_2CH_3), 21,45 (CH_3), 28,90 (CH_2CH_3), 120,55 ($\text{C}_8\text{-aryl}$), 121,74 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 127,82 ($\text{C}_7\text{-aryl}$), 132,05 ($\text{C}_6\text{-aryl}$), 133,30 ($\text{C}_4\text{-aryl}$), 147,01 ($\text{C}_9\text{-aryl}$), 157,57 ($\text{C}_2\text{-aryl}$), 173,32 ($\text{C}=\text{O}$).

Spectre de masse : $m/z = 220$ $[\text{M}-56]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$) : Calc. % : C, 59,97 ; H, 5,49 ; N, 12,72. Exp. % : C, 59,59 ; H, 5,15 ; N, 12,56.

Point de fusion : 221-222 °C.

II.3.1.3. N-(6-éthoxybenzothiazol-2-yl)propylamide (**3**)



A une solution de 2-amino-6-éthoxybenzothiazole (1,91 g, 9,84 mmol) et de triéthylamine fraîchement distillée (2,02 g, 20,00 mmol) dans 40 ml de THF anhydre sont ajoutés 1,85 g (20,00 mmol) de chlorure de propyle en solution dans 20 ml de THF. Le mélange réactionnel est agité pendant trois heures à température ambiante puis il est concentré sous vide.

Le résidu visqueux est repris par 60 ml d'un mélange eau/hexane (1/1). Le précipité obtenu est filtré. La recristallisation dans le méthanol conduit à 1,32 g (5,28 mmol ; Rdt : 53 %) du composé **3**.

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,11 (t, 3H, $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 1,34 (t, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 2,45 (q, 2H, $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 4,06 (q, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 6,98-7,61 (m, 3H, C_6H_3), 12,14 (s, 1H, NH)

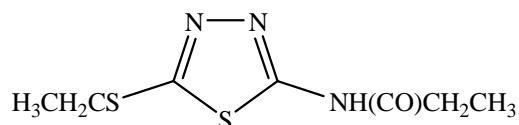
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 9,47 ($-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 15,18 ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28,85 ($-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 64,05 ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 105,82 ($\text{C}_8\text{-aryl}$), 115,62 ($\text{C}_7\text{-aryl}$), 121,47 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 133,18 ($\text{C}_4\text{-aryl}$), 143,05 ($\text{C}_9\text{-aryl}$), 155,74 ($\text{C}_6\text{-aryl}$), 156,40 ($\text{C}_2\text{-aryl}$), 173,15 ($\text{C}=\text{O}$).

Spectre de masse : $m/z = 250$ $[\text{M}-56]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) : Calc. % : C, 57,58 ; H, 5,64 ; N, 11,19. Exp. % : C, 57,31 ; H, 5,16 ; N, 11,07.

Point de fusion : 206-208 °C.

II.3.1.4. N-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (**4**)



A une solution de 2-amino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (1,63 g, 10,12 mmol) et de triéthylamine fraîchement distillée (2,02 g, 20,00 mmol) dans 40 ml de THF anhydre sont ajoutés 1,85 g (20,00 mmol) de chlorure de propyle en solution dans 20 ml de THF. Le mélange réactionnel est agité pendant trois heures à température ambiante puis il est concentré sous vide. Le résidu visqueux jaunâtre est repris par 60 ml d'un mélange eau/hexane (1/1). Le précipité obtenu est filtré. La recristallisation dans le méthanol conduit à 2,11 g (9,7 mmol ; Rdt : 96 %) du composé **4**.

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,09 (t, 3H, -(CO)CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 1,33 (t, 3H, -SCH₂CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 2,47 (q, 2H, -SCH₂CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 3,21 (q, 2H, -(CO)CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 12,53 (s, 1H, NH).

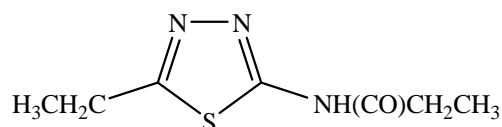
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 9,42 (-(CO)CH₂CH₃), 15,22 (-SCH₂CH₃), 28,52 (-(CO)CH₂CH₃), 28,57 (-SCH₂CH₃), 158,76 (C₅-aryl), 159,08 (C₂-aryl), 172,79 (C₁₀-alkyl).

Spectre de masse : m/z = 217 [M-56]⁺

Analyse élémentaire (C₇H₁₁N₃OS₂) : Calc. % : C, 38,69 ; H, 5,10 ; N, 19,34. Exp. % : C, 38,70 ; H, 4,91 ; N, 19,16.

Point de fusion : 163-165 °C.

II.3.1.5. N-(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (**5**)



A une solution de 2-amino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (1,31 g, 10,83 mmol) et de triéthylamine fraîchement distillée (2,02 g, 20,00 mmol) dans 40 ml de THF anhydre sont ajoutés 1,85 g (20,00 mmol) de chlorure de propyle en solution dans 20 ml de THF.

Le mélange réactionnel est agité pendant trois heures à température ambiante puis il est concentré sous vide. Le résidu visqueux jaunâtre est repris par 60 ml d'un mélange eau/hexane (1/1).

Le précipité obtenu est filtré. La recristallisation dans le méthanol conduit à 1,78 g (9,6 mmol ; Rdt : 96 %) du composé **5**.

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,09 (t, 3H, $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 1,29 (t, 3H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 2,47 (q, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 2,97 (q, $-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 12,31 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 9,53 ($-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14,29 (CH_3CH_2), 23,10 ($-(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28,66 (CH_3CH_2), 158,59 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 165,64 ($\text{C}_2\text{-aryl}$), 172,54 ($\text{C}=\text{O}$).

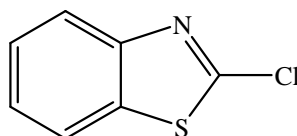
Spectre de masse : $m/z = 185$ $[\text{M}-56]^+$

Analyse élémentaire (C₇H₁₁N₃OS) : Calc. % : C, 45,39 ; H, 5,99 ; N, 22,68. Exp. % : C, 45,10 ; H, 5,48 ; N, 22,32.

Point de fusion : 224-226 °C.

II.3.2. Synthèse des dérivés chlorés (**6-10**)

II.3.2.1. 2-chlorobenzothiazole (**6**)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (105 ml/45 ml) et de cuivre métal (1,70 g) est ajouté, par petites fractions à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (6,83 g, 98,98 mmol) et de 2-aminobenzothiazole (5,00 g, 33,33 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis chauffé à 50 °C jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Le mélange réactionnel obtenu de couleur verte est extrait au chloroforme (3 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10 %). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu rouge visqueux correspondant à 5,15 g du composé **6** (30,47 mmol ; Rdt : 94 %).

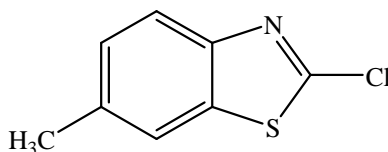
RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 7,34 - 7,95 (m, 4H, C_6H_4).

RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 121,84 (C_8 -aryl), 123,55 (C_5 -aryl), 126,50 (C_7 -aryl), 127,42 (C_6 -aryl), 150,71 (C_4 -aryl), 153,56 (C_9 -aryl), 172,85 (C_2 -aryl).

Spectre de masse : $m/z = 169$ $[\text{M}]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_7\text{H}_4\text{ClNS}$) : Calc.% : C, 49,56 ; H, 2,38 ; N, 8,26. Exp.% : C, 49,08 ; H, 2,11 ; N, 9,01.

II.3.2.2. 2-chloro-6-méthylbenzothiazole (7)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (100 ml/40 ml) et de cuivre métal (1,60 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (6,30 g, 91,30 mmol) et de 2-amino-6-méthylbenzothiazole (5,00 g, 30,48 mmol).

L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Le mélange réactionnel obtenu de couleur verte est extrait au chloroforme (3 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10 %). La phase organique de couleur orange est ensuite séchée une nuit sur sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un solide orange correspondant à 3,73 g du composé **7** (20,38 mmol ; Rdt : 53 %).

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 2,32 (s, 3H, CH_3), 7,01 - 7,81 (m, 3H, C_6H_3).

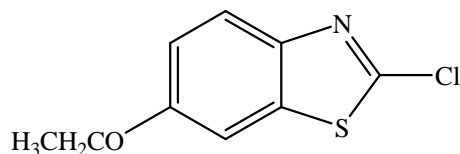
RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 21,53 (CH_3), 120,82 (C_8 -aryl), 122,34 (C_5 -aryl), 128,19 (C_7 -aryl), 136,02 (C_6 -aryl), 149,03 (C_4 -aryl), 152,04 (C_9 -aryl), 172,04 (C_2 -aryl).

Spectre de masse : $m/z = 184$ $[\text{M}+1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_8\text{H}_6\text{ClNS}$): Calc.% : C, 52,32 ; H, 3,29 ; N, 7,63. Exp.% : C, 52,04 ; H, 3,34 ; N, 7,58.

Point de fusion : 50-52 °C.

II.3.2.3. 2-chloro-6-éthoxybenzothiazole (**8**)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (160 ml/60 ml) et de cuivre métal (2,6 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (10,60 g 153,62 mmol) et de 2-amino-6-éthoxybenzothiazole (10,00 g, 51,5 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Le mélange obtenu de couleur verte est extrait au chloroforme (3 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10 %). La phase organique rouge est ensuite séchée sur sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un solide correspondant à 6,99 g du composé **8** (32,66 mmol ; Rdt : 64 %).

RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,35 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 7,00 Hz), 4,07 (q, 2H, OCH₂, ³J_{H-H} = 7,00 Hz), 7,09 - 7,85 (m, 3H, C₆H₃).

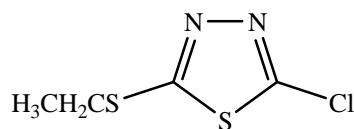
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,00 (CH₃), 64,23 (CH₂), 106,05 (C₅-aryl), 116,78 (C₇-aryl), 123,43 (C₈-aryl), 137,57 (C₄-aryl), 145,04 (C₉-aryl), 149,73 (C₆-aryl), 157,37 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 214 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₉H₈ClNOS) : Calc.% : C, 50,59 ; H, 3,77 ; N, 6,55. Exp.% : C, 49,17 ; H, 3,76 ; N, 6,80.

Point de fusion : 54-56 °C.

II.3.2.4. 2-chloro-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (**9**)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (200 ml/80 ml) et de cuivre métal (3,20 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (12,80 g, 185,55 mmol) et de 2-amino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (10,00 g, 62,11 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Le mélange obtenu de couleur verte est extrait au chloroforme (3 x 50 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10 %). La phase organique est ensuite séchée sur du sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu huileux rouge épais correspondant à 7,60 g du composé **9** (41,98 mmol ; Rdt : 67 %).

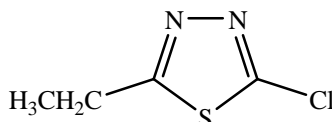
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,37 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 7,60 Hz), 3,24 (q, 2H, CH₂, ³J_{H-H} = 7,60 Hz).

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 14,44 (CH₃), 28,38 (CH₂), 152,55 (C₂-aryl), 168,15 (C₅-aryl).

Spectre de masse : m/z = 181 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₄H₅ClN₂S₂) : Calc.% : C, 26,59 ; H, 2,79 ; N, 15,50. Exp.% : C, 26,44 ; H, 2,57 ; N, 16,61.

II.3.2.5. 2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (**10**)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (50 ml/21 ml) et de cuivre métal (0,80 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (3,20 g 46,37 mmol) et de 2-amino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (2,00 g, 15,50 mmol).

L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux. Le mélange obtenu de couleur verte est extrait au chloroforme (3 x 50 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavée par une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10 %). La phase organique est ensuite séchée sur du sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu huileux rouge épais correspondant à 1,8 g du composé **10** (12,08 mmol ; Rdt : 79 %).

RMN ^1H (300,13 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1,31 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,00 (q, 2H, CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz).

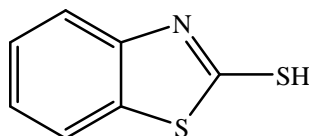
RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 14,32 (CH_3), 24,35 (CH_2), 153,85 (C_2 -aryl), 175,05 (C_5 -aryl).

Spectre de masse : $m/z = 149$ $[\text{M}+1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_4\text{H}_5\text{ClN}_2\text{S}$) : Calc. % : C, 32,33 ; H, 3,39 ; N, 18,85. Exp.% : C, 33,01 ; H, 3,11 ; N, 18,45.

II.3.3. Synthèse des thiols (11-15)

II.3.3.1. Benzothiazole-2-thiol (11)



A une solution de 2-chlorobenzothiazole **6** (2,50 g, 14,79 mmol) dans 36 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (3,03 g, 47,33 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est ensuite refroidi dans un bain de glace. Une solution d'acide chlorhydrique diluée (50 ml à 5 %) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml).

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 0,70 g du dérivé **11** (4,19 mmol ; Rdt : 28 %).

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 3,49 (s, 1H, SH), 7,15 - 7,48 (m, 4H, C_6H_4).

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 112,35 (C_8 -aryl), 121,37 (C_5 -aryl), 124,70 (C_7 -aryl), 127,23 (C_6 -aryl), 130,02 (C_4 -aryl), 140,33 (C_9 -aryl), 190,92 (C_2 -aryl).

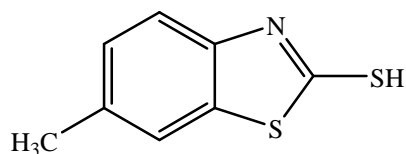
Spectre de masse : $m/z = 167$ $[\text{M}]^+$.

I.R. (cm^{-1}) : $\nu_{\text{SH}} = 2664$.

Analyse élémentaire ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NS}_2$) : Calc.%: C, 50,27; H, 3,01; N, 8,37. Exp.%: C, 50,55; H, 2,82; N, 8,86.

Point de fusion : 170-172 °C.

II.3.3.2. 6-méthylbenzothiazole-2-thiol (**12**)



A une solution de 2-chloro-6-méthylbenzothiazole **7** (2,00 g, 10,87 mmol) dans 60 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (2,50 g, 34,78 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures est ensuite refroidi dans un bain de glace. Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5 %) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml).

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,72 g du dérivé **12** (9,45 mmol ; Rd : 87 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,33 (s, 3H, CH₃), 3,59 (s, 1H, SH), 7,16 - 8,05 (m, 3H, C₆H₃).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,19 (CH₃), 112,68 (C₈-aryl), 123,74 (C₅-aryl), 128,55 (C₇-aryl), 130,56 (C₆-aryl), 134,46 (C₄-aryl), 139,65 (C₉-aryl), 184,33 (C₂-aryl).

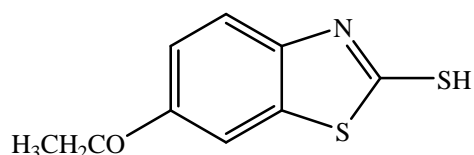
Spectre de masse : m/z = 182 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2509.

Analyse élémentaire (C₈H₇NS₂) : Calc. % : C, 53,00 ; H, 3,89 ; N, 7,73. Exp. % : C, 52,60 ; H, 4,03 ; N, 7,99.

Point de fusion : 150-152 °C.

II.3.3.3. 6-éthoxybenzothiazole-2-thiol (**13**)



A une solution de 2-chloro-6-éthoxybenzothiazole **8** (1,54 g, 7,94 mmol) dans 60 ml d'éthanol. Est ajoutée de la thiourée (1,56 g, 24,37 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est ensuite refroidi dans un bain de glace. Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5 %) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire 0,96 g du dérivé **13** (4,54 mmol ; Rdt : 63 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,32 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,56 (s, 1H, SH), 4,00 (q, 2H, CH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 6,94 - 7,31 (m, 3H, C₆H₃).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,05 (CH₃), 64,19 (CH₂), 106,93 (C₅-aryl), 113,55 (C₇-aryl), 115,63 (C₈-aryl), 131,14 (C₄-aryl), 135,58 (C₉-aryl), 156,31 (C₆-aryl), 188,75 (C₂-aryl).

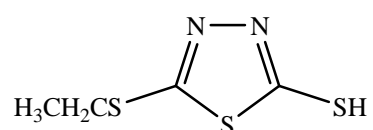
Spectre de masse : m/z = 212 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2509.

Analyse élémentaire (C₉H₉NOS₂) : Calc.% : C, 51,16 ; H, 4,29 ; N, 6,63. Exp.% : C, 51,03 ; H, 3,85 ; N, 7,20.

Point de fusion : 180-182 °C.

II.3.3.4. 5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (**14**)



A une solution de 2-chloro-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole **9** (2,00 g, 11,11 mmol) dans 60 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (2,39 g, 33,33 mmol).

Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est ensuite refroidi dans un bain de glace. Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5 %) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml).

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,46 g du dérivé **14** (8,16 mmol ; Rdt : 73 %) .

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,31 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 3,16 (q, 2H, CH₂, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 7,03 (s, 1H, SH).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO₃, δ, ppm) : 14,94 (CH₃), 28,17 (CH₂), 162,13 (C₅-aryl), 188,32 (C₂-aryl).

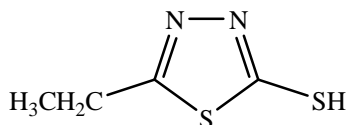
Spectre de masse : m/z = 179 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2528.

Analyse élémentaire (C₄H₆N₂S₃) : Calc.% : C, 26,95 ; H, 3,39 ; N, 15,71. Exp.% : C, 25,73 ; H, 3,56 ; N, 16,77.

Point de fusion : 102-104 °C.

II.3.3.5. 5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (**15**)



A une solution de 2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole **10** (1,80 g, 12,16 mmol) dans 30 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (2,94 g, 38,68 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est ensuite refroidi dans un bain de glace. Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5 %) est ajoutée sous agitation.

Le mélange est extrait au chloroforme (2 x 50 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,00 g de composé **15** (6,85 mmol ; Rdt : 34 %).

RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,19 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 7,5 Hz), 2,00 (q, 2H, CH₂, ³J_{H-H} = 7,5 Hz), 7,03 (s, 1H, SH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 12,69 (CH₃), 24,40 (CH₂), 165,98 (C₂-aryl), 189,35 (C₅-aryl).

Spectre de masse : m/z = 146 [M+1]⁺

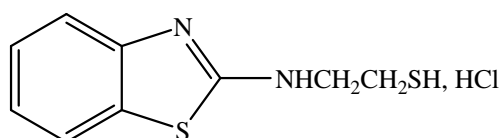
I.R. (cm⁻¹) : $\nu_{SH} = 2523$.

Analyse élémentaire (C₄H₆N₂S₂) : Calc.% : C, 32,85 ; H, 4,14 ; N, 19,16. Exp.% : C, 31,63 ; H, 4,00 ; N, 20,52.

Point de fusion : 68-70 °C.

II.3.4. Synthèse des aminothiols (16-20)

II.3.4.1. 2-(benzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (16)



A une solution de 2-chlorobenzothiazole **6** (1,50 g, 8,87 mmol) dans 15 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (0,70 g, 9,00 mmol). Le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. La cystéamine n'ayant pas réagi est éliminée par filtration sous argon. Après concentration du filtrat sous pression réduite on obtient un résidu visqueux jaune repris dans un mélange THF/pentane (1/3). Le solide obtenu après filtration correspond à 0,65 g de composé **16** (3,09 mmol ; Rdt : 35 %)

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 3,18 (t, 2H, CH₂SH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,36 (s, 1H, SH), 3,58 (t, 2H, NHCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,29-7,98 (m, 4H, C₆H₄), 8,40 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 29,46 (NHCH₂), 38,84 (CH₂SH), 120, 9 (C₅₋₈-aryl), 125,09 (C₄-aryl), 125,75 (C₇-aryl), 134, 58 (C₆-aryl), 152,22 (C₉-aryl), 164,54 (C₂-aryl).

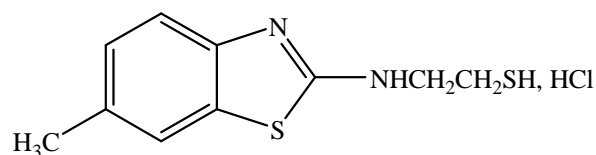
Spectre de masse : $m/z = 211 [M+1]^+$

I.R. (cm⁻¹) : $\nu_{SH} = 2446$, $\nu_{NH} = 3444$.

Analyse élémentaire (C₉H₁₀N₂S₂) : Calc.% : C, 51,40 ; H, 4,79 ; N, 13,32. Exp.% : C, 51,73 ; H, 4,29 ; N, 13,49.

Point de fusion: 174-176 °C.

II.3.4.2. 2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (**17**)



A une solution de 2-chloro-6-méthylbenzothiazole **7** (2,00 g, 10,92 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (0,85 g, 11,04 mmol). Le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures. La cystéamine n'ayant pas réagi est éliminée par filtration sous argon. Après concentration du filtrat, sous pression réduite, on obtient un résidu visqueux jaune repris par 10 ml de THF. Le solide obtenu après filtration correspond à 0,40 g de composé **17** (1,77 mmol ; Rdt : 16 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,43 (s, 3H, CH₃), 3,26 (t, 2H, NHCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,36 (s, 1H, SH), 3,64 (t, 2H, CH₂SH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,30 - 7,83 (m, 3H, C₆H₃), 8,47 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,40 (CH₃), 30,36 (NHCH₂), 38,64 (CH₂SH), 121,25 (C₈-aryl), 121,98 (C₅-aryl), 128,24 (C₇-aryl), 134,88 (C₆-aryl), 135,32 (C₄-aryl), 151,12 (C₉-aryl), 164,35 (C₂-aryl).

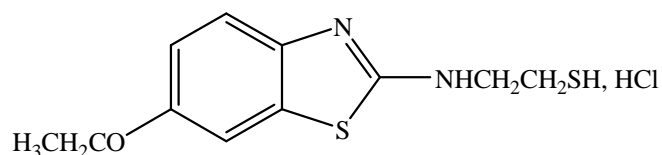
Spectre de masse : m/z = 225 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2580, ν_{NH} = 3434.

Analyse élémentaire (C₁₀H₁₂N₂S₂) : Calc.% : C, 53,54 ; H, 5,39 ; N, 12,49. Exp.% : C, 53,67 ; H, 4,85 ; N, 12,90.

Point de fusion : 170-172 °C.

II.3.4.3. 2-(6-éthoxybenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (**18**)



A une solution de 2-chloro-6-éthoxybenzothiazole **8** (0,99 g, 4,68 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (0,36 g, 4,68 mmol).

Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant huit heures. La filtration et la concentration du filtrat sous pression réduite conduit au produit **18** (0,39 g) sous forme d'une huile jaune (0,15 mmol ; Rdt : 33 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,34 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,19 (t, 2H, CH₂SH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,34 (s, 1H, SH), 3,56 (t, 2H, NHCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,05 (q, 2H, CH₃CH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,02 - 7,84 (m, 3H, C₆H₃), 8,42 (s, 1H, NH).

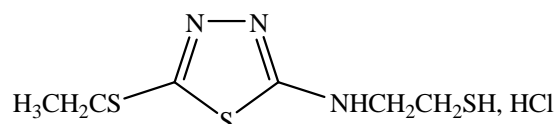
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,07 (CH₃), 31,24 (NHCH₂), 38,44 (CH₂SH), 64,18 (CH₃CH₂), 106,01 (C₅-aryl), 115,98 (C₇-aryl), 122,17 (C₈-aryl), 136,66 (C₄-aryl), 147,38 (C₉-aryl), 156,52 (C₆-aryl), 162,36 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 255 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₁H₁₄N₂OS₂) : Calc.% : C, 51,94 ; H, 5,55 ; N, 11,01. Exp.% : C, 51,85 ; H, 5,98 ; N, 10,67

II.3.4.4. 2-(5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol

(19)



A une solution de 2-chloro-5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazole **9** (3,00 g, 16,66 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (1,28 g, 16,37 mmol). Le mélange est maintenu à reflux pendant trois heures. Après retour à température ambiante, la cystéamine n'ayant pas réagi est filtrée sous argon. Après la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu visqueux jaune, lequel est repris dans un mélange 20 ml d'un mélange THF/pentane (1/3). Le solide obtenu est filtré et correspond à 0,60 g de composé **19** (3,11 mmol ; Rdt : 16 %)

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,38 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,19 (t, 2H, CH₂SH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,29 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,36 (s, 1H, SH), 3,55 (t, 2H, NHCH₂, ³J_{H-H} = 7,20 Hz), 8,32 (s, 1H, NH).

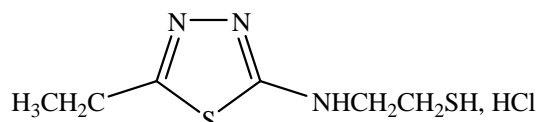
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 14,97 (CH₃), 31,21 (CH₂CH₃), 38,55 (NHCH₂), 39,07 (CH₂SH), 164,10 (C₂-aryl), 166,23 (C₅-aryl).

Spectre de masse : m/z = 222 [M+1]⁺

I.R. (cm^{-1}) : $\nu_{\text{SH}} = 2539$, $\nu_{\text{NH}} = 3375$.

Analyse élémentaire ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}_3$) : Calc.% : C, 32,55 ; H, 5,01 ; N, 18,98. Exp.% : C, 32,22 ; H, 4,85 ; N, 19,47.

II.3.4.5. 2-(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol (**20**)



A une solution de 2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole **10** (2,00 g, 13,51 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (1,84 g, 23,89 mmol). Le mélange est porté à reflux durant trois heures. Après filtration et concentration sous pression réduite du filtrat on isole 1,17 g d'une huile rouge correspondant au produit **20** (6,19 mmol ; Rdt : 44 %).

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,37 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,06 (q, 2H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,43 (s, 1H, SH), 3,61 (t, 2H, CH_2SH , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,80 (t, 2H, NHCH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 8,62 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 13,99 (CH_3), 23,82 (CH_2), 32,92 (NHCH_2), 39,78 (CH_2SH), 164,29 (C_2 -aryl), 172,78 (C_5 -aryl).

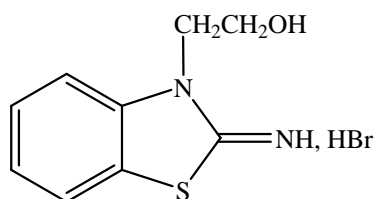
Spectre de masse : $m/z = 188$ [$\text{M}+1$] $^+$

I.R. (cm^{-1}) : $\nu_{\text{SH}} = 2036$, $\nu_{\text{NH}} = 3372$.

Analyse élémentaire ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}_3$) : Calc. % : C, 23,91 ; H, 4,01 ; N, 13,94. Exp.% : C, 23,54 ; H, 4,87 ; N, 13,45.

II.3.5. Synthèse des aminoalcools (**21-25**)

II.3.5.1. 2-iminobenzothiazol-3-yl-éthanol (**21**)



Une solution de 2-aminobenzothiazole (10,19 g, 65,89 mmol) et de 2-bromoéthanol (45,76 g, 366,16 mmol) est portée à reflux pendant trois heures. Après retour à température ambiante, 200 ml de diéthyloéther sont ajoutés au mélange réactionnel.

Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 50 ml d'acétone et 100 ml de diéthyloéther puis séché sous pression réduite conduisant à 11,47 g du composé **21** (59,12 mmol ; Rdt : 90 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 3,79 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,41 (t, 2H, CH₂OH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,71 (s, 1H, OH), 7,23 - 8,03 (m, 4H, C₆H₄), 10,13 (s, 1H, NH).

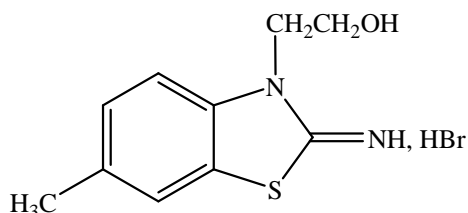
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 48,13 (NCH₂), 58,41 (CH₂OH), 114,18 (C₈-aryl), 122,74 (C₄-aryl), 123,54 (C₈-aryl), 125,40 (C₅-aryl), 127,86 (C₇-aryl), 139,12 (C₉-aryl), 168,86 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 195 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₉H₁₀N₂OS) : Calc. % : C, 55,65 ; H, 5,19 ; N, 14,42. Exp.% : C, 55,65 ; H, 5,19 ; N, 14,42.

Point de fusion: 200-202 °C (déc).

II.3.5.2. (2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol(**22**)



Une solution de 2-amino-6-méthylbenzothiazole (8,00 g, 48,73 mmol) et de 2-bromoéthanol (35,20 g, 281,66 mmol) est portée à reflux pendant trois heures. Après retour à température ambiante, 200 ml de diéthyloéther sont ajoutés au mélange réactionnel. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 50 ml d'acétone et 100 ml de diéthyloéther puis séché sous pression réduite conduisant à 7,73 g du composé **22** (37,16 mmol ; Rdt : 76 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,39 (s, 3H, CH₃), 3,77 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,39 (t, 2H, CH₂OH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,69 (s, 1H, OH), 7,24-7,81 (m, 3H, C₆H₃), 10,07 (s, 1H, NH).

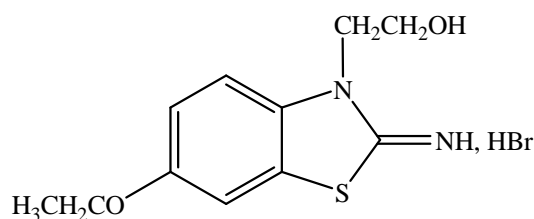
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,16 (CH₃), 48,14 (NCH₂), 58,42 (CH₂OH), 113,89 (C₈-aryl), 122,67 (C₄-aryl), 123,33 (C₇-aryl), 128,74 (C₅-aryl), 135,22 (C₆-aryl), 137,00 (C₉-aryl), 168,18 (C₂-aryl).

Spectre de masse : $m/z = 209 [M+1]^+$

Analyse élémentaire (C₁₀H₁₂N₂OS) : Calc. % : C, 57,67 ; H, 5,81 ; N, 13,45. Exp.% : C, 57,58 ; H, 5,94 ; N, 13,41.

Point de fusion : 232-234 °C (déc).

II.3.5.3. (2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthanol (**23**)



Une solution de 2-amino-6-éthoxybenzothiazole (9,97 g, 49,78 mmol) et de 2-bromoéthanol (35,20 g, 281,66 mmol) est portée à reflux pendant trois heures. Après retour à température ambiante, 200 ml de diéthyléther sont ajoutés au mélange réactionnel. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 50 ml d'acétone et 100 ml de diéthyléther puis séché sous pression réduite conduisant à 9,75 g du composé **23** (37,16 mmol ; Rdt : 82 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,35 (t, 3H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,76 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,06 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,37 (t, 2H, CH₂OH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,91 (s, 1H, OH), 7,07-7,67 (m, 3H, C₆H₃), 9,98 (s, 1H, NH).

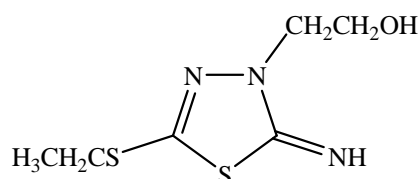
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,01 (CH₂CH₃), 48,15 (NCH₂), 62,01 (CH₂OH), 64,40 (CH₂CH₃), 108,89 (C₈-aryl), 115,14 (C₇-aryl), 115,47 (C₅-aryl), 123,98 (C₄-aryl), 132,99 (C₉-aryl), 156,52 (C₆-aryl), 167,79 (C₂-aryl).

Spectre de masse : $m/z = 239 [M+1]^+$

Analyse élémentaire (C₁₁H₁₄N₂O₂S) : C, 55,44 ; H, 5,92 ; N, 11,76. Exp.% : C, 55,31 ; H, 5,64 ; N, 12,17.

Point de fusion : 225-227 °C (déc).

II.3.5.4. (2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol(**24**)



Une solution de 2-amino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (8,06 g, 49,99 mmol) et de 2-bromoéthanol (35,20 g, 281,66 mmol) est portée à reflux pendant trois heures. Après retour à température ambiante, 300 ml d'un mélange chloroforme/diéthyléther (1/1) est ajouté au mélange réactionnel. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 50 ml d'acétone et 100 ml de diéthyléther puis séché sous pression réduite à 6,06 g du composé **24** (29,56 mmol ; Rdt : 59 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,36 (t, 3H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,22 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,77 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,25 (t, 2H, CH₂OH, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,90 (s, 1H, OH), 9,96 (s, 1H, NH).

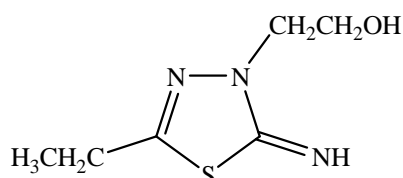
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 14,78 (CH₂CH₃), 28,39 (CH₂CH₃), 53,44 (NCH₂), 58,47 (CH₂OH), 154,11 (C₅-aryl), 167,97 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 206 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₆H₁₁N₃OS₂) : Calc. % : C, 35,10 ; H, 5,40 ; N, 20,47. Exp.% : C, 34,87 ; H, 4,93 ; N, 21,17.

Point de fusion : 136-138 °C (déc).

II.3.5.5. (2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol (**25**)



Une solution de 2-amino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (10,10 g, 76,72 mmol) et de 2-bromoéthanol (35,20 g, 281,66 mmol) est portée à reflux pendant trois heures.

Après retour à température ambiante, 300 ml d'un mélange chloroforme/diéthyléther (1/1) est ajouté au mélange réactionnel. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 50 ml d'acétone et 100 ml de diéthyléther puis séché sous pression réduite conduisant à 7,42 g du composé **25** (42,89 mmol ; Rdt : 56 %).

RMN ^1H (200,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,22 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 2,90 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,74 (t, 2H, NCH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 4,23 (t, 2H, CH_2OH , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 5,45 (s, 1H, OH), 9,81 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 12,80 (CH_2CH_3), 23,86 (CH_2CH_3), 53,00 (NCH_2), 58,47 (CH_2OH), 122,67 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 159,58 ($\text{C}_2\text{-aryl}$).

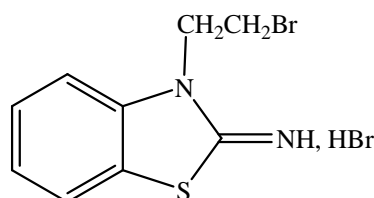
Spectre de masse : $m/z = 174$ $[\text{M}+1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$) : Calc. % : C, 41,60 ; H, 6,40 ; N, 24,26. Exp.% : C, 41,32 ; H, 6,23 ; N, 24,71.

Point de fusion : 150-152 °C (déc).

II.3.6. Synthèse des dérivés bromés (26-30)

II.3.6.1. 3-bromoéthylbenzothiazole-2-imine (**26**)



A une suspension de (2-iminobenzothiazol-3-yl)éthanol **21** (1 g, 5,15 mmol) dans 80 ml de toluène anhydre est ajouté, goutte à goutte et sous argon, du bromure de thionyle (3,21 g, 15,45 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux jusqu'à l'arrêt du dégagement gazeux. Après retour à température ambiante, le précipité obtenu est filtré puis lavé avec 50 ml d'acétone, filtration et séché sous pression réduite conduisant à 0,96 g du produit attendu **26** (3,7 mmol ; Rdt : 72 %)

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 3,87 (t, 2H, NCH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 4,78 (t, 2H, CH_2Br , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 7,11-8,05 (m, 4H, C_6H_4), 10,41 (s, 1H, NH).

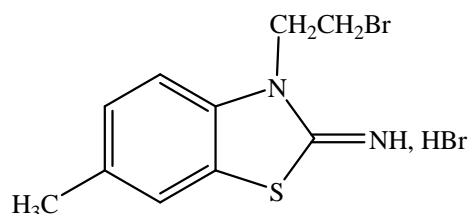
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 28,63 (CH_2Br), 46,00 (NCH_2), 114,20 (C_6 -aryl), 122,60 (C_4 -aryl), 124,13 (C_8 -aryl), 125,80 (C_5 -aryl), 128,22 (C_7 -aryl), 138,42 (C_9 -aryl), 168,91 (C_2 -aryl).

Spectre de masse : $m/z = 259$ $[\text{M}+1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_9\text{H}_9\text{BrN}_2\text{S}$) : Calc. % : C, 42,04 ; H, 3,53 ; N, 10,89. Exp.% : C, 41,79 ; H, 3,54 ; N, 11,13.

Point de fusion : 205-207 °C (déc).

II.3.6.2. 3-bromoéthyl-6-méthylbenzothiazole-2-imine (**27**)



A une suspension de (2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol **22** (1,5 g, 7,21 mmol) dans 80 ml d'acétonitrile anhydre est ajouté, goutte à goutte et sous argon, du bromure de thionyle (4,28 g, 20,61 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux jusqu'à l'arrêt du dégagement gazeux. Après retour à température ambiante, le précipité obtenu est filtré et lavé dans 50 ml de diéthyléther puis séché sous pression réduite conduisant à 1,5 g du produit attendu **27** (5,49 mmol ; Rdt : 80 %).

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 2,38 (s, 3H, CH_3), 3,86 (t, 2H, CH_2Br , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 4,77 (t, 2H, NCH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 7,34-7,82 (m, 3H, C_6H_3), 10,37 (s, 1H, NH).

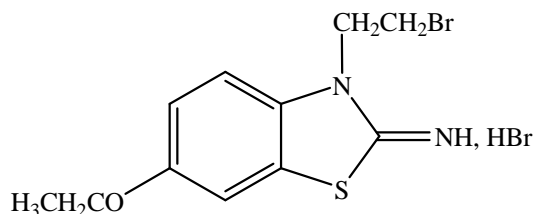
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 21,27 (CH_3), 28,71 (CH_2Br), 46,02 (NCH_2), 113,91 (C_8 -aryl), 123,88 (C_4 -aryl), 125,09 (C_7 -aryl), 129,00 (C_5 -aryl), 135,52 (C_6 -aryl), 136,31 (C_9 -aryl), 168,49 (C_2 -aryl).

Spectre de masse : $m/z = 273$ $[\text{M}]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{S}$) : Calc. % : C, 44,29 ; H, 4,09 ; N, 10,33. Exp.% : C, 44,01 ; H, 3,95 ; N, 10,75.

Point de fusion : 219-221 °C (déc).

II.3.6.3. 3-bromoéthyl-6-éthoxybenzothiazole-2-imine(**28**)



A une suspension de (2-imino-6-éthoxy-benzothiazol-3-yl)éthanol **23** (1,5 g, 6,3 mmol) dans 80 ml de toluène anhydre est ajouté, goutte à goutte et sous argon, du bromure de thionyle (4,02 g, 18,90 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux jusqu'à l'arrêt du dégagement gazeux. Après retour à température ambiante, le précipité obtenu est filtré et lavé dans 50 ml d'acétone puis séché sous pression réduite conduisant à 1,39 g du produit attendu **28** (4,59 mmol ; Rdt : 73 %)

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,34 (t, 3H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,86 (t, 2H, CH₂Br, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,05 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,74 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,09-7,67 (m, 3H, C₆H₃), 10,22 (s, 1H, NH).

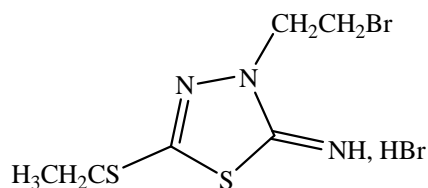
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,01 (CH₂CH₃), 28,86 (CH₂Br), 46,06 (NCH₂), 64,42 (CH₂CH₃), 109,11 (C₈-aryl), 114,99 (C₇-aryl), 115,61 (C₅-aryl), 123,79 (C₄-aryl), 132,06 (C₉-aryl), 156,70 (C₆-aryl), 168,10 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 303 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₁H₁₃BrN₂OS) : Calc. % : C, 43,86 ; H, 4,35 ; N, 9,30. Exp.% : C, 43,52 ; H, 4,22 ; N, 9,77.

Point de fusion : 225-227 °C (déc).

II.3.6.4. 3-bromoéthyl-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-imine (**29**)



A une suspension de (2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol **24** (4,43 g, 22,83 mmol) dans 200 ml de toluène anhydre est ajouté, goutte à goutte et sous argon, du bromure de thionyle (11,79 g, 57,08 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux jusqu'à l'arrêt du dégagement gazeux. Après retour à température ambiante, la solution est concentrée sous pression réduite et le résidu rouge obtenu est repris par 150 ml de diéthyléther conduisant à un précipité. Après filtration, et séchage sous pression réduite du solide, on obtient 3,85 g du composé **29** (16,31 mmol ; Rdt : 63 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,35 (t, 3H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,22 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,88 (t, 2H, CH₂Br, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,61 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 10,18 (s, 1H, NH).

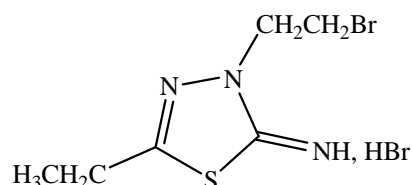
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 14,72 (CH₂CH₃), 28,34 (CH₂CH₃), 29,70 (CH₂Br), 51,63 (NCH₂), 154,77 (C₅-aryl), 168,01 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 269 [M]⁺

Analyse élémentaire (C₆H₁₀BrN₃S₂) : Calc. % : C, 26,87 ; H, 3,76 ; N, 15,67. Exp.% : C, 26,62 ; H, 3,86 ; N, 15,82.

Point de fusion : 140-142°C (déc).

II.3.6.5. 3-bromoéthyl-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-imine (**30**)



A une suspension de (2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol **25** (1,66 g, 9,60 mmol) dans 80 ml de toluène anhydre est ajouté, goutte à goutte et sous argon, du bromure de thionyle (5,89 g, 28,78 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux jusqu'à l'arrêt du dégagement gazeux. Après retour à température ambiante, le précipité obtenu est filtré puis lavé dans 50 ml d'acétone et séché sous pression réduite conduisant à 0,68 g du produit attendu **30** (2,87 mmol ; Rdt : 30 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,23 (t, 3H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 2,92 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,86 (t, 2H, CH₂Br, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,60 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 10,11 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 12,76 (CH₂CH₃), 23,91 (CH₂CH₃), 29,74 (CH₂Br), 51,27 (NCH₂), 160,14 (C₅-aryl), 168,01 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 237 [M+1]⁺

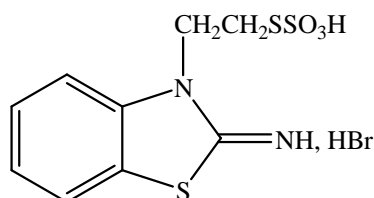
Analyse élémentaire (C₆H₁₀BrN₃S) : Calc. %: C, 30,52 ; H, 4,27 ; N, 17,80. Exp.% : C, 30,46 ; H, 3,96 ; N, 18,17.

Point de fusion : 206-208 °C (déc).

II.3.7. Synthèse des acides thiosulfoniques (31-35)

II.3.7.1. Acide S-2-(2-iminobenzothiazol-3-yl)éthyl

thiosulfonique (**31**)



A une solution de thiosulfate de sodium (1,02 g, 4,13 mmol) dans 42 ml d'eau est ajoutée une solution de 3-bromoéthylbenzothiazole-2-imine **26** (1,00 g, 3,89 mmol) dans un mélange éthanol/eau (20 ml/10 ml). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant une heure trente puis refroidi à 4 °C. Le solide obtenu est filtré puis recristallisé deux fois dans un mélange éthanol/eau. Le produit obtenu est séché sous vide en présence de P₂O₅. On obtient 0,21 g du dérivé **31** (0,72 mmol ; Rdt : 19%).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 3,24 (t, 2H, CH₂S, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,56 (t, 2H, NCH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,34-7,94 (m, 4H, C₆H₄), 10,01 (s, 1H, NH).

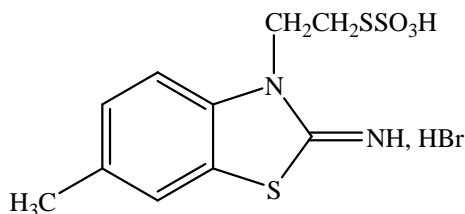
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 31,39 (CH₂S), 45,13 (NCH₂), 113,99 (C₆-aryl), 122,74 (C₄-aryl), 123,96 (C₈-aryl), 125,74 (C₅-aryl), 128,36 (C₇-aryl), 138,87 (C₉-aryl), 168,97 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 291 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₉H₁₀N₂O₃S₃) : Calc.% : C, 37,23 ; H, 3,47 ; N, 9,65. Exp.% : C, 35,13 ; H, 3,26 ; N, 8,95.

Point de fusion : 230-232 °C (déc).

II.3.7.2. Acide S-2-(2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthyl
thiosulfonique (**32**)



A une solution de thiosulfate de sodium (0,96 g, 3,87 mmol) dans 42 ml d'eau est ajoutée une solution de 3-bromoéthyl-6-méthylbenzothiazole-2-imine **27** (1,00 g, 3,69 mmol) dans un mélange éthanol/eau (20 ml/10 ml).

Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant une heure trente puis refroidi à 4 °C. Le solide obtenu est filtré puis recristallisé deux fois dans un mélange éthanol/eau. Le produit obtenu est séché sur P₂O₅. On obtient 0,30 g du dérivé **32** (0,99 mmol ; Rdt : 27 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,49 (s, 3H, CH₃), 3,27 (t, 2H, CH₂S, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,57 (t, 2H, N-CH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,37-7,77 (m, 3H, C₆H₃), 9,99 (s, 1H, NH).

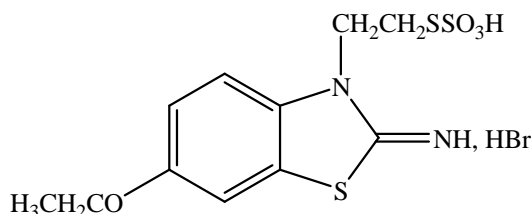
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 20,68 (CH₃), 30,98 (CH₂S), 44,63 (CH₂N), 113,24 (C₇-aryl), 123,25 (C₄-aryl), 124,51 (C₅-aryl), 128,72 (C₈-aryl), 135,04 (C₆-aryl), 136,29 (C₉-aryl), 168,10 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 305 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₀H₁₂N₂O₃S₃) : Calc.% : C, 39,46 ; H, 3,97 ; N, 9,20. Exp.% : C, 37,45 ; H, 4,28 ; N, 8,71.

Point de fusion : 233-235 °C (déc).

II.3.7.3. Acide S-2-(2-imino-6-éthoxy-benzothiazol-3-yl)éthyl
thiosulfonique (**33**)



A une solution de thiosulfate de sodium (0,87 g, 3,52 mmol) dans 40 ml d'eau est ajoutée une solution de 3-bromoéthyl-6-éthoxybenzothiazol-2-imine **28** (1,00 g, 3,32 mmol) dans un mélange éthanol/eau (20 ml/10 ml). Le mélange est chauffé à reflux pendant une heure trente puis refroidi à 4°C. Le solide obtenu est filtré puis recristallisé deux fois dans un mélange éthanol/eau. Le produit obtenu est séché sur P₂O₅. On obtient 0,38 g du dérivé **33** (1,14 mmol ; Rdt: 34%).

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,36 (t, 3H, CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 3,27 (t, 2H, CH₂S, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,08 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 4,56 (t, 2H, N-CH₂, ³J_{H-H} = 6,00 Hz), 7,12-7,76 (m, 3H, C₆H₃), 9,91 (s, 1H, NH).

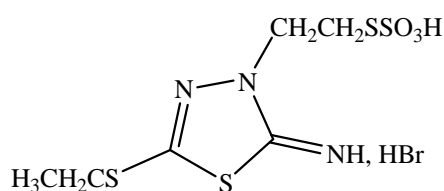
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 14,98 (CH₃), 31,46 (CH₂S), 45,12 (NCH₂), 64,43 (CH₂CH₃), 109,01 (C₈-aryl), 114,70 (C₇-aryl), 115,71 (C₅-aryl), 123,89 (C₄-aryl), 132,50 (C₉-aryl), 156,70 (C₆-aryl), 167,99 (C₂-aryl).

Spectre de masse : m/z = 334 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₁H₁₄N₂O₄S₃) : Calc.% : C, 39,50 ; H, 4,22 ; N, 8,38. Exp.% : C, 38,42 ; H, 4,10 ; N, 8,12.

Point de fusion : 256-258 °C (déc).

II.3.7.4. Acide S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (**34**)



A une solution de thiosulfate de sodium (0,98 g, 3,95 mmol) dans 40 ml d'eau est ajoutée une solution de 3-bromoéthyl-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-imine **29** (1,00 g, 3,73 mmol) dans un mélange éthanol/eau (20 ml/10 ml). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant une heure trente puis concentré sous pression réduite. Le solide obtenu est lavé dans de l'éthanol (15 ml) à chaud puis filtré. Le produit obtenu est lyophilisé. On obtient 0,12 g du dérivé **34** (0,39 mmol ; Rdt : 11%).

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,33 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,17 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,32 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$, $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 4,44 (t, 2H, N-CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 9,90 (s, 1H, NH).

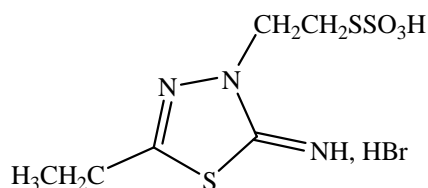
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 13,75 (CH_3), 28,59 (CH_2CH_3), 32,54 (CH_2S), 49,81 (NCH_2), 132,60 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 173,68 ($\text{C}_2\text{-aryl}$).

Spectre de masse : $m/z = 300$ $[\text{M}-1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_4$) : Calc.% : C, 23,91 ; H, 3,68 ; N, 13,94. Exp.% : C, 24,15 ; H, 3,32 ; N, 14,06.

Point de fusion : 180-182 °C (déc).

II.3.7.5. Acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl
thiosulfonique (**35**)



A une solution de thiosulfate de sodium (1,12 g, 4,49 mmol) dans 40 ml d'eau est ajoutée une solution de 3-bromoéthyl-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-imine **30** (1,00 g, 4,23 mmol) dans un mélange éthanol/eau (20 ml/10 ml). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant une heure trente puis concentré sous pression réduite. Le solide obtenu est lavé dans de l'éthanol (15 ml) à chaud puis filtré. Le produit obtenu est lyophilisé. On obtient 0,16 g du dérivé **35** (0,59 mmol ; Rdt : 14%).

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 1,23 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 2,95 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 3,07 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$, $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 4,02 (t, 2H, N-CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 6,00$ Hz), 9,90 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 12,79 (CH_3), 24,10 (CH_2CH_3), 35,39 (CH_2S), 49,29 (NCH_2), 159,72 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 168,00 ($\text{C}_2\text{-aryl}$).

Spectre de masse : $m/z = 274$ $[\text{M}+1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_3$) : Calc.% : C, 26,75 ; H, 4,12 ; N, 15,60. Exp.% : C, 27,04 ; H, 3,98 ; N, 15,45.

Point de fusion : 212-214 °C (déc).

II.3.8. Synthèse des phosphorothioates

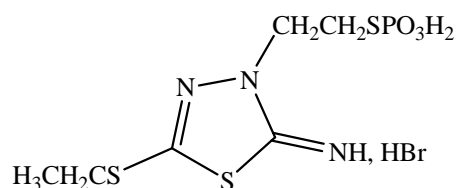
II.3.8.1. Synthèse du thiophosphate de lithium

A une solution de LiOH 56 % (40,00 g, 0,93 mmol) dans 300 ml d'eau est ajoutée goutte à goutte du chlorure de thiophosphoryle (29,05 g, 0,17 mmol). La réaction est exothermique. L'agitation est maintenue à température ambiante jusqu'à disparition du dégagement gazeux blanc formé à la surface du mélange. Le mélange est ensuite refroidi dans un bain de glace puis de l'acétone (200 ml) est ajoutée.

Le précipité formé est filtré puis recristallisé trois fois dans un mélange eau/acétone (1/3, 50 ml/150 ml). On obtient 15,85 g de thiophosphate de lithium (0,12 mmol ; Rdt : 70 %).

