

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière

Département de Chimie



Mémoire de Master Académique

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie appliquée

Présenté par : Bellaouar Nacira

Khemgani Ouarda

Thème

**Le potentiel antioxydant in vitro et l'activité
biologique des dithiolethiones**

Soutenu publiquement

Le : 26 / 05 /2016

M. Dendougui Hocine

Université d'Ouargla

Président

Mme. Slougui Nabila

Université d'Ouargla

Examineur

Melle. Zehour Rahmani

Université d'Ouargla

Encadreur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous remercions tout d'abord ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la santé et la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur Melle. Zehour Rahmani Docteur à l'université d'Ouargla pour son aide précieuse et ses conseils éclairés dans la direction de nos travaux, ainsi que pour sa grande disponibilité et son immense gentillesse.

A cette même occasion nous tenons à remercier les Professeurs : Hocine Dendougui et Nabila Slougui pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.

Nous remercions également le personnel du laboratoire pédagogique faculté des mathématiques et science de la matière de l'université de Kasdi Merbah d'Ouargla et le personnel du laboratoire de l'hôpital de Mohammed Boudiaf d'Ouargla.

Nous sommes reconnaissants aussi envers nos enseignants et nos camarades de promotion.

Enfin, nos pensées particulières vont à nos parents et le reste de la famille, car ils étaient notre soutien dans nos études et notre projet.



Dédicaces

*Nous rendons grâce à ALLAH le tout puissant et
miséricordieux qui nous a donné la force et les
moyens de réaliser ce travail.*

Nous dédions ce travail :

*À nos parents, pour leur irremplaçable et
inconditionnel amour, leurs encouragements, et
pour avoir cru à nos ambition.*

*À nos familles et nos chères copines pour tous les
sacrifices consentis et le soutien moral pendant tout
ce projet.*

*À nos enseignants qui nous ont aidés pendant cette
année universitaire*

Liste des abréviations

Liste des abréviations:

p.f	Point de fusion
AEAC	Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity
R²	coefficient de détermination
Abs	Absorbance
Mo	Molybdate
PI	le potentiel d'ionisation
Kcal	Kilocalories
LogP	coefficient de partage
EOA	espèces oxygénées activées
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
DMF	diméthylformamide
σ_p^-	constante de Hammett
Å	Angstrom
RX	rayons X
KHPM	kallitréinekinogène de haut poids moléculaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
TCA	temps de céphaline + activateur
TCK	Temps de Céphaline Kaolin
TQ	temps de quick
TP	taux de prothrombine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiolethione
s	Seconde
min	Minute
PM	phospho-molybdate

Liste des figures

Liste des figures

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Figure I.1	Formule générale des 1,2-dithiole-3-thiones	10
Figure I.2	Les formes les plus célèbres de 1,2dithiole-3-thione	10
Figure I.3	La méthode de l'E.K. Field	11
Figure I.4	Propriété électrochimique	12
Figure I.5	La densité électronique de différents atomes et les valeurs de moments dipolaires des molécules des inhibiteurs.	13
Figure II.1	Dimensions moyennes du globule rouge humain	18
Figure II.2	Globules rouges vus au microscope électronique à balayage	18
Figure II.3	Sang coagulé	20
Figure II.4	Mécanismes de la coagulation	21
Figure II.5	Étapes pour démarrer et arrêter le saignement	24
Figure III.1	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C)	29
Figure III.2	Courbes représentant le pouvoir réducteur de dithiolethiones étudiés	29
Figure III.3	Classification de la capacité réductrice selon les valeurs d'AEAC	30
Figure III.4	La relation d'AEAC avec le potentiel d'ionisation	31
Figure III.5	La relation d'AEAC avec le coefficient de partage	32
Figure III.6	Tube Citrate après centrifugation	34
Figure III.7	Appareil de mesure coagulomètre (thrombotimer 1)	35
Figure III.8	Classification des valeurs TCA de témoin	36
Figure III.9	des valeurs TCA de malade	37
Figure III.10	La relation de TCA témoin avec le coefficient de partage	38
Figure III.11	La relation de TCA malade avec le coefficient de partage	38
Figure III.12	Classification des valeurs TQ	40
Figure III.13	La relation de TQ avec le coefficient de partage	41

Liste des tableaux

Liste des tableaux

<i>Tableau</i>	<i>titre</i>	<i>page</i>
Tableau I.1	Principales sources de production des radicaux libres	5
Tableau I.2	valeurs de σ_p de reste 5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl et de 4-[1,2-dithiole-3-thione]-yl	13
Tableau II.1	facteurs de la coagulation, numéro de facteur, nom et particularités	22
Tableau III.1	Les structures et les abréviations des dérivés dithioliques	27
Tableau III.2	Les résultats de test du pouvoir réducteur (AEAC)	30
Tableau III.3	Les valeurs de PI	31
Tableau III.4	Les valeurs de Log P	32
Tableau III.5	Les résultats de dosage TCA de témoin	36
Tableau III.6	Les résultats de dosage TCA de malade	37
Tableau III.7	Les résultats de dosage TQ	39