RMN ^{31}P (D_2O ; δ , ppm) : 31,98

II.3.8.2. S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate(**36**)



A une suspension de $\text{Li}_3\text{SPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,99 g, 5,32 mmol) dans l'eau (24 ml) est ajoutée le 3-bromoéthyl-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-imine **29** (1,92 g, 5,50 mmol). Puis 12 ml de diméthylformamide sont ajoutés jusqu'à dissolution totale du solide. Le mélange est agité pendant trois heures à température ambiante. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le résidu obtenu et repris dans 10 ml d'acétone puis lavé avec 10 ml de méthanol. Le précipité obtenu est séché sous pression réduite conduisant à 320 mg du dérivé **36** (1,06 mmol ; Rdt : 20 %).

RMN ^1H (300,13 MHz, D_2O , δ , ppm) : 1,31 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 3,00 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-S}$ et CH_2SP), 4,28 (t, 2H, N-CH_2 , $^3J_{\text{H-H}} = 9,00$ Hz), 7,80 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75,46 MHz, D_2O , δ , ppm) : 11,78 (CH_3), 27,76 (CH_2CH_3), 28,54 (CH_2S), 50,68 (NCH_2), 158,73 ($\text{C}_5\text{-aryl}$), 168,45 ($\text{C}_2\text{-aryl}$).

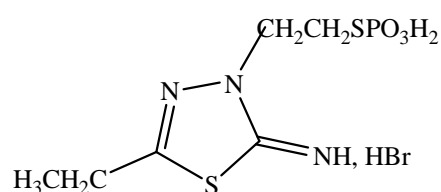
RMN ^{31}P (D_2O ; δ , ppm) : 15,80.

Spectre de masse : $m/z = 308 [M+1]^+$

Analyse élémentaire (C₆H₁₁LiN₃O₃PS₃) : Calc.% : C, 23,45 ; H, 3,61 ; N, 13,67. Exp.% : C, 23,06 ; H, 3,89 ; N, 13,78.

Point de fusion : 250-252 (dec).

II.3.8.3. S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (**37**)



A une suspension de Li₃SPO₃, 5H₂O (1,20 g, 6,45 mmol) dans l'eau (30 ml) est ajoutée le 3-bromoéthyl-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-imine (2,13 g, 6,72 mmol). Puis 12 ml de DMF sont ajoutés jusqu'à dissolution totale du solide. Le mélange est agité pendant trois heures à température ambiante. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le résidu obtenu et repris avec 10 ml d'acétone puis lavé dans 10 ml de méthanol. Le solide obtenu est séché sous pression réduite conduisant à 600 mg du dérivé **37** (2,6 mmol ; Rdt : 32 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, D₂O, δ, ppm) : 1,25 (t, 3H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 2,81 (q, 2H, CH₂CH₃, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 3,06 (t, 2H, CH₂-S, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 4,32 (t, 2H, N-CH₂, ³J_{H-H} = 9,00 Hz), 7,80 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75,46 MHz, D₂O, δ, ppm) : 11,83 (CH₃), 23,74 (CH₂CH₃), 27,90 (CH₂S), 49,59 (NCH₂), 158,73 (C₅-aryl), 167,82 (C₂-aryl).

RMN ³¹P (D₂O ; δ, ppm) : 15,80.

Spectre de masse : $m/z = 275 [M+1]^+$

Analyse élémentaire (C₆H₁₁LiN₃O₃PS₂) : Calc.% : C, 26,18 ; H, 4,03 ; N, 15,27. Exp.% : C, 25,99 ; H, 4,43 ; N, 15,06.

Point de fusion : 250-252 (dec).

II.3.9. Synthèse du *N*-(3-aminopropyl)-2-
aminoéthylphosphorothioate (WR-2721)

II.3.9.1. Synthèse du *N*-(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine



Dans un bicol, surmonté d'un Dean Stark, est ajouté à une solution de *N*-(2-hydroxyéthyl)-1,3-propanediamine (25 ml, 211 mmol) une solution d'acide bromhydrique aqueux 48 % goutte à goutte et sous agitation (200 ml, 1,75 mol). Le mélange est porté à reflux jusqu'à élimination totale de l'eau.

Le résidu marron est repris avec 40 ml de méthanol. Puis 100 ml d'acétone sont ajoutés, sous agitation, à la solution. Le précipité blanc obtenu est filtré et puis séché sur P₂O₅. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par 50 ml d'acétone. Le précipité obtenu est filtré puis séché sous vide en présence de P₂O₅. On obtient 67,40 g du dérivé bromé (198,8 mmol ; Rdt : 94 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, D₂O, δ, ppm) : 2,10 - 2,14 (m, 2H), 3,09 - 3,21 (m, 4H), 3,44 - 3,70 (m, 4H).

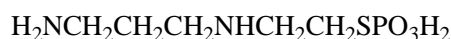
RMN ¹³C (75,46 MHz, D₂O, δ, ppm) : 23,64 (CH₂Br), 26,06 (CH₂CH₂CH₂), 36,66 (H₂NCH₂), 44,59 (CH₂CH₂CH₂), 49,33 (CH₂CH₂Br).

Spectre de masse : m/z = 181 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₅H₁₃BrN₂) : Calc. % : C, 33,17 ; H, 7,24. Exp. % : C, 34,02 ; H, 6,39

Point de fusion : 205-207 °C.

II.3.9.2. Synthèse du *N*-(3-aminopropyl)-2-
aminoéthylphosphorothioate



A une solution de Na₃SPO₃ anhydre (3,46 g, 19,25 mmol) dans 19 ml d'eau à 30 °C est ajouté sous agitation le *N*-(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine (6,60 g, 19,25 mmol). Après dissolution totale, 1,5 ml de DMF sont ajoutés.

Le mélange est agité une nuit à 30°C. 150 ml de méthanol sont ajoutés. Le précipité blanc obtenu est recristallisé trois fois dans un mélange méthanol/eau (4/1). On obtient 2,3 g du dérivé phosphoré (10,70 mmol ; Rdt : 56 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, D₂O, δ, ppm) : 2,02 - 2,12 (m, 2H), 2,89 - 2,98 (m, 2H), 3,06 - 3,15 (m, 4H), 3,32 - 3,35 (m, 2H).

RMN ¹³C (75,46 MHz, D₂O, δ, ppm) : 23,78 (CH₂CH₂CH₂), 25,44 (H₂NCH₂), 36,50 (NHCH₂CH₂SH), 44,35 (CH₂CH₂CH₂NH), 50,39 (CH₂S).

RMN ³¹P (D₂O ; δ, ppm) : 15,72.

Spectre de masse : m/z = 215 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₅H₁₅N₂O₃PS) : Calc. % : C, 28,03 ; H, 7,06. Exp.% : C, 27,63 ; H, 7,46.

Point de fusion : 151-153 °C

II.3.10.Synthèse du 2-(3-aminopropylamino)éthanethiol (WR-1065)



A une solution de NaSH (1,50 g, 26,78 mmoles) dans 85 ml de méthanol est ajouté à -10 °C sous agitation le *N*-(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine (3,00 g, 16,67 mmol). Le mélange est agité une heure à 0 °C puis une nuit à température ambiante. Le mélange est évaporé sous pression réduite, le résidu est repris par 6 ml d'éthanol sec. Le solide obtenu est filtré puis séché sous vide. On obtient 620 mg de WR-1065 (4,63 mmol ; Rdt : 28 %).

RMN ¹H (300,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,76 - 1,81 (m, 4H), 2,65 - 2,96 (m, 6H)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 26,64 (CH₂S), 36,07 (CH₂CH₂CH₂), 37,85 (H₂NCH₂), 45,29 (CH₂CH₂CH₂NH), 47,53 (NHCH₂CH₂SH).

Spectre de masse : m/z = 135 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₅H₁₄N₂S) : Calc. % : C, 44,73 ; H, 10,51. Exp.% : C, 44,03 ; H, 11,21

Point de fusion :

CHAPITRE III :

ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET

RADIOPROTECTRICE *IN VITRO*

I. INTRODUCTION

Avant d'étudier le pouvoir radioprotecteur chez l'animal des composés synthétisés, nous avons choisi d'évaluer *in vitro* leur activité antioxydante et radioprotectrice. Cette étude se déroule en plusieurs étapes :

- l'évaluation des propriétés antioxydantes en raison de la production de radicaux oxygénés lors d'une irradiation
- l'évaluation de la protection de l'ADN, principale cible des rayonnements ionisants
- le développement d'une approche mécanistique et d'un modèle d'étude de relation structure-activité (QSAR)

Afin de répondre à l'ensemble de ces objectifs, les propriétés antioxydantes sont évaluées au moyen de tests simples par spectrophotométrie UV-visible avec des radicaux stables tels que le 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH) et l'acide de 2,2'-Azinobis-(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique) (ABTS) et par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE). La protection de l'ADN est ensuite évaluée en soumettant de l'ADN plasmidique soit à une réaction de Fenton, réalisée *in situ*, soit à une irradiation gamma par une source au Cobalt 60. Ces irradiations sont réalisées à l'ONERA (Office National d'Etudes et de Recherches Aérospatiales). Les lésions de l'ADN sont révélées par électrophorèse sur gel d'agarose. Enfin, nous avons développé deux types d'études théoriques : une étude de la théorie de la fonctionnelle de la densité (Density Functionnal Theory (DFT)) et une étude Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR). Les résultats de ces derniers travaux seront présentés et discutés dans le chapitre IV.

Notre travail commence par l'étude de la naphthylméthylimidazoline (Naphazoline) connue pour avoir des propriétés radioprotectrices intéressantes chez l'animal lors d'études préliminaires [104] dans le but d'approfondir son mécanisme d'action encore inconnu *in vitro*. Il s'agit d'une étude comparative avec le WR-2721, choisi comme référence dans le domaine. La seconde partie de ce chapitre concerne la caractérisation des propriétés antioxydantes et radioprotectrices des composés dont la synthèse est décrite dans le chapitre précédent.

¹⁰⁴ Laval J.D. et. al. Eur. J. Med. Chem. **28**, 709-713, 1993.

II. ETUDE DE LA NAPHAZOLINE

II.1. Introduction

La naphthylméthylimidazoline ou Naphazoline (NP) est un composé entrant dans la composition de certains collyres. En effet, la Naphazoline, de par ses propriétés alpha-sympathomimétiques est à l'origine d'un effet vasoconstricteur [105]. Elle agit comme un antagoniste des récepteurs dopaminergiques, propriété expliquant son effet sédatif au niveau du système nerveux central. Son utilisation est indiquée dans le traitement de certaines affections telles que des rhinites, laryngites, conjonctivites [106]...

Durant ces dernières années, la Naphazoline a fait l'objet de nombreuses études relatives à ses propriétés radioprotectrices. En effet, elle s'avère être un bon radioprotecteur dont le FRD (rapport des doses qui provoquent 50 % de mortalité à 30 jours, respectivement chez les animaux protégés et chez les animaux non protégés) atteint 1,5 lorsque le composé est injecté, chez la souris, à une dose de 30 mg/kg, par voie intrapéritonéale, 15 minutes avant une irradiation [104]. Cependant, sa toxicité, toujours chez la souris, n'en reste pas moins élevée puisqu'elle est de 50 mg/kg. L'intérêt de ce composé vient de la présence d'un noyau imidazole, connu pour apporter un effet radioprotecteur. C'est pourquoi, certains dérivés de la Naphazoline ont été synthétisés afin d'augmenter le pouvoir radioprotecteur d'une part et d'autre part de diminuer la toxicité ; il s'agit pour l'essentiel de dérivés phosphorés, par analogie au WR-2721, et de dérivés organométalliques (métallathiazolidines et métalladithioacétals). Concernant les dérivés phosphorés, il est mis en évidence une augmentation notable du pouvoir radioprotecteur chez la souris avec des FRD allant de 1,60 à 1,84 sans grande variation de la toxicité [107]. Par contre, concernant les dérivés organométalliques, il est montré une influence importante du métal dans l'activité et dans la toxicité. En effet, qu'il s'agisse du germanium ou du silicium, les structures synthétisées (métallathiazolidines, métalladithioacétals) procurent une diminution de la toxicité des dérivés de base purement organiques et une exaltation, parfois très importante, de leurs propriétés radioprotectrices [108, 109].

¹⁰⁵ Szabo B. Pharmacol. Therap. **93**, 1-35, 2002.

¹⁰⁶ Ogidigben M.J., Chu, T.C., Potter, D.E. Exp. Eye Res. **72**, 331-9, 2001.

¹⁰⁷ Céleriès B. et al. Radioprotection, **40(1)**, 57-71, 2005.

¹⁰⁸ Celaries B. et al. Metal Based Drugs, **8**, 199-210, 2001.

¹⁰⁹ Rima G. et al. Eur. J. Med. Chem. **28**, 761-767, 1993.

Malgré tout, le mécanisme d'action impliqué dans l'effet radioprotecteur apporté par la Naphazoline reste encore inconnu. C'est pourquoi, nous avons choisi de mettre en évidence les propriétés antioxydantes et de protection de l'ADN de la Naphazoline, jusqu'à présent non décrites, par des tests simples *in vitro* présentés ci-dessous. Ces travaux ont donné lieu à une publication [110].

II.2. Mise en évidence de la protection de l'ADN en présence de la Naphazoline après une irradiation gamma

II.2.1. Introduction

Afin d'évaluer le pouvoir radioprotecteur de la Naphazoline et du WR-2721, vis à vis de l'ADN, nous soumettons de l'ADN plasmidique Φ 174 (4361 bp, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) à une irradiation gamma par une source au Cobalt 60, en présence et en absence de ces deux composés. Les irradiations sont réalisées à l'ONERA (Office National d'Etudes et de Recherches Aérospatiales) à Toulouse. En effet, comme il est mentionné dans le premier chapitre, l'ADN contenu dans le noyau des cellules constitue la cible principale des rayonnements ionisants. Les modifications de l'ADN consécutives à une irradiation peuvent être réparées pour certaines, mais pour d'autres, elles peuvent persister et être à l'origine de mutations, de mort cellulaire ou de phénomène de cancérisation. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser de l'ADN plasmidique comme modèle d'étude.

II.2.2. Conditions expérimentales

Différentes solutions contenant de l'ADN plasmidique Φ 174 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, 4361 pb) dans 30 μ L de tampon phosphate 5 mM (pH 7,4, NaCl 10 mM) ont été exposées à une irradiation par une source Cobalt 60 à différentes doses (débit de dose à 50 Gy/h) à 25°C en présence et en absence des différents composés. La quantité d'ADN utilisée par échantillon est de 0,5 μ g (16,7 μ g/ml). Les doses d'irradiation sont similaires à celles utilisées dans la littérature pour des tests semblables [111].

¹¹⁰ Prouillac C., Célariès B., Vicendo P., Rima G. C. R. *Biologies*, **329(3)**, 196-199, 2006.

¹¹¹ Kumar S.S., Chaubey R.C., Devasagayam T.P.A., Priyadarsini K.I. *Mutat. Res.* **425**, 71-79, 1999.

L'ADN plasmidique se présente sous la forme d'un ADN double brin circulaire superenroulé (forme I). Lorsqu'il subit une coupure simple brin, il passe à une forme double brin circulaire relaxée (forme II) qui migre moins loin sur le gel d'agarose. Enfin, une coupure double brin conduit à un ADN linéarisé (forme III) qui migre entre les formes I et II. Ces différentes formes sont séparées par migration électrophorétique et révélées par le bromure d'éthyidium.

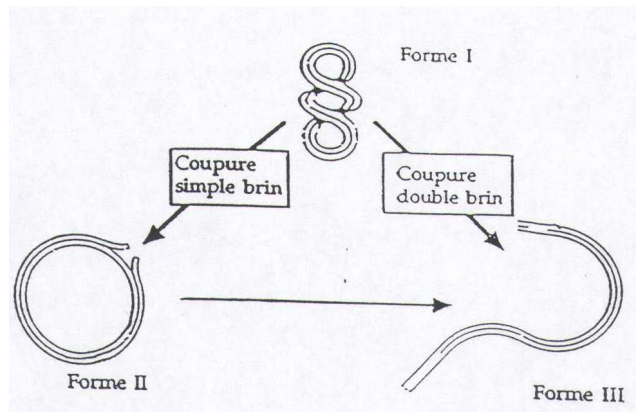


Figure 16 : Les différentes formes d'ADN plasmidique.

Les coupures de l'ADN consécutives à l'irradiation ont donc été révélées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 25 μ l de bromure d'éthyidium (10 mg/ml). Après irradiation, 10 μ L de bleu de bromophénol (75% glycérol, 24,95 % tampon Tris, 0,05 % bleu de bromophénol) sont ajoutés à chaque échantillon. La migration est réalisée pendant 16 heures à 20 V dans du tampon tris borate EDTA (10,8 g/L de tris(hydroxyméthyl)aminométhane, 5,5 g/L acide borique, 0,93 g/L d'EDTA). Le gel est ensuite analysé et les différentes formes d'ADN plasmidique ont été révélées par illumination sur une table UV à 254 nm. Après photographie, une quantification des bandes a été réalisée par densitométrie à l'aide d'un logiciel Mesurim.

Les dommages induits par les rayonnements γ ont été estimés par l'augmentation de la quantité de la forme circulaire relaxée. Le nombre de cassures simple brin par molécule d'ADN générées par les rayonnements a été évalué par le pourcentage de forme circulaire relaxée (% Forme II) selon la formule suivante :

$$\% \text{ FII} = 100 * \left(\frac{\text{Forme circulaire relaxée}}{\text{Forme circulaire relaxée ADN} + \text{Forme superenroulée} \times 1.66} \right)$$

FII = Forme Circulaire Relaxée

Le coefficient de 1,66 a été affecté à la forme superenroulée en raison d'une plus faible fluorescence du bromure d'éthydiu lorsqu'il est lié à la forme superenroulée. La forme très compacte de l'ADN superenroulée ne permet pas une bonne intercalation du bromure d'éthydiu entre ses paires de bases.

Nous avons également pu calculer les pourcentages de protection de la façon suivante :

$$\% \text{ protection} = 100 * \frac{P_F - T_{NT}}{T_F - T_{NT}}$$

Avec P_F = Produit + ADN + Fenton ; T_{NT} = témoin ADN non traité ; T_F = témoin ADN traité.

Un test t de Student a été réalisé afin de mettre en évidence l'effet protecteur des nos composés. Nous avons comparé les échantillons ADN traité + produit avec le témoin non traité c'est à dire l'ADN natif (** différence très significative $p < 0,01$; * différence significative $p < 0,05$) à l'aide du logiciel GraphPad InStat version 3.00.

II.2.3. Résultats

Après irradiation de l'ADN plasmidique en présence et en absence des différents composés et après électrophorèse sur gel d'agarose, nous déterminons les pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée (soit le pourcentage de cassures simple brin) et les pourcentages de protection correspondants. Les concentrations utilisées en Naphazoline et en WR-2721 sont les suivantes : 0,5, 1, 5 et 10 mM.

Les pourcentages de cassures simples brins obtenus après irradiation gamma en absence et en présence de Naphazoline et de WR-2721, en fonction de leur concentration, sont représentés figure 17.

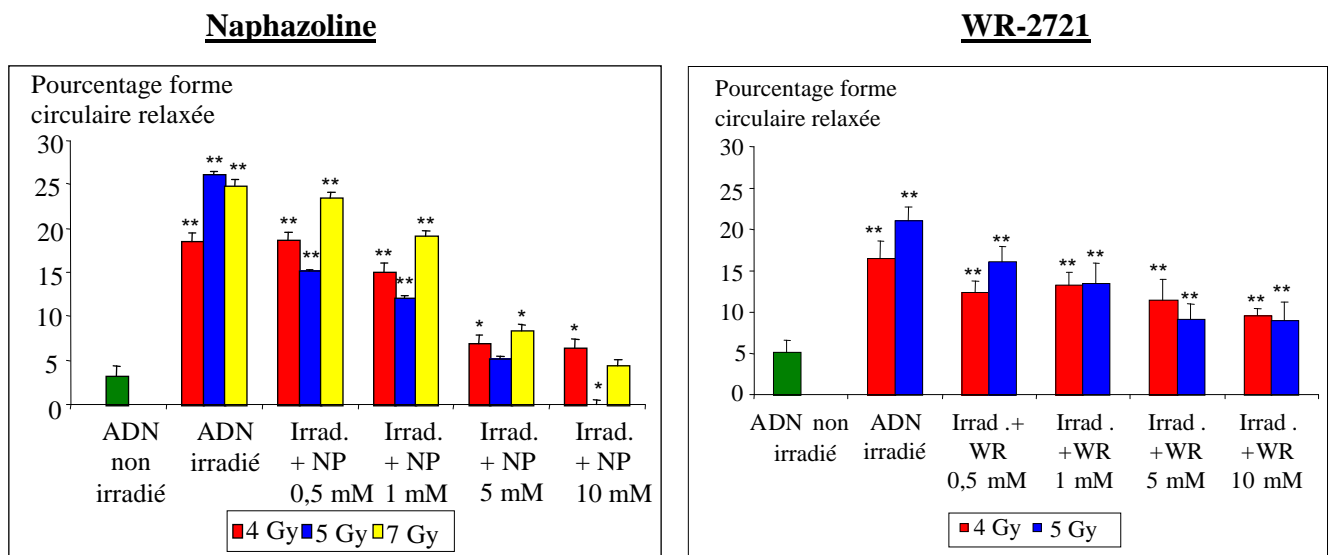


Figure 17 : Pourcentage de cassures simples brins après irradiation gamma à différentes doses (4, 5, 7 Gy) en présence et en absence de Naphazoline et du WR-2721 à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM). Tous les échantillons ont été réalisés en triplicates et sont représentés, sous forme d'histogramme, les pourcentages moyens obtenus et les écarts types. * produit + irradiation gamma versus témoin non irradié, $p < 0,05$, ** produit + irradiation gamma versus témoin non irradié, $p < 0,01$.

Une étude statistique est réalisée visant à comparer par un test de Student les moyennes des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée dans les échantillons traités par la réaction de Fenton en présence de produits avec la moyenne du pourcentage d'ADN sous forme circulaire relaxée dans le témoin non traité par la réaction de Fenton (** : différence très significative, * : différence significative).

Les rayonnements gamma induisent des cassures simples brins. Le taux de coupures simple brin augmente avec la dose d'irradiation. Concernant l'expérimentation en présence de Naphazoline, les pourcentages de cassures générées par différentes doses d'irradiation sont évalués à $18,67 \pm 0,99$ % à 4 Gy, $26,05 \pm 0,33$ % à 5 Gy et à $24,61 \pm 0,75$ % à 7 Gy contre $3,13 \pm 1,23$ % en absence d'irradiation.

Pour l'expérimentation en présence de WR-2721, ces taux de coupures sont évalués à $16,44 \pm 2,13$ % à 4 Gy et $21,12 \pm 1,54$ % à 5 Gy contre $5,12 \pm 1,45$ % en absence d'irradiation. Les pourcentages de coupures obtenus, dans les deux expériences, après irradiation en absence de composé sont significativement différents des témoins non traités, c'est à dire non irradié et en absence des composés. ($p < 0,01$).

L'addition de Naphazoline dans le milieu induit une diminution du pourcentage de cassures simple brin après une irradiation gamma et quelle que soit la dose d'irradiation. De plus, cet effet est d'autant plus important que la concentration en Naphazoline augmente. Nous avons donc une relation dose-effet.

D'autre part, quelle que soit la dose d'irradiation, nous obtenons une protection maximale à la concentration de 5 mM ($75,60 \pm 0,94$ % à 4 Gy). Ceci démontre l'effet protecteur vis à vis de l'ADN apporté par la Naphazoline.

Concernant le WR-2721, nous observons également une diminution du pourcentage de cassures simples brins lorsque la concentration en produit augmente, et ce quelle que soit la dose d'irradiation. Cependant, contrairement à la Naphazoline, nous n'observons pas une protection totale de l'ADN, même aux concentrations les plus élevées ($44,54 \pm 2,56$ % à 4 Gy). Les pourcentages moyens de coupure obtenus en présence de WR-2721 à 10 mM restent encore significativement différents du pourcentage de coupure dans l'échantillon non irradié.

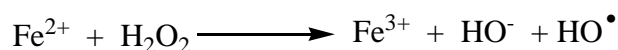
En conséquence, dans nos conditions, la Naphazoline semble plus efficace que le WR-2721. Cependant, il ne faut pas oublier que le WR-2721 est une prodrogue du WR-1065 à l'origine de l'effet protecteur. Il semble que le passage par ce métabolite soit indispensable à l'observation d'un effet et que les rayonnements ionisants n'induisent pas sa formation.

Il est à noter que l'effet radioprotecteur de la Naphazoline, *in vitro*, s'effectue à des concentrations élevées. Ceci suggère qu'*in vivo* les effets physiologiques de cette molécule, en particulier, son effet alpha sympathomimétique, agissent en synergie avec son activité antioxydante. L'effet vasoconstricteur de la Naphazoline pourrait être à l'origine d'une diminution de l'effet oxygène. Dans nos conditions expérimentales, l'effet radioprotecteur observé de ce composé résulte de ses capacités à piéger les radicaux oxygénés formés *in situ*. Différents processus d'hydroxylation sur la molécule elle-même ou de donation d'hydrogène peuvent être envisagés.

II.3. Mise en évidence des dommages de l'ADN après réaction de Fenton en présence et en absence de la Naphazoline (NP)

II.3.1. Introduction

L'effet majeur des radiations étant la radiolyse de l'eau, nous simulons cette radiolyse par une réaction de Fenton afin de mettre en évidence une protection (ou non) de l'ADN vis-à-vis de l'attaque des radicaux hydroxyles [112,113]. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, le fer ferreux est oxydé en fer ferrique avec production de radicaux hydroxyles.



Cette réaction est connue depuis 1894, lorsque Fenton rapporte que certains alcools peuvent être oxydés en présence de peroxyde d'hydrogène et d'ions ferreux $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ [114]. Ce type de réaction est la principale source d'espèces réactives du dioxygène en solution [115,116] en biologie. Cependant, le mécanisme de cette réaction reste ambigu et continuellement controversé dans de nombreuses publications. Yamazaki *et al.* proposent le passage par un ion ferryl ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) capable d'arracher un hydrogène acide [117].

¹¹² Frelon S., Douki T., Favier A., Cadet J. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 2866-2870, 2002.

¹¹³ Zhao C., et al. Biochemica et Biophysica Acta, **1723**, 114-123, 2005.

¹¹⁴ Fenton H.J.H. J. Chem. Soc. **65**, 899-910, 1894.

¹¹⁵ Puppo A. Phytochemistry **31**, 85-88, 1992.

¹¹⁶ Yoshiki Y., Okubo K., Onuma M., Igarashi K. Phytochemistry **39**, 225-229, 1995.

¹¹⁷ Yamazaki, I., Piette, L. H. J. Am. Chem. Soc., **113**, 7588-7593, 1991.

Dans notre mode opératoire, nous réalisons la réaction de Fenton en présence d'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA). Généralement, l'EDTA a pour rôle de former un complexe avec le Fe(II) et le Fe(III). Le complexe Fe(II)-EDTA permet d'éviter la liaison du Fe(II) avec le radical hydroxyle et ainsi il contribue à promouvoir la dégradation du peroxyde d'hydrogène et la formation des radicaux oxygénés [118]. Par ailleurs, l'addition d'EDTA améliore la solubilisation des oxydes de fer ferrique et ainsi favorise la réaction d'oxydo-réduction du fer [119].

L'EDTA peut également réagir directement avec l'eau oxygénée pour former des radicaux hydroxyles [120,121]. Cependant un excès d'EDTA peut neutraliser les radicaux OH[•] [122,123]. C'est pourquoi il est important d'optimiser le ratio Fe(II)/EDTA. Selon Shao-An Cheng [118], il est conseillé d'utiliser un rapport 1:1.

II.3.2. Conditions expérimentales

A une solution aqueuse d'ADN plasmidique Φ 174 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, 4361 pb) dans du tampon phosphate 5 mM (pH 7,4, NaCl 10 mM) sont ajoutées des quantités variables des composés testés (Naphazoline et WR-2721) eux mêmes en solutions dans du tampon phosphate. La quantité d'ADN utilisée par échantillon est de 0,5 μ g (16,7 μ g/ml). La réaction de Fenton est réalisée en ajoutant des solutions fraîchement préparées de sel de Mohr (sulfate d'ammonium ferreux, ACS reagent, 100 μ M), de peroxyde d'hydrogène à 30 % (100 μ M) et d'EDTA (Sigma Aldrich, 100 μ M). Les échantillons, d'un volume final de 30 μ L, sont ensuite incubés à 37 °C pendant 12 minutes. La réaction de Fenton est bloquée par addition d'une solution de mésylate de desferoxamine (concentration finale de 0,18 mM).

Comme précédemment, les coupures de l'ADN consécutives à l'attaque des radicaux oxygénés ont donc été révélées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 25 μ L de bromure d'éthydiuim (10 mg/mL) après addition à chaque échantillon de 8 μ L de bleu de bromophénol (75 % glycérol, 24,95 % tampon Tris, 0,05 % bleu de bromophénol). La migration est réalisée pendant 16 heures à 20 V dans du tampon tris borate EDTA (10,8 g/L de tris(hydroxyméthyl)aminométhane, 5,5 g/L acide borique, 0,93 g/L d'EDTA).

¹¹⁸ Cheng S.A., Fung W.K., Chan K.Y., Shen P.K. *Chemosphere*, **52**, 1797-1805, 2003.

¹¹⁹ Blesa M.A., Morando P.J., Regazzoni A.E. *Chemical Dissolution of Metal Oxides*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994

¹²⁰ Gutteridge J.M.C., Bannister J.V. *Biochem. J.* **234**, 225-228, 1986.

¹²¹ Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M. *J. Biol. Chem.* **264**, 20509-20512, 1989.

¹²² Walling C., Partch R.E., Weil T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 140-142, 1975.

¹²³ Zhao M.J., Jung L., Tanielian C., Mechin R. *Free Radical Res.* **20**, 345-363, 1994.

Le gel est ensuite analysé et les différentes formes d'ADN plasmidiques révélées par illumination sur une table UV à 254 nm. Après photographie, une quantification a été réalisée par densitométrie à l'aide d'un logiciel Mesurim.

Les dommages induits par les radicaux oxygénés ont été estimés par l'augmentation de la quantité de la forme circulaire relaxée. Le nombre de cassures simple brin par molécule d'ADN générées par les radicaux oxygénés a été évalué par le pourcentage de forme circulaire relaxée (% Forme II) selon la formule suivante :

$$\% \text{ FII} = 100 * \left(\frac{\text{Forme circulaire relaxée}}{\text{Forme circulaire relaxée ADN} + \text{Forme superenroulée} \times 1.66} \right)$$

FII = Forme Circulaire Relaxée

Le coefficient de 1,66 a été affecté à la forme superenroulée en raison d'une plus faible fluorescence du bromure d'éthidium lorsqu'il est lié à la forme superenroulée. La forme très compacte de l'ADN superenroulée ne permet pas une bonne intercalation du bromure d'éthidium entre ses paires de bases.

Nous avons également pu calculer les pourcentages de protection de la façon suivante :

$$\% \text{ protection} = 100 * \frac{P_F - T_{NT}}{T_F - T_{NT}}$$

Avec P_F = Produit + ADN + Fenton ; T_{NT} = témoin ADN non traité ; T_F = témoin ADN traité.

Un test *t* de Student a été réalisé afin de mettre en évidence l'effet protecteur des nos composés. Nous avons comparé les échantillons ADN traité + produit avec le témoin non traité c'est à dire l'ADN natif (** différence très significative $p < 0,01$; * différence significative $p < 0,05$) à l'aide du logiciel GraphPad InStat version 3.00.

II.3.3. Résultats

Après traitement de l'ADN plasmidique par une réaction de Fenton en présence et en absence des différents composés, l'électrophorèse sur gel d'agarose, nous permet de déterminer les pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée et les pourcentages de protection correspondants. Les concentrations utilisées en Naphazoline et en WR-2721 sont les mêmes que celles utilisées dans le test précédent.

Les résultats obtenus sont représentés figure 18 où sont exprimés les pourcentages de cassures simples brins, consécutives à l'attaque des radicaux hydroxyles, en fonction de la concentration en Naphazoline et en WR-2721.

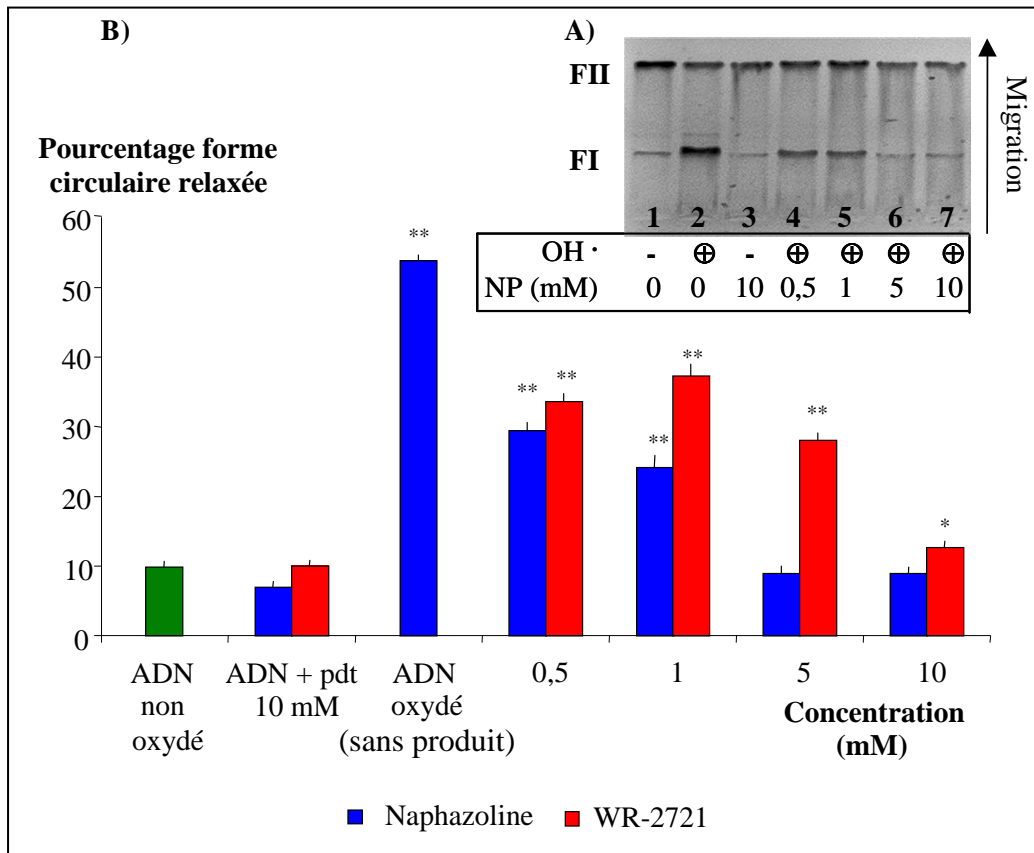


Figure 18 : (A) Gel d'électrophorèse de l'ADN $\Phi 174$ exposé aux radicaux $OH\cdot$ générés par la réaction de Fenton en présence et en absence de la Naphazoline (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 mM). Colonne 1 : ADN non traité, colonne 2 : ADN exposé aux $OH\cdot$, colonne 3 : ADN en présence de NP (10 mM), colonne 4 : ADN exposé aux $OH\cdot$ en présence de NP (0,5 mM), colonne 5 : ADN exposé aux $OH\cdot$ en présence de NP (1 mM), colonne 6 : ADN exposé aux $OH\cdot$ en présence de NP (5 mM), colonne 7 : ADN exposé aux $OH\cdot$ en présence de NP (10 mM). FI = Forme superenroulée, FII = forme circulaire relaxée. (B) Pourcentage de cassures simple brin générées par les radicaux $OH\cdot$ issus de la réaction de Fenton en présence et en absence de NP et de WR-2721 à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 mM). Tous les échantillons ont été réalisés en triplicates et les valeurs figurées sont des valeurs moyennes \pm écarts types. * produit + réaction de Fenton versus témoin non traité, $p < 0,05$, ** produit + réaction de Fenton versus témoin non traité, $p < 0,01$.

Une étude statistique est réalisée visant à comparer par un test de Student les moyennes des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée dans les échantillons traités par la réaction de Fenton en présence de produits avec la moyenne du pourcentage d'ADN sous forme circulaire relaxée dans le témoin non traité par la réaction de Fenton (** : différence très significative, * : différence significative).

Comme il est représenté figure 18, les radicaux oxygénés induisent des cassures simples brins alors que la Naphazoline et le WR-2721 n'ont aucun effet délétère sur l'ADN plasmidique. Dans nos conditions, nous obtenons $53,80 \pm 0,77$ % d'ADN sous forme circulaire relaxée lorsque nous le soumettons à une réaction de Fenton ; les radicaux hydroxyyles génèrent des cassures simple brin. De plus, dans le témoin non traité, nous avons $10,06 \pm 0,87$ % d'ADN sous forme circulaire relaxée. La différence des pourcentages moyens de coupures entre ces deux échantillons est significative ($p < 0,01$).

L'addition de Naphazoline entraîne une nette diminution des coupures de l'ADN, et ce dès la concentration de 0,5 mM. A cette concentration, environ 45,3 % de l'apparition de coupure simple brin a été inhibée. Cet effet est observé également avec le WR-2721 mais la diminution est moins importante : l'inhibition est dans ce cas de 37,6 % à 0,5 mM.

En présence de Naphazoline, la protection de l'ADN augmente avec la concentration pour atteindre un effet maximal à 5 mM, lorsque l'ADN est protégé en totalité. En effet, il n'y a pas pour cette concentration de différence significative entre le pourcentage moyen de cassure dans le témoin non traité et le pourcentage moyen obtenu à 5 mM ($9,94 \pm 0,94$ % d'ADN sous forme circulaire relaxée). Cette concentration est similaire à celle obtenue avec un autre composé testé en tant que radioprotecteur, le verbascoside [124].

Avec le WR-2721, cette protection reste toujours moins importante en comparaison avec la Naphazoline. En effet, à 5 mM, il reste encore $28,04 \pm 0,66$ % d'ADN sous forme circulaire relaxée. Une protection quasi-totale est obtenue à 10 mM avec $12,67 \pm 1,09$ % de coupures simples brins ; la différence est significative avec le témoin non traité ($p < 0,05$) pour lequel nous observons $9,80 \pm 0,87$ % de coupures simple brin.

¹²⁴ Zhao C. al. Biochem. Biophys. Acta, **1723(1-3)**, 114-123, 2005.

Les résultats obtenus avec la Naphazoline montrent que l'effet radioprotecteur observé chez l'animal résulte en partie de l'inhibition de l'effet indirect des rayonnements ionisants. Afin de confirmer les propriétés antioxydantes de la Naphazoline, nous avons entrepris une étude par résonance paramagnétique électronique.

Par contre, même si les concentrations nécessaires en WR-2721 pour obtenir un effet antioxydant sont plus élevées que celles utilisées avec la Naphazoline, ce résultat ne remet pas en cause l'efficacité de ce produit. En effet, comme nous le mentionnions précédemment, le WR-2721 est une prodrogue, son métabolite actif, le WR-1065, est à l'origine de l'effet radioprotecteur.

Dans le cas du WR-2721, il semble indispensable qu'il y ait un clivage de la liaison S-P pour qu'il y ait une activité. Cette réaction ne peut être induite par les radicaux hydroxyles. L'activité antioxydante que nous mesurons dans ces conditions est donc uniquement celle du WR-2721 et non celle du produit issu de son hydrolyse, le WR-1065.

II.4. Etude par Résonance Paramagnétique Electronique du mécanisme de capture des radicaux hydroxyles par la Naphazoline

II.4.1. Introduction

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de choix pour détecter les espèces paramagnétiques tels que les radicaux libres. Pour contourner les problèmes de détection des radicaux libres liés à leur faible durée de vie, la technique de piégeage de spin est mise au point par Janzen *et al* [125].

Cette méthode consiste en l'utilisation d'une molécule diamagnétique (figure 19), le piège, qui réagit avec le radical libre pour donner un adduit de spin plus persistant et donnant un signal caractéristique en RPE.

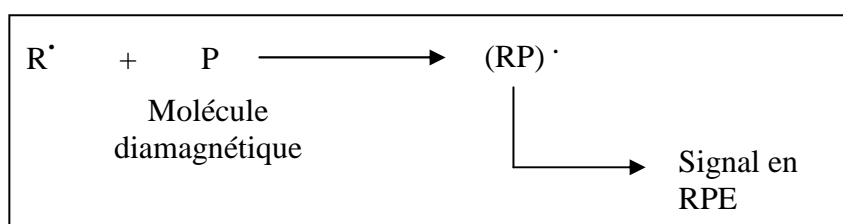
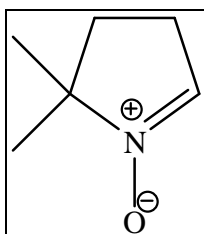


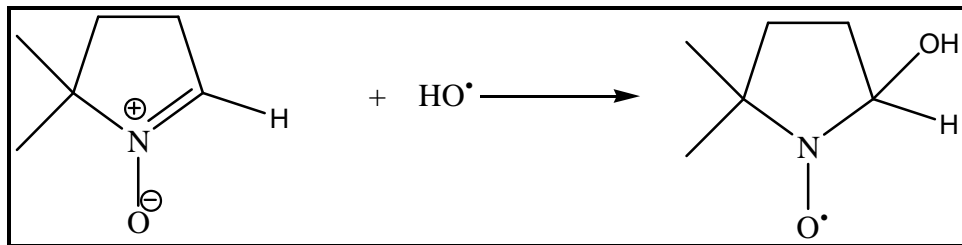
Figure 19 : Schéma du principe du piégeage de spin.

Il existe deux grandes classes de molécules pièges : les nitroso et les nitrones. Pour notre part, nous avons choisi une molécule appartenant à la classe des nitrones et la plus utilisée, le 2,2-diméthyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole-1-oxyde (DMPO). Ce piège est l'un des plus performants concernant les radicaux centrés sur l'oxygène.



¹²⁵ Janzen, E.G., Blackburn, B.J. J. Am. Chem. Soc. **90**, 5909-5910, 1968.

Dans le cas du DMPO, l'addition du radical ne se fait pas sur l'azote mais sur le carbone de la fonction nitrone, donnant en RPE un signal caractéristique qui est un triplet dédoublé.



II.4.2. Conditions expérimentales

Les radicaux hydroxyles ont, comme précédemment, été générés par une réaction de Fenton. Les réactions ont été réalisées dans du tampon phosphate 5 mM (pH 7,4, NaCl 10 mM) pour un volume final de 100 μ L. Pour chaque essai, les différents réactifs ont été ajoutés dans l'ordre suivant : EDTA (100 μ M), peroxyde d'hydrogène (100 μ M), NP (0, 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 mM), sel de Mohr (100 μ M) et le DMPO (150 mM). Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre Bruker EFP 300e à température ambiante. Les mesures sont réalisées au bout de 6 minutes.

L'intensité du signal obtenu pour différentes concentrations de composé a été comparée avec le signal en l'absence de celle-ci.

II.4.3. Résultats

Nous avons déterminé les propriétés antioxydantes de la Naphazoline vis à vis des radicaux hydroxyles générés par une réaction de Fenton *in situ*. Les concentrations utilisées en Naphazoline sont les mêmes que celles utilisées dans les tests précédents.

Les résultats obtenus sont présentés figure 20 où sont exprimés les intensités relatives du signal RPE obtenu en présence de Naphazoline par rapport au signal du DMPO.

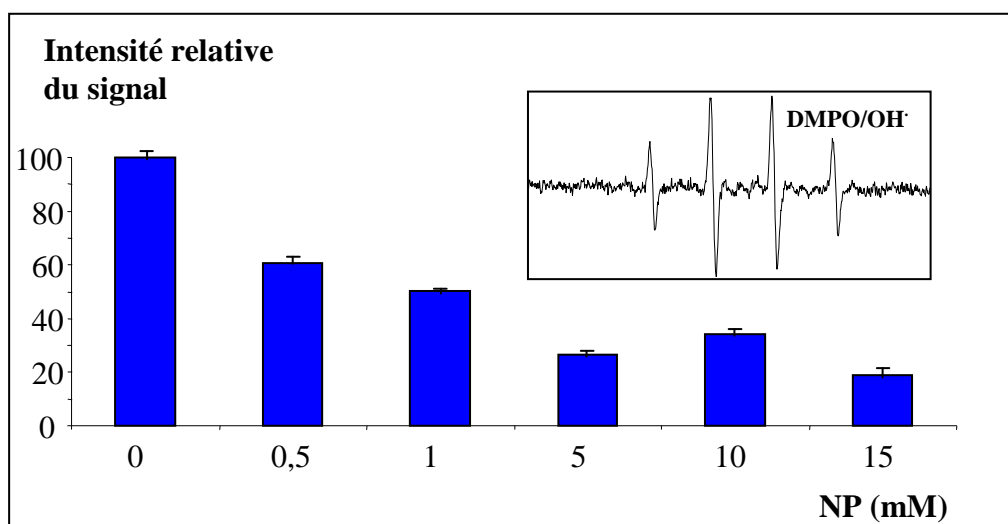


Figure 20 : Pourcentage du signal de l'adduit DMPO/OH' obtenu en présence de NP par rapport au témoin sans NP (100 %). Dans l'encart, signal RPE de l'adduit DMPO/OH'.

En absence de Naphazoline, nous obtenons un signal caractéristique de l'adduit DMPO/OH' avec $a_N = 14,85$ et $a_H = 14,85$. L'addition de Naphazoline à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM) induit une diminution de l'intensité du signal attribué au piégeage des radicaux hydroxyles. Dès 0,5 mM, nous observons une diminution de 36,84 % du signal par rapport au témoin sans Naphazoline. D'autre part, nous avons une inhibition de 50,31 % \pm 2,54 du signal dès la concentration de 1 mM ; à 5 mM, nous observons une inhibition du signal de 74,64 %. Nous avons donc une augmentation de la capture des radicaux hydroxyles par la Naphazoline lorsque sa concentration augmente pour atteindre un plateau à 5 mM, la même concentration pour laquelle nous avons observé un effet radioprotecteur dans nos investigations précédentes. Ces résultats témoignent de la plus grande affinité de la Naphazoline vis-à-vis des radicaux oxygénés que le DMPO.

Ce test confirme le potentiel antioxydant de la Naphazoline à des concentrations néanmoins relativement élevées.

II.5. Conclusion

En conclusion, nous confirmons le pouvoir radioprotecteur de la Naphazoline *in vitro*. La concentration pour laquelle nous observons un effet maximal est de 5 mM. Cependant, nous pouvons observer un effet dès la concentration de 0,5 mM. De plus, nous montrons également que ce composé possède des propriétés antioxydantes qui semblent expliquer une partie de son mécanisme d'action. Il faut noter que la concentration efficace reste relativement élevée ; par conséquent, il est raisonnable de penser qu'il existe, *in vivo*, un autre mécanisme permettant d'expliquer ses propriétés radioprotectrices. Cet autre mécanisme résulte vraisemblablement de ses propriétés alpha-adrénergiques à l'origine d'un effet hypertenseur. La capture des radicaux libres est le principal mécanisme connu impliqué dans l'effet radioprotecteur, mais il ne faut pas oublier que l'induction d'une hypoxie en est un autre. La 5-hydroxytryptamine en est d'ailleurs un exemple puisqu'il s'agit d'un radioprotecteur dont un des mécanismes d'action est l'induction d'une hypoxie consécutive à une vasoconstriction [126]. L'activité radioprotectrice de la Naphazoline résulte donc d'une combinaison de ses propriétés antioxydantes à des doses élevées et peut être de ses propriétés alpha-adrénergiques.

D'autre part, nous comparons l'activité antioxydante de la Naphazoline avec celle du WR-2721. A l'issue de ces tests, il s'avère que le WR-2721 est moins efficace en terme de protection de l'ADN. Son métabolite, le WR-1065, semble le principal responsable de l'activité radioprotectrice et la liaison S-P semble résister aux radiations et aux radicaux hydroxyles.

Au vu de ces résultats nous avons réalisé la synthèse et l'étude de nouveaux radioprotecteurs dérivés du benzothiazole et du thiadiazole de types thiols, aminothiols, acides thiosulfoniques et phosphorothioates. La synthèse de ces composés est développée dans le chapitre II, nous présentons dans les paragraphes suivants les résultats de l'étude de leur activité antioxydante et radioprotectrice vis-à-vis de l'ADN plasmidique.

¹²⁶ van der Meer C., van Bekkum DW. Int. J. Radiat. Biol. **4**, 105-110, 1961.

III. ETUDE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DES COMPOSES SYNTHETISES

III.1. Test au 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

III.1.1. Introduction - Principe du test

Ces dernières années, un intérêt grandissant porté aux substances potentiellement antioxydantes est apparu en vue de prévenir notamment les effets délétères des radicaux libres formés de façon endogène dans l'organisme ou bien issus de processus physiques, notamment de la radiolyse de l'eau.

Parallèlement à cela, de nombreuses méthodes se sont développées permettant d'évaluer les capacités antioxydantes de composés naturels ou bien issus de la synthèse chimique. L'une d'entre elle, couramment utilisée, fait appel à l'utilisation d'un radical libre stable, le 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH).

La stabilité de ce radical résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule empêchant ainsi la dimérisation de se produire comme c'est souvent le cas pour les autres radicaux (figure 21). D'autre part, cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette en solution éthanolique ou méthanolique caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 516 nm.

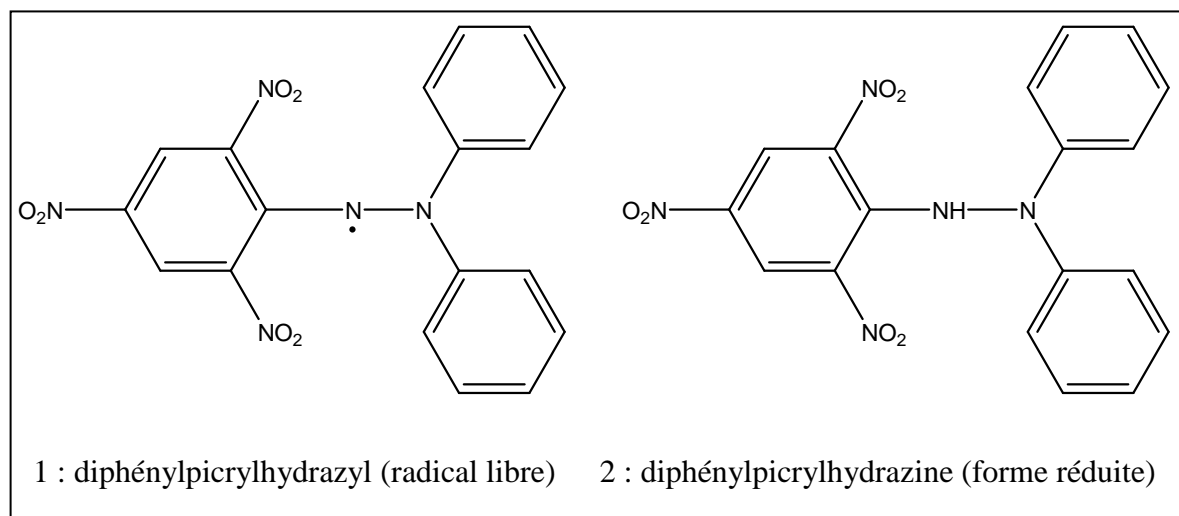
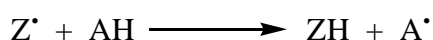


Figure 21 : Structure du radical 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl et de sa forme réduite.

Le principe du test est le suivant : l'addition du radical DPPH[•] à une solution éthanolique (ou méthanolique) contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH.

Simultanément il se forme un autre radical, lui même pouvant engendrer des réactions secondaires, notamment des dimérisations. Au terme de la réaction, il persiste une légère coloration jaune due au groupement picryl résiduel.

Si nous représentons le radical DPPH[•] par Z[•] et la molécule donneuse d'hydrogène par AH, la réaction peut s'écrire de la façon suivante :



où ZH est la forme réduite et A[•] le radical produit.

Certaines molécules peuvent donner deux atomes d'hydrogènes ; c'est le cas de l'acide ascorbique (vitamine C). Deux molécules de DPPH[•] sont donc réduites par une molécule d'acide ascorbique.

Avant de réaliser ce test, pour chaque composé, nous avons également déterminé les maximums d'absorption et les coefficients d'extinction molaires (ϵ) afin de nous assurer que les composés synthétisés n'absorbent pas dans la zone d'absorption du radical DPPH[•] à 516 nm. Ces caractérisations sont décrites dans la partie expérimentale de ce chapitre. Aucun de nos composés ne possède de bande d'absorption à 516 nm.

Cette étude débute par l'évaluation du pouvoir antioxydant des précurseurs utilisés pour la synthèse de nos dérivés, à savoir les amines. Le but est de s'assurer que la modification structurale apportée permet d'augmenter l'activité antioxydante. Nous présentons ensuite les résultats obtenus avec les amides (**1-5**), les alcools (**21-25**), les thiols (**11-15**) et enfin les aminothiols (**16, 17, 19**). Les aminothiols **18** et **20** n'ont pas pu être testés pour des raisons de solubilité ainsi que les acides thiosulfoniques (**30-35**) et les phosphorothioates (**36-37**).

III.1.2. Conditions expérimentales

III.1.2.1. Détermination des caractéristiques UV

Afin de s'assurer que nos composés n'absorbent pas dans les longueurs d'ondes utilisées pour les deux tests suivants (DPPH, 516 nm et ABTS, 734 nm), nous avons déterminé pour chacun d'eux les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaires par famille de composés. Les coefficients d'extinction molaire sont obtenus en traçant la droite d'absorbance en fonction de la concentration du composé. Les produits ont tous été solubilisés dans l'éthanol sauf pour les acides thiosulfoniques et les phosphorothioates pour lesquels les spectres ont été obtenus dans l'eau.

Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre UV Agilent 8453 piloté par le logiciel Chemstation.

• Les amines

La figure 22 représente un spectre UV obtenu avec le 2-aminobenzothiazole.

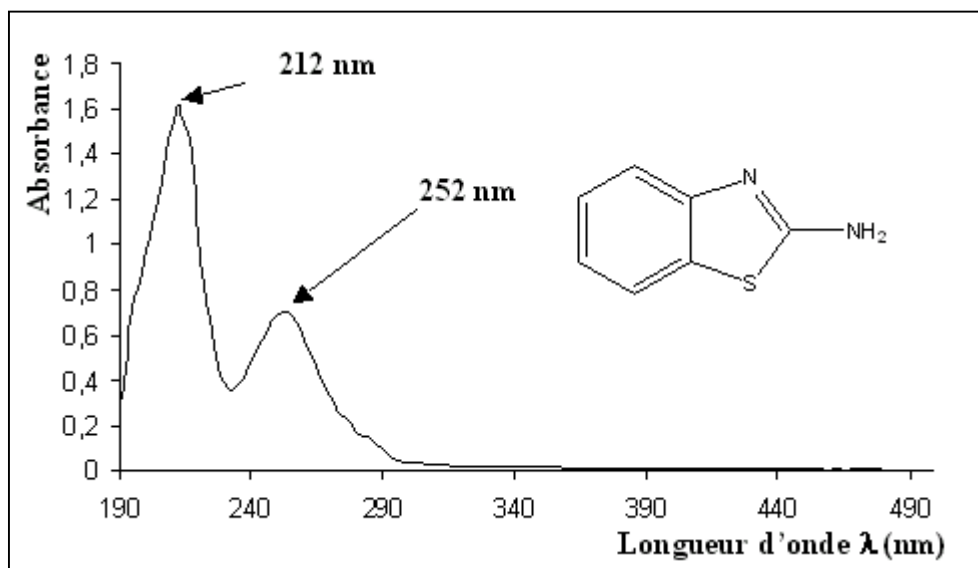


Figure 22 : Spectre UV du 2-aminobenzothiazole (60 µM).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 8 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
2-amino-benzothiazole	212	11276
	252	21909
2-amino-6-méthylbenzothiazole	204	22600
	218	25400
2-amino-6-éthoxybenzothiazole	264	12800
	211	28400
2-amino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole	270	11500
	197	1200
2-amino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole	281	8400
	201	2300
	254	6100

Tableau 8 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des amines dans l'éthanol.

• Les amides (1-5)

La figure 23 représente un spectre UV obtenu pour le *N*-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4).

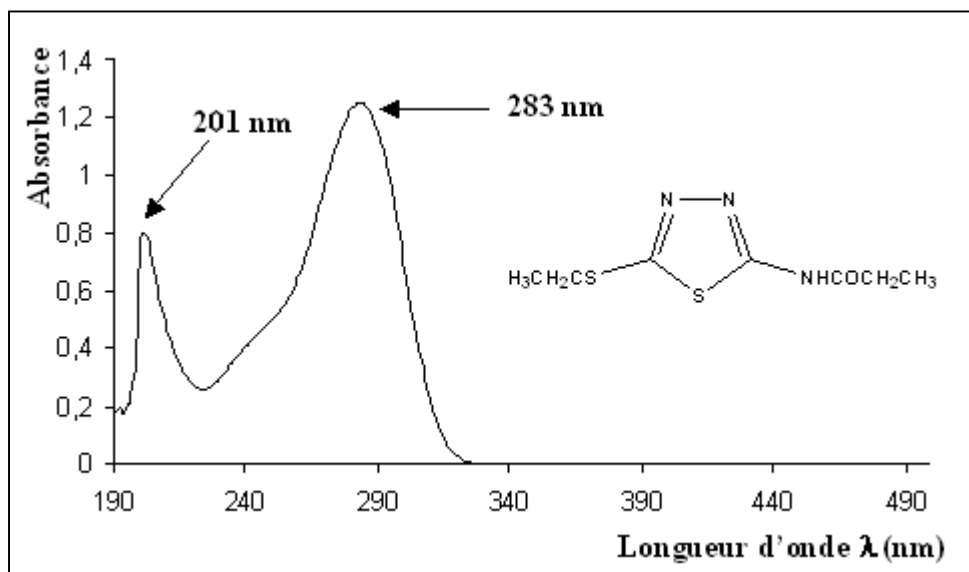


Figure 23 : Spectre UV du *N*-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4) (120 μ M).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 9 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
<i>N</i> -benzothiazol-2-yl-propylamide (1)	209	18400
	275	3000
<i>N</i> -(6-méthylbenzothiazol-2-yl)propylamide (2)	214	23300
	279	15200
<i>N</i> -(6-éthoxybenzothiazol-2-yl)propylamide (3)	217	25700
	287	15400
<i>N</i> -(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4)	201	6900
	283	11200
<i>N</i> -(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (5)	201	4300

Tableau 9 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (1-5) dans l'éthanol

• Les aminoalcools (21-25)

La figure 24 représente un spectre UV obtenu pour le 2-iminobenzothiazol-3-yl-éthanol (21).

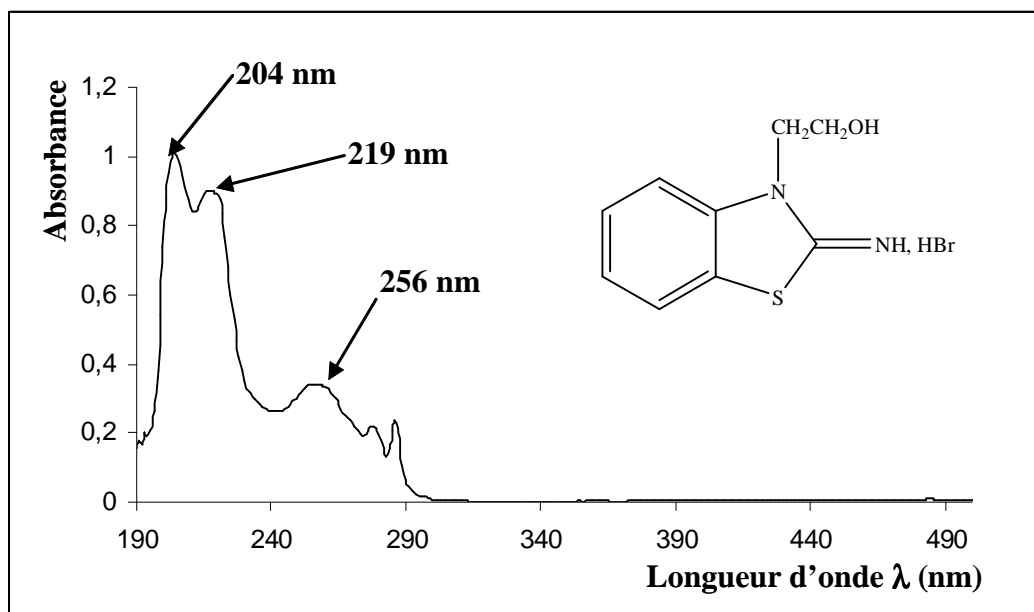


Figure 24 : Spectre UV du 2-iminobenzothiazol-3-yl-éthanol (62 μM).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 10 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
2-benzothiazol-2-ylamino-éthanol (6)	204	5900
(2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol (7)	219	11900
(2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthanol (8)	252	5900
(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol (9)	209	20100
(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol (10)	262	6100
	213	20300
	273	7800
	202	6000
	277	5100
	201	4500
	247	3700

Tableau 10 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (6-10) dans l'éthanol.

• Les thiols (11-15)

La figure 25 représente le spectre UV du dérivé 5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (15).

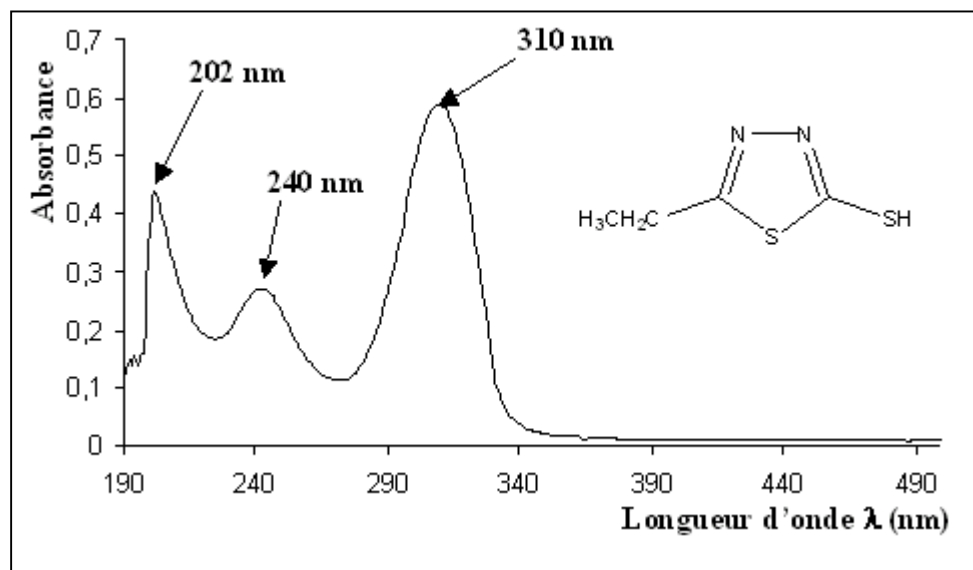


Figure 25 : Spectre UV du 5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (15) (60 μ M).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 11 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
benzothiazole-2-thiol (11)	207	9100
	230	7100
	325	13100
6-méthylbenzothiazole-2-thiol (12)	208	17000
	239	14700
	327	16700
6-éthoxybenzothiazole-2-thiol (13)	202	18300
	240	14500
	329	20900
5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (14)	203	20800
	243	13500
	323	19200
5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (15)	202	8600
	241	4900
	310	10600

Tableau 11 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (11-15) dans l'éthanol.

• Les aminothiols (16, 17, 19)

La figure 26 représente le spectre UV du dérivé 2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (17).

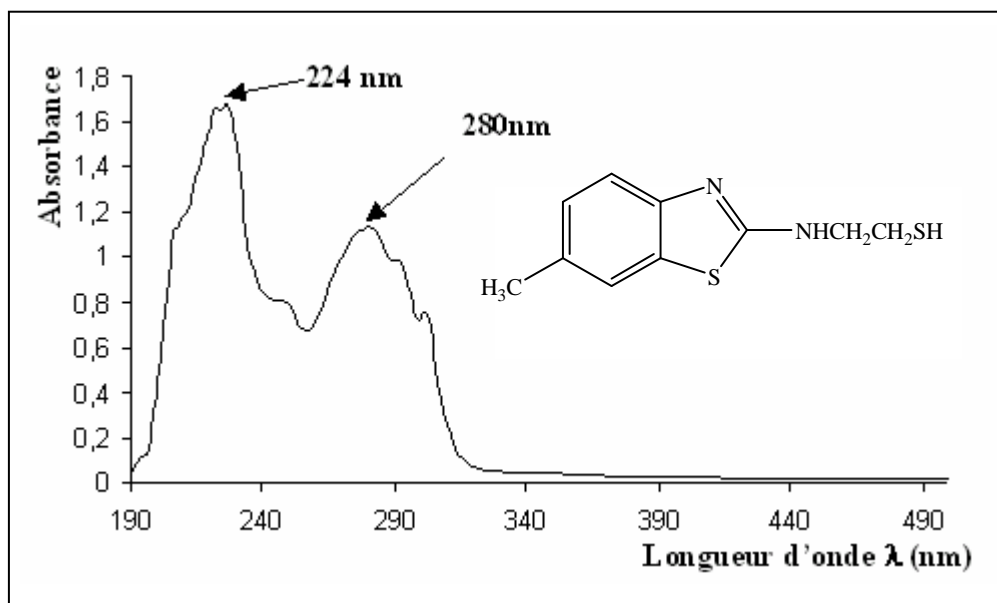


Figure 26 : Spectre UV du 2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (17) (100 μ M).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 12 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
2-(benzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (16)	224	14300
	274	9000
2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (17)	224	17500
2-(5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol (19)	280	11400
	206	2800
	288	7100

Tableau 12 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (16-17, 19) dans l'éthanol.

• Les acides thiosulfoniques (34, 35)

La figure 27 représente le spectre UV de l'acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (35) :

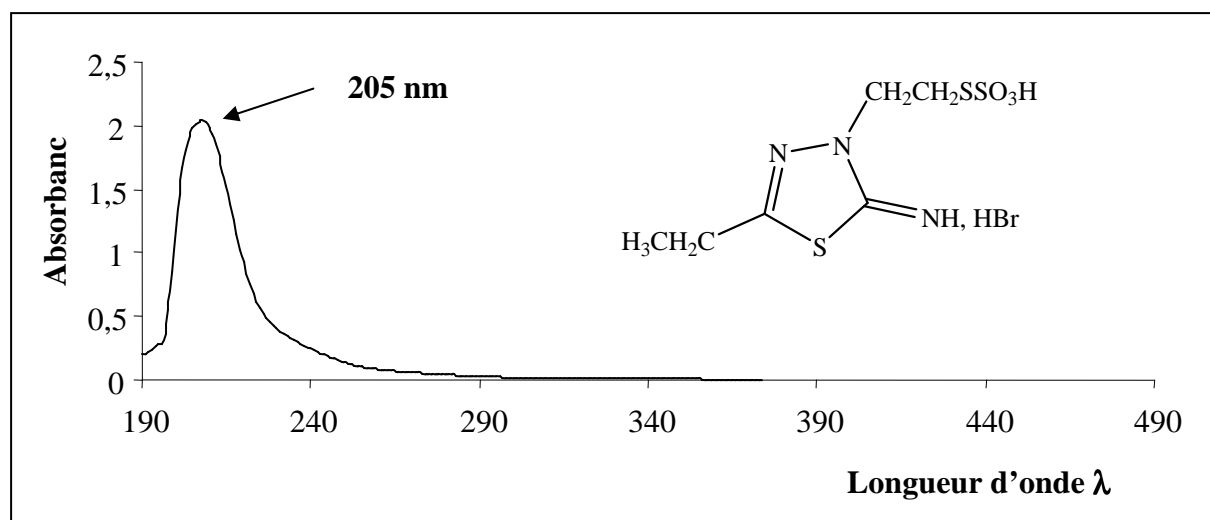


Figure 27 : Spectre UV de l'acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (35).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 13 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
acide S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (34).	205	2158
acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (35).	207	4096

Tableau 13 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (34, 35) dans l'eau.

• Les phosphorothioates (36, 37)

La figure 28 représente le spectre UV du dérivé S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (37).

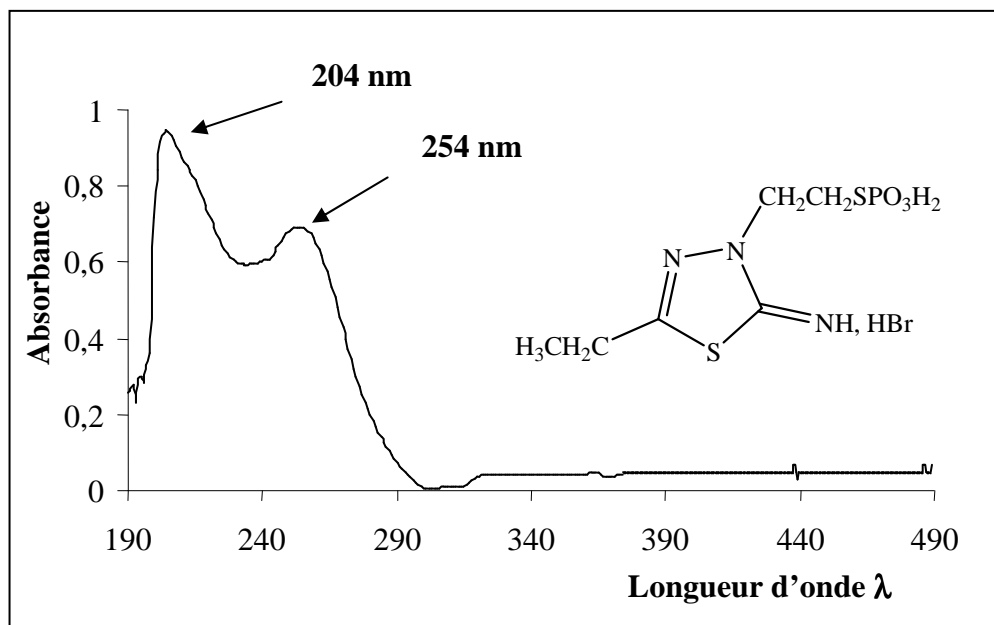


Figure 28 : Spectre UV du S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (37).

Les maximums de longueurs d'onde et les coefficients d'extinction molaire sont rassemblés dans le tableau 14 :

Composés	Maximum de longueur d'onde (nm)	Epsilon ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (36)	195 210	9931 9362
S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (37)	204 254	3800 2700

Tableau 14 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (36, 37) dans l'eau.

III.1.2.2. Techniques expérimentales

Ce test est décrit en 1958 par Blois [127]. Depuis, certaines modifications ont été apportées et un paramètre important a été introduit : la détermination de la CI_{50} définie comme étant la concentration en substrat entraînant une diminution de 50 % de la coloration violette donc de l'absorption. A cette concentration 50 % du DPPH[•] est passé sous forme réduite. Ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et al. [128] par analogie avec d'autres paramètres biologiques tels que la DL_{50} .

Récemment Molyneux [129] décrit les conditions de réalisation de ce test :

- le volume de la réaction doit être compris entre 2 et 4 ml ;
- le solvant peut être du méthanol ou de l'éthanol ;
- il n'y a pas de conditions de pH strictement définies ;
- la concentration en DPPH doit être comprise entre 50 et 200 μ M afin d'avoir une absorbance inférieure à 1 (classiquement aux alentours de 80 μ M) ;
- l'absorbance est mesurée classiquement à 515, 516, 518 ou 520 nm ;
- la durée totale de réaction est généralement fixée à 30 minutes.

Nous avons donc choisi de répondre à l'ensemble de ces critères et de déterminer pour chaque produit le pourcentage de réduction du DPPH[•] calculé selon la formule ci-dessous :

$$Q = 100 (A_0 - A_C)/A_0$$

où A_0 est l'absorbance initiale en absence de composé à tester et A_C est l'absorbance mesurée à 30 minutes.

A une solution dans l'éthanol du radical DPPH[•] (80 μ M) est ajoutée une solution du composé à tester à différentes concentrations pour un volume final de 3 ml.

L'absorbance est mesurée à 516 nm à 30 minutes. Chaque concentration est réalisée en triplicate.

Pour chaque test nous avons réalisé une courbe d'étalonnage du DPPH[•]. En effet pour chaque essai une nouvelle solution de DPPH[•] est préparée car ce radical évolue en solution et il y a une perte d'activité d'environ 4 à 5 % en une semaine.

¹²⁷ Blois M.S. Nature, **181**, 1199-200, 1958.

¹²⁸ Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C Food Science and Technology, **28**, 25-30, 1995.

¹²⁹ Molyneux P. Songklanakarin J. Sci. Technol. **26**, 211-219, 2003.

Un exemple du spectre UV du radical DPPH[•] et de courbe d'étalonnage est représenté figure 29.

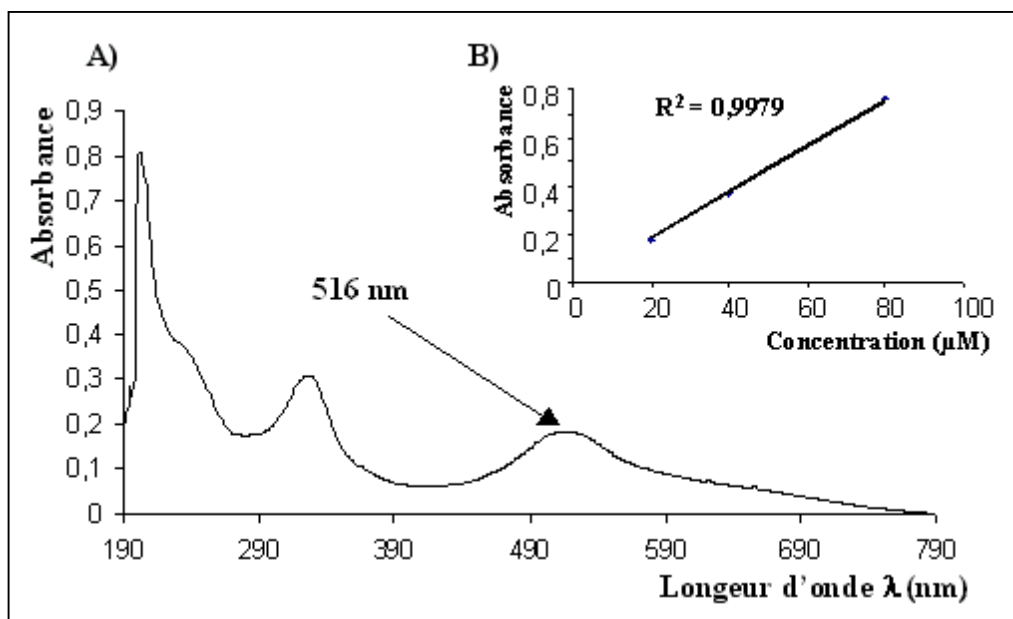


Figure 29 : A) Spectre UV du DPPH (20µM) dans l'éthanol. B) Droite d'étalonnage du DPPH ($f([DPPH]) = Abs.$).

III.1.3. Résultats

III.1.3.1. Les amines

Le test au DPPH[•] est réalisé en présence des différentes amines, utilisées comme précurseurs dans nos synthèses, pour différentes concentrations.

L'ensemble des résultats obtenus à la concentration de 4 mM en composé est rassemblé dans le tableau 15 :

Composés	Pourcentage d'inhibition à 4 mM
2-aminobenzothiazole	6,03 ± 0,57 %
2-amino-6-méthylbenzothiazole	5,57 ± 0,98 %
2-amino-6-éthoxybenzothiazole	9,03 ± 1,01 %
2-amino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole	9,57 ± 0,68 %
2-amino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole	4,80 ± 0,78 %

Tableau 15 : Détermination des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des amines à la concentration de 4 mM.

Quel que soit le composé testé, nous observons une très faible diminution de l'absorbance à 516 nm (de l'ordre de 10 % en moyenne) pour des concentrations inférieures à 4 mM. Ceci traduit un faible pouvoir antioxydant vis-à-vis du radical DPPH[•].

Les concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) de ces composés ne sont pas déterminées en raison de la nécessité d'une concentration élevée, supérieure à 4 mM pour avoir une inhibition voisine des 10 % en moyenne.

Ces résultats montrent clairement l'intérêt de modifier chimiquement ces composés afin de les transformer en véritables molécules antioxydantes.

III.1.3.2. Les amides (1-5)

Le test au DPPH[•] est réalisé en présence de chacun de ces amides à plusieurs concentrations. Comme pour les dérivés de la famille précédente, il n'est pas observé d'importante diminution de l'absorbance à 516 nm pour des concentrations inférieures à 4 mM. C'est pourquoi, dans le tableau 16 sont reportées les inhibitions obtenues à la concentration de 4 mM pour chacun des dérivés.

Composés	Pourcentage d'inhibition à 4 mM
<i>N</i> -benzothiazol-2-yl-propylamide (1)	19,10 ± 0,11 %
<i>N</i> -(6-méthyl-benzothiazol-2-yl)propylamide (2)	2,99 ± 0,15 %
<i>N</i> -(6-éthoxy-benzothiazol-2-yl)propylamide (3)	5,49 ± 0,89 %
<i>N</i> -(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4)	7,21 ± 0,56 %
<i>N</i> -(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (5)	2,62 ± 0,76 %

Tableau 16 : Détermination des pourcentages d'inhibition à 4 mM en présence des amides (1-5).

Comme pour les composés précédents, les CI₅₀ de ces composés ne sont pas déterminées en raison de la nécessité d'une concentration élevée, supérieure à 4 mM pour avoir une inhibition voisine des 10 % en moyenne.

En raison du faible pouvoir antioxydant de ces composés, nous écartons cette famille de la suite de notre étude.

III.1.3.3. Les alcools (21-25)

Le test au DPPH[•] est réalisé en présence des aminoalcools à plusieurs concentrations. Pour le dérivé **21**, la CI₅₀ de ce composé n'est pas déterminée : en effet, une inhibition de seulement 25,73 ± 1,8 % a été observée pour la concentration de 4,5 mM.

Il en est de même pour le composé **22** pour lequel une inhibition de seulement 19,68 ± 2,24 % est observée pour la concentration de 4 mM.

En revanche pour les dérivés **23**, **24** et **25**, nous avons déterminé les CI_{50} (tableau 17). Elles sont obtenues à partir des droites de régression des pourcentages d'inhibition obtenus en fonction de la concentration en composé :

Composés	CI_{50} (mM)
23	1,4
24	3,5
25	2,4

Tableau 17 : Concentrations inhibitrices 50 % des aminoalcools **23**, **24** et **25**.

En raison de leur faible pouvoir antioxydant, ces composés sont également écartés pour la suite de notre étude. En effet, les CI_{50} sont toutes supérieures à 1 mM.

III.1.3.4. Les thiols (**11-15**) :

Le test au DPPH[•] est réalisé en présence des thiols **11** à **15** pour lesquels nous déterminons les CI_{50} respectives, graphiquement à partir des droites de régression tracées représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations (cf p 171). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 18 :

Composés	CI_{50} (mM)
11	0,092 ± 0,006
12	0,091 ± 0,004
13	0,046 ± 0,005
14	0,053 ± 0,006
15	0,084 ± 0,005

Tableau 18 : Concentrations inhibitrices 50 % des thiols **11-15**.

Il s'avère que nous modifions considérablement les propriétés antioxydantes des composés de départ, à savoir les amines. La simple substitution de la fonction amine en position 2 par une fonction thiol permet d'abaisser les CI_{50} qui deviennent toutes inférieures à 100 μ M. En effet, pour les amines, nous n'avons pas déterminé les CI_{50} car elles étaient toutes supérieures à 4 mM.

III.1.3.5. Les aminothiols (**16,17,19**) :

Nous avons évalué le pouvoir antioxydant de trois aminothiols qui sont les dérivés **16**, **17** et **19**, les aminothiols **18** et **20** n'étant que peu solubles.

Pour chacun des ces dérivés nous déterminons les CI_{50} graphiquement à partir des droites de régression obtenues représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations (cf p 172).

Les résultats sont reportés dans le tableau 19 :

Composés	CI_{50} (mM)
16	1,39 \pm 0,49
17	3,17 \pm 0,85
19	0,11 \pm 0,20

Tableau 19 : Détermination des CI_{50} des aminothiols **16**, **17** et **19**.

Les CI_{50} restent supérieures à celles obtenues avec les dérivés **11**, **12**, **13**, **14** et **15**. Bien qu'elles soient néanmoins relativement élevées, notamment pour les composés **16** et **17**, nous avons choisi de poursuivre leur étude afin de confirmer ces résultats et l'influence de la chaîne alkyle dans l'activité antioxydante et radioprotectrice étant donné que les aminothiols sont rapportés dans la littérature pour être des radioprotecteurs intéressants. De plus, par rapport aux alcools **21** et **22**, les CI_{50} des composés **16** et **17** sont inférieures ce qui montre l'intérêt d'une fonction thiol.

III.1.4. Bilan du test au DPPH

Nous avons commencé par tester les composés de départ à savoir les amines primaires afin de vérifier que l'addition d'un quelconque groupement (amide, thiol ...) permet d'augmenter les propriétés antioxydantes. Il s'avère que pour ces composés, les CI_{50} sont supérieures à 4 mM. Ces dernières n'ont pas été déterminées car nous estimons qu'au delà de 4 mM les propriétés antioxydantes sont trop faibles. Il en a été de même lorsque nous avons testé les amides correspondants (**1-5**).

Nous avons ensuite déterminé les CI_{50} des aminoalcools (**21-25**), intermédiaires réactionnels de la synthèse des phosphorothioates. Les résultats sont regroupés dans les tableaux 20.

Aminothiols

Aminoalcools

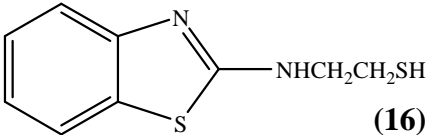
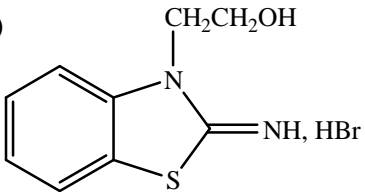
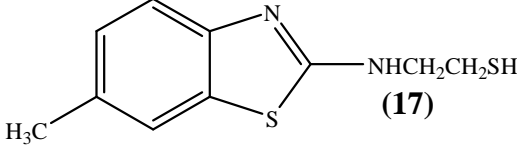
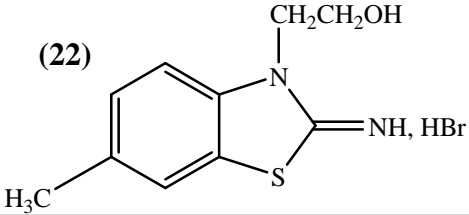
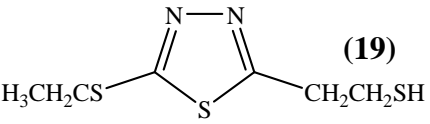
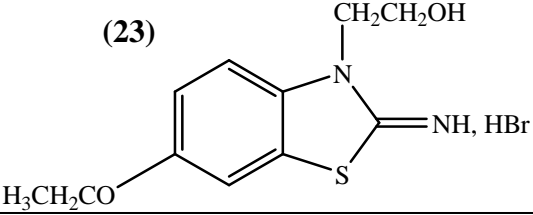
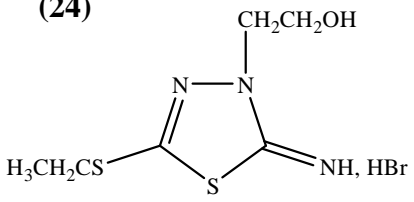
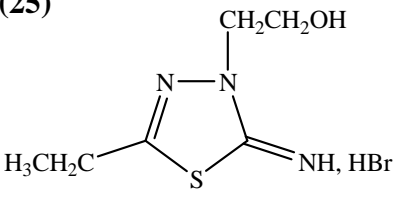
Composés	CI ₅₀ (a) (mM)	Composés	CI ₅₀ (a) (mM)
 <p>(16)</p>	1,39	 <p>(21)</p>	>4
 <p>(17)</p>	3,17	 <p>(22)</p>	>4
 <p>(19)</p>	0,11	 <p>(23)</p>	1,4
		 <p>(24)</p>	3,5
		 <p>(25)</p>	2,4

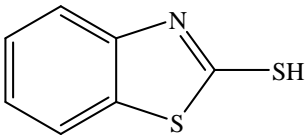
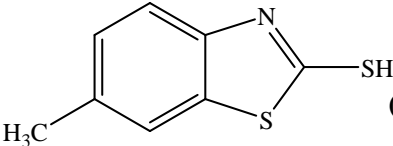
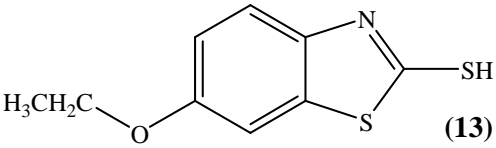
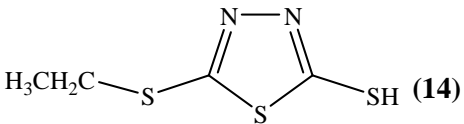
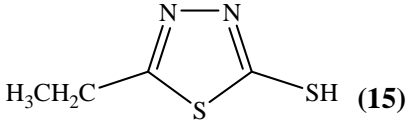
Tableau 20 : Détermination des CI₅₀ des aminothiols et des aminoalcools. ^(a) Concentration en produit nécessaire pour réduire de 50 % l'absorbance du DPPH à 516 nm.

Concernant les *aminoalcools*, ces derniers ont globalement une CI_{50} supérieure à 1 mM voire à 4 mM. Ceci témoigne d'une faible mobilité de l'atome d'hydrogène, plus particulièrement de celui porté par l'oxygène. Ces composés sont écartés pour la suite de cette étude *in vitro*.

Concernant les *aminothiols*, les résultats montrent que nous avons diminué les CI_{50} et par conséquent augmenté les propriétés antioxydantes par rapport aux alcools. La présence de la fonction thiol semble être déterminante pour l'activité antioxydante. Il est important de noter l'activité intéressante du composé **19**, avec une CI_{50} de 100 μ M. Les composés **16** et **17** ont globalement une faible activité avec des CI_{50} supérieures à 1 mM.

Thiols

Références

Composés	CI_{50} (a) (mM)
 (11)	0,092
 (12)	0,091
 (13)	0,046
 (14)	0,053
 (15)	0,084

Composés	CI_{50} (mM)
Trolox	0,034
WR-2721	0,106
Glutathion	0,096

Tableau 21 : Détermination des CI_{50} des thiols (**11**, **12**, **13**, **14** et **15**) ; comparaison avec la littérature. ^(a) Concentration en produit nécessaire pour réduire de 50 % l'absorbance du DPPH à 516 nm.

Lorsque nous testons *les thiols* (tableau 21), nous constatons que les CI_{50} sont généralement inférieures à 100 μ M. Si l'on compare ces résultats avec ceux de la littérature, plus particulièrement avec le WR-2721, l'activité antioxydante des composés **11**, **12**, **13**, **14** et **15** est du même ordre de grandeur que ce dernier. *Le WR-2721* est également testé dans nos conditions et les résultats correspondent à ce qui est décrit dans la littérature [130] avec une CI_{50} voisine de 100 μ M. Ce témoin nous permet de valider les résultats obtenus avec nos composés.

Les valeurs trouvées pour nos composés sont également du même ordre de grandeur que celles décrites pour le glutathion et le Trolox (analogue de la vitamine E) qui sont des antioxydants de références [130]. Le test du DPPH révèle que la chaîne alkyle modifie le pouvoir antioxydant, à l'exception du composé **19** : en effet les CI_{50} des composés **16** et **17** sont supérieures à celles de leurs homologues **11** et **12**. En revanche, les CI_{50} respectives des composés **19** et **14** restent voisines, même si le composé **14** possède une CI_{50} inférieure.

III.1.4.1. Les thiols (**11-15**)

La figure 30 représente les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration en thiols. Pour chaque composé est représentée la droite de régression obtenue à partir des points expérimentaux. Les coefficients de corrélation sont satisfaisants (supérieurs à 0,9).

¹³⁰ Jiang J.J., Chang T.C., Hsu W.L., Hwahng J.M., Hsu L.Y. Chem. Pharm. Bull. **51**, 1307-1310, 2003.

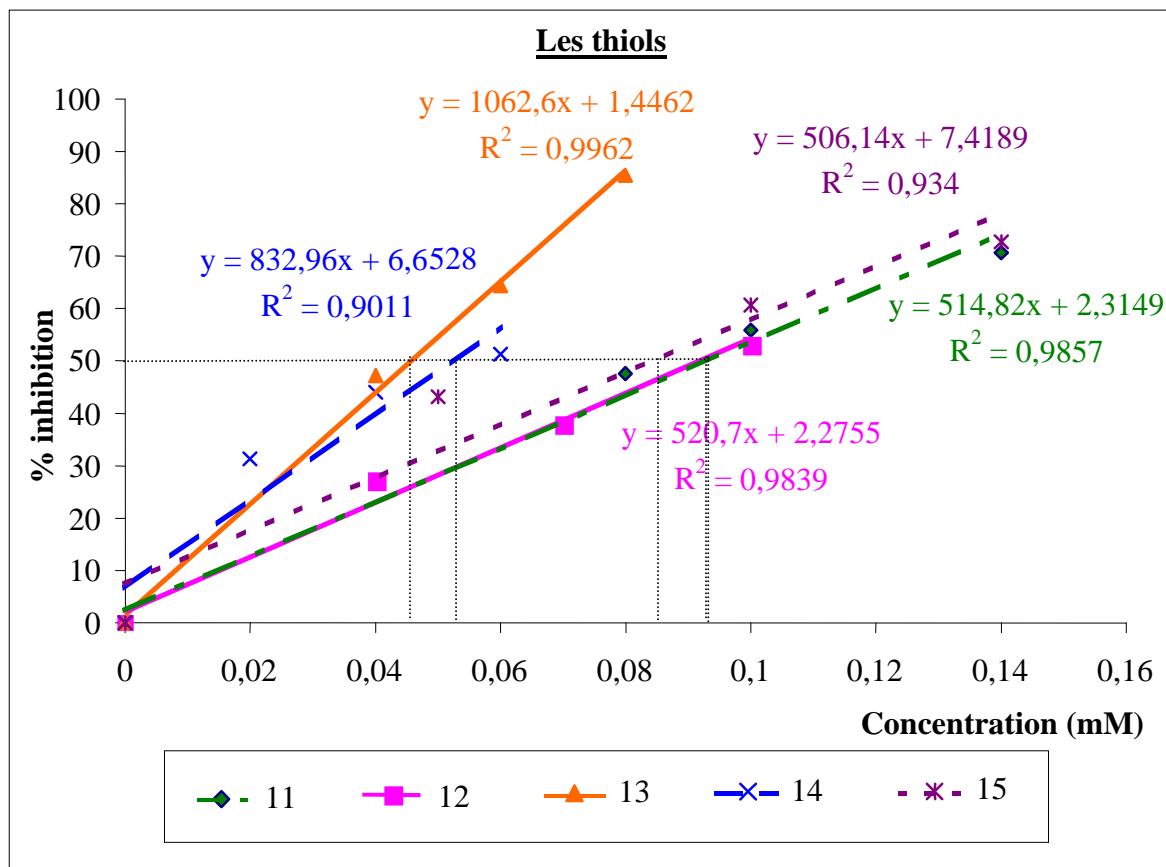


Figure 30 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des thiols **11**, **12**, **13**, **14** et **15** en fonction de la concentration.

Le composé **14** se détache nettement du groupe avec une augmentation notable de l'inhibition pour une faible variation de concentration. Les dérivés **11** et **12** ont quant à eux le même comportement, l'influence du méthyle sur le cycle aromatique est négligeable sur l'activité antioxydante. A l'inverse, le groupement éthoxy du composé **13** semble apporter une activité importante supérieure à celle du dérivé **14**.

III.1.4.2. Les aminothiols (16, 17, 19)

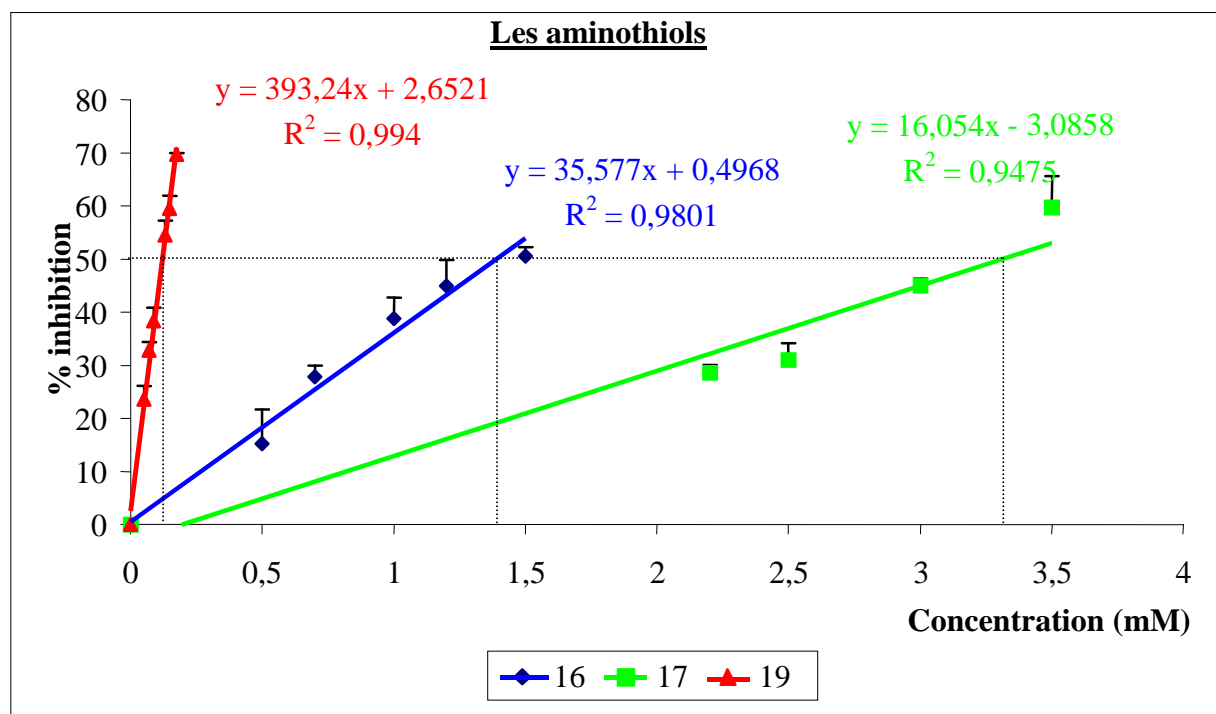


Figure 31 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des aminothiols 16, 17 et 19 en fonction de la concentration.

La figure 31 représente de la même façon que précédemment, les droites de régression des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en aminothiol déterminées à partir des points expérimentaux. Lorsqu'on considère les dérivés 16, 17 et 19, nous remarquons également qu'un composé se distingue, il s'agit du dérivé 19, analogue du 14. De la même façon que pour le dérivé 14, nous observons une augmentation importante de l'inhibition pour une faible variation de concentration. Il semblerait que, pour ce test, les dérivés du thiadiazole possèdent une meilleure activité que ceux du benzothiazole pour piéger le radical DPPH.

III.1.4.3. Conclusion

Nous pouvons classer les composés testés en fonction de leur efficacité croissante à piéger le radical DPPH : **17 < 16 < 19 = 11 < 12 < 15 < 14 < 13**.

Au sein des 2 familles de composés (thiols et aminothiols), le motif thiadiazole reste le plus efficace (à l'exception du composé **13**).

Ces résultats montrent l'apport non négligeable d'une fonction thiol ou aminothiol dans les propriétés antioxydantes par rapport aux composés de départ. Il en est de même pour les amides (**1-5**). La présence d'une fonction thiol directement reliée aux cycles augmente les propriétés antioxydantes ; les valeurs obtenues sont tout à fait comparables à celles des composés de références : le WR-2721, le trolox et le glutathion.

Concernant les dérivés phosphorés (**36-37**) et les acides thiosulfoniques (**31-35**), le test n'est pas concluant. Aucune CI_{50} , n'est déterminée en raison de l'apparition d'une bande d'absorption à 516 nm se superposant à celle du DPPH lorsque nous réalisons le test. Malgré ce phénomène compétitif, une décoloration de la solution éthanolique est observée témoignant d'une activité antioxydante. C'est pourquoi nous avons fait appel à un autre test par spectrophotométrie UV-visible avec un autre radical : le radical cation ABTS.

III.2. Test au radical cation, l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS).

III.2.1. Introduction - Principe du test

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est également un radical libre et stable. Il est très utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des composés purs. Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron [131,132]. Ce radical cation est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu. D'autres oxydants peuvent être utilisés tels que le dioxyde de manganèse (MnO₂). Le radical formé est stable avec des coefficients d'extinction molaire élevés à 416, 650 et 734 nm. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à ces longueurs d'onde. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance à 734 nm. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante des composés testés mais souvent aussi du temps et de la concentration [133].

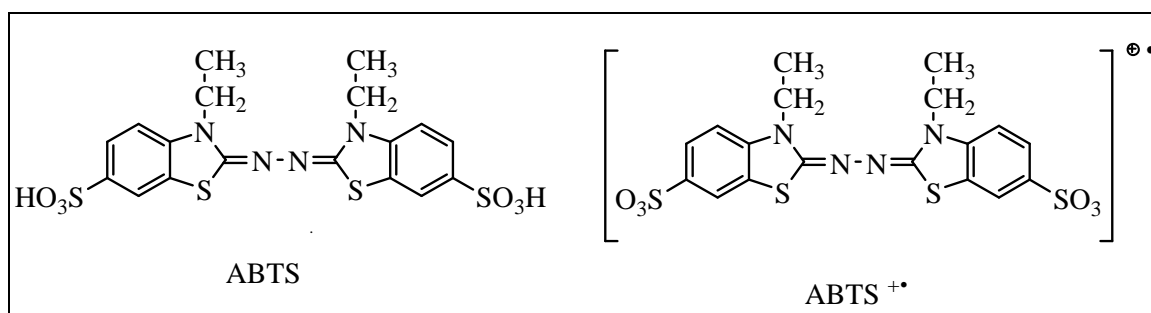


Figure 32 : Structure de 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) : forme réduite ABTS, forme radical cation ABTS^{•+}.

¹³¹ Rice-Evans C., Miller, N.J. Methods Enzymol. 234, 279-293, 1994.

¹³² Rice-Evans C. et al. Free Radical Res. **22**, 375-383, 1995.

¹³³ Re R. et al. Free Rad. Biol. Med. 26 (9/10), 1231-1237, 1999.

Comme pour le test précédent, nous déterminons un pourcentage d'inhibition à 734 nm (correspondant à une diminution de la coloration de la solution) en fonction de la concentration en composé et du temps.

Ce test présente l'avantage de nous permettre de tester d'autres composés, tels que les acides thiosulfoniques et les phosphorothioates, qui sont peu solubles dans les alcools utilisés dans le test au DPPH et pour lesquels nous avons observé l'apparition d'une bande d'absorption à 516 nm lorsque nous avons réalisé le test au DPPH..

III.2.2. Conditions expérimentales

A une solution dans l'eau d'ABTS (Sigma Aldrich) 7 mM est ajoutée une solution de persulfate de potassium (Sigma Aldrich) à 140 mM pour obtenir une concentration finale de 3,5 mM [134]. Le mélange est agité une nuit dans le noir à température ambiante pour former le radical cation ABTS⁺. Avant utilisation, la solution est diluée pour obtenir une absorbance voisine de 0,70 à 734 nm et à 30°C pour un volume finale de 1,5 ml. Le rendement de la réaction d'oxydation peut être ainsi calculé à partir du coefficient d'extinction molaire connu de $1,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ [133]. En effet, la réaction est toujours incomplète, elle commence immédiatement mais ne se stabilise qu'après au moins 6 heures.

La solution obtenue est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante. L'activité antioxydante est mesurée par addition à une solution diluée de radical ABTS⁺ (1,5ml) 10 à 15 µl du composé à tester. Le changement d'absorbance est mesuré à 0 s, 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min et toutes les 5 min jusqu'à obtention d'un plateau. Nous avons déterminé pour chaque produit le pourcentage de réduction du ABTS⁺ calculé selon la formule ci-dessous :

$$Q = 100 (A_0 - A_C)/A_0$$

où A_0 est l'absorbance initiale en absence de composé à tester et A_C est l'absorbance mesurée à 1 min.

¹³⁴ Henriquez, C. Aliaga C., Lissi E. Int. J. Chem. Kinetics **34**(12), 659-665, 2002.

Le pouvoir antioxydant est évalué en calculant la CI_{50} , concentration pour laquelle nous obtenons 50 % de diminution de l'absorbance à 734 nm.

Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre UV Agilent 8453 piloté par le logiciel Chemstation.

III.2.3. Résultats

Pour chaque composé et pour chaque concentration une cinétique d'inhibition est réalisée. D'une façon générale pour l'ensemble des composés testés, nous observons une importante inhibition dès la première minute. Après une minute, la réaction se stabilise et nous obtenons un plateau. C'est pourquoi les CI_{50} sont calculées à 1 minute.

Au vu des résultats obtenus avec le test précédent, nous évaluons le pouvoir antioxydant des thiols (**11-15**), des aminothiols (**16, 17 et 19**), des acides thiosulfoniques (**34, 35**) et des phosphorothioates (**36, 37**).

III.2.3.1. Les thiols (11-15)

Comme précédemment, nous avons représenté les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration en thiols. Pour chaque composé est déterminée la droite de régression obtenue à partir des points expérimentaux.

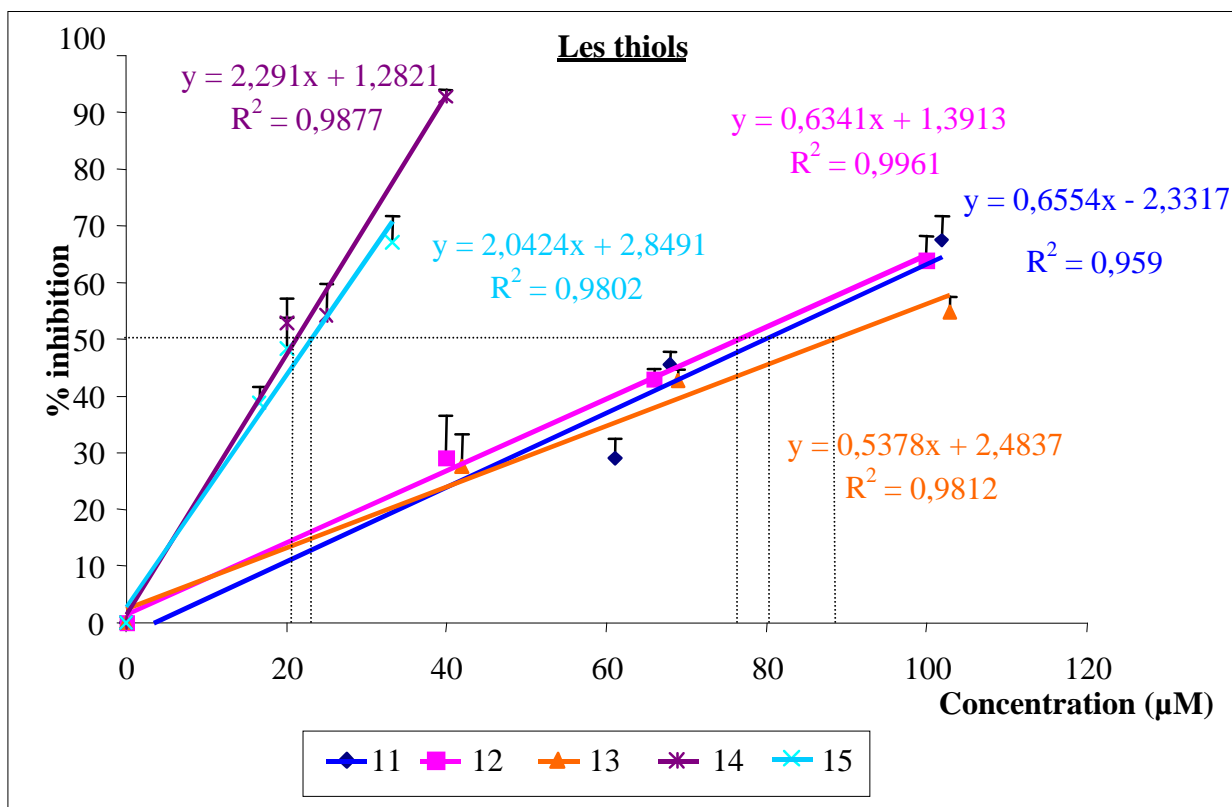


Figure 33 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des thiols 11, 12, 13, 14, et 15 en fonction de la concentration.