Sommaire

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	II
Liste de tableaux.....	III
Sommaire.....	IV
Introduction générale.....	V

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les radicaux libres Et antioxydants

I	Les radicaux libres Et antioxydants.....	4
I.1	Les radicaux libres.....	4
I.1.1	Production de radicaux libres	4
I.1.2	Dérivés réactifs de l'oxygène	5
I.1.3	Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme.....	6
I.1.4	Définition du stress oxydant	6
I.2	Les antioxydants.....	7
I.2.1	Les antioxydants synthétiques	7
I.2.2	Les antioxydants naturels	8
I.2.3	Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant.....	8
I.2.4	Définition de l'activité antioxydante.....	9
I.3	Généralité sur les 1,2-dithiole-3-thiones.....	9
I.3.1.1	Synthèse de 1,2-dithiole-3-thione	10
I.3.1.2	Synthèse de 3- méthylthio-1,2- dithioliumcations	11
I.3.2	Les propriétés de dithiolethiones	12
I.3.2.1	Propriété électrochimique	12
I.3.2.2	Propriétés physiques	12
I.3.3	Les effets électroniques des restes 5-[1,2-dithiole-3-thiones]-yl et 4-[1,2-dithiole-3-thiones]	13

I.3.3.1	Aromaticité	14
I.3.4	Domain d'application des dithiolethiones	15

Chapitre II : Le sang et la coagulation

II.1	Le sang	17
II.1.1	Les cellules	17
	a. L'érythrocyte (globule rouge)	17
	b. Leucocytes (globules blancs)	18
II.2	Plaquettes et hémostase	19
II.3	La coagulation.....	20
II.3.1	Facteur de la coagulation	20
II.3.2	les étapes de la coagulation	20
II.3.2.1	Etapes de la génération de la prothrombinase	20
II.3.2.2	L'étape de la thrombinoformation.....	21
II.3.2.3	L'étape de La fibrinoformation.....	21
II.4	L'hémophilie	22
II.4.1	Définition de la maladie	22
II.4.2	Historique de l'hémophilie.....	22
II.4.3	Epidémiologie de l'hémophilie.....	23
II.4.4	Comment démarrer et arrêter le saignement ?	24
II.4.5	Transmission génétique de l'hémophilie	24
	1. Une femme porteuse de l'anomalie (XX) mariée à un homme sans anomalie XY.....	24
	2. Une femme non porteuse (XX) mariée à un homme hémophile (XY).....	25
	Autres causes peuvent être à l'origine d'hémophilie chez les femmes	25

Partie II : Partie expérimentales

***Chapitre III : Activité antioxydante et activité
anticoagulant***

III.1	Activité antioxydante	28
III.1.1	La structure des composés étudiés	28

III.1.2	Test de Phosphomolybdate (PM)	29
	a. Préparation du réactif de molybdate.....	29
	b. Procédure.....	29
	c. Résultats et discussion.....	29
III.2	Activité anticoagulant	34
	Temps de Céphaline Kaolin (TCK)	34
III.2.1	a. Principe	34
	b. Echantillonnage	35
	c. Matériel	35
	d. Réactifs	35
	e. Mode opératoire (TCK).....	36
	f. Résultats et discussion.....	37
	Le temps de quick TQ.....	40
III.2.2	a. Principe	40
	b. Mode opératoire(TP)	40
	c. Résultats et discussion.....	40
	Conclusion générale	44
	Référence bibliographique.....	46

Introduction

générale:

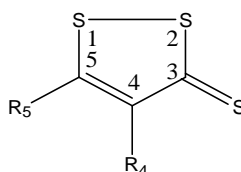
Introduction générale

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA) [1].

Dans l'organisme, les radicaux libres sont responsables du dommage cellulaire lié au vieillissement, aux maladies cardio-vasculaires, au cancer et à la plupart des maladies dégénératives... quelle que soit la toxine à l'origine du processus. Ces radicaux libres s'attaquent à l'ADN à un rythme alarmant. Plus ils sont nombreux à assaillir votre ADN, plus le « taux d'oxydants » est élevé [2].

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes [3].


Parmi les antioxydants qui nous intéresseront les 1,2-dithiolethiones ces composés sont des hétérocycles contenant trois sulfures possèdent un caractère aromatiques et polaire.



L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude des propriétés antioxydantes des dithiolethiones avec une application potentielle dans le domaine médical (activité anti coagulante). Ce travail combine entre la Chimie et la Biologie. Car il consiste à déterminer de la relation entre la structure chimique des dérivés dithioliques et l'activité anti coagulante du sang.

Pour réaliser ces objectifs tracés, notre travail sur reparti comme suit :

- Dans le 1^{ère} chapitre, nous avons commencé par quelques notions de base sur les radicaux libres, les différents systèmes d'antioxydant. Aussi, nous mentionnons certaines propriétés physico-chimiques des dithiolethiones.
- Le 2^{ème} chapitre, intitulée évaluation de sang et la coagulation nous rappellerons, certaines définitions sur le sang et les constituants du sang et la coagulation.
- Le dernier chapitre est consacré aux procédures expérimentales utilisées, nous présentons le protocole expérimental puis nous discuterons les résultats obtenus.