La figure 33 montre clairement l'existence de deux familles de composés aux activités différentes. En effet, les composés 14 et 15 se détachent du groupe de composés appartenant à la famille du benzothiazole, à savoir les dérivés 11, 12. Pour les composés 14 et 15, nous observons une augmentation importante de l'activité pour une faible variation de concentration.

Ce phénomène est moins important lorsqu'on considère les composés 11, 12 et 13 qui ont globalement le même comportement. A l'inverse des résultats obtenus dans le test au DPPH, le substituant en position 6 du cycle benzénique, en particulier le groupement éthoxy, n'a pas d'influence sur la capture du radical ABTS^+ .

Les concentrations inhibitrices 50 % sont reportées dans le tableau 22 :

Composés	CI ₅₀ (μM)
11	79,84 ± 3,55
12	76,66 ± 5,97
13	88,35 ± 3,28
14	23,08 ± 2,17
15	21,26 ± 1,41
Acide ascorbique	46,46 ± 0,33

Tableau 22 : Concentrations inhibitrices 50 % des thiols (**11-15**).

Concernant le WR-2721, il n'a pas été possible de déterminer une CI₅₀ en raison d'une mauvaise reproductibilité des résultats obtenus à 1 minute. En effet, avec ce composé, nous n'avons pas pu mettre en évidence de plateau mais une inhibition croissante et régulière jusqu'à une inhibition totale. Par exemple, dès la concentration de 68 μM, nous observons systématiquement 100 % d'inhibition à 8 minutes. C'est pourquoi nous avons choisi de tester, dans nos conditions un antioxydant de référence tel que l'acide ascorbique.

Les résultats confirment une activité très intéressante du composé **14** (comme dans le test au DPPH) mais aussi du composé **15** avec des CI₅₀ inférieures à celle de la vitamine C (46,46 μM) de l'ordre de 20 μM (tableau 22). Ces deux composés appartiennent à la série dérivée du thiadiazole.

Les dérivés **11**, **12** et **13**, issus du benzothiazole, possèdent, quant à eux, des CI₅₀ voisines de 80 μM. Ces CI₅₀ sont supérieures à celle de l'acide ascorbique mais restent relativement intéressantes car toujours inférieures à 100 μM.

En conclusion, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le test au DPPH. En effet, l'ordre de grandeur des concentrations inhibitrices est le même : elles sont toutes inférieures à 100 μM . La différence avec le premier test réside dans le fait que le composé **15** est plus actif que tous les autres et que le composé **13** possède une activité voisine des composés **11** et **12**. Malgré tout, la série dérivée du thiadiazole est la plus efficace par rapport à celle du benzothiazole. Nous pouvons donc classer ces composés par ordre d'activité décroissante de la façon suivante : **15** \approx **14** > **12** > **11** > **13**.

III.2.3.2. Les aminothiols (**16**, **17** et **19**)

Figure 34 sont représentées comme précédemment les droites de régression des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en aminothiols, obtenues à partir des points expérimentaux.

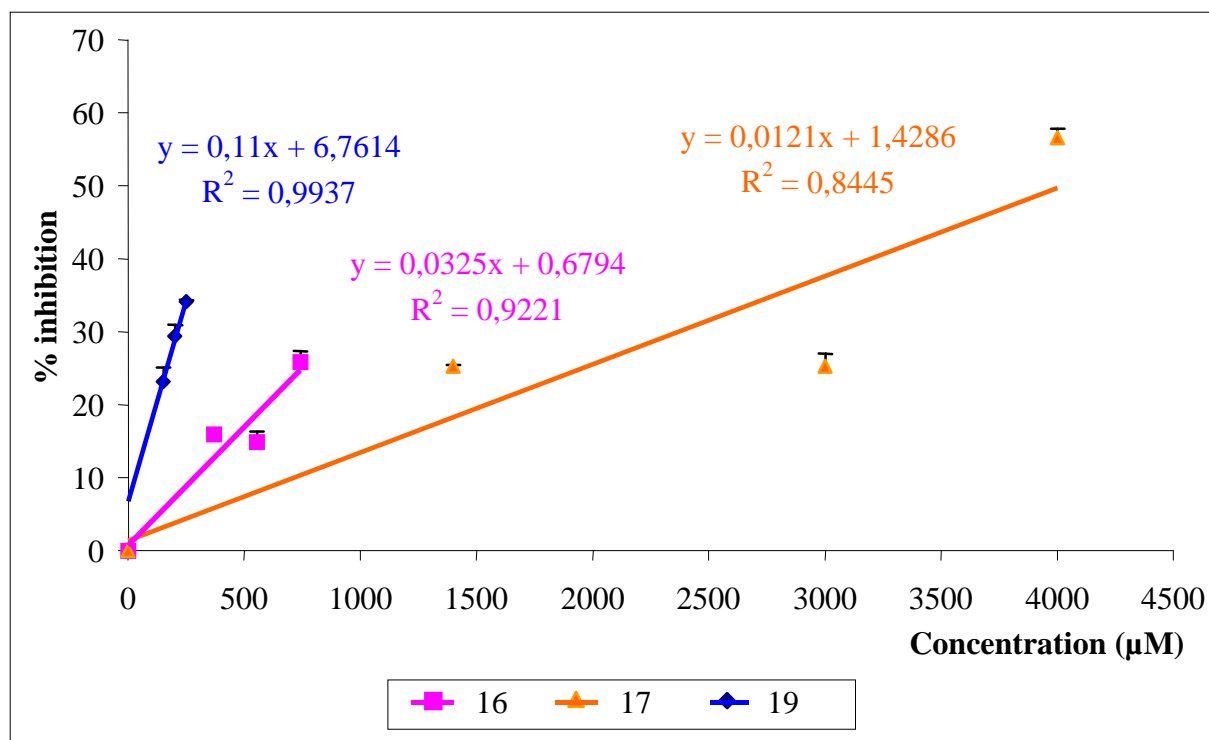


Figure 34 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des aminothiols **16**, **17** et **19** en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux du test au DPPH. En effet, ils montrent clairement que le composé **19** se distingue des deux autres car il présente une activité plus grande. Dans le cas des aminothiols, nous constatons comme dans le cas des thiols une activité plus importante des dérivés du thiadiazole par rapport aux dérivés du benzothiazole.

Les concentrations inhibitrices 50 % sont les suivantes :

Composés	CI ₅₀ (mM)
16	1,52 ± 0,09
17	4,04 ± 0,62
19	0,39 ± 0,03
Acide ascorbique	0,046 ± 0,03

Tableau 23 : Concentrations inhibitrices 50 % des aminothiols **16**, **17** et **19**.

Comme dans le cas du test au DPPH, les concentrations inhibitrices sont supérieures à 1 mM pour les composés **16** et **17** et de ce fait supérieures à celle de la vitamine C. Le composé **19** reste le plus actif de cette famille avec un CI₅₀ de 0,39 mM. Ainsi nous pouvons classer ces composés par ordre d'activité décroissante de la façon suivante **19** > **16** > **17**.

Ces résultats sont en accord total avec le premier test au DPPH.

III.2.3.3. Les acides thiosulfoniques et les phosphorothioates

Enfin, grâce à ce test nous avons pu évaluer, de la même façon, que pour les thiols et aminothiols les propriétés antioxydantes des acides thiosulfoniques **34** et **35** et des phosphorothioates **36** et **37**. Les acides thiosulfoniques **32-33** n'ont pas pu être testés en raison de problèmes de solubilité. Les résultats sont représentés figure 35.

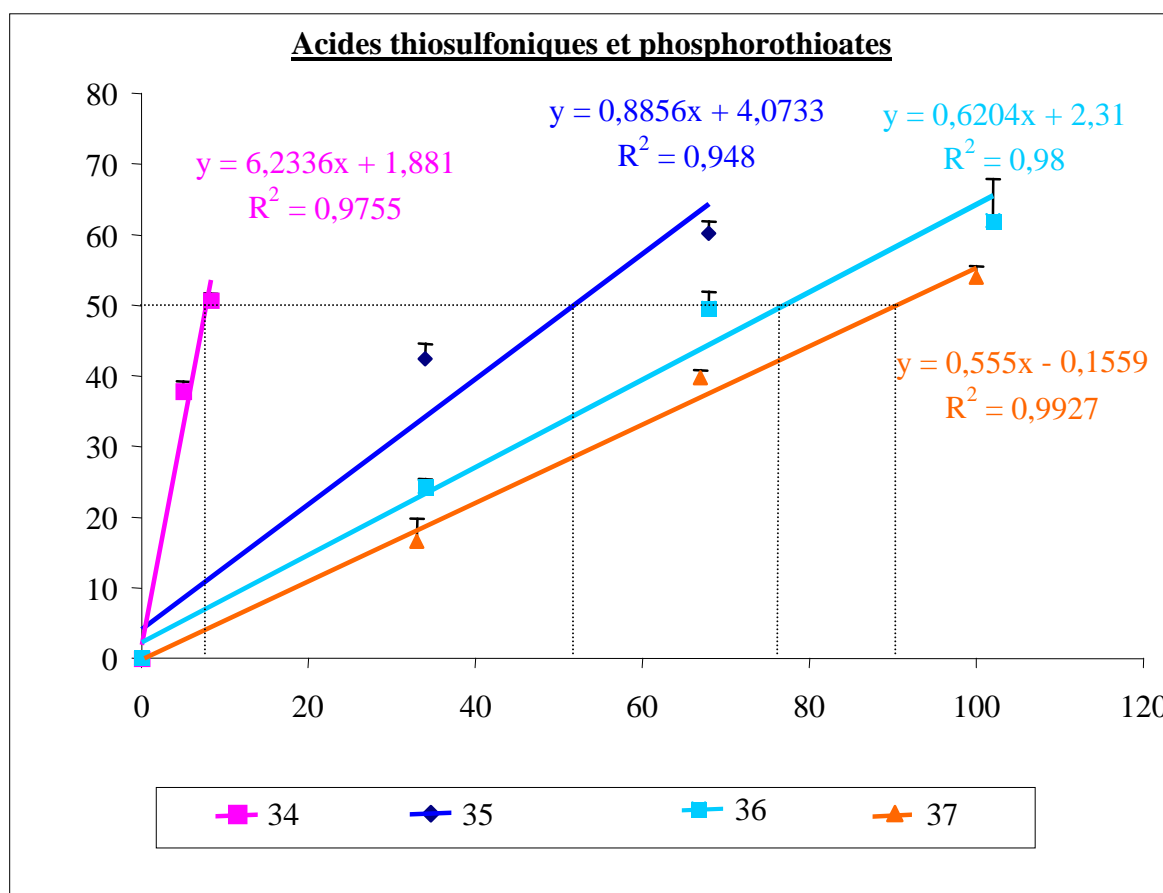


Figure 35 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des composés **34**, **35**, **36** et **37** en fonction de la concentration.

Selon la figure 35, les acides thiosulfoniques **34** et **35** ont une activité supérieure à celles des phosphorothioates correspondants. En témoignent les pentes de chacune des droites de régression. Cependant, il faut noter que le composé **34** est le plus actif puisque l'inhibition est plus rapide que pour les autres composés.

Les concentrations inhibitrices sont les suivantes :

Composés	CI ₅₀ (µM)
34	8,32 ± 0,12
35	51,85 ± 3,06
36	76,87 ± 0,99
37	90,33 ± 2,56
Acide ascorbique	46,46 ± 0,03

Tableau 24 : Concentrations inhibitrices 50 % des composés (34-37).

Comme pour les thiols, toutes les concentrations inhibitrices sont inférieures à 100 µM. Seul le composé **34** présente une meilleure activité que la vitamine C avec une CI₅₀ voisine de 10 µM. Il semble donc que le groupement terminal de la chaîne alkyle ait une influence sur l'activité antioxydante. En particulier, la présence d'un groupement phosphorothioate diminue l'activité par rapport à un groupement thiosulfonique.

III.3. Conclusion

Pour conclure, ce test confirme les résultats obtenus avec le test au DPPH. Cependant, il semble sous estimer légèrement les valeurs obtenues avec ce dernier pour les thiols en particulier.

De plus, ces deux tests attestent l'activité antioxydante des nos composés **11-15** et **34-37**. Nous pouvons ainsi classer nos familles de composés par ordre décroissant d'activité antioxydante de la façon suivante :

Thiols : **15** ≈ **14** ≈ **13** > **11** > **12**.

Aminothiols : **19** > **16** > **17**

Acides thiosulfoniques : **34** > **35**

Phosphorothioates : **36** > **37**

Alcools : **21-25**

Amides : **1-5**

D'autre part, au sein de chaque famille, et notamment des familles thiol et aminothiols, les motifs dérivés du thiadiazole sont toujours plus actifs que les dérivés du benzothiazole.

Au sein même de cette famille dérivée du thiadiazole, la présence d'un groupement éthylthio-, en position 5 du cycle, améliore, dans la plupart des cas, les propriétés antioxydantes par rapport à un groupement éthyle.

Enfin, les tests réalisés montrent que les composés les plus actifs ont une activité antioxydante comparable à celle du WR-2721.

IV. ETUDE DU POUVOIR RADIOPROTECTEUR DES THIOLS ET AMINOTHIOLS

IV.1. Etude du pouvoir protecteur vis-à-vis de l'ADN des composés synthétisés après réaction de Fenton

IV.1.1. Introduction

Afin de confirmer le pouvoir antioxydant des composés ayant obtenu une CI_{50} satisfaisante aux tests avec les radicaux DPPH \cdot et ABTS $^{+}$, nous avons étudié la capacité des dérivés thiols (**11-15**) et aminothiols (**16, 17, 19**) à protéger l'ADN plasmidique des radicaux hydroxyles, connus pour être à l'origine des principaux dégâts sur l'ADN suite à la radiolyse de l'eau.

Par la réaction de Fenton, nous simulons *in situ* l'effet indirect des radiations ionisantes. En effet, cette réaction simple d'oxydation du Fer ferreux (Fe^{2+}) en Fer ferrique Fe^{3+} en présence de peroxyde d'hydrogène aboutit à la formation du radical et de l'anion hydroxyle.

IV.1.2. Conditions expérimentales

A une solution aqueuse d'ADN plasmidique pBR322 (Sigma Aldrich, 4363 pb) dans du tampon phosphate 5 mM (pH 7,4, NaCl 10 mM) sont ajoutées des quantités variables des composés testés eux mêmes en solutions dans du tampon phosphate. La quantité d'ADN utilisée par échantillon était de 1,25 µg (42 µg/mL).

La réaction de Fenton est réalisée en ajoutant des solutions fraîchement préparées de sel de Mohr (sulfate d'ammonium ferreux, ACS reagent, 100 µM), de peroxyde d'hydrogène à 30 % (100 µM) et d'EDTA (Sigma Aldrich, 100 µM). Les échantillons, d'un volume final de 30 µL, sont ensuite incubés à 37 °C pendant 12 minutes. La réaction de Fenton est bloquée par addition d'une solution de mésylate de desferoxamine (concentration finale de 0,18 mM).

Les coupures de l'ADN consécutives à l'attaque des radicaux oxygénés ont été révélées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 25 µL de bromure d'éthydiuim (10 mg/mL) après addition à chaque échantillon de 8 µL de bleu de bromophénol (75 % glycérol, 24,95 % tampon Tris, 0,05 % bleu de bromophénol). La migration est réalisée pendant 16 heures à 20 V dans du tampon tris borate EDTA (10,8 g/L de tris(hydroxyméthyl)aminométhane, 5,5 g/L acide borique, 0,93 g/L d'EDTA).

Le gel est ensuite analysé et les différentes formes d'ADN plasmidiques révélées par illumination sur une table UV à 254 nm. Après photographie, une quantification a été réalisée par densitométrie à l'aide d'un logiciel Mesurim.

De la même façon que pour les tests réalisés avec la Naphazoline (p X) nous avons déterminé le pourcentage de forme circulaire relaxée (% Forme II) selon la formule suivante :

$$\% \text{ FII} = 100 * \left(\frac{\text{Forme circulaire relaxée}}{\text{Forme circulaire relaxée ADN} + \text{Forme superenroulée} \times 1.66} \right)$$

FII = Forme Circulaire Relaxée

Nous avons également pu calculer les pourcentages de protection de la façon suivante :

$$\% \text{ protection} = 100 * \frac{P_F - T_{NT}}{T_F - T_{NT}}$$

Avec P_F = Produit + ADN + Fenton ; T_{NT} = témoin ADN non traité ; T_F = témoin ADN traité.

Un test *t* de Student a été réalisé afin de mettre en évidence l'effet protecteur des nos composés. Nous avons comparé les échantillons ADN traité + produit avec le témoin non traité c'est à dire l'ADN natif (** différence très significative $p < 0,01$; * différence significative $p < 0,05$) à l'aide du logiciel GraphPad InStat version 3.00.

IV.1.3. Etude des thiols (11-15) et aminothiols (16,17, 19)

Dans un premier temps nous présentons les résultats obtenus avec les thiols (11-15) et les aminothiols (16, 17, 19). En effet les résultats du test au DPPH attestent d'un pouvoir antioxydant intéressant pour la plupart d'entre eux. De plus, il est connu que la majorité des radioprotecteurs efficaces sont des thiols ou des aminothiols.

Pour des raisons de solubilité, le composé 13 n'a pas pu être testé dans nos conditions. Cependant, afin de solubiliser les autres dérivés, nous avons préparé des solutions mères diluées avec 2 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). En raison du volume prélevé très faible de ces solutions mères et du faible volume réactionnel, l'effet du DMSO est considéré comme nul. La concentration finale en DMSO est estimée en moyenne à 0,4 % en volume dans l'échantillon.

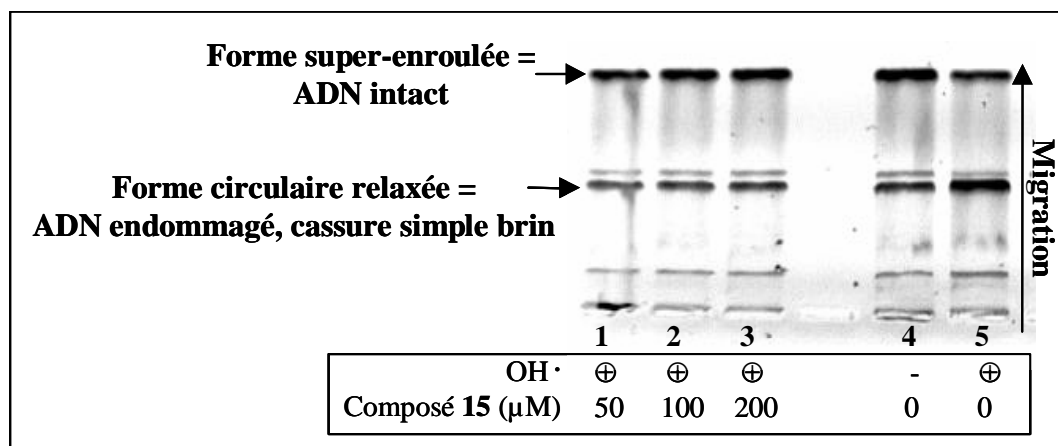


Figure 36 : Electrophorèse sur gel d'agarose obtenu après traitement de l'ADN par une réaction de Fenton en présence et en absence du composé 15 (50 µM ; 100 µM ; 200 µM). Colonne 1 : 50 µM, colonne 2 : 100 µM, colonne 3 : 200 µM. Colonne 4: ADN non oxydé, colonne 5 : ADN exposé aux radicaux OH· sans le composé 15.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogrammes (figure 37).

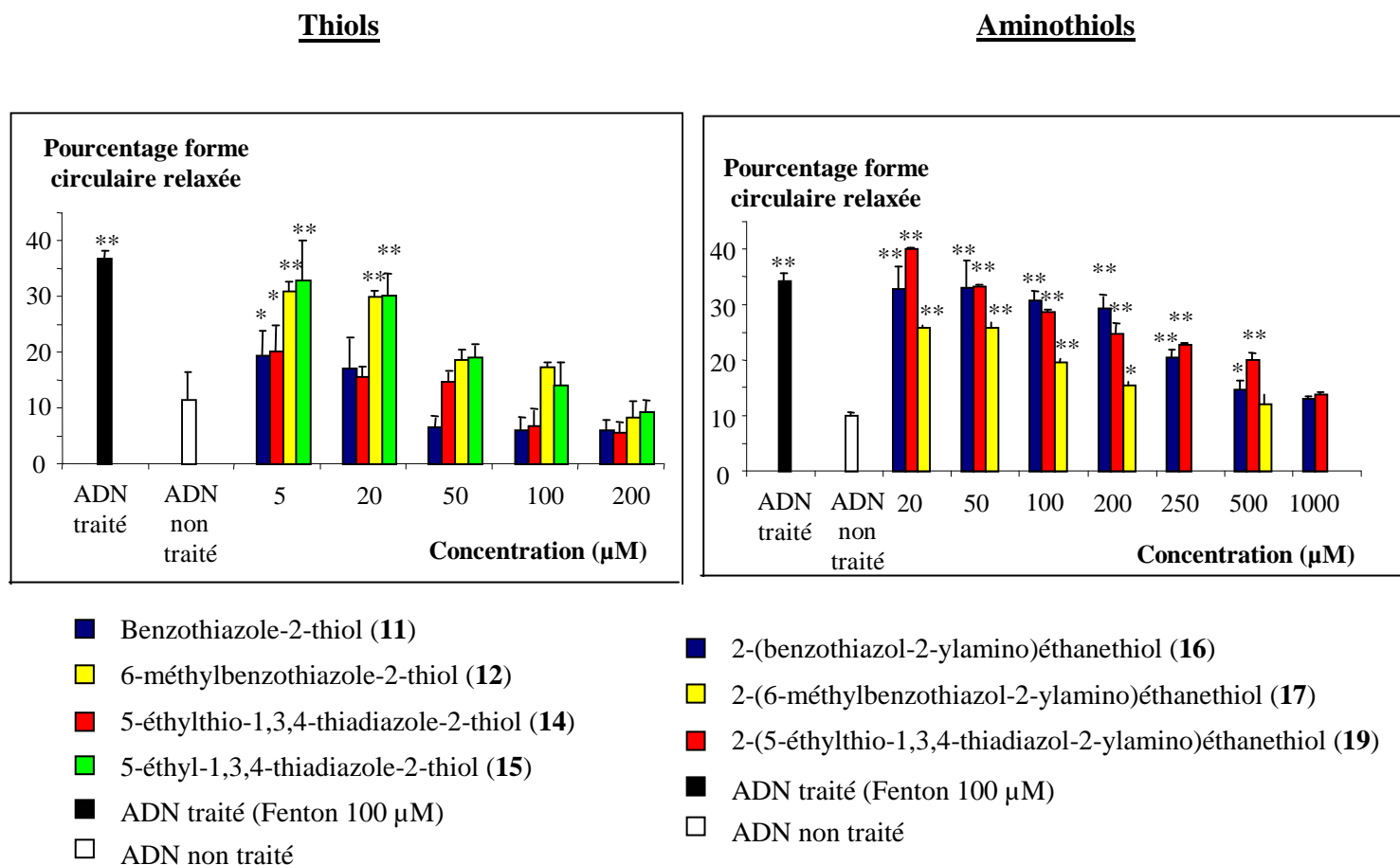


Figure 37 : Représentation des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée après réaction de Fenton en présence ou en absence des composés **11**, **12**, **14**, **15**, **16**, **17** et **19**. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicates et les valeurs figurées sont des valeurs moyennes \pm écart type. * produit + réaction de Fenton versus témoin non traité par la réaction de Fenton, $p < 0,05$, ** produit + réaction de Fenton versus témoin non traité par la réaction de Fenton, $p < 0,01$.

Une étude statistique est réalisée visant à comparer par un test de Student les moyennes des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée dans les échantillons traités par la réaction de Fenton en présence de produits avec la moyenne du pourcentage d'ADN sous forme circulaire relaxée dans le témoin non traité par la réaction de Fenton (** : différence très significative, * : différence significative).

Tout d'abord, il faut noter l'augmentation significative ($p < 0,01$) des dommages de l'ADN induits par les radicaux hydroxyles. En effet, les taux de coupures simples brins générés par les radicaux hydroxyles pour les deux expériences sont respectivement de $36,92 \pm 2,01$ % et de $35,80 \pm 1,89$ %. En revanche, les taux de coupures simple brin dans les échantillons non traités par la réaction de Fenton sont de $11,50 \pm 1,30$ % et $12,03 \pm 2,14$ %.

De plus, ces deux histogrammes montrent clairement l'effet protecteur des thiols : nous observons une diminution du pourcentage de la forme circulaire relaxée lorsque la concentration en dérivés **11**, **12**, **14**, **15** augmente. Cette diminution est d'autant plus importante que les concentrations sont élevées.

D'autre part, ces résultats montrent une protection totale de l'ADN vis à vis des OH \cdot par le dérivé **11** dès la concentration de 50 μ M. En effet, à partir et au delà de cette concentration, il n'y a aucune différence statistiquement significative entre le témoin non traité et l'échantillon traité en présence du composé **11**. Concernant le dérivé **12**, la protection totale est obtenue pour une concentration de 100 μ M.

Avec les dérivés **14** et **15**, les taux de coupures simple brin, après réaction de Fenton, sont plus importants qu'avec les dérivés **11** et **12** quelle que soit la concentration en produit. En effet, ils sont de $31,05 \pm 1,29$ pour le composé **14**, $32,84 \pm 2,18$ % pour le composé **15**, $19,52 \pm 4,07$ % pour le composé **11** et $20,27 \pm 4,26$ % pour le composé **12** à la concentration de 5 μ M.

L'étude statistique révèle une différence significative entre le témoin non traité par la réaction de Fenton et les échantillons traités par la réaction de Fenton et en présence de ces composés. Ces histogrammes permettent donc de conclure sur l'efficacité plus importante des thiols dérivés du benzothiazole par rapport aux thiols dérivés du thiadiazole. Ces résultats sont certes en contradiction avec ceux des tests précédents concernant l'efficacité relative de ces dérivés mais les concentrations efficaces restent dans tous les cas inférieures à 100 μ M.

Concernant les aminothiols, il faut noter tout d'abord que comparativement aux composés **11**, **12**, **14**, **15** les concentrations nécessaires pour avoir un effet protecteur d'au moins 50 % avec les composés **16**, **17** et **19** sont supérieures. Ceci témoigne d'une efficacité moindre de la part des aminothiols par rapport aux thiols.

De plus, une protection totale n'est obtenue que pour la concentration de 1 mM pour les composés **16** et **19**. Le composé **19** reste le plus actif de cette famille avec une protection quasi-totale à 500 μM . Les concentrations de 250 et 1000 μM n'ont pas été réalisées avec le composé **16**.

Nous avons représenté les pourcentages de protection obtenus pour l'ensemble des composés en fonction de la concentration (figure 38).

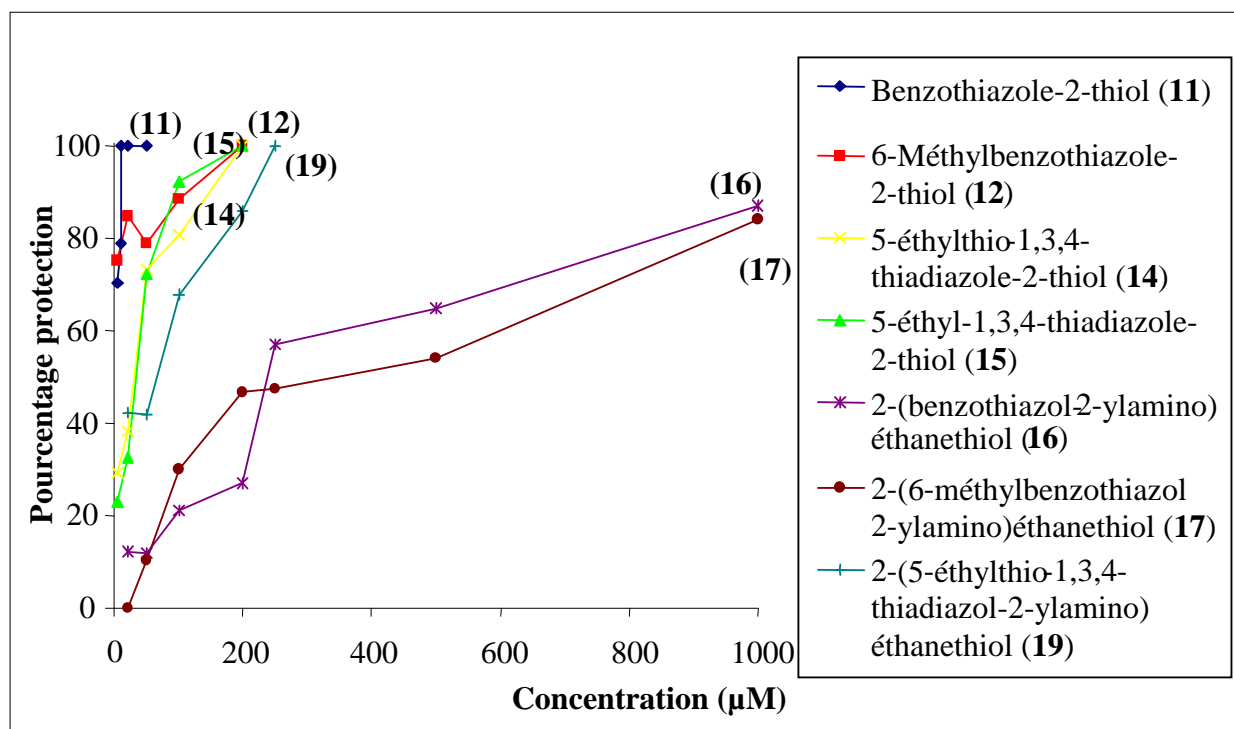


Figure 38 : Représentation de pourcentages de protection de l'ADN après réaction de Fenton en fonction des concentrations en thiols et aminothiols.

Cette représentation montre l'existence de deux groupes de composés en fonction de leur efficacité. En effet, nous avons d'une part les thiols et le composé **19** et d'autre part, moins protecteurs, les dérivés aminothiols **16** et **17**. Quel que soit le test réalisé, l'aminothiol **19**, dérivé du thiadiazole, se rapproche en terme d'activité de celle des thiols.

En comparaison avec le WR-2721 et son métabolite, le WR-1065, dans l'ensemble les composés **11**, **12**, **14** et **15** possèdent une activité protectrice nettement plus importante. Les pourcentages de protection obtenus, dans les mêmes conditions, pour le WR-2721 et le WR-1065 à la concentration de 50 μM sont respectivement de $13,82 \pm 1,40 \%$ et $8,96 \pm 1,88 \%$ contre 100,00 % pour le composé **11**, $79,00 \pm 2,55 \%$ pour le composé **12**, $73,45 \pm 0,57$ pour le composé **14** et $72,31 \pm 4,07 \%$ pour le composé **15** à 50 μM .

Enfin, il faut noter que les concentrations utilisées en produit sont relativement faibles, voisines de celles utilisées dans les tests biochimiques précédents (DPPH, ABTS). Pour ce test, nous ne déterminons pas les concentrations inhibitrices 50 % en raison de la non linéarité des résultats obtenus. Cependant, elles se situent pour les dérivés **11**, **12**, **14**, **15** et **19** en dessous de 50 μM ce qui est du même ordre de grandeur que pour les tests avec les radicaux DPPH \cdot et ABTS $^{+}$.

Pour les dérivés **16**, **17**, une protection de 50 % est observée pour des concentrations comprises entre 200 et 250 μM .

En conclusion, les deux tests précédents montrent que la plupart des composés testés présentent une activité antioxydante intéressante. De plus, les tests (test DPPH et test ABTS) précédents semblent de bons modèles de criblage des composés même si en toute vraisemblance ils sous estiment l'activité antioxydante. Ceci s'explique simplement par le fait que les radicaux hydroxyyles générés par la réaction de Fenton sont beaucoup plus réactifs que les radicaux DPPH et ABTS.

IV.1.4. Etude des acides thiosulfoniques (34, 35) et des phosphorothioates (36, 37)

Nous avons également évalué le pouvoir protecteur des acides thiosulfoniques et des phosphorothioates vis-à-vis de l'ADN traité par une réaction de Fenton.

Cependant, les résultats obtenus ne nous permettent pas de tracer des histogrammes représentant les pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée en fonction des concentrations en produits testés. En effet, comme en témoignent les gels d'électrophorèse représentés à la figure 39, aucun effet protecteur n'a été observé.

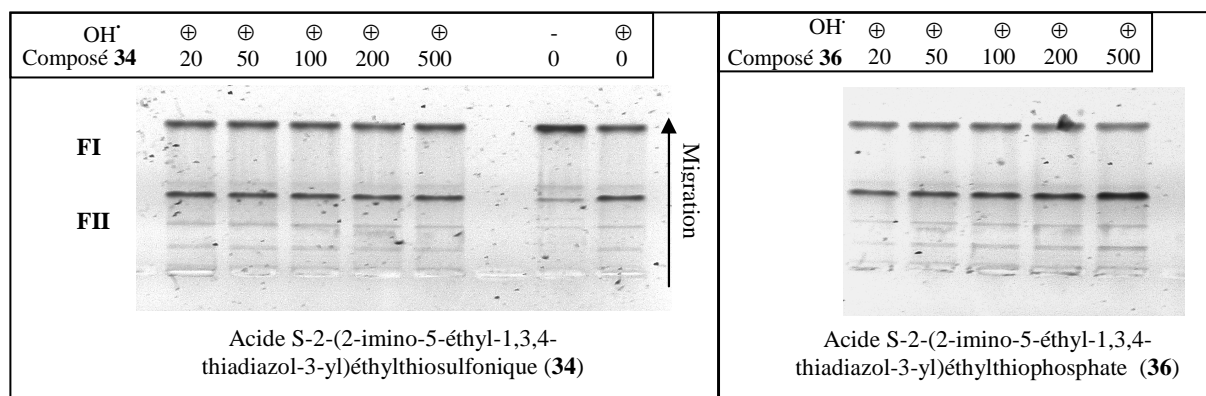


Figure 39 : Gel d'électrophorèse de l'ADN pBR322 exposé aux radicaux OH[•] générés par la réaction de Fenton en présence et en absence des dérivés 34 et 36 (20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 500 μM). Colonne 1 : ADN exposé aux OH[•] en présence des dérivés (20 μM), colonne 2 : ADN exposé aux OH[•] en présence des dérivés (50 μM), colonne 3 : ADN exposé aux OH[•] en présence des dérivés (100 μM), colonne 4 : ADN exposé aux OH[•] en présence des dérivés (200 μM), colonne 5 : ADN exposé aux OH[•] en présence des dérivés (500 μM), colonne 6 : ADN non traité, colonne 7 : ADN exposé aux OH[•]. FI = Forme superenroulée, FII = forme circulaire relaxée

Ces résultats confirment d'une part la nécessité pour les dérivés phosphorés de l'intervention de la phosphatase alcaline permettant de libérer la forme active, à savoir l'aminothiols correspondant, comme pour le WR-2721. En effet, dans les mêmes conditions, les pourcentages de protection obtenus pour le WR-2721 et pour son métabolite, le WR-1065 à 1 mM sont respectivement de 10,02 ± 2,63 % et de 90,67 ± 1,45 %. Le WR-1065 est donc bien le composé à l'origine de l'effet protecteur par capture des radicaux oxygénés.

Il est décrit dans la littérature que cette métabolisation a lieu au niveau des membranes cellulaires. Nous avons confirmé par une étude RMN du devenir du WR-2721 dans du plasma dépourvu de cellules. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de diminution du pic caractéristique en phosphore du WR-2721, ni l'apparition d'un pic correspondant à du phosphate. La phosphatase alcaline membranaire est donc indispensable à la libération dans le milieu intracellulaire du métabolite actif.

D'autre part, comme pour le WR-2721, nous montrons par le test au DPPH que les phosphorothioates possèdent des propriétés antioxydantes intrinsèques malgré une protection de l'ADN nulle. Il en est de même pour les acides thiosulfoniques, pour lesquels nous n'observons pas d'effet protecteur malgré une activité antioxydante intéressante mesurée par le test ABTS. Ceci suggère que pour ces composés, une métabolisation est indispensable à l'activité.

IV.2. Evaluation du pouvoir radioprotecteur vis-à-vis de l'ADN plasmidique *in vitro* après irradiation gamma

IV.2.1. Introduction

Afin de déterminer un effet radioprotecteur vis-à-vis des radiations γ , nous soumettons une solution d'ADN plasmidique pBR322 dans 30 μ L de tampon phosphate 5 mM (pH 7,4, NaCl 10 mM) à différentes doses d'irradiation γ (60 Gy/h) par une source cobalt 60 à température ambiante en présence et en absence des différents composés testés. Les irradiations ont été réalisées en présence et en absence des différents composés à différentes concentrations.

De la même façon que pour la réaction de Fenton, nous séparons les différentes formes d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et nous quantifions chacune d'elle.

Nous calculons ainsi les pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée et les pourcentages de protection pour chacun des dérivés testés.

IV.2.2. Conditions expérimentales

Différentes solutions contenant de l'ADN plasmidique pBR322 (1,25 µg soit 42 µg/mL) dans 30 µL de tampon phosphate 5 mM (pH 7,4, NaCl 10 mM) ont été exposées à une irradiation par une source Cobalt 60 à différentes doses (débit de dose à 50 Gy/h) à 25°C en présence et en absence des différents composés. Les doses d'irradiation sont similaires à celles utilisées dans la littérature pour des tests similaires [124].

Après irradiation, 10 µL de bleu de bromophénol (75% glycérol, 24,95 % tampon Tris, 0,05 % bleu de bromophénol) sont ajoutés à chaque échantillon. Les coupures de l'ADN consécutives à l'irradiation ont été révélées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % contenant 25 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml). La migration est réalisée pendant 16 heures à 20 V dans du tampon tris borate EDTA (10,8 g/L de tris(hydroxyméthyl)aminométhane, 5,5 g/L acide borique, 0,93 g/L d'EDTA). Le gel est ensuite analysé et les différentes formes d'ADN plasmidique ont été révélées par illumination sur une table UV à 254 nm. Après photographie, une quantification des bandes a été réalisée par densitométrie à l'aide d'un logiciel Mesurim. Nous avons pu ainsi déterminer les pourcentages d'ADN sous forme relaxée qui correspond à la forme endommagée et les pourcentages de protection comme dans le test précédent.

IV.2.3. Résultats

IV.2.3.1. Thiols (11-15)

Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment et d'évaluer un pouvoir radioprotecteur « réel », nous soumettons de l'ADN plasmidique à des radiations gamma par une source Cobalt 60 (10 et 15 Gy) en présence et en absence des dérivés suivants : **11**, **12**, **14**, **15**, WR-2721 et WR-1065. Les coupures de l'ADN consécutives à l'irradiation ont été révélées par électrophorèse sur gel d'agarose. La figure 40 montre un exemple de gel d'électrophorèse obtenu après une irradiation de 10 Gy en présence du composé **15**.

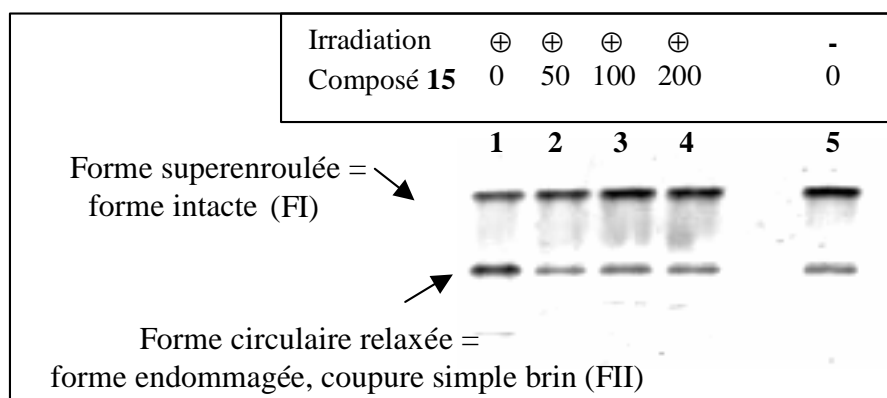


Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose obtenu après exposition de l'ADN à des radiations gamma (10 Gy) en présence et en absence du composé **15** (50 μM ; 100 μM ; 200 μM). Colonne 1 : ADN exposé aux radiations gamma. ADN exposé aux radiations gamma en présence du composé **15** ; colonne 2 : 50 μM , colonne 3 : 100 μM , colonne 4 : 200 μM . colonne 5 : ADN non traité.

Les résultats quantitatifs sont représentés figure 41. Une étude statistique est réalisée visant à comparer par un test de Student les moyennes des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée dans les échantillons traités en présence de produits avec la moyenne du pourcentage d'ADN sous forme circulaire relaxée dans le témoin non traité (** : différence très significative, * : différence significative).

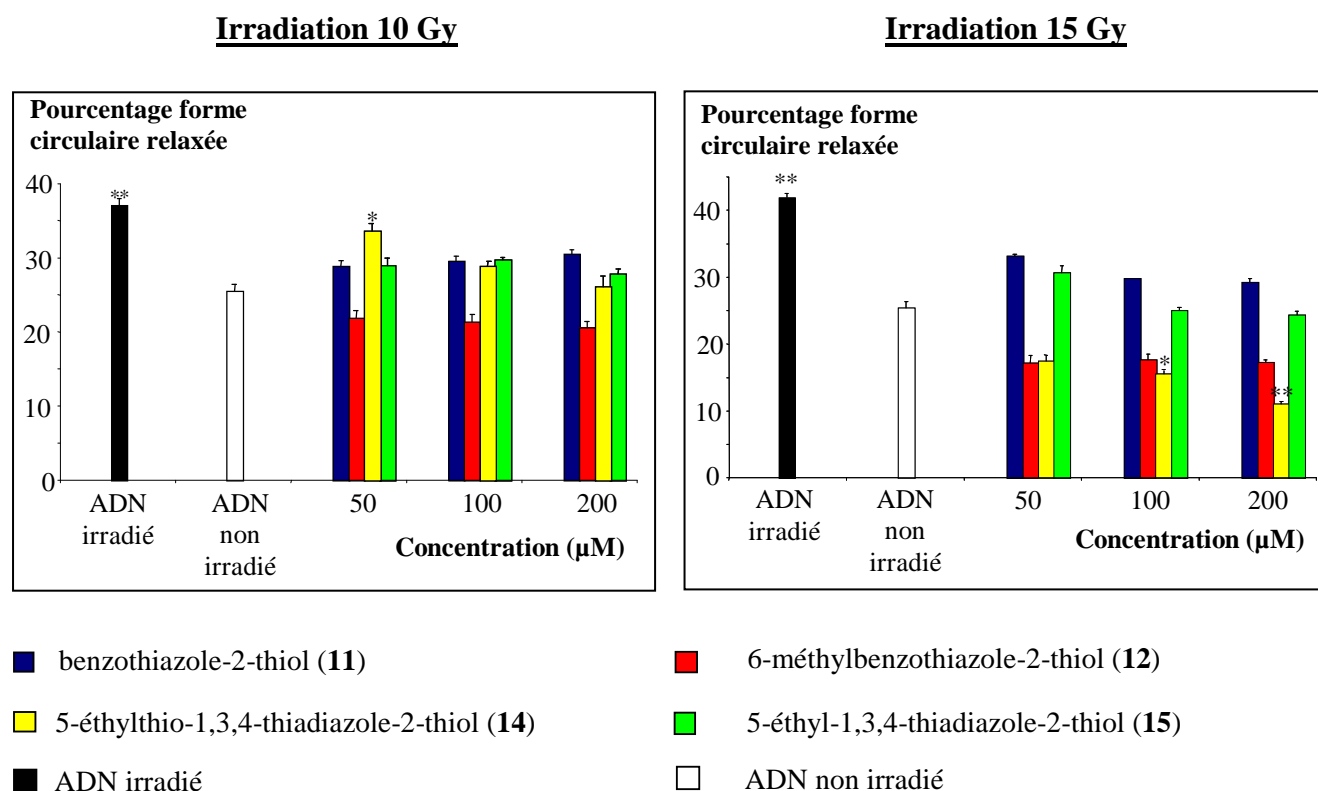


Figure 41 : Représentation des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée après irradiation gamma (10 Gy et 15 Gy) en présence ou en absence des composés **11**, **12**, **14**, **15**. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicates et les valeurs figurées sont des valeurs moyennes \pm écart type. * produit + irradiation gamma versus témoin non irradié, $p < 0,05$, ** produit + irradiation gamma versus témoin non irradié, $p < 0,01$.

Ces histogrammes montrent que quelque soit la dose d'irradiation nous avons une augmentation significative des dommages radio-induits de l'ADN. A 10 Gy, nous obtenons $36,99 \pm 0,90$ % d'ADN sous forme circulaire relaxée contre $25,46 \pm 0,91$ % dans l'échantillon non irradié. Les taux de coupures simple brin sont légèrement supérieurs après une irradiation gamma qu'après une réaction de Fenton.

Pour une dose d'irradiation de 10 Gy, les résultats obtenus témoignent toujours d'une grande efficacité des thiols. Dès la plus faible concentration (50 μM) nous pouvons considérer que nous avons une protection totale de l'ADN en particulier avec le composé **12**. En effet, nous observons autant d'ADN sous forme circulaire relaxée ($28,78 \pm 0,85 \%$) que dans l'échantillon non irradié.

Les pourcentages de protection calculés à 100 μM , pour une dose d'irradiation de 10 Gy, des composés **11**, **12**, **14** et **15** sont respectivement de $64,70 \pm 7,43 \%$, $100,00 \pm 7,66 \%$, $71,12 \pm 5,61 \%$ et de $63,59 \pm 3,27 \%$. Nous avons également calculé les pourcentages de protection du WR-1065 et du WR-2721 à 100 μM et à la même dose d'irradiation ; ils sont respectivement de $22,25 \pm 3,02$ et de $0,32 \pm 2,49$ à 10 Gy.

Ces résultats attestent donc que les thiols apportent une meilleure protection de l'ADN que le composé de référence dans le domaine et son métabolite, à savoir le WR-2721 et le WR-1065.

Concernant la dose de 15 Gy, il faut noter que l'augmentation des dommages de l'ADN dans le témoin irradié est minime par rapport à la dose de 10 Gy. En effet, les pourcentages d'ADN sous forme relaxée pour les deux doses d'irradiation sont très proches : $36,99 \pm 0,90 \%$ à 10 Gy contre $41,91 \pm 0,59 \%$ à 15 Gy.

A cette dose, nous obtenons une protection totale de l'ADN avec les composés **12** et **14** dès 50 μM .

En comparaison avec le WR-1065 et le WR-2721, les pourcentages de protection calculés à 100 μM pour l'ensemble des composés restent supérieurs à ceux du WR-2721 et du WR-1065. En effet, pour le composé **11**, à 100 μM , nous obtenons $73,09 \pm 3,68 \%$ de protection. Pour les trois autres composés, nous avons une protection estimée à 100 % alors que pour le WR-2721 et le WR-1065, les protections sont estimées à $15,89 \pm 5,76 \%$ et $40,84 \pm 6,34 \%$.

Les différents composés peuvent être classés par activité décroissante dans l'ordre suivant : **12** > **14** > **11** > **15** > WR-1065 > WR-2721

IV.2.3.2. Les aminothiols (**16**, **17** et **19**)

Comme précédemment nous avons représenté figure 42 les pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée en fonction de la concentration en composés **16**, **17** et **19** et de la dose d'irradiation.

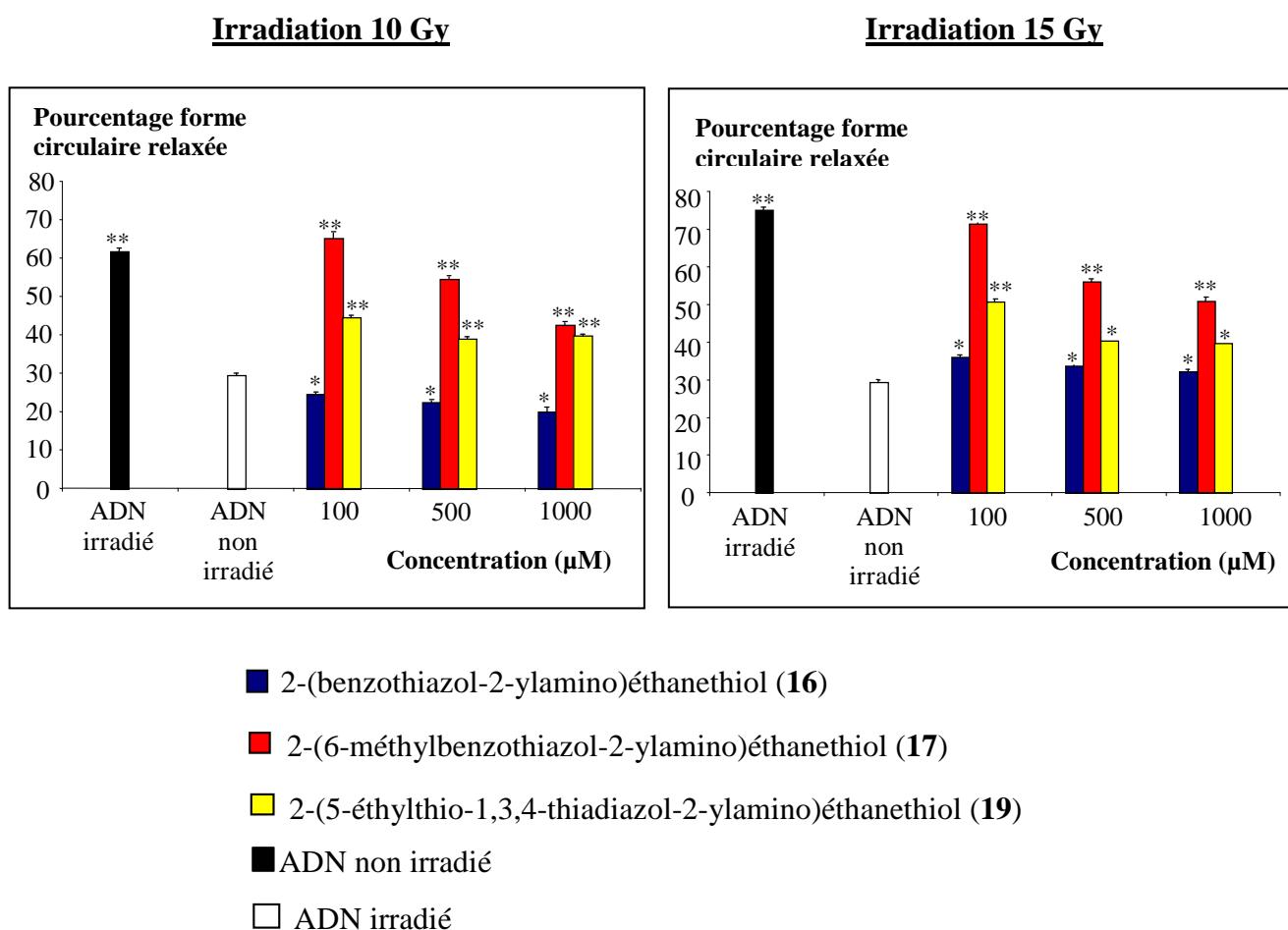


Figure 42 : Représentation des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée après irradiation gamma (10 Gy et 15 Gy) en présence ou en absence des composés **16**, **17**, **19**. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicates et les valeurs figurées sont des valeurs moyennes \pm écart type. * produit + irradiation gamma versus témoin non irradié, $p < 0,05$, ** produit + irradiation gamma versus témoin non irradié, $p < 0,01$.

Il est important de noter que les concentrations nécessaires pour observer une protection avec les aminothiols restent toujours supérieures à celles utilisées pour les thiols. Globalement ces dérivés **16**, **17** et **19** sont donc moins efficaces que les dérivés **11**, **12**, **14** et **15**.

De plus, comme précédemment, il existe une augmentation significative des dommages de l'ADN après une irradiation aux doses de 10 et 15 Gy. Les pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée sont respectivement de $61,69 \pm 0,93$ % et de $75,18 \pm 0,63$ % contre $29,33 \pm 0,74$ % lorsque l'ADN n'est pas irradié.

Concernant l'irradiation à 10 Gy, les dérivés **16** et **19** apportent respectivement une protection de 100,00 % et $70,13 \pm 1,43$ % dès 500 μM et à 10 Gy contre $22,60 \pm 2,33$ % pour le dérivé **17**. D'autre part, à la même concentration et pour la même dose d'irradiation de 10 Gy, les pourcentages de protection respectifs du WR-2721 et du WR-1065 sont $24,41 \pm 1,07$ % et $70,13 \pm 1,43$ % : ces pourcentages restent inférieurs à ceux obtenus avec les dérivés **16** et **19**.

Pour une dose de 15 Gy, $75,18 \pm 0,63$ % de l'ADN se trouve sous forme circulaire relaxée contre $29,33 \pm 0,74$ % lorsque l'ADN n'est pas irradié. Nous obtenons des résultats similaires à ceux observés avec la dose de 10 Gy. Le même rapport d'activité existe entre les différents composés avec $\mathbf{16} \cong \mathbf{19} > \mathbf{17}$. En effet, les pourcentages de protection sont les suivants à 100 μM : $73,42 \pm 1,45$ % pour le composé **16**, $41,92 \pm 1,67$ % pour le composé **17**, $75,94 \pm 1,38$ % pour le composé **19**. Concernant le WR-2721 et le WR-1065, les pourcentages de protection calculés sont de $45,44 \pm 5,76$ % et de $76,47 \pm 5,39$ % à 500 μM .

Il en résulte une efficacité comparable des dérivés **16** et **19** avec le métabolite actif du WR-2721 quelle que soit la dose d'irradiation et pour une concentration de 500 μM .

V. CONCLUSION

En conclusion de cette étude *in vitro*, les différents résultats montrent, d'une part, une plus grande efficacité des dérivés thiols comparativement aux aminothiols quel que soit le test. De plus ces thiols semblent avoir une efficacité comparable à celle du WR-1065 et du WR-2721 testés dans les mêmes conditions.

D'autre part, il semble que les dérivés du motif thiadiazole sont dans la majorité des cas plus efficaces que ceux dérivés de la famille du benzothiazole. Concernant ces derniers, le substituant en position 6 n'a pas d'influence majeure sur l'activité.

Le tableau 25 résume pour chaque test les CI_{50} obtenues en mM:

Composés	Test DPPH	Test ABTS	Fenton	Gamma (10 Gy)	Gamma (15 Gy)
11	0,092	0,079	< 0,05	< 0,05	0,05
12	0,092	0,076	< 0,05	< 0,05	< 0,05
14	0,053	0,023	< 0,05	< 0,1	< 0,05
15	0,084	0,021	< 0,05	< 0,1	< 0,05
16	1,39	1,52	0,250	< 0,25	< 0,25
17	3,17	4,04	0,250	1	1
19	0,11	0,39	< 0,10	0,250	0,250

Tableau 25 : Bilan des résultats obtenus en fonction du test utilisé.

Les résultats obtenus avec les phosphorothioates confirment que le mécanisme d'action de ces dérivés passe d'abord par l'intervention d'une enzyme permettant de libérer la forme active correspondante, c'est à dire l'aminothiol. Cependant, ces dérivés, tout comme le WR-2721, possèdent une activité antioxydante notable dans les tests *in vitro* avec les radicaux DPPH \cdot et ABTS $^{\cdot+}$. L'activité antioxydante n'est donc pas le seul paramètre entrant en jeu dans l'effet protecteur.

Au vu de cette étude, nous avons synthétisé de nouveaux composés aux propriétés antioxydantes et radioprotectrices très intéressantes. En effet, comparativement aux références connues dans le domaine des antioxydants, les thiols **11**, **12**, **14**, **15** ont une activité tout aussi comparable voire meilleure que la vitamine C ou encore le Trolox. De plus, comparativement aux polyphénols, décrits comme d'excellents antioxydants dans la littérature, les composés synthétisés restent très intéressants de part leur activité voisines de celle des polyphénols [135]. Ainsi, nous représentons ci-dessous les structures intéressantes (figure 43).

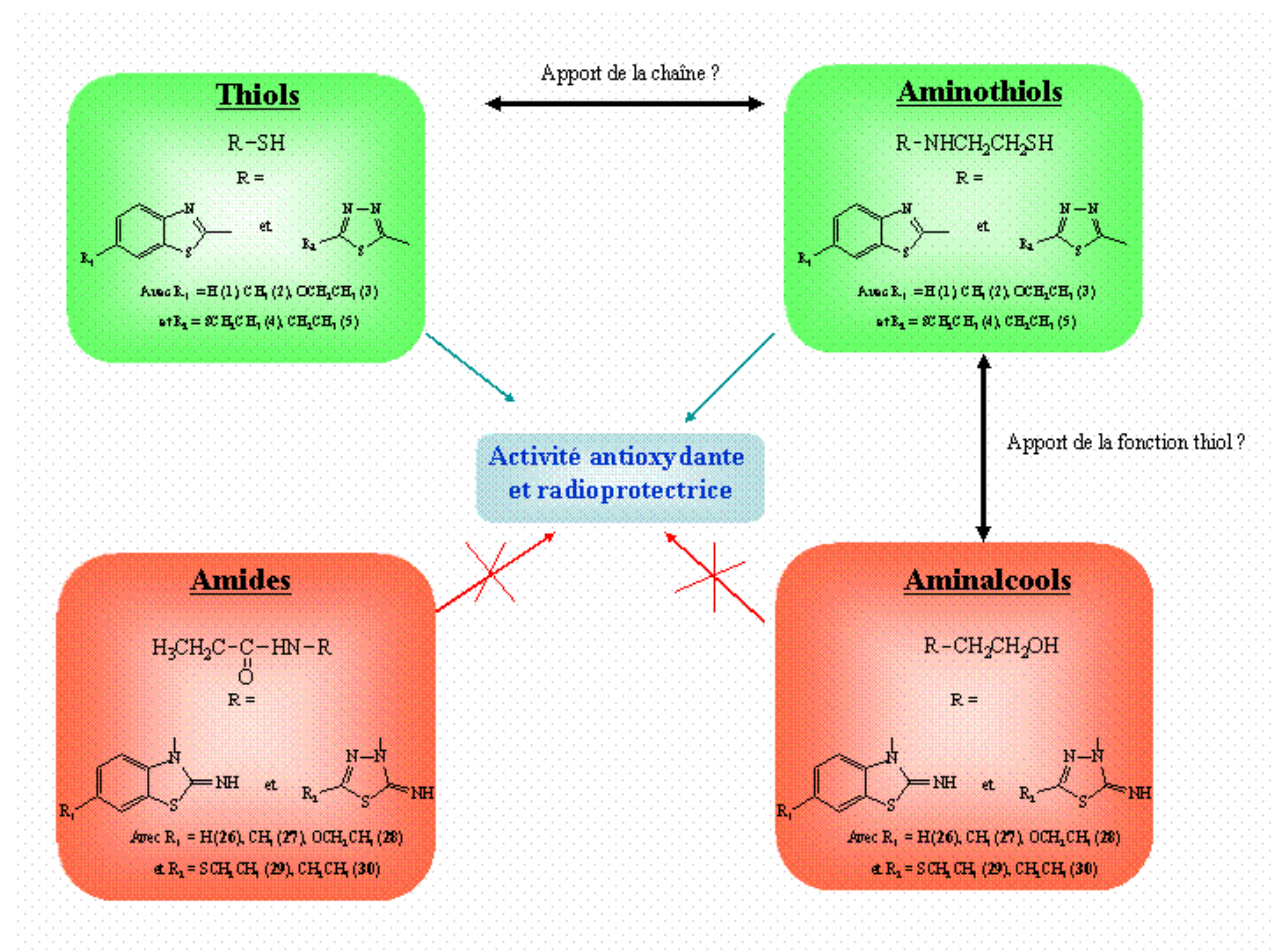
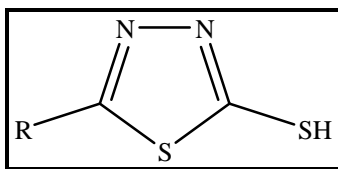


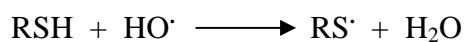
Figure 43 : Représentations des relations structure-activité.

¹³⁵ Villano, D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., Parilla-Garcia M.C. Talanta, in press.

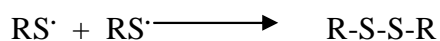
Contrairement à ce qu'il est décrit dans la littérature, nos résultats montrent que la présence de deux carbones entre la fonction amine et la fonction thiol n'améliore pas l'activité [1,57]. En effet, il semble même que la présence d'une fonction amine ne soit pas indispensable. En revanche, nous confirmons que les aminoalcools sont toujours moins actifs que les thiols. Enfin, il semble que les motifs aminobenzothiazole et thiadiazole, ainsi que la présence de substituants, influent sur l'activité antioxydante et radioprotectrice. Les dérivés du thiadiazole sont plus actifs que les dérivés du benzothiazole. Une substitution du cycle benzénique du motif benzothiazole en position 6 par un méthyl en particulier, entraîne une diminution de l'activité par rapport à son homologue non substitué. Par contre la présence d'un éthoxy améliore considérablement l'activité mais entraîne des problèmes de solubilité en milieu tampon. En conséquence, la structure la plus intéressante devrait dériver du thiadiazole sur lequel il serait intéressant d'étudier l'influence de certains groupements.



D'autre part, concernant le mécanisme d'action des thiols en particulier, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Ces hypothèses reposent sur un processus qui est la capture des radicaux oxygénés, plus particulièrement du radical hydroxyle. Il est envisageable que ces thiols puissent neutraliser ces radicaux de différentes manières. La première possibilité est que de part la mobilité de l'atome d'hydrogène porté par le soufre, ce dernier réagisse avec le radical hydroxyle pour former une molécule d'eau :



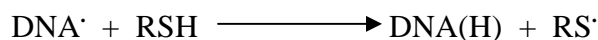
Les radicaux RS^{\cdot} peuvent à leur tour réagir entre eux pour former des disulfures. Ces derniers peuvent être réduits par des systèmes réducteurs intracellulaires tels que la glutathion transférase ou bien subir l'attaque d'autres espèces radicalaires pour donner lieu à la formation d'une part d'acide sulfonique et d'autre part du thiol correspondant.



Dans tous les cas, la capture précoce de ces radicaux permet d'éviter que ceux ci ne soient à l'origine de dommages, notamment au niveau de l'ADN.

Néanmoins, il est aussi raisonnable de penser que ces composés peuvent encore agir après l'attaque des radicaux oxygénés au niveau des bases de l'ADN. En effet, l'attaque directe des radicaux au niveau de ces bases se traduit notamment par la formation d'espèces radicalaires au sein même de cette macromolécule. En effet de nombreux auteurs mettent en évidence les conséquences au niveau de l'ADN de l'effet indirect des radiations ionisantes.

Différents mécanismes peuvent intervenir mais tous aboutissent à l'apparition de bases modifiées après réarrangement des bases radicalaires formées par l'attaque des radicaux oxygénés voire à une coupure simple brin [14,136,137]. Concrètement, si l'on conserve l'exemple des radicaux hydroxyles, ces derniers peuvent attaquer certaines doubles liaisons des bases puriques et pyrimidiques et ainsi s'additionner en créant une espèce radicalaire. Ils peuvent également arracher un proton créant également une espèce radicalaire. Les composés possédant une activité antioxydante, s'ils interviennent avant que les bases atteintes n'évoluent, peuvent neutraliser ces espèces radicalaires par donation d'un atome d'hydrogène par exemple et ainsi réparer entièrement ou partiellement les bases atteintes.



L'ensemble de ces mécanismes nécessite la présence des composés radioprotecteurs au moment de l'irradiation étant donné la très haute réactivité de radicaux formés.

Enfin, la dernière hypothèse que nous pouvons formuler, par analogie à ce que nous venons de décrire pour l'ADN, est la possibilité d'hydroxylation de nos composés en divers endroits de la molécule après attaque des radicaux hydroxyles.

¹³⁶ Cadet J. et al. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 151, 1-7, 1999.

¹³⁷ Ward J.F.. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 35, 95-125, 1988.

Afin d'approfondir, la compréhension des différences d'activité de certains de nos composés, leur mécanisme d'action et dans le but d'établir des relations structure-activité, nous présentons dans le chapitre suivant les résultats issus de deux études théorique : la première concerne l'étude d'une réaction radicalaire mise en jeu dans l'activité antioxydante et radioprotectrice par des calculs de DFT (Density Functional Theory) : il s'agit de la réaction d'abstraction d'un atome d'hydrogène du composé par un radical hydroxyle. La seconde approche est couramment utilisée dans le domaine pharmaceutique, notamment dans ce que l'on appelle le « Drug Design ». En effet, il s'agit d'une étude dite de QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) : elle a pour principe de déterminer les paramètres moléculaires (lipophilie, structure électronique ...) impliqués dans l'activité à partir d'un panel de composés testés expérimentalement.

CHAPITRE IV :
ETUDE THEORIQUE

I. ETUDE DE LA THEORIE FONCTIONNELLE DE LA

DENSITE

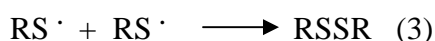
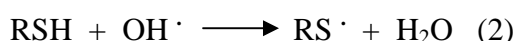
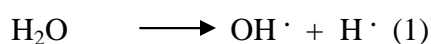
I.1. Introduction

Les thiols sont connus depuis longtemps pour protéger les cellules vivantes des effets des radiations ionisantes. Par exemple, Newton et al. [138] rapportent les propriétés radioprotectrices de certains composés tels que la spermidine et la spermine qui diminuent le nombre de cassures simples brins de l'ADN après irradiation gamma en solution aqueuse. Le mécanisme d'action supposé de tels agents est la capture de radicaux libres oxygénés, tels que le radical hydroxyle, en solution.

Plus récemment, Weiss et al. [45] montrent d'une part l'efficacité des phosphorothioates et d'autres thiols chez la souris et d'autre part que les antioxydants naturels (dérivés sélénisés, vitamine E) sont moins efficaces que les thiols issus de la synthèse chimique.

Un des mécanismes d'action connus des thiols et aminothiols est la capture des radicaux libres. Très rapidement (de l'ordre de la nanoseconde), les thiols, leur thiolates ou leurs disulfures correspondants protègent l'ADN par capture des radicaux hydroxyles diminuant ainsi le nombre de dommages radio-induits sur l'ADN. Il faut noter cependant, que des antioxydants « non thiols » sont bien souvent moins efficaces que les thiols suggérant ainsi que la capture des radicaux n'est pas le seul mécanisme impliqué dans l'effet radioprotecteur des thiols.

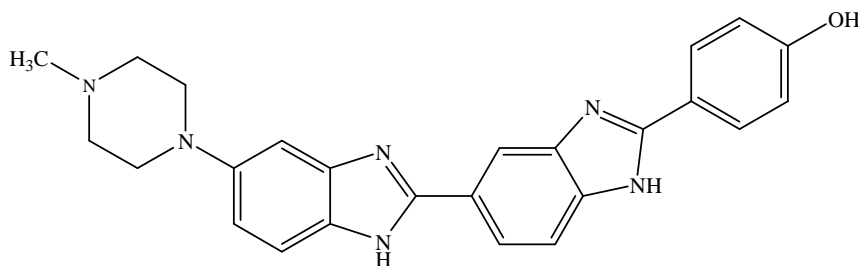
Nous avons choisi ici d'étudier par une approche théorique une réaction radicalaire impliquée dans ce processus de capture des radicaux hydroxyles par les thiols. Cette étude a pour but de confirmer les résultats expérimentaux obtenus avec nos composés. Comme il est décrit au chapitre 1, lors de la radiolyse de l'eau, des radicaux oxygénés se forment. Ces derniers peuvent être « neutralisés » par des thiols de la façon suivante :



¹³⁸ Newton G.L., Aguilera J.A., Ward J.F., Fahey R.C Rad. Res. **148(3)**, 272-284, 1997.

Nous nous sommes attachés à la modélisation de la réaction 2 consistant en l'abstraction d'un atome d'hydrogène de nos composés par le radical hydroxyle. Pour cela, nous avons fait appel à la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT, Density Functional Theory). Cette théorie est désormais devenue un outil standard pour comprendre les propriétés des molécules, agrégats et matériaux à l'échelle atomique, complétant ainsi les connaissances expérimentales par des simulations numériques basées sur la mécanique quantique. Elle permet notamment de caractériser les structures électroniques des molécules. Dans notre cas, elle nous a permis d'étudier la réaction 2 en déterminant les chemins réactionnels des différents composés dans le but de mettre en évidence l'influence des propriétés électroniques de chaque composé dans leur capacité à piéger un radical hydroxyle.

L'utilisation de la chimie théorique dans l'étude des mécanismes d'action des radioprotecteurs reste encore limitée. Trois études seulement concernent le WR-2721, son métabolite, le WR-1065 [139,140] et le dérivé Hoescht 33258 [141]. Par contre, les mécanismes d'addition du radical hydroxyle sont plus connus [142,143].



HOESCHT 33258

I.2. Méthodes de calculs

Depuis ces dernières années, la théorie de la fonctionnelle de la densité, est une méthode, maintenant standard, acceptée par la communauté de chimie théorique. Il s'agit d'un outil d'étude fiable des réactions chimiques impliquant aussi bien des molécules à couches fermées que des molécules à couches ouvertes (espèces possédant un ou plusieurs électrons célibataires). Il est ainsi possible de caractériser des réactifs, des produits et des états de transition, c'est à dire des mécanismes réactionnels, pour une grande variété de composés grâce à cette méthode.

¹³⁹ Vasilescu D., Broch H., Hamza A. J. Mol. Struct. **538**, 133-144, 2001.

¹⁴⁰ Broch H., Hamza A., Vasilescu D. J. Mol. Struct. **538**, 117-132, 2001.

¹⁴¹ Kakkar R., Garg R., Suruchi R. J. Mol. Struct. (Theochem) **668**, 243-248, 2004.

¹⁴² Galano A. et al. J. Mol. Struct. (Theochem) **676**, 97-103, 2004.

¹⁴³ Lunqvist M.J., Eriksson L.A. J. Phys. Chem. **104**, 848-855, 2000.

L'ensemble des calculs est réalisé avec le logiciel Gaussian 03 en utilisant la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-31+G(d,p) [144]. La contamination de spin de la fonction d'onde UB3LYP des molécules dans leur état doublet de spin (c'est à dire de radicaux) est faible. Elle est estimée grâce au calcul de la valeur moyenne de \hat{S}^2 . Pour un doublet la valeur attendue est :

$$S^2 = S(S + 1)h^2 = 1/2(1/2 + 1)h^2 = 3/4h^2$$

Dans notre cas elle est systématiquement très voisine de $0,75h^2$ ($0,77h^2$ au maximum). Cette valeur confirme la validité de la description des états doublet en DFT.

Les états de transition sont recherchés avec la méthode QST [145] (Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton).

Les calculs de fréquence vibrationnelle sont réalisés systématiquement pour chaque géométrie atteinte lors d'une optimisation de cette géométrie afin de caractériser la nature du point stationnaire. Une fréquence vibrationnelle positive est caractéristique d'un état de transition.

Les chemins réactionnels sont explorés de l'état de transition aux produits et réactifs en utilisant la méthode IRC [146] (Intrinsic Reaction Coordinate).

Les énergies libres de Gibbs sont calculées avec Gaussian 03 en appliquant les équations données dans les manuels standards de thermodynamique statistique [147].

I.3. RESULTATS - DISCUSSION

I.3.1. Cas des composés 11, 16 et 19

Nous avons choisi d'étudier le thiol **11** et les aminothiols **16** et **19**. Le but de cette étude est de comparer ces trois composés afin de confirmer la plus grande activité des thiols par rapport aux aminothiols. Pour cela, nous avons simulé par le calcul l'abstraction d'un atome d'hydrogène par un radical hydroxyle au niveau de la fonction thiol. En effet, les deux tests réalisés *in vitro* (test DPPH et test ABTS) mettent en évidence la grande labilité de cet hydrogène. Nous avons volontairement simplifié la structure du composé **19** en remplaçant le groupement thioéthyle par un groupement thiométhyle (**19'**). Les calculs sont réalisés dans le vide.

¹⁴⁴ Frisch J.M. et al. Gaussian 03, Revision B.05, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

¹⁴⁵ Peng C., Ayala P.Y., Schlegel B., Frisch M.J. J. Comput. Chem. **17**(1), 49-56, 1996.

¹⁴⁶ Gonzalez C., Schlegel H.B. J. Chem. Phys. **90**, 2154-2161, 1989.

¹⁴⁷ McQuarrie D.A., Simon J.D., Physical Chemistry: a Molecular Approach, University Science Book, Sausalito, 1997.

Les résultats montrent que quelque soit le composé, il s'agit d'un processus thermodynamique avec le même type de chemin réactionnel. En effet, il s'agit d'une réaction élémentaire représentée ci-dessous de façon schématique :



L'arrachement de l'atome d'hydrogène passe par la formation d'un adduit stabilisé par des liaisons hydrogènes intermoléculaires puis par un état de transition. L'élimination d'une molécule d'eau passe elle aussi par un adduit. L'énergie de chaque état est déterminée en kcal.mol⁻¹.

Nous obtenons les profils énergétiques représentés figure 44 :

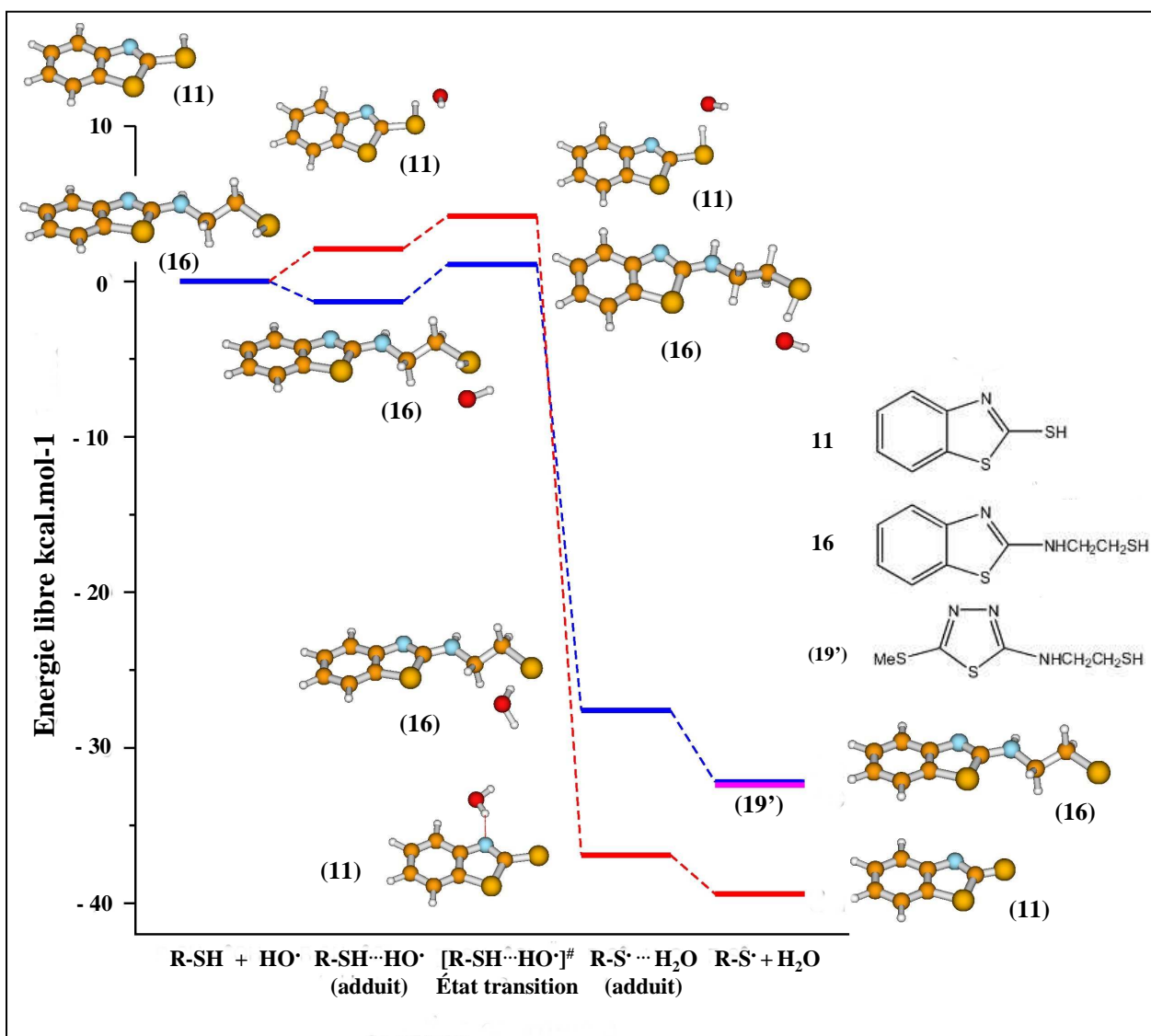


Figure 44 : Représentation des profils énergétiques obtenus pour les composés 11, 16 et 19'.

Concernant le composé **19'**, il nous a été impossible de déterminer un état de transition en raison vraisemblablement d'une sous estimation par la fonctionnelle B3LYP des barrières d'activation qui sont ici très petites. Pour les deux autres composés **11** et **16**, l'attaque du radical hydroxyle sur la fonction thiol, implique le passage par la formation d'un adduit dont l'énergie est voisine de celle de l'état de transition. La barrière énergétique nécessaire à ce passage est très faible de l'ordre de 5 kcal.mol^{-1} . Bien que la fonctionnelle B3LYP soit connue pour sous estimer cette barrière, les résultats suggèrent qu'il s'agit d'un processus très favorable et essentiellement gouverné par la thermodynamique et non par la cinétique.

Les radicaux résultant de l'abstraction d'un hydrogène RS^\bullet sont représentés figure 43. L'étape de libération de la molécule d'eau implique elle aussi le passage par un adduit stabilisé par des liaisons hydrogènes entre la molécule d'eau et le radical RS^\bullet . Cependant, il faut noter que l'énergie libre est plus importante pour l'adduit que pour le radical libre produit. Ce dernier semble moins stable si on considère l'enthalpie. Δn et ΔS sont positifs [148], ce qui permet la stabilisation des produits de la réaction $\text{RS}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$ par rapport à l'adduit $\text{RS}^\bullet \dots \text{H}_2\text{O}$.

Les énergies de réaction nécessaires pour l'abstraction directe de l'atome d'hydrogène sont $-32,2$, $-32,4$ et $-39,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour les composés **11**, **19'** et **16**. Pour tous les composés, il s'agit donc d'une réaction très exothermique. Cette exothermicité est significativement plus importante pour le composé **11** que pour les deux autres. Compte tenu de la très faible barrière d'activation, la réaction étudiée obéit à un processus thermodynamique, le composé **11** réagit plus efficacement avec les radicaux hydroxyles que les composés **16** et **19'**. Ceci tend à confirmer la plus grande réactivité des thiols par rapport aux aminothiols observée expérimentalement.

Enfin, nous avons réalisé les mêmes calculs en considérant l'aminoalcool correspondant au composé **16**. Bien que la réaction ne nécessite pas une barrière d'activation élevée, de la même façon que pour les composés **11**, **16** et **19'**, elle est significativement moins exothermique avec une énergie libre de $-20,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ au lieu de $-32,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour le composé **16**. Ce résultat confirme la plus grande activité antioxydante des thiols par rapport aux alcools.

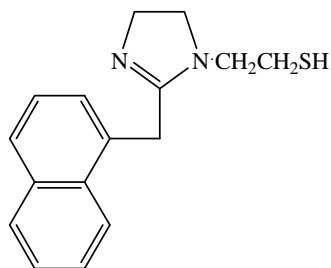
¹⁴⁸ Watson L.A., Eisenstein O. J. Chem. Ed., **79**, 1269, 2002.

En conclusion, la réaction d'abstraction d'un atome d'hydrogène porté par un atome de soufre résulte d'un processus thermodynamique exergonique. Les résultats obtenus nous permettent de classer nos composés par ordre d'activité décroissante **11** > **16** = **19'**. Nous confirmons ainsi par le calcul les résultats expérimentaux obtenus avec les tests *in vitro* montrant une meilleure activité antioxydante du composé **11** par rapport au composé **16**. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par une meilleure stabilisation du radical R-S \cdot dans le cas du composé **11** du fait de sa plus basse énergie et de la possibilité de délocalisation de l'électron célibataire. En effet, pour le radical R-S \cdot du composé **11**, il est possible d'envisager l'existence de plusieurs formes limites de résonance alors que pour le composé **16** la présence d'un chaîne alkyle empêche la délocalisation de l'électron célibataire.

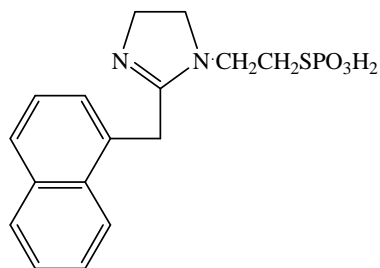
Enfin, la présence d'une fonction thiol semble indispensable à une activité intéressante puisque lorsque nous remplaçons la fonction thiol par une fonction alcool, le processus est moins favorable.

I.3.2. Cas de la 1-thioéthyl-2-(1-naphthylméthyl)-2-imidazoline

Dans un second temps, nous avons choisi de réaliser les mêmes calculs pour un autre composé, le 1-thioéthyl-2-(1-naphthylméthyl)-2-imidazoline. Par analogie avec le WR-2721, ce dérivé est le métabolite d'un composé phosphoré correspondant, le S-2-[2-(1-naphthylméthyl)-2-imidazoline]éthylthiophosphate. Ces deux dérivés ont fait l'objet d'une étude de l'activité radioprotectrice *in vivo* chez la souris. Les pourcentages de survie obtenus à un mois sont respectivement de 40 % après une irradiation de 9,75 Gy et 100 % après une irradiation de 8,1 Gy [90]. Cette différence d'activité montre clairement l'influence du groupement phosphoré dans l'activité, vraisemblablement par une meilleure vectorisation de la prodrogue libérant ensuite l'aminothiols correspondant.



1-thioéthyl-2-(1-naphthyl
méthyl)-2-imidazoline



S-2-[2-(1-naphthylméthyl)-2-
imidazoline]éthylthiophosphate

Afin de faciliter le calcul, nous avons simplifié la structure en retirant le motif naphthalène. De plus, comme précédemment, nous avons réalisé des calculs visant à simuler l'abstraction d'un atome d'hydrogène porté par le cycle et par l'atome de soufre.

Les profils énergétiques obtenus sont représentés à la figure 45.

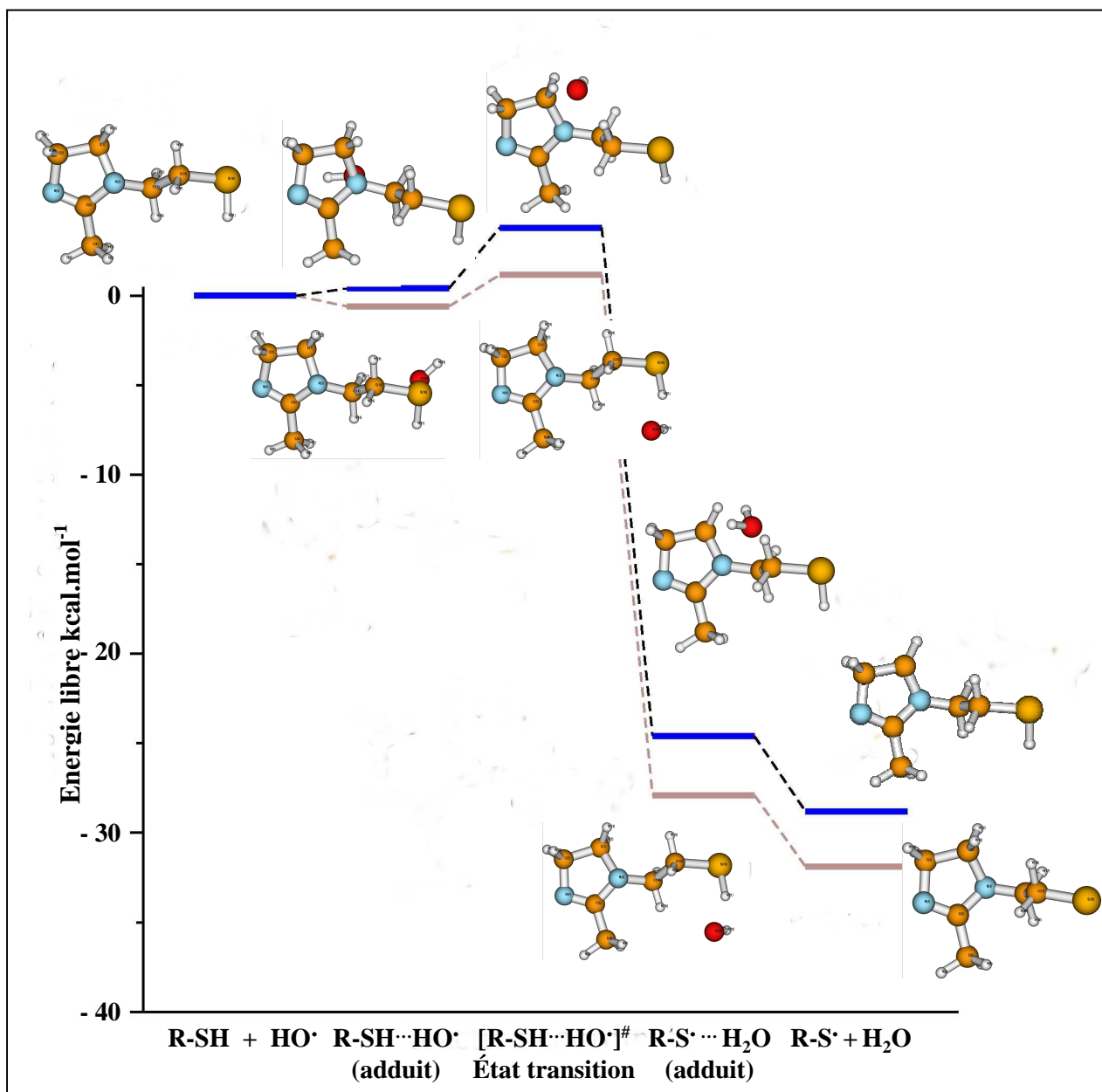


Figure 45 : Représentation des profils énergétiques obtenus pour le 1-thioéthyl-2-(1-naphthylméthyl)-2-imidazoline.

Les résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment puisqu'il s'agit toujours de processus thermodynamiquement favorables avec passage par deux adduits et un état de transition de basse énergie. Pour chaque réaction étudiée (abstraction d'un hydrogène sur le cycle ou sur l'atome de soufre), l'état de transition est déterminé.

Les énergies de réaction nécessaire pour l'abstraction directe de l'atome d'hydrogène sur l'atome de soufre est de - 31,9 contre - 28,7 kcal.mol⁻¹ pour l'arrachement de l'hydrogène sur le cycle imidazole. Dans les deux cas, il s'agit donc d'une réaction très exothermique avec une faible barrière d'activation. Cette exothermicité est un peu plus importante dans le premier cas. L'arrachement d'un hydrogène de la fonction thiol est donc plus favorable que l'arrachement d'un hydrogène sur le cycle. De plus, il faut noter que l'énergie nécessaire à l'abstraction de l'hydrogène porté par l'atome de soufre est très voisine de celle calculée pour le composé **16** et **19**.

Il est raisonnable d'envisager au vu de ces résultats, que le composé **11** reste plus efficace en terme d'activité antioxydante même si les expérimentations n'ont pas été réalisées. Cependant, la capture des radicaux libres n'est pas le seul mécanisme pouvant être impliqué dans l'activité radioprotectrice. En effet, comme il a été décrit au chapitre I, différents mécanismes de radioprotection chimique existent. D'autres études, *in vitro* et *in vivo*, permettraient de mettre en évidence ou non l'existence de propriétés vasoconstrictrices, antimutagènes ...

I.4. Conclusion

Cette étude théorique nous permet de confirmer les résultats expérimentaux obtenus avec certains de nos composés à savoir une plus grande activité des dérivés thiols par rapport aux aminothiols correspondants. Cette différence d'activité peut être attribuée à la délocalisation de l'électron célibataire. Cette hypothèse est confirmée par le calcul de la densité de spin de Mulliken. Ce calcul a été obtenu après l'optimisation de la géométrie des composés **11** et **16**. Figure 46 se trouvent les représentations graphiques pour ces composés.

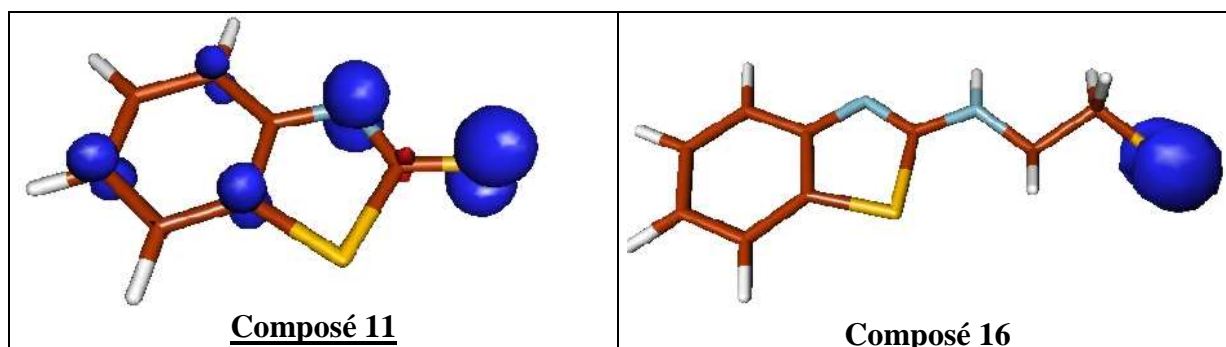


Figure 46 : Représentations des densités de spin de Mulliken des composés **11** et **16**.

La densité de spin sur l'ensemble des atomes est égale au nombre d'électrons célibataires. Ainsi pour une espèce radicalaire, cette densité est égale à 1. Les représentations ci-dessus témoignent d'une répartition différente de la densité de spin pour ces deux composés. En effet, pour le composé **16**, cette densité est essentiellement localisée sur l'atome de soufre où elle vaut 1.

En revanche, pour le composé **11** il existe une répartition de la densité de spin sur l'ensemble de la molécule, si bien qu'elle est égale à 0,65 sur l'atome de soufre. Ces résultats confirment donc l'existence d'une délocalisation de l'électron célibataire pour le composé **11** qui n'existe pas pour l'aminothiol correspondant (composé **16**). Cette délocalisation est donc à l'origine d'une plus grande stabilité de ce radical R-S \cdot et de sa plus basse énergie. Ces résultats peuvent être extrapolés de la même façon aux dérivés du thiadiazole tels que les dérivés **14** et son aminothiol correspondant **19**.

Comme perspective, il est possible d'envisager, d'une part, la poursuite de cette approche limitée ici à une seule réaction et des calculs dans le vide. En effet, il serait intéressant de compléter ces résultats par l'étude des réactions radicalaires dans un milieu aqueux, reflétant le milieu biologique. D'autre part, d'autres réactions telles que des hydroxylations des radioprotecteurs peuvent être envisagées : ces hydroxylations sont une autre forme de capture des radicaux hydroxyles. Enfin, l'interaction de certains radioprotecteurs avec l'ADN semble un autre moyen d'appréhender les mécanismes d'action de ces composés.

Il est important de noter que ces calculs ne concernent qu'un des mécanismes possibles de radioprotection chimique et que bien entendu il existe vraisemblablement d'autres paramètres en jeu. C'est pourquoi, en complément de ce travail, nous avons étudié par un autre type d'approche théorique une relation structure activité au moyen d'une étude QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship).

II. ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE

II.1. Introduction

Dans le domaine de la radioprotection chimique, très peu de travaux font appel à la bioinformatique. En effet, seules trois études utilisent différentes approches théoriques visant à interpréter les résultats expérimentaux. Une des premières études concerne les dérivés à structure dithiolannique [149,150] et utilise la méthode de Free et Wilson [151]. Un travail plus récent concerne le dérivé Hoescht 33258 et l'étude de son mécanisme d'action par une approche QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) [152] : les résultats de cette étude montrent l'influence non négligeable de certains groupements donneurs d'électron dans l'activité radioprotectrice.

II.2. Principe

II.2.1. Etude QSAR

Le principe d'une étude QSAR, consiste à trouver une corrélation entre une activité biologique mesurée pour un panel de composés et certains descripteurs moléculaires. En effet, une fonction mathématique permet de relier l'activité biologique à certains de ces paramètres physico-chimiques.

$$\text{Activité biologique} = f(\text{propriétés physico-chimiques})$$

L'association des variations de l'activité aux paramètres structuraux permet d'obtenir un système d'équations qui donne, *pour une série chimique donnée et pour une activité définie, une équation de corrélation.*

L'intérêt essentiel de cette équation est qu'elle doit permettre de déterminer les valeurs des paramètres qui correspondent à une activité maximale et ainsi de prévoir l'activité des molécules qui n'ont pas encore été synthétisées.

¹⁴⁹ Grassy G., Terol A., Belly A., Robbe Y., Chapat J.P., Granger R. Eur. J. Med. Chem. **10(1)**, 14-18, 1975.

¹⁵⁰ Grassy G. et al. Eur. J. Med. Chem. **10(1)**, 14-18, 1975.

¹⁵¹ Free J.M., Wilson I.W. J. Med. Chem. **7**, 395-399, 1964

¹⁵² Kakkar R., Pathak S.M. J. Mol. Struc. (Theochem) **714**, 35-42, 2005.

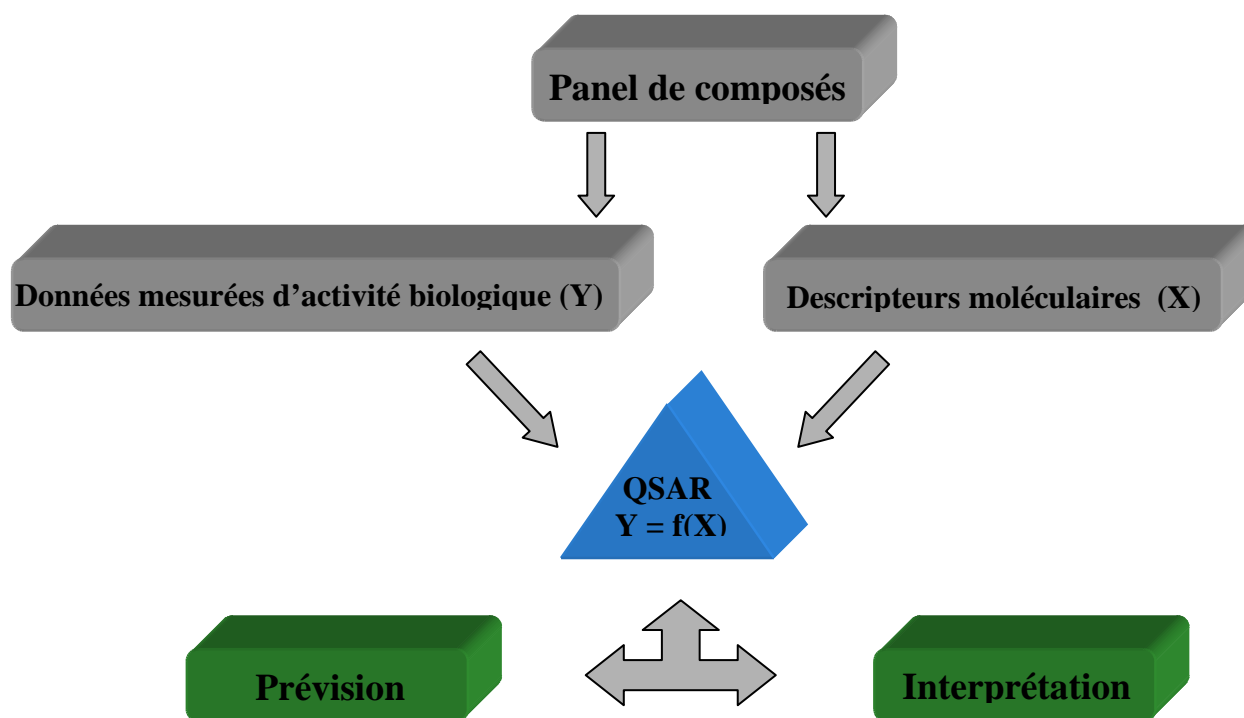


Figure 47 : *Modèle d'étude de relation structure-activité (QSAR).*

Ainsi, Hansch et al. [153] sont les premiers, en 1964, à établir une relation entre les propriétés physico-chimiques (logP, pKa, paramètres stériques et électroniques) et l'activité biologique. En 1971, ils réalisent une étude de relation structure-activité sur différentes familles d'antifongiques : benzoquinones, sels d'alkylpyridinium, imidazoles, phénols [154]. L'activité antifongique dépend du coefficient de partage octanol-eau mesuré expérimentalement ou calculé.

Les techniques QSAR s'appuient sur le concept postulant que des structures similaires ont des propriétés similaires [155]. Ce type d'étude a donc pour vocation d'une part d'expliquer les paramètres moléculaires impliqués dans l'activité biologique mesurée et d'autre part de prévoir l'influence de certaines modifications structurales dans l'activité biologique. Les descripteurs moléculaires calculés sont classiquement de trois types : physico-chimiques (lipophilie, pKa ...), électroniques (moment dipolaire...) et topologiques (indice de Balaban...). Ces descripteurs sont eux mêmes caractéristiques de la structure en 2 dimensions ou en 3 dimensions de la molécule.

¹⁵³ Hansch C., Fujita T. π - ρ - π Analysis. J. Am. Chem. Soc. **86**, 1616-1626, 1964.

¹⁵⁴ Hansch C., Lien E.J. J. Med. Chem. **14**(8), 653-670, 1971.

¹⁵⁵ Maldonado A.G., Doucet J.P., Petitjean M., Fan B.T. Molecular Diversity **10**, 39-79, 2006

La QSAR-2D est un moyen de rationaliser au moyen d'une équation (régression linéaire) une propriété biologique avec des descripteurs physico-chimiques ou topologiques calculés à partir de la formule développée. Pour notre part, nous nous sommes attachés à l'étude QSAR-3D de nos composés. Ce type d'étude est décrit pour la première fois par Cramer et al. [156] et permet d'établir des relations linéaires entre une propriété biologique et des champs stériques/électrostatiques calculés à partir d'une conformation spatiale définie. Nos résultats ont été confirmés par une validation croisée.

La réalisation d'une telle étude, notamment l'établissement des corrélations, fait appel à l'utilisation des réseaux de neurones.

II.2.2. Réseau de neurones

II.2.2.1. Historique

Le début des réseaux de neurones date de 1943, avec McCulloch et Pitts [157] qui inventent le premier neurone formel. Ce n'est qu'en 1958 qu'apparaît le premier réseau de neurones artificiels grâce aux travaux de Rosenblatt [158] qui conçoit le Perceptron. Ce dernier est constitué d'une couche de neurones d'entrée et d'une couche de neurones de sortie. Ce réseau est le premier système artificiel présentant la capacité d'apprendre par l'expérience. Néanmoins, en 1969, Minsky et Papert [159] démontrent dans leur livre « Perceptrons » les limites des réseaux de neurones à une seule couche. Il faut attendre 1982 et les travaux de Hopfield [160] pour susciter à nouveau l'intérêt des scientifiques en proposant les neurones associatifs. Dans le même temps, Werbos [161] conçoit l'algorithme de rétropropagation de l'erreur offrant un mécanisme d'apprentissage pour les réseaux multi-couches de type Perceptron et qui permet d'entraîner les neurones des couches cachées. Cependant, cet algorithme ne deviendra connu qu'après 1986 grâce à Rumelhart [162].

¹⁵⁶ Cramer R.D., Patterson D.E., Bunce J.D. J. Am. Chem. Soc. **110**, 5959-5967, 1998.

¹⁵⁷ McCulloch W.S., Pitts W. Bulletin of Mathematical Biophysics, **5**, 115-133, 1943.

¹⁵⁸ Rosenblatt F Psychological Review, **65**, 386-408, 1958.

¹⁵⁹ Minsky M., Papert S. Perceptrons. MIT Press. 1969

¹⁶⁰ Hopfield J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. **9**, 2554, 1982.

¹⁶¹ Werbos. P. Thèse d'Université, Harvard University, Cambridge, MA, 1974

¹⁶² Rumelhart D., Hinton G.E., Williams R.J. Nature, **323**, 533-536, 1986.

II.2.2.2. Les réseaux de neurones, définitions et propriétés

Un neurone est une fonction paramétrée, à valeurs bornées : il réalise une fonction paramétrée de ses variables d'entrées. Un neurone est donc avant tout un opérateur mathématique avec des « entrées » (variables de la fonction mathématique) et des « sorties » (valeurs de la fonction). L'intérêt des neurones réside dans les propriétés qui résultent de leur association en réseaux, c'est-à-dire de la composition des fonctions réalisées par chacun des neurones.

La sortie d'un neurone dépend de l'entrée du neurone et de sa *fonction de transfert*. Il existe essentiellement trois types de fonction de transfert qui sont les fonctions seuils, les fonctions linéaires et les fonctions sigmoïdes (figure 48). La fonction sigmoïde est la plus utilisée car elle représente un bon compromis entre les fonctions seuils et linéaires.

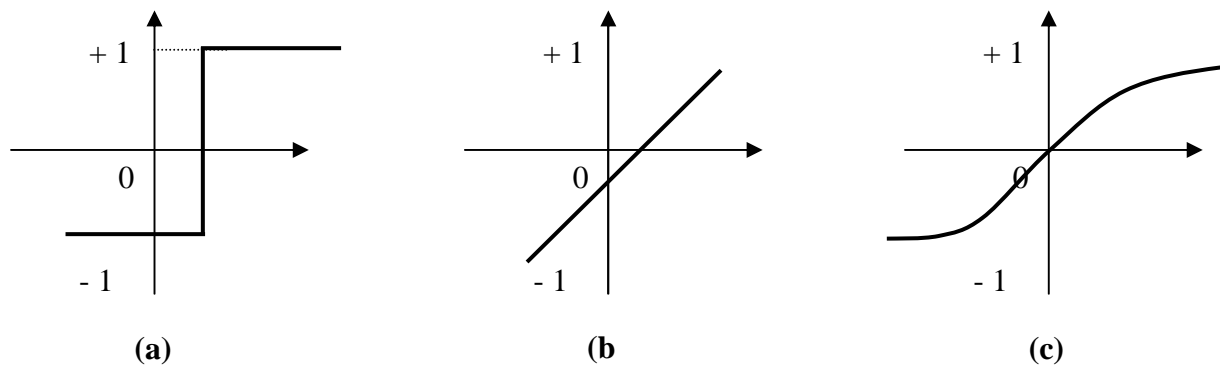


Figure 48 : Fonction de transfert : (a) du neurone «seuil» ; (b) du neurone «linéaire», et (c) du neurone «sigmoïde».

Il existe deux types de réseaux de neurones : les *réseaux non bouclés* et les réseaux bouclés. Nous ne parlerons que des premiers. Les réseaux de neurone non bouclés réalisent une (ou plusieurs) fonction algébrique de ses entrées, par composition des fonctions réalisées par chacun de ses neurones. Il s'agit donc d'un ensemble de neurones connectés entre eux, l'information circulant des entrées vers les sorties sans retour en arrière possible. On parle souvent de Perceptron multicouche à cause de la présence de neurones cachés (figure 49).

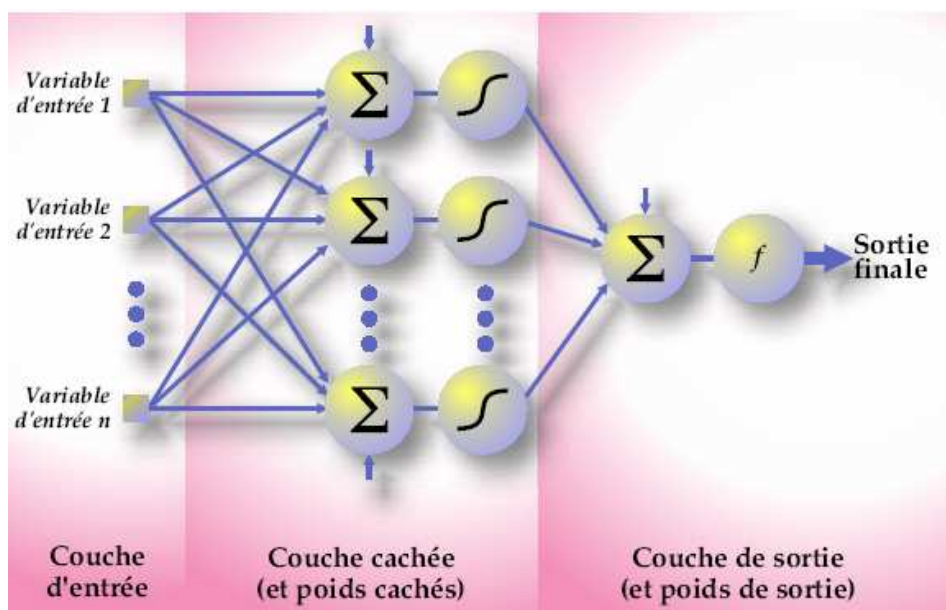


Figure 49 : Topologie d'un réseau de neurones. Dans chaque unité de la couche cachée les variables sont combinées de façon linéaire. Le réseau de neurones applique une transformation non-linéaire à chacune de ces combinaisons. Finalement, les valeurs résultantes des unités cachées sont combinées de façon linéaire pour obtenir la valeur prévue.

Il existe plusieurs types d'apprentissages mais nous n'utiliserons dans notre étude que l'apprentissage supervisé. Le principe de ce dernier est que le réseau doit s'adapter par comparaison entre le résultat qu'il a calculé, en fonction des entrées fournies, et la réponse attendue en sortie. Dans notre cas, les entrées fournies sont les descripteurs moléculaires et les sorties sont les résultats biologiques obtenus sous forme de concentration inhibitrice 50 %. Le réseau se modifie jusqu'à ce qu'il trouve la bonne sortie. Ces modifications ont lieu au cours de cycles de présentations des données selon un algorithme d'apprentissage. Dans notre étude, nous utilisons un algorithme de rétropropagation consistant à minimiser la différence entre la sortie calculée et la sortie fournie en apprentissage c'est à dire les valeurs expérimentales.

II.2.2.3. L'algorithme de rétropropagation

Comme il est décrit ci-dessus, l'apprentissage consiste en un entraînement du réseau de neurones. L'algorithme consiste dans un premier temps à propager vers l'avant les entrées (ici les descripteurs moléculaires) jusqu'à obtenir une sortie (CI₅₀ calculées) calculée par le réseau. La seconde étape consiste à comparer la sortie calculée avec la sortie expérimentale : on détermine ainsi une erreur. Cette dernière est ensuite rétropropagée vers l'arrière jusqu'à la couche d'entrée tout en modifiant la pondération des neurones. Le processus est ainsi répété jusqu'à ce que l'erreur de sortie soit considérée comme négligeable.

Soit un neurone j d'une couche de sortie et i de la couche précédente. L'activité totale du neurone j est calculée suivant :

$$x_j = \sum_i y_i c_{ij}$$

y_j étant l'activité du neurone j de la couche supérieure et c_{ij} le coefficient synaptique, ou poids de la liaison entre j et i. La valeur y_j est calculée en utilisant une fonction de transfert sigmoïde exponentielle :

$$y_j = \frac{1}{1 + \exp(-x_j)}$$

Quand les activités de tous les neurones de sortie ont été déterminées, le coût J est calculé. J détermine l'erreur entre la valeur de sortie calculée et celle donnée dans la série d'apprentissage.

$$J = \frac{1}{2} \sum_j (y_j - d_j)^2$$

Où y_j représente l'activité du neurone de sortie J et d_j la valeur fournie dans la série d'apprentissage. Cette fonction coût varie quand la valeur de sortie est modifiée :

$$J_{aj} = \frac{\partial J}{\partial y_j} = y_j - d_j$$

La fonction coût varie quand la valeur d'entrée est modifiée :

$$J_{sj} = \frac{\delta J}{\delta x_i} = \left(\frac{\delta J}{\delta y_j} \right) \left(\frac{\delta y_j}{\delta x_i} \right) = J_{aj} y_i (1 - y_j)$$

La fonction coût varie quand la valeur d'un coefficient synaptique est modifiée :

$$J_{csij} = \frac{\delta J}{\delta c_{ij}} = \left(\frac{\delta J}{\delta x_i} \right) \left(\frac{\delta x_i}{\delta c_{ij}} \right) = J_{sj} y_i$$

La fonction coût varie quand la valeur de l'activité d'un neurone de la couche précédente est modifiée :

$$J_{ai} = \frac{\delta J}{\delta y_i} = \sum_j \left(\frac{\delta J}{\delta x_j} \right) \left(\frac{\delta x_j}{\delta y_i} \right) = \sum_j J_e c_{ij}$$

L'apprentissage continue jusqu'à ce que l'écart entre la valeur calculée et la valeur donnée dans la série d'apprentissage soit acceptable. Le système a alors convergé.

II.2.3. Mise en œuvre

Dans un premier temps, il faut calculer les poids du réseau c'est à dire estimer les paramètres essentiels. Pour cela, il faut construire un réseau reliant directement les neurones représentant les descripteurs choisis avec les neurones de sortie. Chaque descripteur est alors affecté d'un poids en fonction de l'importance de chacun d'entre eux dans l'activité.

Dans un second temps, il faut choisir l'architecture du réseau d'apprentissage c'est à dire choisir les entrées externes, le nombre de neurones cachés et l'agencement des neurones entre eux. Le nombre d'unités cachées joue un rôle important dans la qualité du réseau. Si le nombre est trop petit, le réseau possède trop peu de paramètres et ne peut interpréter les dépendances servant à modéliser et prévoir. Si le nombre de neurones cachés est trop grand, le réseau risque de s'ajuster au bruit présent dans les données de l'ensemble d'apprentissage.

Enfin, il faut estimer la qualité du réseau obtenu en lui présentant des exemples ne faisant pas partie de l'apprentissage. Il s'agit d'une validation croisée (figure 50).

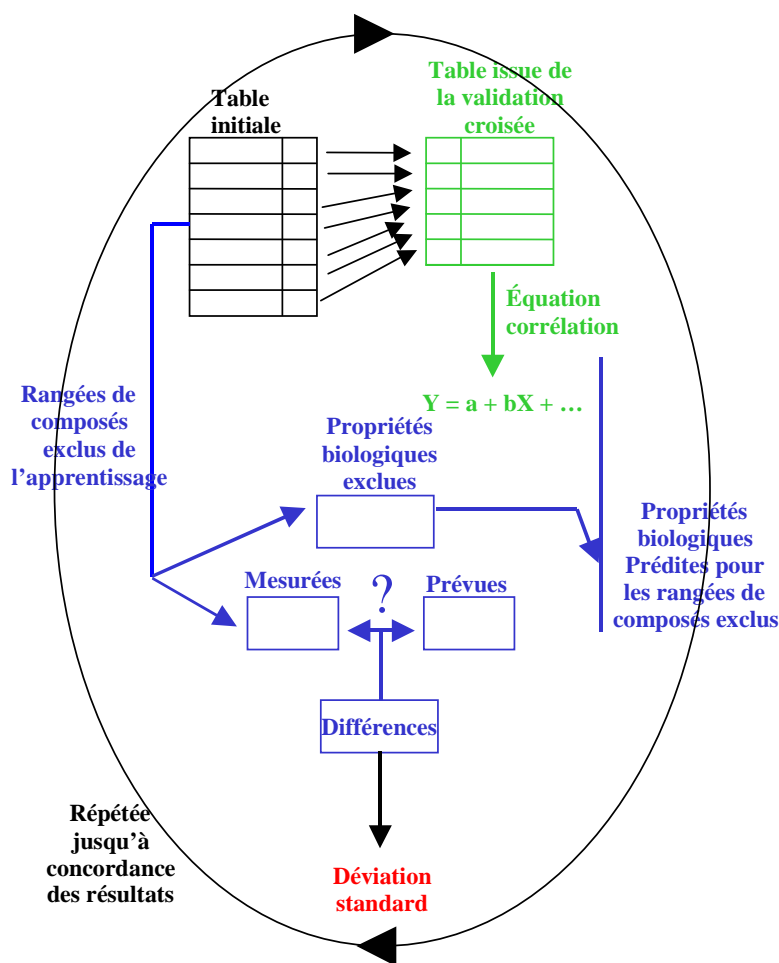


Figure 50 : Validation croisée.

II.2.4. Applications des réseaux de neurones

Les réseaux de neurones sont utilisés essentiellement pour de la classification. On retrouve ces réseaux dans divers domaines : dans les milieux financiers pour la prédiction des fluctuations de marché ; dans le domaine bancaire pour la détection des fraudes sur les cartes de crédit ; dans les départements de marketing pour prévoir le comportement des consommateurs ; en aéronautique pour la programmation de pilotes automatiques ; dans le domaine pharmaceutique pour des études QSAR. Dans ce dernier cas, une telle approche permet d'éviter une synthèse coûteuse si l'on peut prédire que la molécule envisagée ne possède pas les propriétés voulues. Les applications sont nombreuses. L'avantage principal des réseaux de neurones réside dans le fait qu'ils permettent d'automatiser la découverte des dépendances les plus importantes du point de vue de la prédiction de processus.

Nous allons présenter dans les paragraphes suivants les résultats obtenus avec nos composés afin de déterminer les paramètres impliqués dans les propriétés antioxydantes de nos dérivés.

II.2.5. Les descripteurs moléculaires

II.2.5.1. Les descripteurs physicochimiques

Ces paramètres sont souvent des descripteurs caractéristiques de la structure générale en 2D de la molécule. Parmi ces descripteurs, nous pouvons évoquer le poids moléculaire, la taille, le caractère lipophile et hydrophile, la réfractivité molaire, la surface accessible au solvant (Connolly Accessible Surface). Concernant le caractère lipophile, celui-ci est souvent évalué en déterminant le coefficient de partage octanol/eau c'est à dire le logP [153, 154].

Ces descripteurs n'apportent que peu d'information sur la structure des molécules. Pour élaborer des modèles prédictifs plus élaborés, il est nécessaire de leur adjoindre d'autres types de descripteurs.

II.2.5.2. Les descripteurs électroniques

Parmi ces paramètres, nous pouvons citer les suivants : le moment dipolaire, les énergies HOMO (orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie) et LUMO (orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie), la densité électronique, les forces de Van der Waals ...

II.2.5.3. Les descripteurs topologiques

La plupart de ces descripteurs sont calculés sur l'enchaînement bidimensionnel des atomes. Ils se traduisent sous la forme d'indice (indice de Balaban, Wiener...) et découlent de la théorie des graphes. Cette théorie a été développée par Euler en 1780 et s'applique à l'heure actuelle dans de nombreux domaines tels que la biologie, la chimie ou encore les sciences sociales. Un graphe permet de représenter la topologie d'une molécule sans tenir compte de la géométrie spatiale exacte de celle-ci. Un graphe est un ensemble de points, certains d'entre eux étant reliés par des lignes. Un point représente un atome et une ligne une liaison covalente. Les chemins sont caractéristiques de l'architecture de l'ensemble des atomes constitutifs de la molécule. La plupart du temps, les atomes d'hydrogène sont exclus du graphe afin de simplifier le calcul.

Cette théorie est particulièrement bien adaptée pour les structures non cycliques. Cependant pour les structures cycliques, la distance entre deux points est le nombre de lignes reliant ces points suivant le chemin le plus court.

Par exemple pour le 2,3-diméthylpentane la formule développée permet de créer d'une part un modèle tridimensionnel et d'autre part un graphe lié (figure 51).

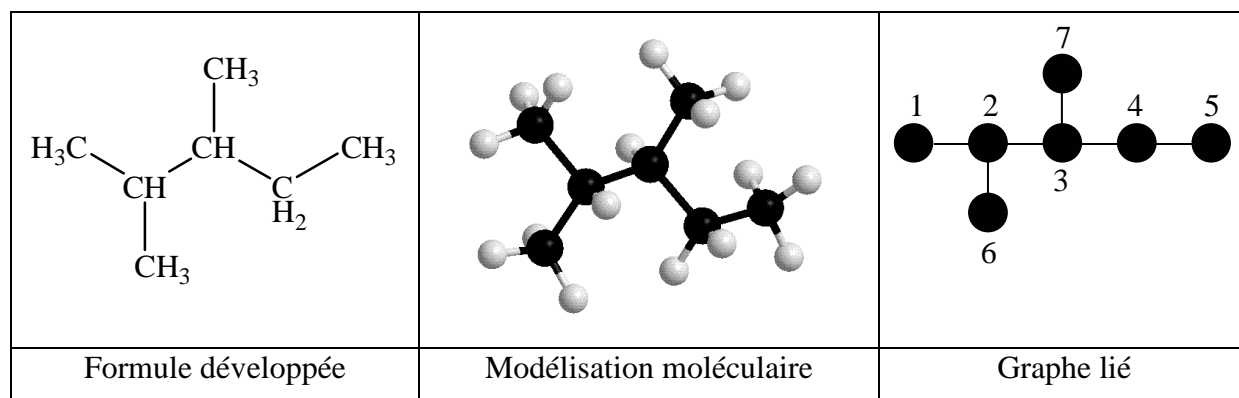


Figure 51 : Formule développée, modélisation moléculaire et graphe lié du 2,3-diméthylpentane.

Le graphe lié permet la création d'une matrice de connectivité et d'une matrice de distance. Un élément c_{ij} de la matrice de connectivité prend la valeur 1 si les points i et j sont adjacents. Un élément d_{ij} de la matrice de distance égale la longueur du plus petit chemin joignant i et j . A la figure 52 est représenté un exemple de calcul de la matrice de connectivité et de distance pour le 2,3-diméthylpentane.

$D = \begin{bmatrix} & 1 & 2 & 3 & 4 & 5 & 6 & 7 \\ 1 & & 1 & 2 & 3 & 4 & 2 & 3 \\ 2 & 1 & & 1 & 2 & 3 & 1 & 2 \\ 3 & 2 & 1 & & 1 & 2 & 2 & 1 \\ 4 & 3 & 2 & 1 & & 1 & 3 & 2 \\ 5 & 4 & 3 & 2 & 1 & & 4 & 3 \\ 6 & 2 & 1 & 2 & 3 & 4 & & 3 \\ 7 & 3 & 2 & 1 & 2 & 3 & 3 & \end{bmatrix}$	$C = \begin{bmatrix} & 1 & 2 & 3 & 4 & 5 & 6 & 7 \\ 1 & & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 1 & & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 3 & 0 & 1 & & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 4 & 0 & 0 & 1 & & 1 & 0 & 0 \\ 5 & 0 & 0 & 0 & 1 & & 0 & 0 \\ 6 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & & 0 \\ 7 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & \end{bmatrix}$
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figure 52 : Matrice de connectivité (C) et de distance (D) calculée à partir du graphe lié du 2,3-diméthylpentane.

Ces matrices permettent de déterminer de nombreux index tels que les index de Wiener, l'index de Balaban et le Molecular Topological Index (MTI) qui sont parmi les plus connus.

L'indice de Wiener, proposé en 1947 [163] est utilisé pour caractériser la ramification et le volume moléculaire. Il est égal à la somme de toutes les distances topologiques entre toutes les paires d'atomes de la molécule.

$$W = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N d_{ij}$$

L'indice de Balaban, proposé en 1982 [164] représente la moyenne des distances de connexion au sein d'une molécule.

$$J = \frac{q}{\mu + 1} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (d_{ij})^{-0,5}$$

Dans cette équation, $\mu = q - n + 1$, q étant le nombre de liaisons dans le graphe et d_{ij} est calculé à partir de la matrice de distances.

Le MTI [165] utilise en plus des matrices de connectivité (C) et de distance (D) une troisième matrice de valence (V). Pour le 2,3-diméthylpentane, elle est égale à :

$$V = [1 \ 3 \ 3 \ 2 \ 1 \ 1 \ 1]$$

Cet index se calcule de la façon suivante : le résultat de la somme des matrices (C) et (D) est lui même multiplié par la matrice (V). La somme des éléments résultants de ce produit donne l'indice. Pour le 2,3-diméthylpentane, il vaut 416.

¹⁶³ Wiener, H. J. Am. Chem. Soc. **69**, 2636-2638, 1947.

¹⁶⁴ Balaban A.T. Chem. Phys. Lett. **89(5)**, 399-404, 1982.

¹⁶⁵ Schultz H.P. J. Chem. Inf. Compout. Sci. **29**, 227-228, 1989.

II.3. Résultats

II.3.1. Logiciels

Le calcul des paramètres moléculaires est réalisé avec le logiciel ChemOffice Ultra 2006. Toutes les molécules ont été minimisées de la même façon à l'aide d'une méthode de calcul semi-empirique avec le serveur MOPAC, en utilisant l'hamiltonien AM1.

Les réseaux de neurones sont réalisés à l'aide du logiciel SNNS version 4.1 (Stuttgart Neural Network Simulator, University of Stuttgart, Germany) mis au point par Zell et al.

Ces logiciels fonctionnent sur un système Xeon 2,7 GHz sous Windows XP. Les données expérimentales et les paramètres calculés ont été normalisés afin de travailler avec des valeurs comprises entre 0 et 1. Les figures ont été tracées à partir de ces données normalisées.

II.3.2. Résultats obtenus dans l'étude QSAR avec le test au

DPPH

Dans cette étude, nous faisons intervenir les résultats expérimentaux obtenus dans l'évaluation des propriétés antioxydantes des composés avec le test au DPPH. Dans ce modèle, nous avons incorporé dans un premier temps l'ensemble des composés pour lesquels nous avons déterminé une CI_{50} . Ces composés sont les alcools (**23**, **24**, **25**), les thiols (**11**, **12**, **13**, **14**, **15**), les aminothiols (**16**, **17**, **19**), soit au total 11 composés.

Pour chaque composé, nous avons calculé 12 paramètres moléculaires qui sont représentés dans le tableau 26.

Paramètre	Définition
ClogP	Logarithme du coefficient de partage octanol/eau [166,167]
MR	Réfractivité Molaire [168]
Conn. Access. A.	Connolly Accessible Area [169]
O	Ovalité
μ	Moment dipolaire
l_p	Longueur du dipôle
HOMO	HoMO
LUMO	LUMO
J	Index de Balaban
Cl.Cnt.	Cluster Count
MTI	Molecular Topological Index
W	Index de Wiener

Tableau 26 : Groupe des 12 descripteurs moléculaires calculés pour l'ensemble des composés.

II.3.2.1. Détermination des paramètres essentiels

Afin de déterminer les paramètres essentiels, nous avons construit un réseau avec 12 entrées et 1 sortie (une table d'apprentissage avec 11 composés et 3000 cycles d'apprentissage). Il existe ainsi une relation directe entre les neurones représentant chacun des descripteurs et la sortie associée à la CI₅₀.

¹⁶⁶ Nys G.G., Rekker R.F. Eur. J. Med. Chem. **9**(4), 361-375, 1974.

¹⁶⁷ Nys G.G., Rekker R.F. Chim. Ther. **8**(5), 521-535, 1973.

¹⁶⁸ Viswanadhan V.N., Ghose A.K., Revankar G.R., Robins R.K. J. Chem. Inf. Comput. **29**, 163-172, 1989.

¹⁶⁹ Connolly M.L. The Molecular Surface Package. J. Mol. Graphics, **11**, 1993.

Les poids respectifs des 12 paramètres ont été déterminés et sont rassemblés dans le tableau 27 :

Paramètre	Poids
ClogP	-15,80
MR	0,83
Conn. Access. A.	4,31
O	-0,57
μ	6,82
$l\rho$	-12,23
HOMO	0,92
LUMO	0,34
J	10,78
Cl.Cnt.	1,35
MTI	4,67
W	5,87

Tableau 27 : Poids associé à chacun des 12 paramètres moléculaires.

Il apparaît clairement que le logarithme du coefficient de partage octanol/eau, la longueur du dipôle et l'indice de Balaban sont des paramètres très importants de par leur fort poids. Secondairement, nous constatons également que d'autres paramètres possèdent un poids moindre mais non négligeable ; ces paramètres sont la surface accessible au solvant, le moment dipolaire, l'index moléculaire topologique et l'index de Wiener.

Ainsi, il était intéressant de créer différents réseaux de neurones afin de calculer différentes valeurs d'activité antioxydante, en conservant le même groupe d'apprentissage, mais en faisant varier le nombre de paramètres en entrée. Le but était d'établir une corrélation linéaire entre l'activité calculée et l'activité expérimentale en fonction d'un ou de plusieurs paramètres par une validation croisée.

Dans le tableau 28 sont regroupées les caractéristiques de deux des réseaux étudiés :

Code du réseau	Nombre de neurones d'entrée et paramètres moléculaires associés	Nombre de neurones cachés
RN 1	7 : ClogP ; Conn. Access. A. ; μ ; $l\rho$; J ; MTI ; W	3
RN 2	3 : ClogP ; $l\rho$; J	2

Tableau 28 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones.

Les résultats obtenus avec le système RN 1 sont représentés figure 53.

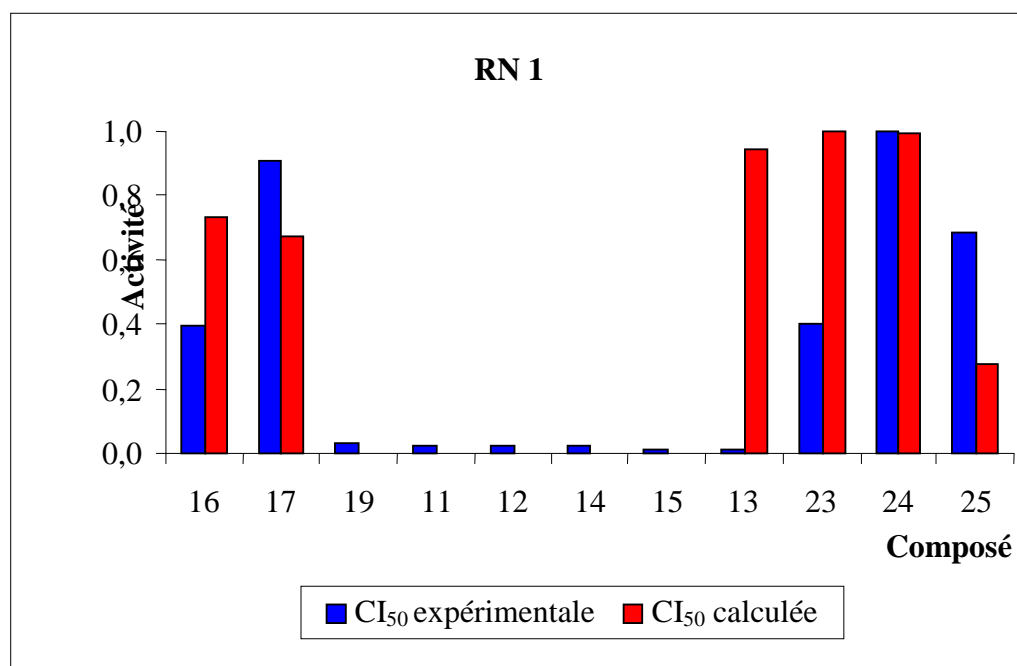


Figure 53 : Représentation des CI_{50} expérimentales et CI_{50} calculées par le réseau de neurones RN 1.

Les résultats montrent que le réseau RN 1 n'est pas performant. En effet, il sous estime de beaucoup les CI_{50} sauf pour les composés **13**, **16**, **23**. Cependant, il classe correctement les composés les plus actifs des inactifs sauf pour le composé **13**. Cette famille de **11** composés n'est vraisemblablement pas assez homogène d'un point de vue structural d'une part et d'un point de vue activité d'autre part. Les valeurs expérimentales des CI_{50} sont trop dispersées, il n'y a pas assez de valeurs intermédiaires (comprises entre 100 μ M et 1 mM). Un nombre plus important de composés est nécessaire.

Etant donné les forts poids du ClogP, de la longueur du dipôle et de l'index de Balaban, nous avons modélisé le réseau RN 2. Dans ce cas, il nous est également impossible d'obtenir une régression linéaire entre les CI_{50} calculées et les CI_{50} expérimentales. Ceci confirme bien qu'il est difficile d'établir, pour cette famille, une relation structure-activité. C'est pourquoi, nous nous sommes attachés à l'étude des thiols et aminothiols, composés pour lesquels nous avons réalisé différents tests d'activité.

II.3.2.2. Détermination des paramètres essentiels pour les 7
composés 11, 12, 14, 15, 16, 17 et 19

Comme précédemment, afin de déterminer les paramètres essentiels, nous avons construit un réseau avec 12 entrées et 1 sortie. Les poids respectifs des 12 paramètres ont été déterminés et sont rassemblés dans le tableau 29 (une table d'apprentissage avec 7 composés et 30000 cycles d'apprentissage) :

Paramètre	Poids
ClogP	0,84
MR	-0,16
Conn. Access. A.	-0,52
O	-1,53
μ	-0,62
$l\rho$	-1,20
HOMO	2,24
LUMO	2,05
J	4,00
Cl.Cnt.	-0,37
MTI	2,16
W	2,10

Tableau 29 : Poids associé à chacun des 12 paramètres moléculaires.

Dans le tableau 29, il apparaît nettement que les paramètres suivants sont essentiels : l'ovalité, la longueur du dipôle, l'énergie de l'orbitale HOMO, l'énergie de l'orbitale LUMO, l'indice de Balaban, l'index moléculaire topologique et l'indice de Wiener. L'ovalité se calcule de la façon suivante :

$$O = S/4\pi(3V/4\pi)^{2/3}$$

où S est la surface moléculaire et V le volume moléculaire.

Il faut remarquer que comme précédemment, les paramètres topologiques sont importants, plus particulièrement l'indice de Balaban (4,00). En revanche, dans cette nouvelle série plus homogène, la lipophilie ne semble pas intervenir dans l'activité puisque le coefficient de partage octanol/eau ne possède qu'un très faible poids (0,84).

Différents réseaux de neurones ont été construits dans le but d'établir une relation linéaire entre l'activité antioxydante mesurée et l'activité calculée par chacun de ces réseaux.

Les caractéristiques de ces différents réseaux sont regroupées dans le tableau 30.

Code du réseau	Nombre de neurones d'entrée et paramètres moléculaires associés	Nombre de neurones cachés
RN 1	6 : O ; HOMO ; LUMO ; J ; MTI ; W	3
RN 2	5 : O ; HOMO ; J ; MTI ; W	2
RN 3	5 : O ; LUMO ; J ; MTI ; W	2
RN 4	4 : HOMO ; J ; MTI ; W	2
RN 5	3 : J ; MTI ; W	2
RN 6	2 : HOMO ; W	0
RN 7	2 : HOMO ; MTI	0

Tableau 30 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones.

Pour construire ces réseaux nous avons exclu les paramètres de poids inférieurs à 1. Pour chaque réseau de neurones créé, les CI_{50} calculées sont tracées en fonction des CI_{50} expérimentales et nous avons réalisé 30000 cycles d'apprentissage.

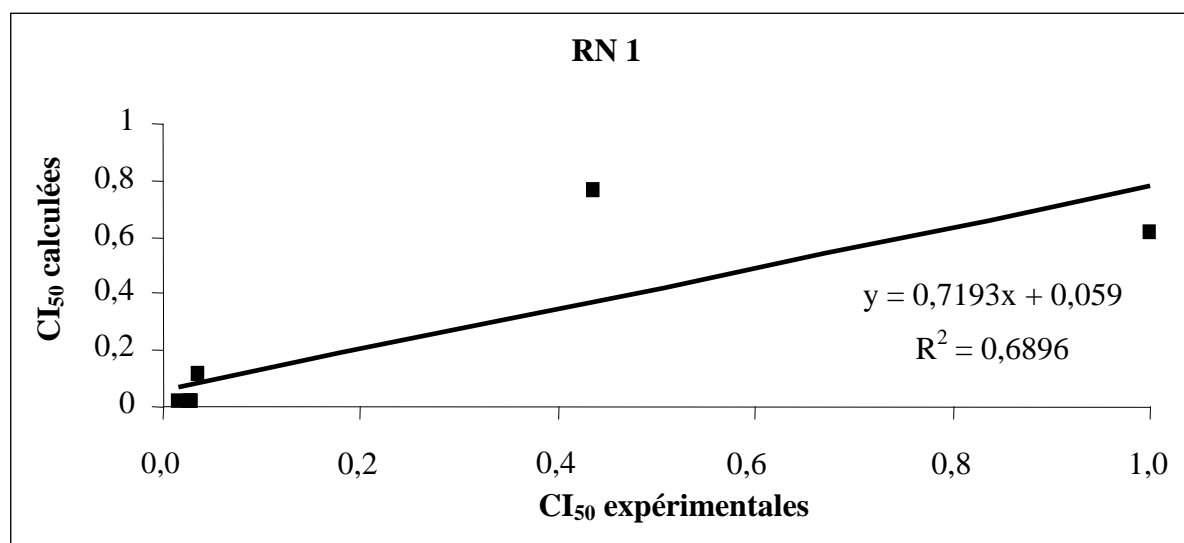


Figure 54 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 1, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

Le réseau de neurones RN 1 comprend les paramètres de plus haut poids (tableau 29). Malgré tout, nous n'avons pas une corrélation satisfaisante entre les CI_{50} calculées et les CI_{50} expérimentales. En effet, le coefficient de corrélation est inférieur à 0,9 (figure 54).

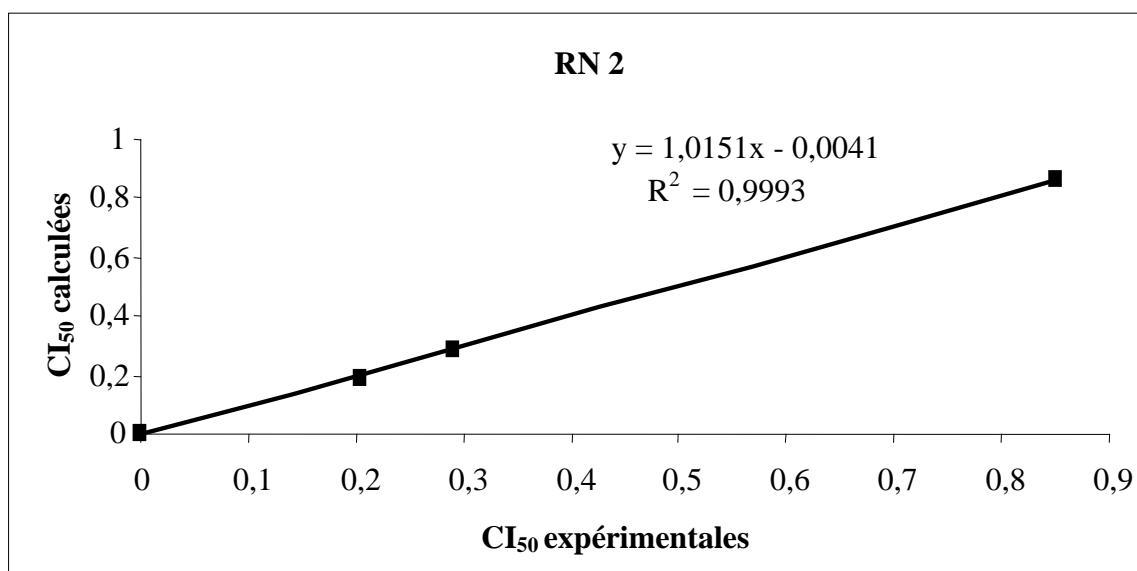


Figure 55: Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 2, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

Le réseau de neurones RN 2 (figure 55) prend en compte 5 paramètres qui sont ceux de plus fort poids à l'exception de l'énergie de l'orbitale LUMO. Dans ce cas, nous obtenons une très bonne corrélation avec un coefficient de corrélation proche de 1. Ces résultats confirment l'importance de ces 5 paramètres, la proportion de paramètres topologiques étant plus importante par rapport aux autres : 3 paramètres topologiques, 1 paramètre électronique et 1 paramètre physicochimique.

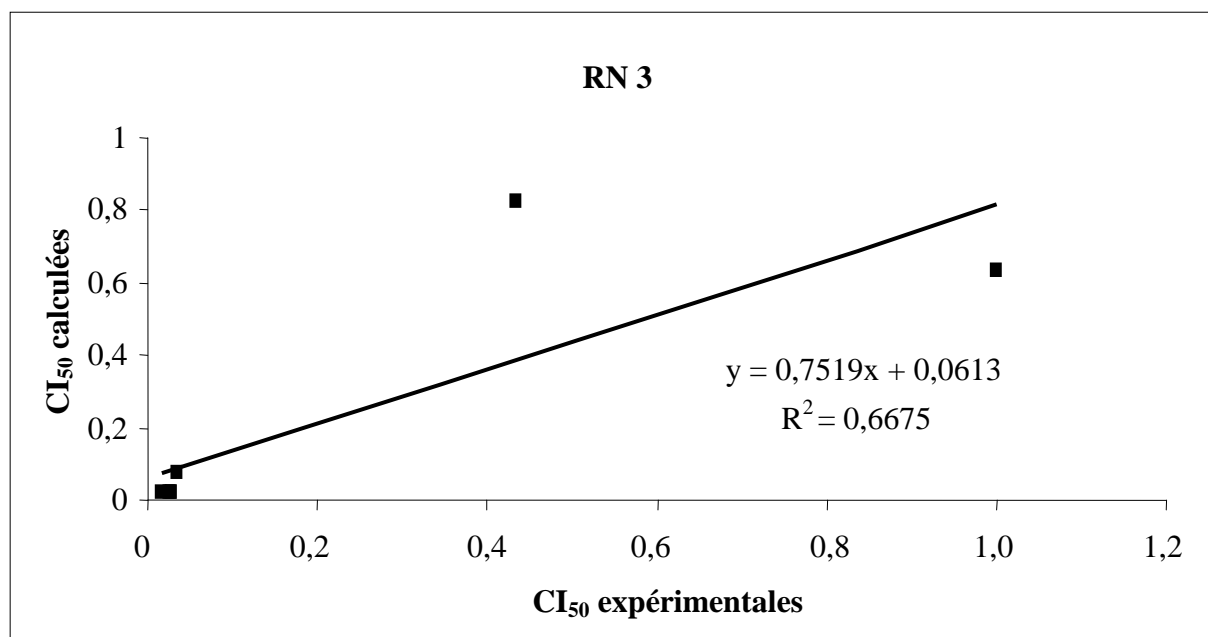


Figure 56 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 3, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

Le réseau de neurones RN 3 (figure 56) englobe les 5 paramètres de plus fort poids à l'exception, cette fois, du paramètre HOMO. Par rapport au réseau précédent, l'énergie de l'orbitale HOMO est remplacée par l'énergie de l'orbitale LUMO. Dans ce cas, nous observons, par rapport au réseau précédent une corrélation moins bonne. Ceci suggère que l'énergie de l'orbitale HOMO est un paramètre essentiel. Au contraire, malgré un poids non négligeable de l'énergie de l'orbitale LUMO, cette dernière ne semble pas impliquée dans l'activité antioxydante.

Ainsi, afin de connaître les descripteurs les plus impliqués, d'autres réseaux sont créés dont deux sont représentés ci-dessous. Le réseau RN 4 (figure 57) correspond au réseau RN 3 sans le paramètre ovalité et le réseau RN 5 (figure 58) correspond au réseau RN 4 sans le paramètre HOMO et ne regroupe que des paramètres topologiques (Balaban, MTI et Wiener).

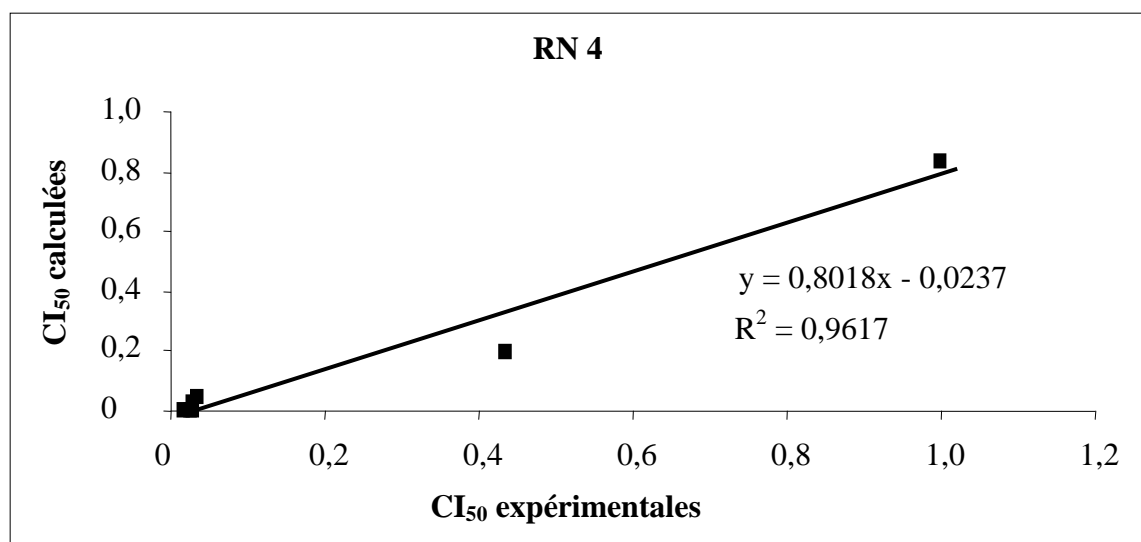


Figure 57 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 4, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

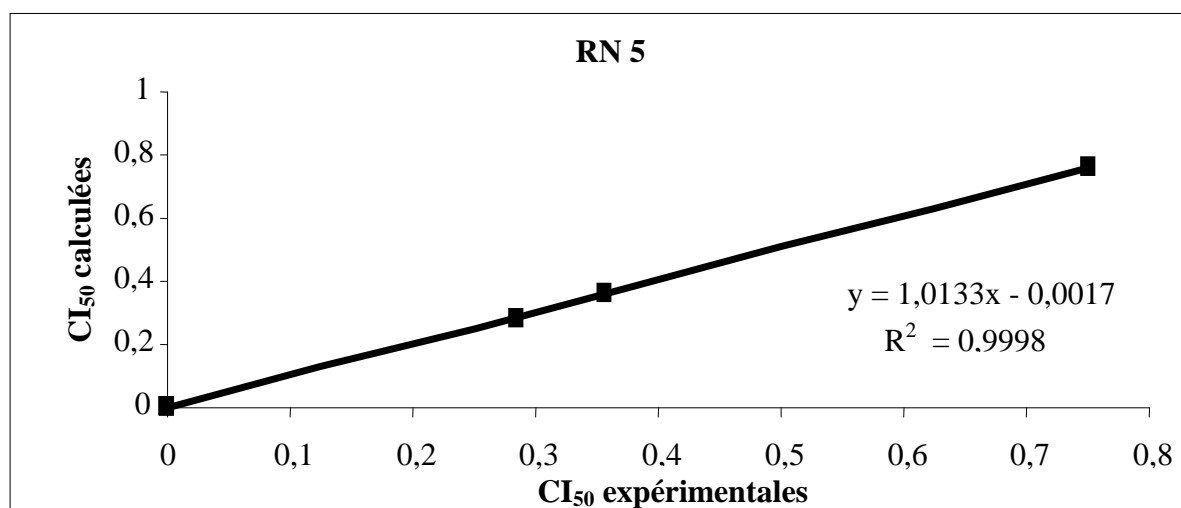


Figure 58 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 5, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

Ces résultats montrent que la corrélation devient excellente lorsque nous considérons trois paramètres topologiques (Balaban, MTI et Wiener). Elle reste néanmoins très bonne avec les paramètres HOMO, J , MTI et W .

Pour finir d'autres réseaux ont été réalisés visant à réduire le nombre de paramètres. Ainsi nous obtenons de très bonnes corrélations avec un réseau à deux entrées et une sortie.

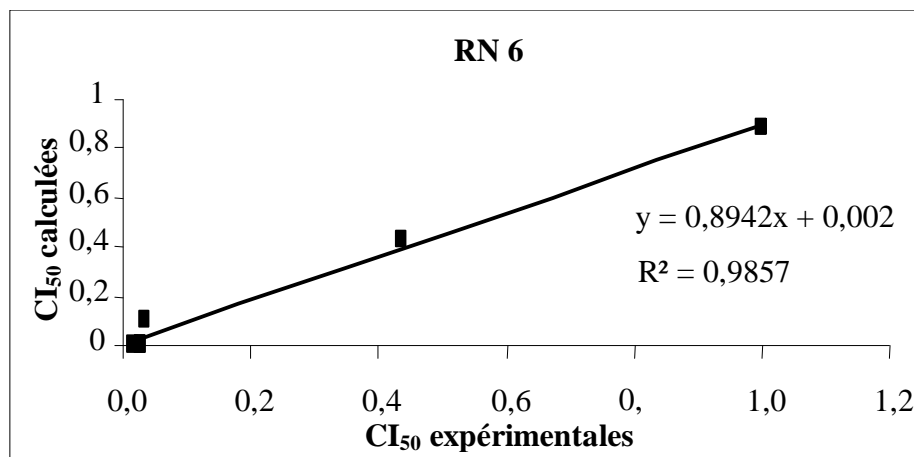


Figure 59 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones à deux entrées (HOMO, Wiener) et une sortie, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

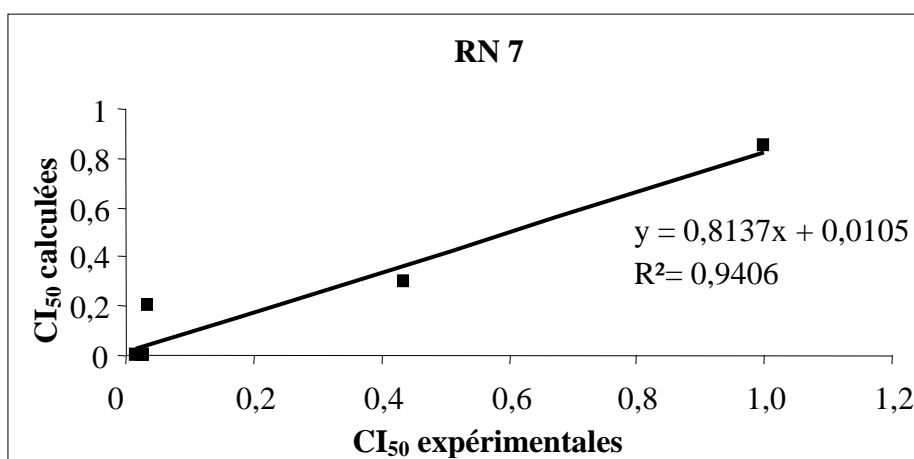


Figure 60 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones à deux entrées (HOMO, MTI) et une sortie, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

Ces deux graphes (figures 59 et 60) montrent l'existence d'une corrélation entre un paramètre électronique (HOMO) et un paramètre topologique (MTI ou Wiener). En revanche, il n'existe pas de corrélation directe entre chacun de ces paramètres et les CI_{50} expérimentales. L'association de ces paramètres est indispensable pour déterminer des CI_{50} calculées.

En conclusion, cette étude confirme l'implication de paramètres électroniques dans l'activité antioxydante, en particulier, l'énergie de l'orbitale HOMO. D'autre part, cette activité dépend également de paramètres topologiques (Balaban, Wiener et MTI).

Il faut noter que ce modèle comporte quelques limites dont les principales sont le nombre restreint de composés utilisés. Ceci se traduit notamment par le fait que les CI_{50} se trouvent très sous estimées pour les plus composés actifs (tableau 31). Cependant le classement obtenu est satisfaisant.

CI_{50} expérimentales (mM) obtenues pour le test DPPH	CI_{50} calculées (mM) par le réseau RN 6
1,38	1,37
3,17	2,78
0,11	0,34
0,092	0,00076
0,091	0,0053
0,084	0,00003
0,053	0,00022

Tableau 31 : Calcul des CI_{50} à partir du réseau RN 6 pour le test DPPH.

Enfin, il faut remarquer que par rapport à l'étude réalisée sur les 11 composés, nous observons toujours l'importance des paramètres topologiques dans l'activité, notamment du paramètre Balaban, qui dans ces deux études possède le poids le plus élevé.

II.3.3. Résultats obtenus dans l'étude QSAR avec le test

ABTS

Dans cette étude, nous faisons intervenir les résultats expérimentaux obtenus dans l'évaluation des propriétés antioxydantes des composés dans le test utilisant le radical cation $ABTS^+$. Dans ce modèle, nous incorporons les thiols (**11**, **12**, **13**, **14**, **15**) et les aminothiols (**16**, **17**, **19**) afin de vérifier les résultats précédents. Les paramètres utilisés sont les mêmes que ceux utilisés dans les calculs précédents.

Afin de vérifier les paramètres essentiels, nous avons construit un réseau avec 12 entrées et 1 sortie. Les poids respectifs des 12 paramètres ont ainsi été déterminés et rassemblés dans le tableau 32 (une table d'apprentissage avec 7 composés et 20000 cycles d'apprentissage) :

Paramètre	Poids
ClogP	0,79
MR	-0,10
Conn. Access. A.	-0,48
O	-1,64
μ	-0,02
l_p	-1,97
HOMO	2,44
LUMO	2,15
J	4,50
Cl.Cnt.	-0,37
MTI	2,39
W	2,36

Tableau 32 : Poids associé à chacun des 12 paramètres moléculaires.

Il apparaît nettement que les paramètres suivants sont essentiels : l'ovalité, la longueur du dipôle, l'énergie de l'orbitale HOMO, l'énergie de l'orbitale LUMO, l'indice de Balaban, l'index moléculaire topologique et l'indice de Wiener. Ce sont les mêmes que dans l'étude précédente.

Les mêmes réseaux ont été construits et sont représentés dans le tableau 33 :

Code du réseau	Nombre de neurones d'entrée et paramètres moléculaires associés	Nombre de neurones cachés
RN 8	6 : O ; HOMO ; LUMO ; J ; MTI ; W	3
RN 9	5 : O ; HOMO ; J ; MTI ; W	2
RN 10	5 : O ; LUMO ; J ; MTI ; W	2
RN 11	4 : HOMO ; J ; MTI ; W	2
RN 12	3 : J ; MTI ; W	2
RN 13	2 : HOMO ; W	0
RN 14	2 : HOMO ; MTI	0

Tableau 33 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones.

Pour ce test, nous obtenons les mêmes corrélations que précédemment avec 20000 cycles d'apprentissage. A titre d'exemple, sont représentés à la figure 61 les résultats avec le réseau RN 9 (équivalent au réseau RN 2 créé pour le test DPPH).

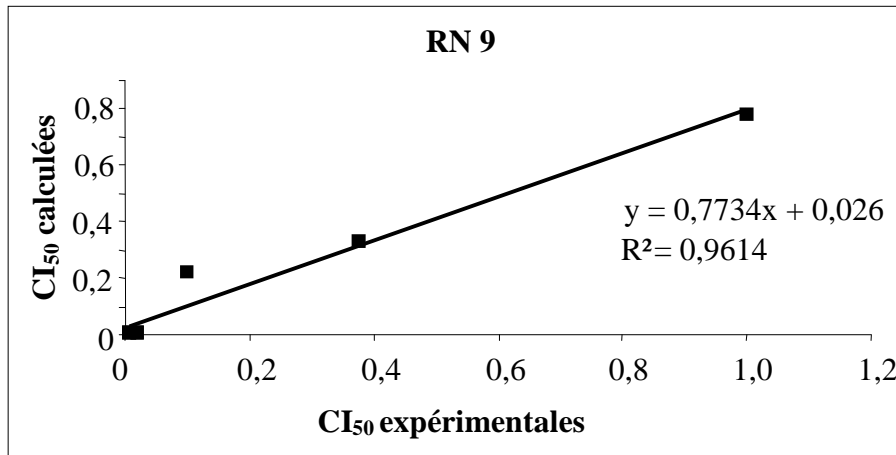


Figure 61 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 9, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

Comme précédemment il est possible d'établir une corrélation entre les CI_{50} calculées à partir de deux paramètres, un topologique et un électronique, et les CI_{50} expérimentales. Figure 62 est représenté le graphe obtenu avec un réseau à deux neurones d'entrée (HOMO, Wiener) et une sortie.

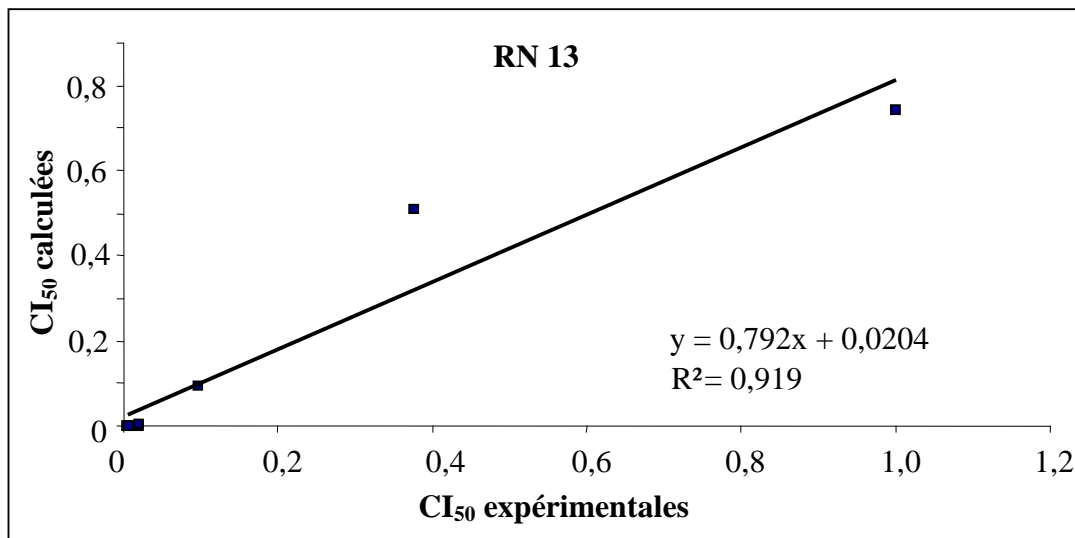


Figure 62 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones à deux entrées (HOMO, Wiener) et une sortie, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.

De la même façon que pour le test au DPPH, nous obtenons une bonne corrélation lorsque nous créons un réseau avec un paramètre électronique (HOMO) et un paramètre topologique (Wiener).

II.3.4. Résultats obtenus dans l'étude QSAR avec le test sur l'ADN plasmidique et la réaction de Fenton

II.3.4.1. Introduction

Concernant ce test, comme nous l'avons décrit au chapitre III, il ne nous a pas été possible de déterminer avec précision des concentrations inhibitrices 50 %. Cependant, en vue de confirmer les résultats des calculs réalisés avec les tests biochimiques, nous avons réalisé des calculs en classant les CI_{50} dans un système binaire. Nous avons choisi d'attribuer la valeur 1 pour les composés dont la CI_{50} est inférieure à 50 μ M. Cette concentration a été choisie en raison des résultats expérimentaux obtenus qui montrent l'existence de deux groupes de composés : un groupe correspondant aux thiols possédant une CI_{50} inférieure à 50 μ M et un autre groupe correspondant aux aminothiols qui possèdent une CI_{50} supérieure.

II.3.4.2. Résultats

Au vu des résultats des calculs précédents, nous avons conservé les paramètres les plus importants dans les tests au DPPH et avec le radical cation $ABTS^+$. Ces derniers sont rassemblés dans le tableau 34 :

Paramètres	Définition
HOMO	HOMO
J	Index de Balaban
MTI	Molecular Topological Index
W	Index de Wiener

Tableau 34 : Groupe des 4 descripteurs utilisés pour les 7 composés.

Nous avons construit 7 réseaux dont les caractéristiques figurent dans le tableau 35. Ces réseaux sont les mêmes que ceux réalisés pour les deux tests précédents.

Code du réseau	Nombre de neurones d'entrée et paramètres moléculaires associés	Nombre de neurones cachés
RN 15	6 : O ; HOMO ; LUMO ; J ; MTI ; W	3
RN 17	5 : O ; HOMO ; J ; MTI ; W	2
RN 18	5 : O ; LUMO ; J ; MTI ; W	2
RN 19	4 : HOMO ; J ; MTI ; W	2
RN 20	3 : J ; MTI ; W	2
RN 21	2 : HOMO ; W	0
RN 21	2 : HOMO ; MTI	0

Tableau 35 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones (20 000 cycles).

L'ensemble des résultats obtenus confirme l'existence de deux familles de produits à savoir les inactifs (les aminothiols **16**, **17**, **19**) et les actifs (les thiols **11**, **12**, **14**, **15**). A titre d'exemple, nous avons représenté à la figure 63, les résultats obtenus avec le réseau RN 18.

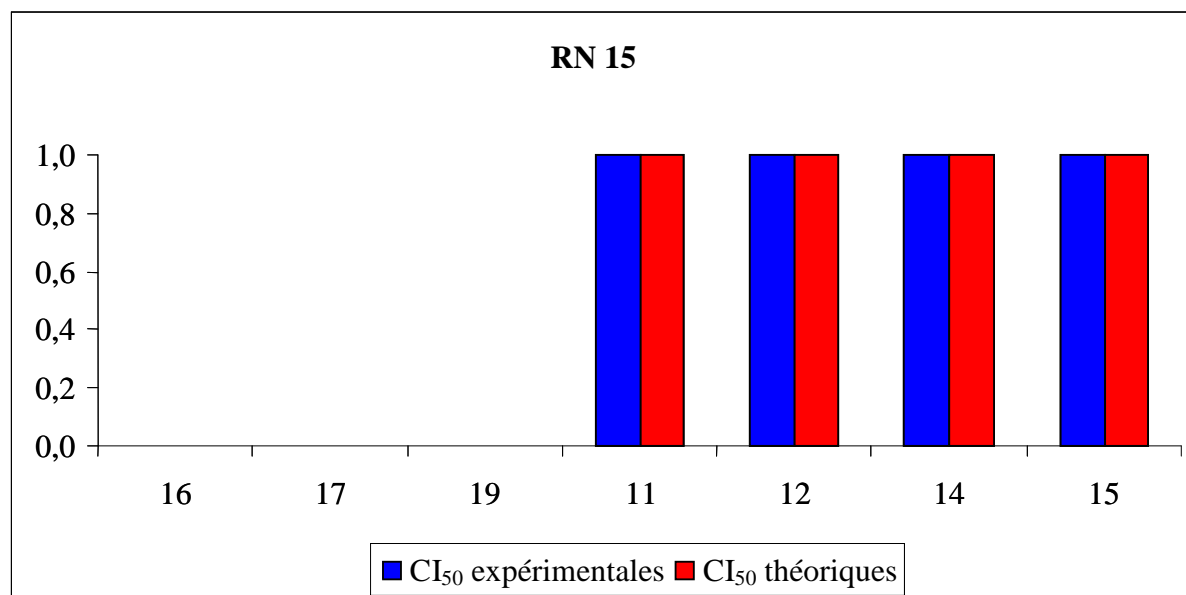


Figure 63 : Représentation des CI₅₀ expérimentales et calculées par le réseau de neurones RN 18.

Tous ces réseaux sont capables de discriminer les produits actifs des inactifs. Les paramètres impliqués sont toujours des paramètres topologiques (J , W , MTI) et un paramètre électronique (HOMO).

III. DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus dans l'étude QSAR montre clairement l'implication d'au moins deux types de paramètres moléculaires dans l'activité antioxydante mesurée par deux tests biochimiques (test DPPH, test ABTS). Ces paramètres sont d'une part de type topologique tels que les indices de Balaban, de Wiener et le paramètre MTI . D'autre part, ils sont également de type électronique ; plus particulièrement, il s'agit de l'énergie de l'orbitale occupée la plus haute. Le fait qu'il n'existe pas de corrélation directe entre les valeurs respectives du paramètre HOMO et d'un paramètre topologique avec les activités mesurées traduit clairement l'idée selon laquelle la combinaison de ces derniers est indispensable.

Dans le tableau 36 figurent les valeurs des CI_{50} calculées, expérimentales et le résultat du calcul de la différence entre les deux. Concernant les deux premiers tests, nous avons adopté la même stratégie. A partir de 12 paramètres moléculaires choisis, nous avons construit un réseau permettant de calculer les poids de chacun d'eux. Dans le cas du test DPPH, à partir des paramètres de poids les plus élevés, nous avons créé le réseau RN 1. Celui-ci ne nous a pas permis d'obtenir une bonne corrélation entre les CI_{50} calculées et les CI_{50} expérimentales. Pour les produits **16** et **17**, il n'a pas été en mesure d'ajuster convenablement les CI_{50} calculées aux CI_{50} expérimentales. C'est pourquoi, nous avons créé d'autres réseaux mettant en évidence l'influence de certains paramètres et permettant d'obtenir de bonnes corrélations en particulier pour les réseaux RN 2, RN 4, RN 5, RN 6, RN 7. L'absence du paramètre LUMO dans le réseau RN 2 par rapport au RN 1 et dans le réseau RN 4 par rapport au RN 3 améliore la corrélation. En revanche, l'absence du paramètre HOMO dans le réseau RN 3 affecte le calcul des CI_{50} . Finalement, nous avons obtenu deux réseaux comprenant deux paramètres (un topologique et un électronique) pour lesquels les corrélations entre les CI_{50} calculées et les CI_{50} expérimentales sont correctes.

Dans le cas du test ABTS, la même démarche a été adoptée et nous avons obtenu des résultats semblables. Les réseaux les plus performants sont les réseaux RN 9, RN 11, RN 12, RN 13, RN 14. Ces réseaux sont toujours caractérisés par la présence d'au moins un caractère topologique (*J*, *W*, *MTI*) et d'un paramètre électronique (*HOMO*). Il faut noter que le paramètre *MTI* peut aussi être considéré en partie comme un paramètre électronique dans la mesure où il fait intervenir les valences.

Enfin, dans le cas du test sur l'ADN plasmidique, n'ayant pas pu déterminer de CI_{50} expérimentales, nous avons classé nos produits dans un système binaire (1 = actif, 0 = inactif). Les mêmes réseaux ont été utilisés et les résultats montrent que tous ces réseaux permettent de classer correctement les produits en deux catégories : les inactifs (composé **16**, **17**, **19**) et les actifs (**11**, **12**, **14** et **15**). En comparaison avec les réseaux les moins performants des tests DPPH et ABTS, ils sont capables également de classer qualitativement nos composés de la même manière. La faiblesse de ces derniers ne se situe que d'un point de vue quantitatif. Ces résultats confirment la validité des paramètres choisis et des réseaux construits. Il est toutefois intéressant de poursuivre l'étude en déterminant avec précision et sur un plus grand nombre de composé des CI_{50} expérimentales pour le test avec l'ADN plasmidique.

RN 1		RN 2		RN 3		RN 4		RN 5	
Comp.	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}
16	1,39	2,42	1,39	0,59	1,39	0,82	1,39	0,62	1,39
17	3,17	1,95	3,17	2,75	3,17	0,63	3,17	2,64	3,17
19	0,11	0,35	-0,24	0,91	0,11	0,08	0,11	0,13	0,11
TEST	9,20	4,17	5,03	1,68	9,20	1,90	9,20	7,56	9,20
DPPH	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²
11	9,10	4,43	4,67	2,31	9,10	1,96	9,10	1,52	9,10
12	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²
14	5,30	4,92	3,80	1,65	5,30	2,13	5,30	9,51	5,30
15	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²
TEST	8,40	4,21	4,19	1,46	8,40	1,92	8,40	8,24	8,40
DPPH	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²

RN 8		RN 9		RN 10		RN 11		RN 12	
Comp.	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}
16	1,52	3,54	-2,02	1,35	1,52	3,68	1,52	1,35	1,52
17	4,04	2,20	1,84	3,16	4,04	2,11	4,04	3,02	4,04
19	0,39	0,18	0,21	0,91	0,39	0,17	0,39	1,06	0,39
TEST	7,90	3,11	4,79	1,58	7,90	5,21	7,90	7,07	7,90
ABTS	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²
11	7,60	3,73	3,87	1,97	7,60	5,91	7,60	9,01	7,60
12	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²
14	2,30	3,87	-1,57	1,94	2,30	6,14	2,30	7,35	2,30
15	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²
TEST	2,10	3,96	-1,86	1,87	2,10	6,31	2,10	6,79	2,10
ADN	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²

RN 15		RN 16		RN 17		RN 18		RN 19	
Comp.	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}	CI _{30cal}	CI _{30exp}
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TEST	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ADN	1	1	1	1	1	1	1	1	1

RN 6						RN 7						
Comp.	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}
16	1,39	1,37	0,01	1,39	3,02	-1,64						
17	3,17	2,78	0,39	3,17	8,54	-5,37						
19	0,11	0,34	-0,23	0,11	2,02	-1,91						
TEST DPPH	9,20	7,61	9,12	9,20	7,03	9,13						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²						
12	9,10	5,33	8,57	9,10	5,73	8,53						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²						
14	5,30	2,22	5,28	5,30	3,01	5,27						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²						
15	8,40	3,17	8,40	8,40	0	8,40						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁵	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²						
RN 13						RN 14						
Comp.	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}
16	1,52	2,06	-0,54	1,52	0,84	0,68						
17	4,04	3,00	1,04	4,04	2,58	1,46						
19	0,39	0,37	0,02	0,39	1,55	-1,16						
TEST ABTS	7,90	2,42	7,66	7,90	6,87	7,83						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²						
12	7,60	1,31	6,29	7,60	3,96	7,20						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²						
14	2,30	8,08	2,22	2,30	4,04	2,26						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²						
15	2,10	2,02	2,08	2,10	8,08	2,09						
	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰⁴	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰²	10 ⁻⁰³	10 ⁻⁰²						
RN 13						RN 14						
Comp.	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}	CI _{50exp}	CI _{50cal}	CI _{50exp} -CI _{50cal}
16	0	0	0	0	0	0						
17	0	0	0	0	0	0						
19	0	0	0	0	0	0						
TEST ADN	1	1	1	1	1	1						
	1	1	1	1	1	1						
12	1	1	1	1	1	1						
	1	1	1	1	1	1						
14	1	1	1	1	1	1						
	1	1	1	1	1	1						
15	1	1	1	1	1	1						

Tableau 36 : Valeurs des CI₅₀ expérimentales et des CI₅₀ calculées par les réseaux de neurones, et résultats du calcul des différences entre les CI₅₀ expérimentales et les CI₅₀ calculées pour chaque test.

D'autre part, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude précédente de DFT. En effet, les calculs de DFT nous ont permis de mettre en évidence l'influence de la structure et des propriétés électroniques dans l'aptitude de nos composés à capturer les radicaux hydroxyles. Plus précisément, la répartition de la densité de spin conditionne en partie cette réaction radicalaire qui passe par la formation d'un radical RS^\cdot . L'énergie de ce radical RS^\cdot est d'autant plus basse (et donc la réaction d'autant plus favorable) que cette densité de spin peut se délocaliser sur la molécule. Or cette répartition dépend elle-même de la structure du composé car elle résulte de la possibilité de délocalisation ou non de l'électron célibataire porté par le radical RS^\cdot . En effet, la présence d'un groupement de type électro donneur ou électro attracteur peut influencer cette délocalisation et donc la réaction de capture du radical OH^\cdot .

Au vu des résultats obtenus, seule l'énergie de l'orbitale HOMO semble étroitement liée à l'activité. En revanche, malgré un poids comparable de l'énergie de l'orbitale LUMO cette dernière n'a pas pu être incluse dans les différents réseaux de neurones que nous avons construits. En effet, il ne nous a pas été possible d'obtenir de corrélation entre l'activité mesurée et l'activité calculée, en considérant un réseau de neurones à deux entrées (LUMO et un paramètre topologique) comme cela a été possible avec l'énergie de l'orbitale HOMO. Par contre, nous avons comparé les différences d'énergie entre ces deux orbitales pour l'ensemble des composés. Ces différences d'énergie peuvent permettre de mesurer l'excitabilité de la molécule : plus elles sont importantes, moins le composé est « excitable ». Les paramètres calculés sont rassemblés dans le tableau 37.

Composé	Energie HOMO (eV)	Energie LUMO (eV)	$E_{HOMO} - E_{LUMO}$ (eV)
11	- 8,818	- 0,599	- 0,717
12	- 8,748	- 0,616	- 0,721
14	-9,212	- 0,659	- 0,271
15	- 8,725	- 0,824	- 0,230
16	- 8,57	- 0,176	- 0,202
17	- 8,429	- 0,16	- 0,200
19	- 8,324	- 0,521	- 0,053

Tableau 37 : Calcul des énergies des orbitales HOMO et LUMO et de la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO pour les 7 composés.

Ces différences d'énergie sont d'autant plus grandes que les composés sont moins actifs. En effet, la différence est plus importante pour les composés **16** et **17** pour lesquels nous avons déterminé des CI_{50} supérieures au millimolaire. Nous avons ensuite le composé **19**, pour lequel la CI_{50} se trouve au dessus de 100 μ M et les composés **11**, **12**, **14**, **15** qui ont des CI_{50} inférieures à 100 μ M.

Ces résultats devraient être étendus sur un plus grand nombre de composés. Cependant la comparaison des énergies HOMO et LUMO pourrait permettre de préjuger de l'activité de certains composés.

IV. CONCLUSION

Les outils de la chimie quantique (DFT) et de calculs de relations structure-activité (QSAR) nous ont permis de comprendre les différences d'activité que nous avons pu observer expérimentalement. En effet, grâce à la DFT nous avons pu étudier une réaction de type radicalaire impliquée dans le mécanisme de radioprotection chimique et ainsi de comparer la réactivité de certains de nos composés vis-à-vis du radical hydroxyle. Les résultats ont montré que la réaction est plus favorable pour les thiols que pour les aminothiols. D'autre part, l'étude QSAR nous a apporté des éléments dans l'influence de certains paramètres, propres à nos composés, sur l'activité biologique mesurée. Ces paramètres sont de deux types : les propriétés électroniques et la structure même de nos composés.

Ces travaux sont non seulement prometteurs quant à l'apport non négligeable de ces outils de calculs dans la synthèse et l'étude de nouveaux radioprotecteurs chimiques mais nécessitent également d'être approfondis (famille de composés plus grande, plus homogène).

CONCLUSION

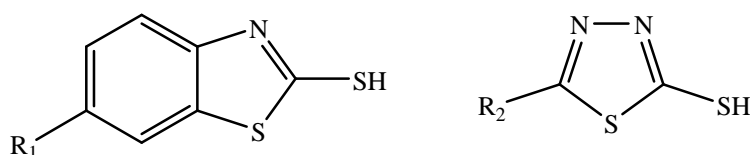
PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail de recherche étaient la synthèse et l'étude *in vitro* de nouveaux radioprotecteurs organiques et phosphorés dérivés du benzothiazole et du thiadiazole.

Dans le domaine de la radioprotection chimique de nombreux travaux ont été réalisés dans le but de synthétiser des composés offrant le meilleur rapport efficacité/toxicité. Dans le premier chapitre, nous avons mis en évidence la nécessité de mettre en place une radioprotection chimique de par l'omniprésence de la radioactivité dans de nombreux domaines et des conséquences sur la santé de l'exposition aux rayonnements ionisants. Nous avons rapporté également, de manière non exhaustive, les principaux composés étudiés dans ce domaine et nous avons montré les contraintes auxquelles doivent répondre ces radioprotecteurs. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche sous l'impulsion de la Direction Générale pour l'Armement et a pour vocation de rationaliser la synthèse de nouveaux radioprotecteurs par l'étude des relations structure/activité.

Ainsi, nous avons développé la synthèse de nouveaux composés à partir des motifs aminobenzothiazole et aminothiadiazole. Ces composés sont diversement fonctionnalisés : en effet, nous avons synthétisé des amides, des thiols, des aminothiols, de acides thiosulfoniques et des phosphorothioates. Ces synthèses sont décrites au chapitre II. L'objectif était de comparer l'apport de différents groupements dans l'activité antioxydante et radioprotectrice. En effet, des travaux précédents, réalisés chez la souris, montrent le bénéfice apporté, en terme de vectorisation et donc d'efficacité, d'un groupement phosphorothioate [90] par rapport à l'aminothiol correspondant. L'intérêt porté aux composés phosphorés résulte de la découverte de l'amifostine, encore appelé WR-2721. Ce dérivé est d'ailleurs, encore aujourd'hui, le seul à pouvoir être utilisé en médecine malgré de nombreux effets secondaires rendant son utilisation délicate. Son effet radioprotecteur est attribué à son métabolite, un aminothiol, le WR-1065, obtenu après intervention d'une alcaline phosphatase membranaire. C'est pourquoi, nous nous sommes plus particulièrement attachés à la synthèse et l'étude *in vitro*, de tels dérivés de type aminothiols et phosphorothioates.

L'étude des propriétés antioxydantes et radioprotectrices de nos composés a été menée *in vitro* dans le but de réaliser un « screening » des produits les plus intéressants avant de passer à l'étude sur l'animal. Nous avons choisi d'utiliser le WR-2721 et son métabolite comme référence dans le domaine. Nous avons étudié dans un premier temps les propriétés antioxydantes car l'effet principal des radiations ionisantes sur un organisme biologique se traduit par la radiolyse de l'eau, elle-même à l'origine de la production de nombreuses espèces radicalaires très réactives. Ces premiers résultats nous ont permis de confirmer que les composés possédant une fonction thiol sont les plus actifs. Etant donné que ces dérivés sont potentiellement les métabolites de phosphorothioates, nous avons poursuivi notre étude par la mise en évidence de leur pouvoir radioprotecteur après irradiation gamma de l'ADN plasmidique. L'ensemble de nos résultats montre que les meilleurs composés se caractérisent par la présence d'une fonction thiol directement reliée au noyau benzothiazole et thiadiazole. La présence d'une fonction de type aminothiols diminue au contraire les propriétés antioxydantes et radioprotectrices.



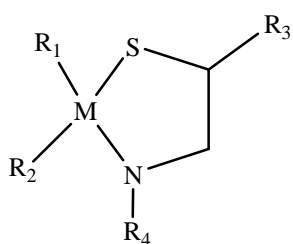
Avec $R_1 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{OCH}_2\text{CH}_3$
 et $R_2 = \text{SCH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3$

Cette famille de dérivés possède des propriétés antioxydantes et radioprotectrices, *in vitro*, comparables au meilleur radioprotecteur connu, le WR-2721. De plus, concernant plus particulièrement, les propriétés antioxydantes, ces derniers se situent dans la même zone d'efficacité que la vitamine C ou encore le Trolox. Enfin, au sein même de cette famille, le motif thiadiazole semble le plus efficace. Cette étude nous a permis d'appréhender un des mécanismes d'action possibles de ces thiols qui est de type radicalaire.

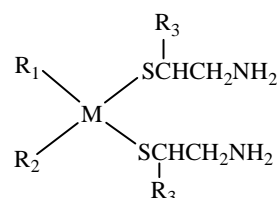
Dans la dernière partie de notre travail, nous avons utilisé des outils de chimie théorique et de bioinformatique afin de mieux comprendre ce mécanisme radicalaire et d'établir des relations structure-activité. Les calculs de DFT nous ont permis de modéliser une réaction de capture d'un radical hydroxyle par nos composés (thiols et aminothiols). Les résultats confirment, d'une part, qu'il s'agit d'une réaction très favorable et d'autre part que les dérivés thiols sont plus efficaces que les aminothiols correspondants. De plus, l'étude QSAR nous a permis d'apporter certains éléments : en effet, il nous a été possible de relier l'activité à des paramètres moléculaires électroniques et topologiques.

L'ensemble des résultats obtenus suggère de nombreuses perspectives. Nous envisageons de poursuivre ce travail d'une part par l'étude de la toxicité des composés synthétisés sur cultures cellulaires avant de passer à l'étude de leurs propriétés radioprotectrices chez le rongeur en collaboration avec le pharmacien en chef Christine Amourette du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées à La Tronche.

D'autre part, nous envisageons la synthèse et l'étude de dérivés organométalliques, de types métallathiazolidines et métalladithioacétals, obtenus à partir des motifs organiques issus de ce travail. En effet, des travaux précédents réalisés au laboratoire montrent que la présence d'un métal modifie les propriétés biologiques des composés organiques parents. Ces composés organométalliques pourront être testés *in vitro* et *in vivo*.



Métallathiazolidines



Métalladithioacétals

Avec M = Ge ou Si

$R_1 = R_2 =$ dérivés du benzothiazole et du thiadiazole

$R_3 = R_4 =$ H, CH₃

De plus, la synthèse de ces nouveaux dérivés permettra de développer une étude QSAR plus approfondie et donc d'établir des relations structure/activité plus solides. Il est également intéressant de développer une étude QSAR avec des composés pour lesquels nous

disposons des résultats d'études menées *in vivo* chez la souris afin d'orienter de nouvelles synthèses.

Enfin, nous envisageons, en collaboration avec l'équipe de C. Mioskovski et T. Le Gall (CEA Saclay), de développer l'étude de la norbadione, les acides pulvinique et atromentique afin d'améliorer leurs propriétés radioprotectrices en les fonctionnalisant par des groupements aminothiols, organométalliques ou phosphorothioates afin de diminuer leur toxicité et augmenter leur pouvoir anti-oxydant.

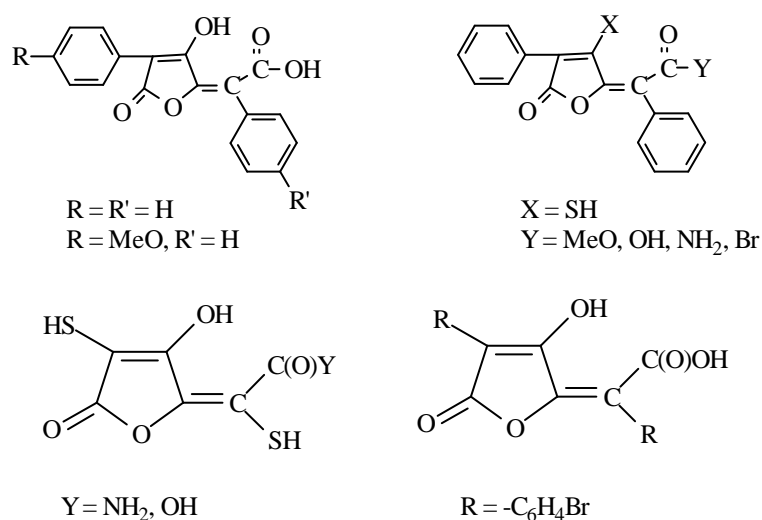


Figure 64 : Exemples d'acides pulviniques modifiés.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Patt H.M., Tyree E.B., Straube R.L., Smith D.E. Cysteine Protection against X Irradiation. *Science*, **110**, 213, 1949.
- [2] Kuna P., Dostal M., Neruda O., Knajfi J., Petyrek P., Severa J. et al. Acute toxicity and radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cysteamine in single whole body fission neutrons irradiated rats. *J. Appl. Biomed.*, **2**, 43-49, 2004.
- [3] Müller A.C., Pigorsch S., Beyer C., Lautenschläger C., Dunst J. Radioprotective effects of amifostine *in vitro* and *in vivo* measured with the comet assay. *Strahlenther Onkol.*, **8**, 517-525, 2004.
- [4] Célariès B., Amourette C., Lion C., Rima G. Nouveaux phosphorothioates dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline : application en radioprotection chimique. *Radioprotection*, **40**, 57-71, 2005.
- [5] Rima G., Satgé J., Dagiral R., Lion C., Fatome M., Roman V., et al. Synthesis and application of new organometallic compounds of silicon and germanium in chemical radioprotection. *Appl. Organometal. Chem.* **13**,1-12, 1999.
- [6] Cordoliani Y.S. Chapitre II : Grandeurs et unités en radioprotection. *Feuillets de radiologie*, **42**, 248-252, 2002.
- [7] ICRU. Fundamental quantities and units for ionizing radiation. ICRU Report 60, ICRU Publications: Bethesda (1998).
- [8] Les clés du CEA. **43**, 2000.
- [9] Boissière A. Contribution « K » à l'effet biologique des rayonnements ionisants. *Thèse de troisième cycle*, Université Paris VI, 2004.
- [10] Corde S. Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforcateurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse. *Thèse de troisième cycle*, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2002.
- [11] Tubiana M., Dutreix J., Wambersie A. Radiobiologie. Science et Pratique Médicale, Hermann, Paris, 1997.
- [12] Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat. Res.* **464**, 35-40, 2000.
- [13] Pouget J.P. Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire: mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées. *Thèse de troisième cycle*, Université Paris XI, 2000.
- [14] Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparoutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* **424**, 9-21, 1999.

- [15] Wallace S. Enzymatic processing of radiation induced free radical damage in DNA. *Radiat. Res.* **150**, S60-S79, 1988.
- [16] Averbeck D. Mécanismes de réparation et mutagénèse radio-induite chez les eucaryotes supérieurs. *Cancer/Radiother.* **4**, 335-354, 2000.
- [17] Boiteux S. Réparation des lésions endogènes et induites par les radiations ionisantes dans l'ADN: mécanismes et fonctions biologiques. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, **26**, 126-132, 2002.
- [18] Frankenberg-Schwager M. Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukariotic cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**, 273-292, 1990.
- [19] Ikushima T., Aritomi H., Morisita J. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat. Res.* **358**, 193-198, 1996.
- [20] Nilsen H., Krokan H.E. Base Excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, **22**, 987-998, 2001.
- [21] Elkind M.M., Sutton H. Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat. Res.* **13**, 556-593, 1959.
- [22] Jarrett C.D.G. Medical Management of Radiological Casualties. Armed Forces Radiobiology Research Institute, Special Publication, Bethesda, Maryland, 1999.
- [23] Keith S., Murray E., Spoo W. Toxicological profile for ionizing radiation, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <http://www.atsdr.cdc.gov>, 1999.
- [24] Cordoliani Y.S. Chapitre VI: Effets pathologiques des rayonnements ionisants: les effets déterministes. *Feuillets de radiologie*, **43**, 80-86, 2002.
- [25] Cerveny T.J., MacVittie T.J., Young R.W. Acute radiation syndrome in humans. Textbook of Military Medicine - Medical Consequences of Nuclear Warfare, Armed Forces Radiobiology Research Institute, Bethesda, Maryland, 17-36, 1989.
- [26] Cosset J.M. Cancers radio-induits: le point en 1997. *Cancer/Radiother.* **1**, 823-835, 1997.
- [27] Dale W.M., Gray L.H., Meredith W.J. The inactivation of an enzyme (carboxypeptidase) by x- and α -radiation. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **242A**, 33-62, 1949.
- [28] Bacq Z.M., Lecomte H.A., Fischer P., Blavier J. Protection contre le rayonnement X par la β -mercaptoéthylamine. *Arch. Int. Physiol.* **LIX**, 442-446, 1951.
- [29] Bump E.A., Malaker K. Radioprotectors: Chemical, Biological, and Clinical Perspectives, CRC. 1998.

- [30] Popisil M. Pharmacological radiation protection. In : Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation Pharmacological radiation protection. Ed. Baumstark-Khan, C.; Kozubek, S.; Horneck, G. Kluwer Academic Publishers, 411-420, 1999.
- [31] Goudable J., Favier A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Metabol.* **11(2)**, 115-120, 1997.
- [32] Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J., Poole L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28(1)**, 32-40, 2003.
- [33] Vatassery G.T., Smith W.E., Quach H.T. Ascorbic acid, glutathione and synthetic antioxidants prevent the oxidation of vitamin E in platelets. *Lipids.* **24(12)**, 1043-1047, 1989.
- [34] Chan A.C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71(9)**, 725-731, 1993.
- [35] Cillard J., Cillard P. Prooxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. *Ann. Nutr. Aliment.* **34(3)**, 579-591, 1980.
- [36] Samuni A., Aranovitch J., Godinger D., Chevion M., Czapski G. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism. *Eur. J. Biochem.* **137(1-2)**, 119-124, 1983.
- [37] Chepda T., Perier C. Chamson A., Frey J. Effets pro- et antioxydants de l'ascorbate. *Nutr. Clin. Metabol.* **13(2)**, 115-120, 1999.
- [38] Arteel G.E., Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Env. Toxicol. Pharmacol.* **10(4)**, 153-158, 2001.
- [39] Foye W.O. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. John Wiley & Sons Inc, New York, 1981.
- [40] Eldjarn L., Pihl A. On the mode of action of X-Ray protective agents. I. The fixation *in vivo* of cystamine and cysteamine to proteins. *J. Biol. Chem.* **223(1)**, 341-352, 1956.
- [41] Copeland E.S. Mechanisms of radioprotection - a review. *Photochem. Photobiol.* **28**, 839-844, 1978.
- [42] Foye WO. Radiation-Protective Agents in Mammals. *J. Pharm. Sci.* **58**, 283-300, 1969.
- [43] Venkatachalam S.R., Chattopadhyay S. Natural Radioprotective Agents : An Overview. *Curr. Org. Chem.* **9**, 389-404, 2005.

- [44] Maisin J.R., Albert C., Henry A. Reduction of short-term radiation lethality by biological response modifiers given alone or in association with other chemical protectors. *Radiat. Res.* **135**, 332-337, 1993.
- [45] Weiss J.F., Landauer M.R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology*, **189**, 1-20, 2003.
- [46] Singh V.K., Yadav V.S. Role of cytokines and growth factors in radioprotection. *Exp. Mol. Pathol.* **78**, 156-169, 2005.
- [47] Constine L.S., Harwell S., Keng P., Lee F., Rubin P., Siemann D. Interleukin-1 α stimulates hematopoiesis but not tumor cell proliferation and protects mice from lethal total body irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **20**, 447-56, 1991.
- [48] Vavrova J. Role of IL-1 and TNF in the Ribomunyl-induced radioprotection. *Folia Biol.* **41**, 23-30, 1995.
- [49] Kalechmana Y., Shanib A., Albecka M., Sredni B. Induction of acute phase proteins in mice and humans by treatment with AS101, an immunomodulator with radioprotective properties. *Immunopharmacology*, **29**, 149-58, 1995.
- [50] Samuni Y., Coffin D., DeLuca A.M., DeGraff W.G., Venson D.J., Ambudkar I.C., Mitchell, J.B. The Use of Zn-desferrioxamine for Radioprotection in Mice, Tissue culture and Isolated DNA. *Cancer Res.* **59**, 405-409, 1999.
- [51] Foye W.O., Chatterji S. Antiradiation Compounds. 24. Stability of Copper (II) Complexes of Bis(methylthio) and Methylthio amino Derivatives of 1-Methylpyridinium- and 1-Methylquinolinium-2-dithioacetic Acids in the presence of Amino Acids, Simple peptides, and a Protein. *J. Pharm. Sci.* **85**, 811-814, 1996.
- [52] Mourret A., Agnius-Delord C., Rinaldi R. Effect of hyperbaric oxygen on the radioprotective properties of three nitrogenous heterocyclic compounds and influence of these substances on the toxicity of hyperbaric oxygen. *C. R. des Séances de l'Académie des Sciences, Série D: Sciences Naturelles* **275**, 2985-2988, 1972.
- [53] Mourret A., Agnius-Delord C., Rinaldi R. Effectiveness of three heterocyclic, nitrogen-containing radioprotectants on cobalt-60-irradiated C3H mice. *C. R. des Séances de l'Académie des Sciences, Série D : Sciences Naturelles*, **275**, 1575-1578, 1972.
- [54] Mourret A., Rinaldi R. Radioprotective power of imidazole, benzimidazole, and Naphazoline on mice placed in a pure oxygen atmosphere. CEA, Rapport **25**, 1971.
- [55] Hansen B., Sorbo B. Radioprotective effect of aminoalkyl thioesters. *Acta Radiol.* **56**, 141-144, 1961.

- [56] Doherty D.G., Brunett W.T., Shapira R. Chemical protection against ionizing radiation. II. Mercaptoalkylamines and related compounds with protective activity. *Radiat. Res.* **7**, 13-21, 1957.
- [57] Bacq Z.M., Beaumariage M.L., Goutier R., Van Caneghem P. The state of shock induced by cystamine and cysteamine. *Br. J. Pharmacol.* **34**, 202-203, 1968.
- [58] Bhatia A.L., Jain M. Spinacia oleracea L. protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. *Phytomedicine*, **11**, 607-615, 2004.
- [59] Biaglow J.E., Varnes M.E., Epp E.R., Clark E.P., Tuttle S.W., Held K.D. Role of glutathione and other thiols in cellular response to radiation and drugs. *Drug Metab. Rev.* **20(1)**,1-12, 1989.
- [60] Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low Dose gamma-Rays Activate Immune Functions via Induction of Glutathione and Delay Tumor Growth. *J. Radiat. Res.* **45**, 33-39, 2004.
- [61] Savoye C., Swenberg C., Sabattier R., Charlier M., Spothem-Maurizot M. Etude moléculaire de la radioprotection de l'ADN par des thiols. *J. Chem. Phys.* **94**, 337-341, 1997.
- [62] Hamza A., Broch H., Vasilescu D. Quantum molecular simulation of the abstraction at C'4 of NA sugar moiety by the free radical 'OH. *J. Mol. Struc (Theochem)* **491**, 237-247, 1999.
- [63] Broch H., Hamza A., Vasilescu D. Quantum molecular simulation of the radioprotection by the aminothiols WR-1065, active metabolite of amifostine (WR-2721). Part 2. Modeling of the hydrogen abstraction by C4' of DNA desoxyribose radical. *J. Mol. Struct.* **538**, 117-32, 2001.
- [64] Marzatico F., Porta C., Moroni M., Bertorelli L., Borasio E., Finotti N., Pansarasa O., Castagna L. *In vitro* antioxidant properties of amifostine (WR-2721, Ethyol). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45(2)**, 172-176, 2000.
- [65] Grdina D.J., Murley J.S., Kataoka Y., Epperly W. Relationships between cytoprotection and mutation prevention by WR-1065. *Mil. Med.* **167**, 51-53, 2002.
- [66] Santini V., Giles F.J. The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. *Haematologica*, **84**, 1035-42, 1999.
- [67] Schwartz J.L., Giovanazzi S.M., Karison T., Jones C., Grdina D.J. 2-[(aminopropyl)amino]ethanethiol mediated reductions in ⁶⁰Co gamma-ray and fission

- spectrum neutron-induced chromosome damage in V79 cells. *Radiat. Res.* **113**, 145-54, 1988.
- [68] Brown P.E. Mechanism of Action of Aminothiols Radioprotectors. *Nature*, **58**, 363-364, 1967.
- [69] Holmberg B., Sörbo B. Protective Effect of β -Aminoethylthiosulphuric Acid against Ionizing Radiation. *Nature*, **183**, 832, 1959.
- [70] Klayman D.L., Gilmore W.F. The Synthesis of N-Substituted 2-Aminoethanethiosulfuric Acids. *J. Org. Chem.* **7**, 823-824, 1964.
- [71] Klayman D.L., Grenan M.M., Jacobus D.P. Potential Antiradiation Agents. I. Primary Aminoalkanethiosulfuric Acids. *J. Med. Chem.* **12**, 510-512, 1969.
- [72] Klayman D.L., White J.D., Sweeney T.R. Unsymmetrical Disulfides from Amino Bunte Salt. *J. Org. Chem.* **29**, 3737-3738, 1964.
- [73] Van Bekkum D.W., Nieuwerkerk T.M. The Radioprotective Action of a Number of Cysteamine Derivatives and Related Compounds. *Int. J. Radiat. Biol.* **7**, 473-479, 1963.
- [74] Fuentes J.L., Capetillo N., Ferrer M., Padron E., Altanes S., Llagostera M. Radioprotective effect of sodium diethyldithiocarbamate (DDC) and S-2-(aminoethyl-isothioronicadenosin-5-triphosphate (Adeturon) in gamma-irradiated *Escherichia coli* cells. *Mutat. Res.* **422**, 339-345, 1998.
- [75] Gandhi N.M., Nair C.K.K. Radiation Protection by Diethyldithiocarbamate: Protection of Membrane and DNA *In vitro* and *In Vivo* against gamma-radiation. *J. Radiat. Res.* **45**, 175-180, 2004.
- [76] Kent C., Blekkenhorst G. Time modulation effect of diethyldithiocarbamate (DDC) radiosensitization by superoxyde dismutase (SOD) inhibition. *Free Rad. Res. Comm.* **12-13**, 595-599, 1991.
- [77] Roberts J.C., Koch K.E., Detrick S.R., Warters R.L., Lubec G. Thiazolidine Prodrugs of Cysteamine and Cysteine as Radioprotective Agents. *Radiat. Res.* **143**, 203-213, 1995.
- [78] Akerfeldt S. Radioprotective Effects of S-Phosphorylated Thiols. *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.* **45**, 465-469, 1963.
- [79] Piper J.R., Stringfellow R., Elliott R.D., Johnston T.P. S-2-(ω -Aminoalkylamino)ethyl Dihydrogen Phosphorothioates and Related Compounds as Potential Antiradiation Agents. *J. Med. Chem.* **12**, 236-243, 1969.

- [80] Piper J.R., Stringfellow C.R., Johnston T.P. Terminally Substituted S-2-(ω -Aminoalkylamino)ethyl Dihydrogen Phosphorothioates and Related Compounds as Potential Antiradiation Agents. *J. Med. Chem.* **1**, 244-253, 1969.
- [81] Sedlmeier H., Messerschmidt O. Investigations on combined injuries, 29th communication. Protective effect of aminopropylamino-ethylthiophosphate (WR 2721) in mice with radiation and combined injuries (irradiation and skin wound or burn). *Strahlentherapie.* **156(8)**, 572-578, 1980.
- [82] Rasey J.R., Spence A.M., Badger C.C., Krohn K.A., Vera D.M., Livesey J.C. Specific protection of different normal tissues. *Pharmacol. Ther.* **39**, 33-43, 1988.
- [83] Yuhas J. Biological factors affecting the radioprotective efficiency of S-2-[2-aminopropylamino] ethylphosphorothioic acid (WR-2721). *Radiat. Res.* **44**, 621-628, 1970.
- [84] Yuhas J. Radiotherapy of experimental lung tumors in the presence and absence of a radioprotective drug, S-2-(3-aminopropylamino)ethylphosphorothioic acid (WR-2721). *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 69-78, 1973.
- [85] Capizzi R.L. The preclinical basis for broad spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by amifostine (Ethyol). *Eur. J. Cancer*, **32A**, S5-S16, 1996.
- [86] Washburn L.C., Rafter J.J., Hayes R.L. Prediction of the effective radioprotective dose of WR-2721 in humans through an interspecies tissue distribution study. *Radiat. Res.* **66**, 100-105, 1976.
- [87] Murley J.S., Gridna, D.J. Chemoprevention with WR-2721 and its Metabolites. In: Radioprotectors, CRC Press, E. Bump and K. Malaker eds., New York, New York, 299-313, 1998.
- [88] Kligerman M.M., Glover D.J., Turrisi A.T., Norfleet A.L., Yuhas J.M., Coia L.R., et al. Toxicity of WR-2721 administered in single and multiple doses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **10**, 1773-1776, 1984.
- [89] Célariès B. Etude et applications de nouveaux composés organosiliciés, -germaniés, -phosphorés et -sélénés en radioprotection chimique. *Thèse d'Université en Chimie moléculaire*, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2003.
- [90] Célariès B., Prouillac C., Amourette C., Lion C., Rima G. Synthesis and Radioprotective Effects of New Phosphorothioates derived from Naphthylmethylimidazoline and Naphthylethylimidazoline. *Phosphorus, Sulfur and Related Element*, in press.

- [91] Maisin J.R., Mattelin G., Fridman-Manduzio A., van der Parren J. Reduction of short and long term radiation lethality by mixtures of chemical protectors. *Radiat. Res.* **35**, 26-44, 1968.
- [92] Krutovskikh G.N., Rusanov A.M., Gornaeva G.G., Vartanyan L.P., Kolesova M.B. Radioprotective action of thiadiazole derivatives. *Pharm. Chem. J.* **11(4)**, 484-488, 1977.
- [93] Georgieva R., Tsevi R., Kossev K., Balgliska M., Petrova R., Tenchova V., et al. Immobilization of Amino thiols on Poly(oxyalkylene phosphates). Formation of Poly(oxyethylene phosphates)/Cysteamine Complexes and Their Radioprotective Efficiency. *J. Med. Chem.* **45**, 5797-5801, 2002.
- [94] Vladimirov V.G., Mukhomorov V.K., Strel'nikov Y.E., Tsepova N.S., Kokushkina A.V. Molecular mechanisms of the radioprotective action of benzothiadiazole derivatives. *Radiobiologiya* **23**, 616-619, 1983.
- [95] Vladimirov V.G., Strel'nikov Y.E., Belen'kaya I.A., Kostyukovskii Y.L., Tsepova N.S. Radioprotective action and toxicity of some benzo-2,1,3- thiadiazole derivatives. *Radiobiologiya* **14**, 766-770, 1974.
- [96] Vladimirov V.G., Strel'nikov Y.E., Belen'kaya I.A., Kostyukovskii Y.L., Tsepova N.S. Radioprotective activity of some 5-methylbenzo-2,1,3- thiadiazole derivatives. *Radiobiologiya* **14**, 607-610, 1974.
- [97] Caravel J.P., Luu Duc C. Sur les doses de radioprotecteurs utilisés dans les essais de radioprotection: à propos de l'imidazole et de la Naphazoline. *Il Farmaco*, **36**, 49-57, 1981.
- [98] Mourret A., Rinaldi R. Radioprotective power of imidazole, benzimidazole, and Naphazoline on mice placed in a pure oxygen atmosphere. *Commis. Energ. At. Rapp.*, **25**, 1971.
- [99] Anisimova V.A., Spasov A.A., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F., Ostrovskii O.V., Larionov N.P. et al. Synthesis and pharmacological activity of 2-methoxyphenyl-substituted 9-dialkylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazoles. *Pharm. Chem. J.* **39**, 476-483, 2005.
- [100] Petrova L.L., Trufanova L.V., Petrov M.L., Abramov M.A., Zmitrovich N.I., Terent'eva N.A. Synthesis and radioprotective effects of derivatives of thiadiazoles, dithiolidenes, and their selenium analogs. *Pharm. Chem. J.* **28**, 99-102, 1994.

- [101] Foroumadi A., Kiani Z., Soltani F. Antituberculosis agents VIII. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of alkyl α -[5-(5-nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-ylthio]acetates. *Il farmaco*, **58**, 1073-1076, 2003.
- [102] Ambartsumova R.F. On interaction of 2-amino-benzothiazoles with halohydrins. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **35**, 860-865, 1999.
- [103] Meade T.J., Iyengar R., Frey P.A. Synthesis and Rearrangements of Alkyl Phosphorothioates. *J. Org. Chem.* **50**, 936-40, 1985.
- [104] Laval J.D., Roman V., Laduranty J., Miginac I., Lion C., Sentenac-Roumanou H., Fatome M. Radioprotective effect of low doses of 2-(1-naphthylmethyl)-2-imidazoline alone or associated with phosphorothioates. *Eur. J. Med. Chem.* **28**, 709-713, 1993.
- [105] Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol. Therap.* **93**, 1-35, 2002.
- [106] Ogidigben M.J., Chu T.C., Potter D.E. Naphazoline-induced Suppression of Aqueous Humor Pressure and Flow: Involvement of Central and Peripheral α_2 /I1 Receptors. *Exp. Eye Res.* **72**, 331-339, 2001.
- [107] Célariès B., Amourette C., Lion C., Rima G. New phosphorothioates derived from naphthylmethylimidazoline and naphthylethylimidazoline: application in chemical radioprotection. *Radioprotection*. **40(1)**, 57-71, 2005.
- [108] Célariès B., Rima G., Court L., Lion C., Laval J.D. Radioprotective activity and synthesis of siladithioacetals and gemadithioacetals derived from N-substituted naphthylmethylimidazoline. *Metal Based Drugs*, **8**, 199-210, 2001.
- [109] Rima G., Satgé J., Sentenac-Roumanou H., Fatome M., Lion C., Laval J.D. New organogermylated compounds N-substituted by naphthylmethylimidazoline hydrochloride and imidazoline: synthesis and radioprotective activity. *Eur. J. Med. Chem.* **28**, 761-767, 1993.
- [110] Prouillac C., Célariès B., Vicendo P., Rima G. Evaluation, *In Vitro*, of the Radioprotection of DNA From γ -Rays by Naphazoline. *C. R. Biologies*, **329(3)**, 196-199, 2006.
- [111] Kumar S.S., Chaubey R.C., Devasagayam T.P.A., Priyadarsini K.I. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutat. Res.* **425**, 71-79, 1999.
- [112] Frelon S., Douki T., Favier A., Cadet J. Comparative study of base damage induced by gamma radiation and Fenton reaction in isolated DNA. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2866-2870, 2002.

- [113] Zhao C., Dodin G., Yuan C., Chen H., Zheng R., Jia Z., et al. "In vitro" protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1723**, 114-123, 2005.
- [114] Fenton H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J. Chem. Soc.* **65**, 899-910, 1894.
- [115] Puppo A., Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions—influence of the iron chelator. *Phytochemistry* **31**, 85–88, 1992.
- [116] Yoshiki Y., Okubo K., Onuma M., Igarashi K. Chemiluminescence of benzoic and cinnamic-acids, and flavonoids in the presence of aldehyde and hydrogenperoxide or hydroxyl radical by Fenton reaction. *Phytochemistry* **39**, 225–229, 1995.
- [117] Yamazaki I., Piette L. H. EPR spin-trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7588-7593, 1991.
- [118] Cheng S.A., Fung W.K., Chan K.Y., Shen P.K. Optimizing electron spin resonance detection of hydroxyl radical in water. *Chemosphere*, **52**, 1797-1805, 2003.
- [119] Blesa M.A., Morando P.J., Regazzoni A.E. Chemical Dissolution of Metal of Oxides. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994
- [120] Gutteridge J.M.C., Bannister J.V. Copper and zinc and manganese superoxide dismutases inhibit deoxyribose degradation by the superoxide-driven Fenton reaction at 2 different stages—implications for the redox states of copper and manganese. *Biochem. J.* **234**, 225–228, 1986.
- [121] Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* **264**, 20509–20512, 1989.
- [122] Walling C., Partch R.E., Weil T. Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide catalysed by ferric ethylenediaminetetraacetate complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 140–142, 1975.
- [123] Zhao M.J., Jung L., Tanielian C., Mechin R. Kinetics of the competitive degradation of deoxyribose and other biomolecules by hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction. *Free Radical Res.* **20**, 345–363, 1994.
- [124] Zhao C., Dodin G., Yuan C., Chen H., Zheng R., Jia Z., et al. "In vitro" protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochem. Biophys. Acta*, **1723(1-3)**, 114-123, 2005.

- [125] Janzen E.G., Blackburn B.J. Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5909-5910, 1968.
- [126] van der Meer C., van Bekkum D.W. A study on the mechanism of radiation protection by 5-hydroxytryptamine and tryptamine. *Int. J. Radiat. Biol.* **4**, 105-110, 1961.
- [127] Blois M.S. Antioxidants determination by the use of stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-200, 1958.
- [128] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, **28**, 25-30, 1995.
- [129] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**, 211-219, 2003.
- [130] Jiang J.J., Chang T.C., Hsu W.L., Hwahng J.M., Hsu L.Y. Synthesis and Biological Activity of Sulfur-Containing aryl-aldehyde Schiff Bases. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 1307-1310, 2003.
- [131] Rice-Evans C., Miller, N.J. Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods Enzymol.* **234**, 279-293, 1994.
- [132] Rice-Evans C., Miller N.J., Bowell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* **22**, 375-383, 1995
- [133] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26** (9/10), 1231-1237, 1999.
- [134] Henriquez, C. Aliaga C., Lissi E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation : a comparison of different procedures. *Int. J. Chem. Kinetics* **34**(12), 659-665, 2002.
- [135] Villano, D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., Parilla-Garcia M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, *in press*.
- [136] Cadet J., Douki T., Gasparoutto D., Gromova M., Pouget J.P., Ravanat J.L., Romieu A., Sauvaigo S. Radiation-induced damage to DNA: mechanistic aspects and measurement of base lesions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **151**, 1-7, 1999.

- [137] Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and repairability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95-125, 1988.
- [138] Newton G.L., Aguilera J.A., Ward J.F., Fahey R.C. Effect of polyamine-induced compaction and aggregation of DNA on the formation of radiation-induced strand breaks: quantitative models for cellular radiation damage. *Rad. Res.* **148(3)**, 272-284, 1997.
- [139] Vasilescu D., Broch H., Hamza A. Quantum molecular simulation of the radioprotection by the aminothiols WR-1065 active metabolite of amifostine (WR-2721).1. Modeling the OH. scavenging process. *J. Mol. Struct.* **538**, 133-144, 2001.
- [140] Broch H., Hamza A., Vasilescu D. Quantum molecular simulation of the radioprotection by the aminothiols WR-1065, active metabolite of amifostine (WR-2721). Part 2. Modeling of the hydrogen abstraction by C4' of DNA desoxyribose radical. *J. Mol. Struct.* **538**, 117-132, 2001.
- [141] Kakkar R., Garg R., Suruchi R. Theoretical studies on the mechanism of radioprotection by Hoechst 33258 derivatives. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **668**, 243-248, 2004.
- [142] Galano A., Alvarez-Idaboy J. R., Agacino-Valdés E., Ruiz-Santoyo M.E. Quantum mechanical approach to isoleucine + OH gas phase reaction. Mechanism and kinetics. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **676**, 97-103, 2004.
- [143] Lunqvist M.J., Eriksson L.A. Hydroxyl radical reactions with phenol as a model for generation of biologically reactive tyrosyl radical. *J. Phys. Chem.* **104**, 848-855, 2000.
- [144] Frisch J.M. et al. Gaussian 03, Revision B.05, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [145] Peng C., Ayala P.Y., Schlegel B., Frisch M.J. Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comput. Chem.* **17(1)**, 49-56, 1996.
- [146] Gonzalez C., Schlegel H.B. An improved algorithm for reaction path following. *J. Chem. Phys.* **90**, 2154-2161, 1989.
- [147] McQuarrie D.A., Simon J.D., Physical Chemistry: a Molecular Approach, University Science Book, Sausalito, 1997.
- [148] Watson L.A., Eisenstein O. Entropy Explained: the Origin of Some Simple Trends. *J. Chem. Ed.*, **79**, 1269, 2002.

- [149] Grassy G., Terol A., Belly A., Robbe Y., Chapat J.P., Granger R. Relations structure-activité et essai d'optimisation dans le domaine des radioprotecteurs. I. Dérivés de structure dithiolannique-1,3. *Eur. J. Med. Chem.* **10(1)**, 14-18, 1975.
- [150] Grassy G. Terol A., Belly A., Robbe Y., Chapat J.P., Granger R. et al. Structure-activity relations and optimization test of radioprotectives. I. 1,3-Dithiolane derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **10(1)**, 14-18, 1975.
- [151] Free J.M., Wilson I.W. A mathematical contribution to structure-activity studies. *J. Med. Chem.* **7**, 395-399, 1964.
- [152] Kakkar R., Pathak S.M. QSAR studies on the mechanism of radioprotection by Hoechst 33258 analogues. *J. Mol. Struc. (Theochem)* **714**, 35-42, 2005.
- [153] Hansch C., Fujita T. π - ρ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1616-1626, 1964.
- [154] Hansch C., Lien E.J. Structure-Activity relationships in antifungal agents. A survey. *J. Med. Chem.* **14(8)**, 653-670, 1971.
- [155] Maldonado A.G., Doucet J.P., Petitjean M., Fan B.T. Molecular similarity and diversity in chemoinformatics: From theory to applications. *Molecular Diversity* **10**, 39-79, 2006.
- [156] Cramer R.D., Patterson D.E., Bunce J.D. Comparative molecular field analysis (COMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5959-5967, 1988.
- [157] McCulloch W.S., Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, **5**, 115-133, 1943.
- [158] Rosenblatt F. The Perceptron: probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review*, **65**, 386-408, 1958
- [159] Minsky M., Papert S. Perceptrons. MIT Press. 1969.
- [160] Hopfield J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* **9**, 2554, 1982.
- [161] Werbos P. Beyond regression: New tools for prediction and analysis in the behavioural sciences. Thèse d'Université, Harvard University, Cambridge, MA, 1974.
- [162] Rumelhart D., Hinton G.E., Williams R.J. Learning representations by back-propagating errors. *Nature*, **323**, 533-536, 1986.

- [162] Wiener, H. Correlation of heats of isomerization, and difference in heats of vaporization of isomers, among the paraffin hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2636-2638, 1947.
- [163] Balaban A.T. Highly discriminating distance-based topological index. *Chem. Phys. Lett.* **89(5)**, 399-404, 1982.
- [164] Schultz H.P. Topological Organic Chemistry. 1. Graph Theory and Topological Indices of Alkanes. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **29**, 227-228, 1989.
- [165] Nys G.G., Rekker R.F. Concept of hydrophobic fragmental constants (f-value). II. Extension of its applicability to the calculation of lipophilicities of aromatic and heteroaromatic structures. *Eur. J. Med. Chem.* **9(4)**, 361-375, 1974.
- [166] Nys G.G., Rekker R.F. Statistical analysis of a series of partition coefficients with special reference to predictability of folding of drug molecules. Introduction of hydrophobic fragmental constants (f values). *Chim. Ther.* **8(5)**, 521-535, 1973.
- [167] Viswanadhan V.N., Ghose A.K., Revankar G.R., Robins R.K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationship. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interaction and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput.* **29**, 163-172, 1989.
- [168] Connolly M.L. The Molecular Surface Package. *J. Mol. Graphics*, **11(2)**, 139-141, 1993.
- [169] SADABS, Program for data collection, Bruker-AXS
- [170] Sheldrick G.M., *Acta Crystallogr.* Phase annealing in *SHELX-90*: direct methods for larger structures, **A46**, 467-473, 1990
- [171] Sheldrick G.M., *SHELKL-97*, Program for Crystal Structure Refinement, University de Göttingen, 1997

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	7
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
Chapitre I : Introduction - Généralités	13
I. LA RADIOACTIVITE.....	15
I.1. Qu'est-ce que la radioactivité?.....	15
I.2. Interaction des rayonnements avec la matière.....	17
I.2.1. Interactions des particules avec la matière.....	18
I.2.1.1. Cas des particules lourdes : les particules alpha.....	18
I.2.1.2. Cas des particules chargées : les électrons.....	18
I.2.1.3. Conclusion.....	19
I.2.2. Interactions des rayonnements électromagnétiques avec la matière.....	19
I.2.2.1. Les photons X.....	20
I.2.2.2. Les rayonnements gamma.....	20
I.2.2.3. Conclusion.....	21
I.3. Quelles sont les utilisations de la radioactivité?.....	22
I.3.1. Le domaine médical.....	22
I.3.2. Le domaine de la biologie.....	23
I.3.3. Le domaine culturel.....	23
I.3.4. Le domaine industriel.....	24
I.3.5. Le domaine agroalimentaire.....	24
I.4. Unités utilisées en radiobiologie et radioprotection.....	25
I.4.1. L'activité.....	25
I.4.2. Le transfert linéaire d'énergie.....	25
I.4.3. La dose absorbée.....	25
I.4.4. L'équivalent de dose – Dose efficace.....	26
I.5. Sources d'exposition de l'Homme aux rayonnements ionisants.....	28
I.5.1. L'exposition naturelle.....	29
I.5.2. L'exposition artificielle.....	30
II. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS.....	31
II.1. Effets moléculaires des rayonnements ionisants.....	31
II.1.1. Radiolyse de l'eau.....	31
II.1.1.1. Formation des radicaux.....	31
II.1.1.2. Devenir des radicaux et décomposition de l'eau.....	34
II.1.2. Effet des rayonnements en solution aqueuse.....	34
II.1.2.1. Effet direct.....	35
II.1.2.2. Effet indirect.....	35
II.1.3. L'effet oxygène.....	36
II.1.4. Conclusion.....	37
II.2. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et sur les chromosomes.....	38
II.2.1. Structure de l'acide désoxyribonucléique - Généralités.....	38
II.2.2. Les ruptures de chaînes.....	41
II.2.2.1. Les coupures simples brins.....	41
II.2.2.2. Les coupures doubles brins.....	41
II.2.3. Altération des bases.....	41
II.2.4. Pontage ADN-protéine.....	42
II.2.5. Altération des sucres.....	42
II.2.6. Les aberrations chromosomiques.....	43
II.2.7. Les mécanismes de réparation de l'ADN.....	44
II.2.7.1. Réparation par excision et resynthèse.....	44
II.2.7.2. Recombinaison homologue et non homologue.....	46
II.3. Effets des rayonnements sur les autres molécules cibles.....	46
II.3.1. Les protéines.....	46

II.3.2.	Les lipides	47
II.3.3.	Effets cellulaires des rayonnements ionisants	48
II.3.4.	La mort cellulaire	48
II.3.5.	Facteurs influençant l'effet biologique des radiations ionisantes.....	49
II.3.5.1.	La radiosensibilité.....	49
II.3.5.2.	Effet oxygène.....	50
II.3.5.3.	Le temps.....	50
II.4.	Effets des rayonnements ionisants sur l'organisme	51
II.4.1.	Les effets déterministes	51
II.4.1.1.	Irradiation globale : le syndrome d'irradiation aiguë	52
II.4.1.2.	Effets sur la peau.....	53
II.4.1.3.	Effets sur les gonades.....	53
II.4.2.	Les effets stochastiques.....	54
III.	LA RADIOPROTECTION	55
III.1.	Historique et fondements de la radioprotection.....	55
III.2.	La radioprotection chimique.....	56
III.2.1.	Mécanismes de radioprotection chimique.....	57
III.2.1.1.	Les systèmes de défenses anti-oxydantes endogènes	57
•	Les systèmes enzymatiques	57
•	Les systèmes non enzymatiques.....	58
III.2.1.2.	Protection par hypoxie ou anoxie	60
III.2.1.3.	Inhibition des processus radicalaires – Capture des radicaux libres	60
III.2.1.4.	L'hypothèse des disulfures mixtes.....	60
III.2.1.5.	Réparation par transfert d'hydrogène	61
III.2.1.6.	Choc biochimique.....	61
III.2.1.7.	Conclusion.....	62
III.2.2.	Essai de classification des radioprotecteurs	62
III.2.2.1.	Les radioprotecteurs « naturels ».....	63
III.2.2.2.	Les cytokines et immunostimulants.....	64
III.2.2.3.	Les complexes métalliques	65
III.2.2.4.	Les dérivés hydroxylés	65
III.2.2.5.	Les radioprotecteurs non soufrés, hétérocycliques	65
III.2.2.6.	Les radioprotecteurs soufrés : thiols et dérivés.....	66
III.2.2.7.	Les radioprotecteurs organométalliques : métallathiazolidines, métalladithioacétals	73
III.2.3.	Combinaisons de radioprotecteurs	74
III.2.4.	La recherche de radioprotecteurs efficaces, quelques contraintes.....	76
Chapitre II : Synthèse de nouveaux radioprotecteurs.....	79	
I.	INTRODUCTION	81
I.1.	Synthèse des amides (1-5).....	83
I.2.	Synthèse des thiols et aminothiols (6-15).....	84
I.2.1.	Synthèse des thiols (11-15).....	85
I.2.2.	Synthèse des aminothiols (16-20).....	86
I.3.	Synthèse des acides thiosulfoniques (31-35).....	87
I.4.	Synthèse des phosphorothioates (36,37).....	95
I.5.	Conclusion.....	99
II.	TECHNIQUES EXPERIMENTALES	100
II.1.	Solvants et réactifs.....	100
II.2.	Enregistrement des spectres et mesures physico-chimiques.....	100
II.3.	Partie expérimentale	101
II.3.1.	Synthèse des amides (1-5).....	101
II.3.1.1.	Synthèse du N-benzothiazol-2-yl-propylamide (1).....	101
II.3.1.2.	N-(6-méthylbenzothiazol-2-yl)propylamide (2)	102
II.3.1.3.	N-(6-éthoxybenzothiazol-2-yl)propylamide (3).....	103
II.3.1.4.	N-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4).....	104
II.3.1.5.	N-(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (5).....	104
II.3.2.	Synthèse des dérivés chlorés (6-10).....	105
II.3.2.1.	2-chlorobenzothiazole (6)	105
II.3.2.2.	2-chloro-6-méthylbenzothiazole (7).....	106
II.3.2.3.	2-chloro-6-éthoxybenzothiazole (8).....	107
II.3.2.4.	2-chloro-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (9)	107

II.3.2.5.	2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (10).....	108
II.3.3.	Synthèse des thiols (11-15).....	109
II.3.3.1.	Benzothiazole-2-thiol (11).....	109
II.3.3.2.	6-méthylbenzothiazole-2-thiol (12).....	110
II.3.3.3.	6-éthoxybenzothiazole-2-thiol (13).....	110
II.3.3.4.	5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (14).....	111
II.3.3.5.	5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (15).....	112
II.3.4.	Synthèse des aminothiols (16-20).....	113
II.3.4.1.	2-(benzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (16).....	113
II.3.4.2.	2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (17).....	114
II.3.4.3.	2-(6-éthoxybenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (18).....	114
II.3.4.4.	2-(5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol (19).....	115
II.3.4.5.	2-(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol (20).....	116
II.3.5.	Synthèse des aminoalcools (21-25).....	116
II.3.5.1.	2-iminobenzothiazol-3-yl-éthanol (21).....	116
II.3.5.2.	(2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol(22).....	117
II.3.5.3.	(2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthanol (23).....	118
II.3.5.4.	(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol(24).....	119
II.3.5.5.	(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol (25).....	119
II.3.6.	Synthèse des dérivés bromés (26-30).....	120
II.3.6.1.	3-bromoéthylbenzothiazole-2-imine (26).....	120
II.3.6.2.	3-bromoéthyl-6-méthylbenzothiazole-2-imine (27).....	121
II.3.6.3.	3-bromoéthyl-6-éthoxybenzothiazole-2-imine(28).....	122
II.3.6.4.	3-bromoéthyl-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-imine (29).....	122
II.3.6.5.	3-bromoéthyl-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-imine (30).....	123
II.3.7.	Synthèse des acides thiosulfoniques (31-35).....	124
II.3.7.1.	Acide S-2-(2-iminobenzothiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (31).....	124
II.3.7.2.	Acide S-2-(2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (32).....	125
II.3.7.3.	Acide S-2-(2-imino-6-éthoxy-benzothiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (33).....	125
II.3.7.4.	Acide S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (34).....	126
II.3.7.5.	Acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (35).....	127
II.3.8.	Synthèse des phosphorothioates.....	128
II.3.8.1.	Synthèse du thiophosphate de lithium.....	128
II.3.8.2.	S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate(36).....	128
II.3.8.3.	S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (37).....	129
II.3.9.	Synthèse du N-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate (WR-2721).....	130
II.3.9.1.	Synthèse du N-(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine.....	130
II.3.9.2.	Synthèse du N-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate.....	130
II.3.10.	Synthèse du 2-(3-aminopropylamino)éthanethiol (WR-1065).....	131

Chapitre III : Activité Antioxydante et Radioprotectrice *in vitro* 133

I.	INTRODUCTION.....	135
II.	ETUDE DE LA NAPHAZOLINE.....	136
II.1.	Introduction.....	136
II.2.	Mise en évidence de la protection de l'ADN en présence de la Naphazoline après une irradiation gamma.....	137
II.2.1.	Introduction.....	137
II.2.2.	Conditions expérimentales.....	137
II.2.3.	Résultats.....	140
II.3.	Mise en évidence des dommages de l'ADN après réaction de Fenton en présence et en absence de la Naphazoline (NP).....	142
II.3.1.	Introduction.....	142
II.3.2.	Conditions expérimentales.....	143
II.3.3.	Résultats.....	145
II.4.	Etude par Résonance Paramagnétique Electronique du mécanisme de capture des radicaux hydroxyyles par la Naphazoline.....	149
II.4.1.	Introduction.....	149
II.4.2.	Conditions expérimentales.....	150
II.4.3.	Résultats.....	150
II.5.	Conclusion.....	152
III.	ETUDE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DES COMPOSES SYNTHETISES.....	153

III.1.	Test au 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH).....	153
III.1.1.	Introduction – Principe du test.....	153
III.1.2.	Conditions expérimentales.....	155
III.1.2.1.	Détermination des caractéristiques UV.....	155
	• Les amines.....	156
	• Les amides (1-5).....	157
	• Les aminoalcools (21-25).....	158
	• Les thiols (11-15).....	159
	• Les aminothiols (16, 17, 19).....	160
	• Les acides thiosulfoniques (34, 35).....	161
	• Les phosphorothioates (36, 37).....	162
III.1.2.2.	Techniques expérimentales.....	163
III.1.3.	Résultats.....	165
III.1.3.1.	Les amines.....	165
III.1.3.2.	Les amides (1-5).....	166
III.1.3.3.	Les alcools (21-25).....	166
III.1.3.4.	Les thiols (11-15) :.....	167
III.1.3.5.	Les aminothiols (16,17,19) :.....	168
III.1.4.	Bilan du test au DPPH.....	169
III.1.4.1.	Les thiols (11-15).....	172
III.1.4.2.	Les aminothiols (16, 17, 19).....	174
III.1.4.3.	Conclusion.....	175
III.2.	Test au radical cation, l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS).....	176
III.2.1.	Introduction – Principe du test.....	176
III.2.2.	Conditions expérimentales.....	177
III.2.3.	Résultats.....	178
III.2.3.1.	Les thiols (11-15).....	179
III.2.3.2.	Les aminothiols (16, 17 et 19).....	181
III.2.3.3.	Les acides thiosulfoniques et les phosphorothioates.....	183
III.3.	Conclusion.....	184
IV.	ETUDE DU POUVOIR RADIOPROTECTEUR DES THIOLS ET AMINOTHIOLS.....	185
IV.1.	Etude du pouvoir protecteur vis-à-vis de l'ADN des composés synthétisés après réaction de Fenton.....	185
IV.1.1.	Introduction.....	185
IV.1.2.	Conditions expérimentales.....	186
IV.1.3.	Etude des thiols (11-15) et aminothiols (16,17, 19).....	187
IV.1.4.	Etude des acides thiosulfoniques (34, 35) et des phosphorothioates (36, 37).....	192
IV.2.	Evaluation du pouvoir radioprotecteur vis-à-vis de l'ADN plasmidique <i>in vitro</i> après irradiation gamma.....	193
IV.2.1.	Introduction.....	193
IV.2.2.	Conditions expérimentales.....	194
IV.2.3.	Résultats.....	195
IV.2.3.1.	Thiols (11-15).....	195
IV.2.3.2.	Les aminothiols (16, 17 et 19).....	198
V.	CONCLUSION.....	200
Chapitre IV : Etude théorique.....		205
I.	ETUDE DE LA THEORIE FONCTIONNELLE DE LA DENSITE.....	207
I.1.	Introduction.....	207
I.2.	Méthodes de calculs.....	208
I.3.	Resultats – Discussion.....	209
I.3.1.	Cas des composés 11, 16 et 19.....	209
I.3.2.	Cas de la 1-thioéthyl-2-(1-naphthylméthyl)-2-imidazoline.....	212
I.4.	Conclusion.....	215
II.	ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE.....	217
II.1.	Introduction.....	217
II.2.	Principe.....	217
II.2.1.	Etude QSAR.....	217
II.2.2.	Réseau de neurones.....	219
II.2.2.1.	Historique.....	219

II.2.2.2.	Les réseaux de neurones, définitions et propriétés.....	220
II.2.2.3.	L'algorithme de rétropropagation.....	222
II.2.3.	Mise en œuvre.....	223
II.2.4.	Applications des réseaux de neurones.....	224
II.2.5.	Les descripteurs moléculaires	225
II.2.5.1.	Les descripteurs physicochimiques.....	225
II.2.5.2.	Les descripteurs électroniques	225
II.2.5.3.	Les descripteurs topologiques	225
II.3.	Résultats	228
II.3.1.	Logiciels.....	228
II.3.2.	Résultats obtenus dans l'étude QSAR avec le test au DPPH.....	228
II.3.2.1.	Détermination des paramètres essentiels	229
II.3.2.2.	Détermination des paramètres essentiels pour les 7 composés 11, 12, 14, 15, 16, 17 et 19	232
II.3.3.	Résultats obtenus dans l'étude QSAR avec le test ABTS.....	238
II.3.4.	Résultats obtenus dans l'étude QSAR avec le test sur l'ADN plasmidique et la réaction de Fenton	241
II.3.4.1.	Introduction.....	241
II.3.4.2.	Résultats.....	241
III.	DISCUSSION	243
IV.	CONCLUSION	248
	Conclusion	249
	Perspectives	249
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	255
	<i>TABLES DES MATIERES.....</i>	<i>271</i>
	<i>TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX</i>	<i>276</i>
	ANNEXES	279
	<i>ANNEXE 1 : Tableau récapitulatif des différents composés obtenus.....</i>	<i>281</i>
	<i>ANNEXE 2 : Données cristallographiques.....</i>	<i>285</i>

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants. _____	17
Figure 2 : Spectre électromagnétique. _____	20
Figure 3 : Radiolyse de l'eau. _____	33
Figure 4 : Structure des quatre bases de l'ADN. _____	39
Figure 5 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants. _____	40
Figure 6 : Conséquences cellulaires de l'irradiation. _____	43
Figure 7 : Réparation par excision et resynthèse. _____	45
Figure 8 : Représentation schématique des différents systèmes antioxydants enzymatiques. _____	58
Figure 9 : Structure du N-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4). _____	84
Figure 10 : Spectre RMN en HMBC du (2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol (22). _____	88
Figure 11 : Structure du (2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthanol (23). _____	91
Figure 12 : Structure de l'acide S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl sulfonique (34). _____	93
Figure 13 : Structure de l'acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl sulfonique (35). _____	94
Figure 14 : Spectre RMN 31P d'un phosphorothioate dérivé du benzothiazole. _____	96
Figure 15 : Structure du dérivé tricyclique. _____	97
Figure 16 : Les différentes formes d'ADN plasmidique. _____	138
Figure 17 : Pourcentage de cassures simples brins après irradiation gamma à différentes doses (4, 5, 7 Gy) en présence et en absence de Naphazoline et du WR-2721 à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM).. _____	140
Figure 18 : (A) Gel d'électrophorèse de l'ADN Φ 174 exposé aux radicaux OH \cdot générés par la réaction de Fenton en présence et en absence de la Naphazoline (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 mM). _____	146
Figure 19 : Schéma du principe du piégeage de spin. _____	149
Figure 20 : Pourcentage du signal de l'adduit DMPO/OH obtenu en présence de NP par rapport au témoin sans NP (100 %). Dans l'encart, signal RPE de l'adduit DMPO/OH. _____	151
Figure 21 : Structure du radical 1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl et de sa forme réduite. _____	153
Figure 22 : Spectre UV du 2-aminobenzothiazole (60 μ M). _____	156
Figure 23 : Spectre UV du N-(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide (4) (120 μ M). _____	157
Figure 24 : Spectre UV du 2-iminobenzothiazol-3-yl-éthanol (62 μ M). _____	158
Figure 25 : Spectre UV du 5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (15) (60 μ M). _____	159
Figure 26 : Spectre UV du 2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol (17) (100 μ M). _____	160
Figure 27 : Spectre UV de l'acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique (35). _____	161
Figure 28 : Spectre UV du S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate (37). _____	162
Figure 29 : A) Spectre UV du DPPH (20 μ M) dans l'éthanol. B) Droite détalonnage du DPPH ($f([DPPH]) = Abs.$). _____	164
Figure 30 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des thiols 11 , 12 , 13 , 14 et 15 en fonction de la concentration. _____	173
Figure 31 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des aminothiols 16 , 17 et 19 en fonction de la concentration. _____	174
Figure 32 : Structure du 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) : forme réduite ABTS, forme radical cation ABTS $^{+\cdot}$. _____	176
Figure 33 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des thiols 11 , 12 , 13 , 14 , et 15 en fonction de la concentration. _____	179
Figure 34 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des aminothiols 16 , 17 et 19 en fonction de la concentration. _____	181
Figure 35 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition obtenus en présence des composés 34 , 35 , 36 et 37 en fonction de la concentration. _____	183
Figure 36 : Electrophorèse sur gel d'agarose obtenu après traitement de l'ADN par une réaction de Fenton en présence et en absence du composé 15 (50 μ M ; 100 μ M ; 200 μ M). _____	187
Figure 37 : Représentation des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée après réaction de Fenton en présence ou en absence des composés 11 , 12 , 14 , 15 , 16 , 17 et 19 . _____	188
Figure 38 : Représentation de pourcentages de protection de l'ADN après réaction de Fenton en fonction des concentrations en thiols et aminothiols. _____	190
Figure 39 : Gel d'électrophorèse de l'ADN pBR322 exposé aux radicaux OH \cdot générés par la réaction de Fenton en présence et en absence des dérivés 34 et 36 (20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 500 μ M). _____	192
Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose obtenu après exposition de l'ADN à des radiations gamma (10 Gy) en présence et en absence du composé 15 (50 μ M; 100 μ M; 200 μ M). _____	195

Figure 41 : Représentation des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée après irradiation gamma (10 Gy et 15 Gy) en présence ou en absence des composés 11, 12, 14, 15 .	196
Figure 42 : Représentation des pourcentages d'ADN sous forme circulaire relaxée après irradiation gamma (10 Gy et 15 Gy) en présence ou en absence des composés 16, 17, 19 .	198
Figure 43 : Représentations des relations structure-activité.	201
Figure 44 : Représentation des profils énergétiques obtenus pour les composés 11, 16 et 19 .	210
Figure 45 : Représentation des profils énergétiques obtenus pour le 1-thioéthyl-2-(1-naphthylméthyl)-2-imidazoline.	213
Figure 46 : Représentations des densités de spin de Mulliken des composés 11 et 16 .	215
Figure 47 : Modèle d'étude de relation structure-activité (QSAR).	218
Figure 48 : Fonction de transfert : (a) du neurone «seuil» ; (b) du neurone «linéaire», et (c) du neurone «sigmoïde».	220
Figure 49 : Topologie d'un réseau de neurones. Dans chaque unité de la couche cachée les variables sont combinées de façon linéaire.	221
Figure 50 : Validation croisée.	224
Figure 51 : Formule développée, modélisation moléculaire et graphe lié du 2,3-diméthylpentane.	226
Figure 52 : Matrice de connectivité (C) et de distance (D) calculée à partir du graphe lié du 2,3-diméthylpentane.	226
Figure 53 : Représentation des CI_{50} expérimentales et CI_{50} calculées par le réseau de neurones RN 1.	231
Figure 54 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 1, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	233
Figure 55 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 2, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	234
Figure 56 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 3, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	235
Figure 57 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 4, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	236
Figure 58 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 5, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	236
Figure 59 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones à deux entrées (HOMO, Wiener) et une sortie, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	237
Figure 60 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones à deux entrées (HOMO, MTI) et une sortie, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	237
Figure 61 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones RN 9, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	240
Figure 62 : Graphe représentant les CI_{50} calculées, à l'aide du réseau de neurones à deux entrées (HOMO, Wiener) et une sortie, en fonction des CI_{50} expérimentales pour 7 composés.	240
Figure 63 : Représentation des CI_{50} expérimentales et calculées par le réseau de neurones RN 18.	242
Figure 64 : Exemples d'acides pulviniques modifiés.	254

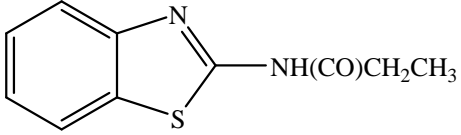
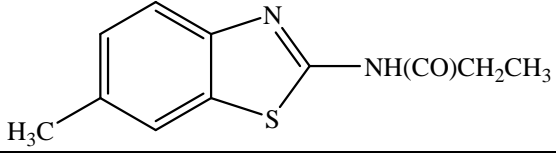
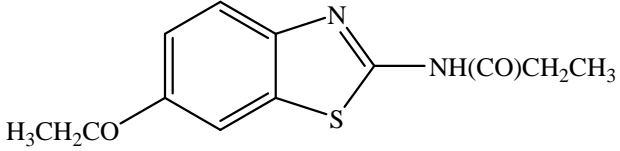
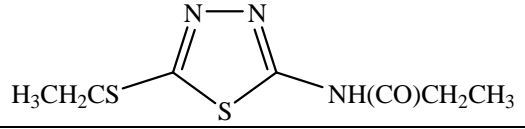
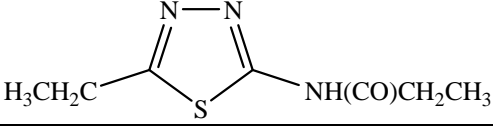
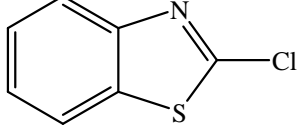
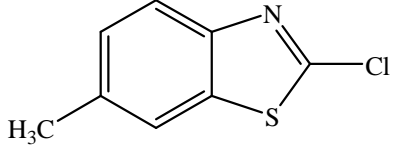
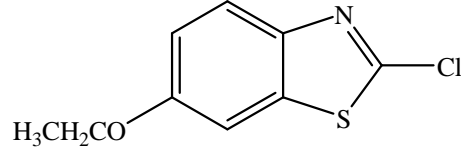
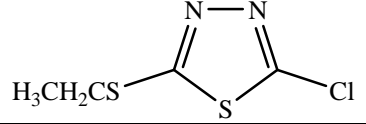
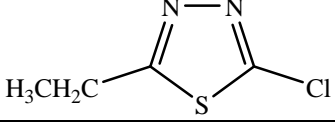
Tableau 1 : Facteurs de qualité des différents types de radiation en fonction de leurs énergies [7].	27
Tableau 2 : Facteurs de pondération correspondant aux différents types de tissus [7].	28
Tableau 3 : Détermination des FRD de phosphorothioates dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CD1.	72
Tableau 4 : Détermination des FRD de métallathiazolidines dérivées de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CD1.	73
Tableau 5 : Détermination des FRD de métalladithioacétals dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CD1.	74
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différents exemples de radioprotecteurs connus	75
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes familles de composés synthétisés.	82
Tableau 8 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des amines dans l'éthanol.	156
Tableau 9 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (1-5) dans l'éthanol	157
Tableau 10 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (6-10) dans l'éthanol.	158
Tableau 11 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (11-15) dans l'éthanol.	159
Tableau 12 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (16-17, 19) dans l'éthanol.	160
Tableau 13 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (34, 35) dans l'eau.	161
Tableau 14 : Détermination des coefficients d'extinction molaire des composés (36, 37) dans l'eau.	162
Tableau 15 : Détermination des pourcentages d'inhibition à 4 mM en présence des amines.	165
Tableau 16 : Détermination des pourcentages d'inhibition à 4 mM en présence des amides (1-5).	166
Tableau 17 : Concentrations inhibitrices 50 % des aminoalcools 23, 24 et 25.	167

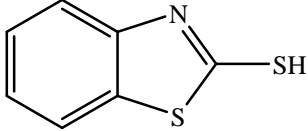
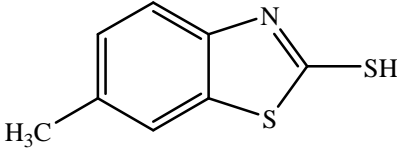
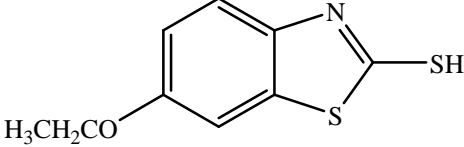
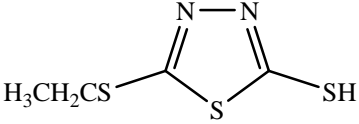
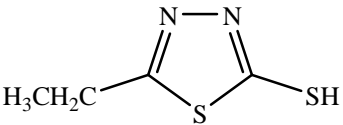
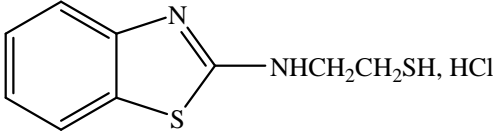
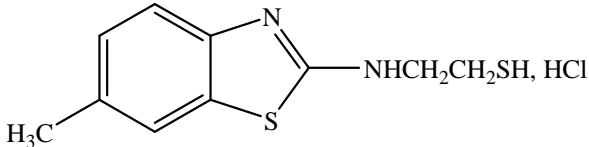
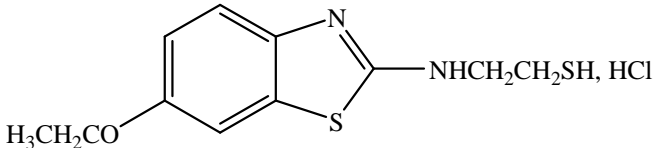
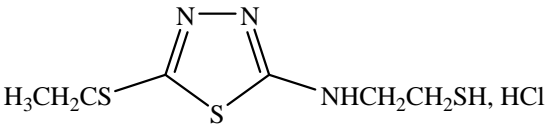
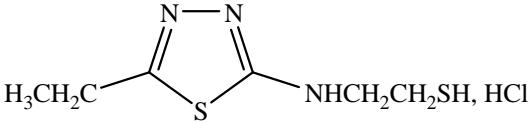
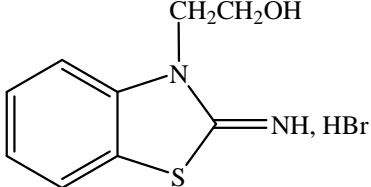
Tableau 18 : Concentrations inhibitrices 50 % des thiols 11-15	167
Tableau 19 : Détermination des CI_{50} des aminothiols 16, 17 et 19	168
Tableau 20 : Détermination des CI_{50} des aminothiols et des aminoalcools. ^(a) Concentration en produit nécessaire pour réduire de 50 % l'absorbance du DPPH à 516 nm.	170
Tableau 21 : Détermination des CI_{50} des thiols (11, 12, 13, 14 et 15) ; comparaison avec la littérature. ^(a) Concentration en produit nécessaire pour réduire de 50 % l'absorbance du DPPH à 516 nm.	171
Tableau 22 : Concentrations inhibitrices 50 % des thiols (11-15).....	180
Tableau 23 : Concentrations inhibitrices 50 % des aminothiols 16, 17 et 19	182
Tableau 24 : Concentrations inhibitrices 50 % des composés (34-37).....	184
Tableau 25 : Bilan des résultats obtenus en fonction du test utilisé.....	200
Tableau 26 : Groupe des 12 descripteurs moléculaires calculés pour l'ensemble des composés.....	229
Tableau 27 : Poids associé à chacun des 12 paramètres moléculaires.....	230
Tableau 28 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones.....	230
Tableau 29 : Poids associé à chacun des 12 paramètres moléculaires.....	232
Tableau 30 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones.....	233
Tableau 31 : Calcul des CI_{50} à partir du réseau RN 6 pour le test DPPH.....	238
Tableau 32 : Poids associé à chacun des 12 paramètres moléculaires.....	239
Tableau 33 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones.....	239
Tableau 34 : Groupe des 4 descripteurs utilisés pour les 7 composés.....	241
Tableau 35 : Nombre de neurones dans la couche d'entrée et dans la couche cachée ainsi que les paramètres retenus pour chaque système de réseau de neurones (20 000 cycles).....	242
Tableau 36 : Valeurs des CI_{50} expérimentales et des CI_{50} calculées par les réseaux de neurones, et résultats du calcul des différences entre les CI_{50} expérimentales et les CI_{50} calculées pour chaque test.....	246
Tableau 37 : Calcul des énergies des orbitales HOMO et LUMO et de la différence d'énergie entre les orbitales HOMO et LUMO pour les 7 composés.....	247

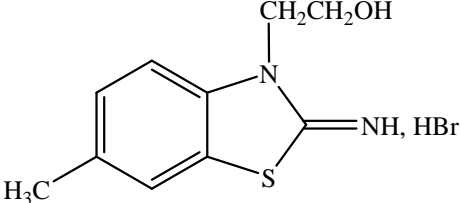
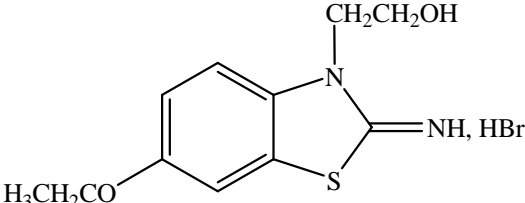
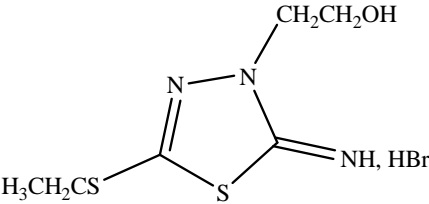
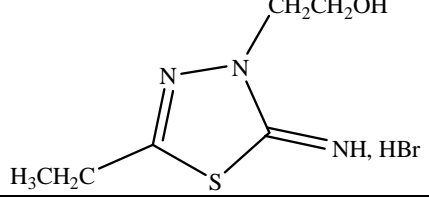
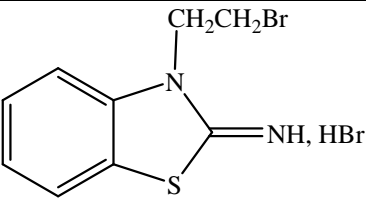
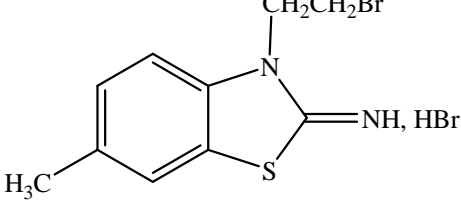
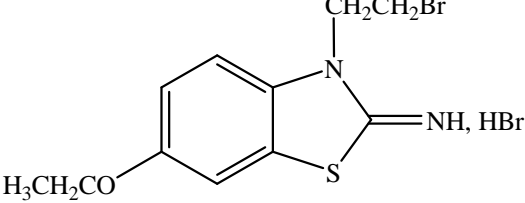
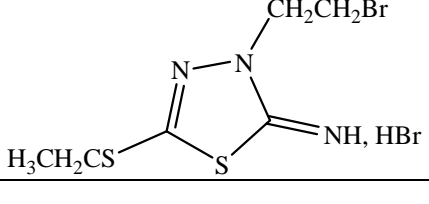
ANNEXES

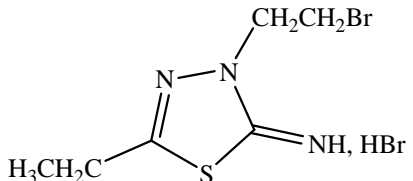
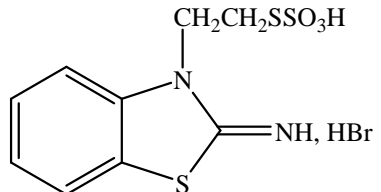
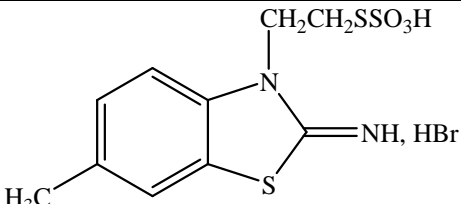
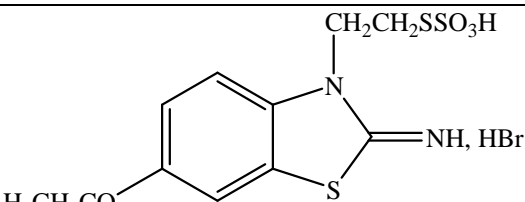
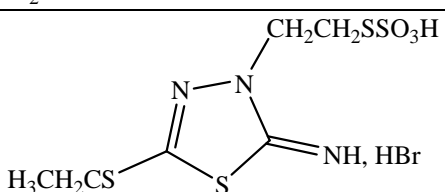
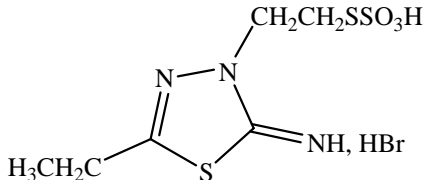
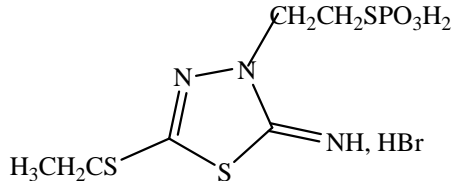
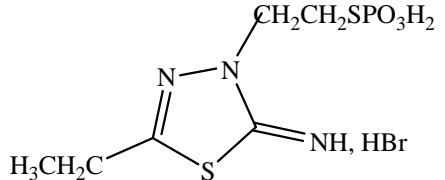
ANNEXE 1 : TABLEAU RECAPITULATIF

DES DIFFERENTS COMPOSES OBTENUS

Formule	Nom	N°
	<i>N</i> -benzothiazol-2-yl-propylamide	1
	<i>N</i> -(6-méthylbenzothiazol-2-yl)propylamide	2
	<i>N</i> -(6-éthoxybenzothiazol-2-yl)propylamide	3
	<i>N</i> -(5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide	4
	<i>N</i> -(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)propylamide	5
	2-chlorobenzothiazole	6
	2-chloro-6-méthylbenzothiazole	7
	2-chloro-6-éthoxybenzothiazole	8
	2-chloro-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole	9
	2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole	10

	Benzothiazole-2-thiol	11
	6-méthylbenzothiazole-2-thiol	12
	6-éthoxybenzothiazole-2-thiol	13
	5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-thiol	14
	5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol	15
	2-(benzothiazol-2-ylamino)éthanethiol	16
	2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol	17
	2-(6-éthoxybenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol	18
	2-(5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol	19
	2-(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthanethiol	20
	2-iminobenzothiazol-3-yl-éthanol	21

	(2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthanol	22
	(2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthanol	23
	(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol	24
	(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthanol	25
	3-bromoéthylbenzothiazole-2-imine	26
	3-bromoéthyl-6-méthylbenzothiazole-2-imine	27
	3-bromoéthyl-6-éthoxybenzothiazole-2-imine	28
	3-bromoéthyl-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-imine	29

	3-bromoéthyl-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-imine	30
	Acide S-2-(2-iminobenzothiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique	31
	Acide S-2-(2-imino-6-méthylbenzothiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique	32
	Acide S-2-(2-imino-6-éthoxybenzothiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique	33
	Acide S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique	34
	Acide S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthyl thiosulfonique	35
	S-2-(2-imino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate	36
	S-2-(2-imino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-3-yl)éthylthiophosphate	37
H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ Br, HBr	<i>N</i> -(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine	
H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ SPO ₃ H ₂	<i>N</i> -(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate	WR-2721
H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₂ SH	2-(3-aminopropylamino)éthanethiol	WR-1065

ANNEXE 2 : DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES

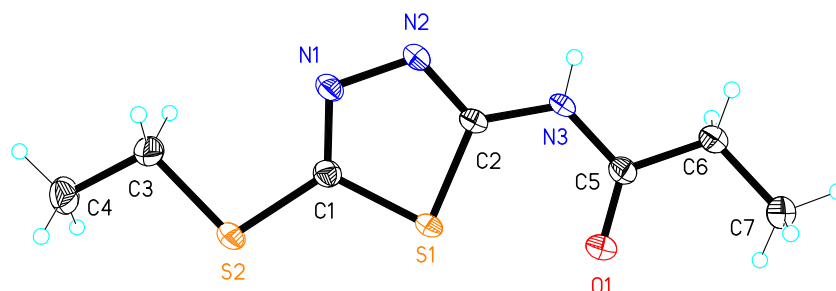
L'ensemble des données collectées du cristal et des détails de l'affinage sont répertoriées dans les pages suivantes. Les cristaux ont été prélevés à température ambiante et enduits d'une couche d'huile. Un cristal a été sélectionné pour l'analyse sur un diffractomètre Bruker-AXS CCD 1000 (longueur d'onde 0,71073 Å, température 273(2) K) et une correction d'absorption semi-empirique a été utilisée [170]. La structure a été résolue par les méthodes directes (SHELXS-97) [171] et les paramètres ont été affinés par la méthode des moindres carrés sur F^2 [172]. Les valeurs R sont définies comme $R1 = \Sigma |F_0| - |F_c| / \Sigma |F_0|$ et $wR2 = (\Sigma w(F_0^2 - F_c^2)^2 / \Sigma w(F_0^2)^2)^{0,5}$.

¹⁷⁰ SADABS, Program for data collection, Bruker-AXS

¹⁷¹ Sheldrick G.M., Acta Crystallogr. **A46**, 467-473, 1990

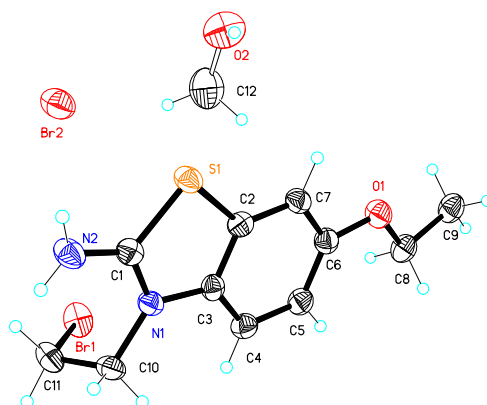
¹⁷² Sheldrick G.M., SHELKL-97, Program for Crystal Structure Refinement, University de Göttingen, 1997

Composé 4



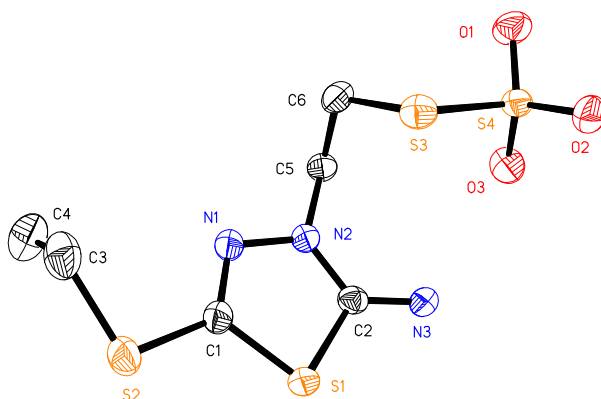
Formule brute	C ₇ H ₁₁ N ₃ OS ₂		Echelle θ de collecte des données	1,89 to 26,45°.
Masse moléculaire	217,31		Echelles des indices hkl	-6<= h <=5 -6<= k <=11, -14<= l <=12
Système cristallographique	Triclinique		Réflexions recueillies	2862
Groupe d'espace	P-1		Réflexions indépendantes	1989 [R(int) = 0,0159]
Paramètres de maille	a = 4,8895(7) Å b = 9,4791(13) Å c = 11,7226(16) Å	α = 112,963(2)° β = 90,193(2)° γ = 99,112(3)°	Précision autour de θ	98,0 %
Volume	492,68(12) Å ³		Max/min de transmission	1,000000 et 0,672740
Groupe formulaire Z	2		Données/contraintes/paramètres	1989 / 0 / 123
Densité (calculée)	1,465 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,025
Coefficient d'absorption	0,504 mm ⁻¹		Indices finaux R[I>2σ(I)]	R1 = 0,0371, wR2 = 0,0908
F(000)	228		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0509, wR2 = 0,0980
Dimension du cristal	0,1 x 0,2 x 0,4 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,529 et - 0,332 e.Å ⁻³

Composé 28



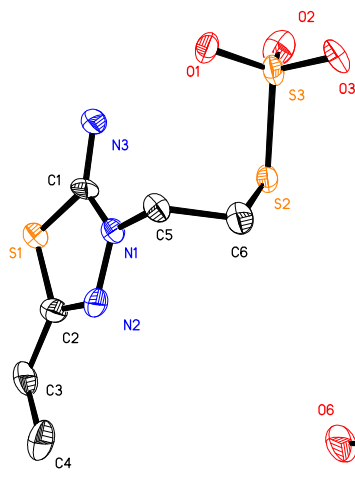
Formule brute	$C_{11}H_{16}Br_2N_2O_1S$		Echelle θ de collecte des données	2,44 to 26,39°
Masse moléculaire	398,14		Echelles des indices hkl	-24 \leq h \leq 20 -11 \leq k \leq 10, -21 \leq l \leq 21
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	8460
Groupe d'espace	C2/c		Réflexions indépendantes	3019 [R(int) = 0,0283]
Paramètres de maille	a = 19,8392(10) Å b = 9,3895(5) Å c = 17,2642(9) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 113,6570(10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,8 %
Volume	2945,7(3) Å ³		Max/min de transmission	1,000000 et 0,548114
Groupe formulaire Z	8		Données/contraintes/paramètres	3019 / 0 / 185
Densité (calculée)	1,796 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,039
Coefficient d'absorption	5,639 mm ⁻¹		Indices finaux R[I>2σ(I)]	R1 = 0,0289, wR2 = 0,0702
F(000)	1576		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0399, wR2 = 0,0747
Dimension du cristal	0,3 x 0,5 x 0,5 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,782 et -0,447 e.Å ⁻³

Composé 34

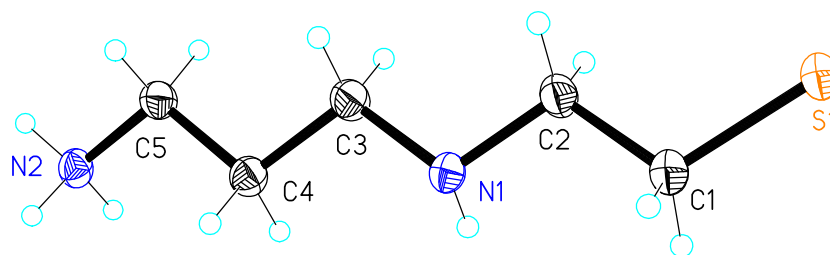


Formule brute	$C_6H_{11}N_3O_3S_4$		Echelle θ de collecte des données	2.44 to 26.37°.
Masse moléculaire	301,42		Echelles des indices hkl	-27 $\leq h \leq$ 32, -8 $\leq k \leq$ 9, -20 $\leq l \leq$ 20
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	7025
Groupe d'espace	C2/c		Réflexions indépendantes	2554 [R(int) = 0,0259]
Paramètres de maille	a = 26,1157(19) Å b = 7,3907(6) Å c = 16,6907(13) Å	$\alpha = \gamma = 90^\circ$ $\beta = 129,3260(10)^\circ$.	Précision autour de θ	99,9 %
Volume	2492,0(3) Å ³		Données/contraintes/paramètres	2554 / 0 / 146
Groupe formulaire Z	8		Qualité d'ajustement sur F²	1,024
Densité (calculée)	1,607 Mg/m ³		Indices finaux R[I>2σ(I)]	R1 = 0,0402, wR2 = 0,0995
Coefficient d'absorption	0,758 mm ⁻¹		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0540, wR2 = 0,1068
F(000)	1248		$\Delta\rho$ (min/max)	0856 et -0,377 e.Å ⁻³
Dimension du cristal	0,1 x 0,3 x 0,5 mm ³			

Composé 35



Formule brute	$C_7H_{11}N_3O_3S_3$		Echelle θ de collecte des données	5,14 to 23,25°
Masse moléculaire	269,36		Echelles des indices hkl	-22 \leq h \leq 21 -6 \leq k \leq 3, -21 \leq l \leq 20
Système cristallographique	Orthorhombic		Réflexions recueillies	9041
Groupe d'espace	Pca2(1)		Réflexions indépendantes	3021 [R(int) = 0.1639]
Paramètres de maille	a = 20,029(4) Å b = 5,6716(11) Å c = 19,544(4) Å	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	98,7 %
Volume	2220,2(7) Å ³		Données/contraintes/paramètres	3021 / 1 / 274
Groupe formulaire Z	8		Qualité d'ajustement sur F²	0,997
Densité (calculée)	1,612 Mg/m ³		Indices finaux R[I>2σ(I)]	R1 = 0,0581, wR2 = 0,1416
Coefficient d'absorption	0,659 mm ⁻¹		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0742, wR2 = 0,1525
F(000)	1120		$\Delta\rho$ (min/max)	0,634 and - 0,577 e.Å ⁻³
Dimension du cristal	0,1 x 0,1 x 0,4 mm ³			

WR-1065

Formule brute	C ₅ H ₁₄ N ₂ S		Echelle θ de collecte des données	2,78 to 26,37°
Masse moléculaire	134,24		Echelles des indices hkl	-8<= h <=8, -13<= k <=6, -12<= l <=13
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	4182
Groupe d'espace	P2(1)/c		Réflexions indépendantes	1504 [R(int) = 0,0251]
Paramètres de maille	a = 6,8695(9) Å b = 10,4604(13) Å c = 10,4510(13) Å	α = 90° β = 101.520(2)° γ = 90°	Précision autour de θ	99,8 %
Volume	735,86(16) Å ³		Max/min de transmission	1,0000000 and 0,7421601
Groupe formulaire Z	4		Données/contraintes/paramètres	1504 / 0 / 89
Densité (calculée)	1,212 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,039
Coefficient d'absorption	0,347 mm ⁻¹		Indices finaux R[I>2σ(I)]	R1 = 0,0340, wR2 = 0,0837
F(000)	296		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0462, wR2 = 0,0891
Dimension du cristal	0,1 x 0,1 x 0,5 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,331 and -0,172 e.Å ⁻³

Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action *in vitro*.

Ce travail s'inscrit dans un programme de recherche visant à synthétiser de nouveaux composés organiques et phosphorés possédant un rapport activité/toxicité convenable. Pour cela, nous avons réalisé la synthèse de nouveaux motifs N-substitués du benzothiazole et du thiadiazole tels que des thiols, aminothiols, acides thiosulfoniques et phosphorothioates. Tous ces composés ont été caractérisés physico-chimiquement par spectroscopie RMN (proton, carbone, phosphore, 2D), par spectrométrie de masse, analyse élémentaire et pour certains d'entre eux par diffraction des rayons X. L'activité de la plupart des composés a été évaluée par des tests *in vitro*. Les résultats expérimentaux ont été confirmés par des calculs théoriques de DFT visant à étudier le mécanisme de capture des radicaux libres par nos composés. D'autre part, une étude de relation structure activité (QSAR) a été réalisée. Les résultats nous ont permis d'élaborer un modèle permettant d'établir une relation structure-activité.

Mots clés : radioprotection chimique, antioxydant, DFT, QSAR

Synthesis and evaluation of new organic and phosphorous derivatives against ionizing radiation. Study of the *in vitro* mechanism of action.

This work falls under a research program. The aim was to synthesize new organic phosphorylated compounds having an interesting radiopharmacological activity without toxicity. That's why, we carried out the synthesis of new benzothiazole and thiadiazole *N*-substituted derivatives as thiols, aminothiols, acids thiosulfonic and phosphorothioates. All these compounds were characterized by NMR (proton, carbon, phosphorus, 2D), by mass spectrometry, elementary analyzes and for some of them by diffraction of x-rays. The activity of the majority of them was evaluated by *in vitro* tests. The experimental results were confirmed by theoretical study : the aim of DFT calculation was the study of the mechanism of capture of the free radicals by our compounds. In addition, a study of relation structure activity (QSAR) was carried out. Our results allow us to create a model making it possible to establish structure-activity relationship.

Mots clés : chemical radioprotection, antioxydant, DFT, QSAR