Partie I :
Synthèse
bibliographique

Chapitre I :

Les radicaux libres et antioxydants

I. Les radicaux libres et antioxydants:

Ce premier chapitre présente le contexte de cette étude. Les notions de stress oxydant et les molécules antioxydantes seront abordées. Une description succincte de la structure des composés dithioliques ainsi que quelques unes de leurs caractéristiques physicochimiques seront présentées.

I.1. Les radicaux libres :

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA) [1].

Les radicaux libres sont des atomes, des groupes d'atomes ou des molécules qui présentent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ces molécules qui contiennent généralement de l'oxygène sont aussi très réactives. Elles interagissent en une fraction de seconde avec d'autres molécules [4].

Dans l'organisme, les radicaux libres sont responsables du dommage cellulaire lié au vieillissement, aux maladies cardio-vasculaires, au cancer et à la plupart des maladies dégénératives... quelle que soit la toxine à l'origine du processus. Ces radicaux libres s'attaquent à l'ADN à un rythme alarmant [2].

Les radicaux libres interviennent dans un grand nombre de domaines en chimie, aussi bien en chimie sous rayonnement ionisant, chimie des radioéléments, qu'en chimie organique, inorganique, photochimie. Généralement les réactions d'oxydoréduction font intervenir des intermédiaires radicalaires. Ces réactions sont omniprésentes dans le milieu vivant et gouvernent des processus aussi importants que la reproduction des espèces, la mutagénèse, la défense contre les maladies [3].

I.1.1. Production de radicaux libres :

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés.

Les autres sources de production de radicaux libres sont représentées dans le tableau I.1. Elles sont classées en deux catégories :

- les sources endogènes : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme.
- les sources exogènes : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme [5].

Tableau I.1: Principales sources de production des radicaux libres.

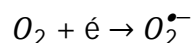
Sources endogènes	Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries). Cellules phagocytaires. Métabolisme de l'acide arachidonique. Système xanthine/Xanthine oxydase.
Sources exogènes	Rayonnement électromagnétique Métaux de transition Pesticides Médicaments...

I.1.2. Dérivés réactifs de l'oxygène :

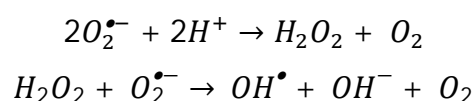
Les principaux représentants des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont :

- le radical hydroxyle (HO^\bullet)
- le radical peroxyde (ROO^\bullet)
- le radical alkoxyde (RO^\bullet)
- le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- l'hydroperoxyde organique (ROOH)
- l'oxygène singulet (O_2)

La formation initiale des DRO se base sur la réduction d'oxygène moléculaire, selon l'équation suivante [6]:



La suite des réactions peut être résumée comme suit :



I.1.3. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme

- Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries.
- Les (DRO) peuvent agir en tant que « molécule-signal » et ainsi intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire.
- Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée.
- Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs. Les dommages oxydatifs peuvent alors se propager via l'attaque des radicaux formés sur d'autres molécules.
- Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono- et polyinsaturés des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation.
- Les radicaux libres et en particulier OH^\bullet , peuvent s'attaquer à l'ADN. Ils réagissent avec les nucléotides. Ils peuvent mener, par exemple, à des modifications des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN, à des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases. Les conséquences de ces altérations peuvent être immédiates. La cellule, n'étant plus capable de fonctionner correctement, entre en apoptose. Cependant, ces conséquences peuvent aussi s'exprimer sur du plus long terme. Les modifications de l'expression du programme génétique de la cellule peuvent être à l'origine d'un cancer [5].

I.1.4. Définition du stress oxydant :

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des DRO, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de DRO, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes [7].

La pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des DRO. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique. Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus [3].

I.2. Les antioxydants :

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes.

Les antioxydants sont définis par HALLIWELL en (1999) comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine [5].

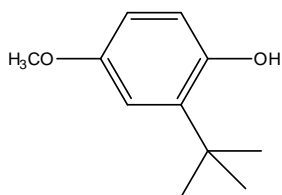
Exemples :

Le probucol (lurselle), la N-acétylcystéine, acide ascorbique (vitamine C), tocophérol (vitamine E), le B-carotène.... [8].

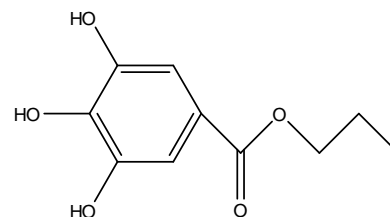
I.2.1. Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tetra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [9].

Exemples :



BHA



Gallate de propyle

I.2.2. Les antioxydants naturels :

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Les métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes et sont " à faible prix de revient ". Chez les plantes, il existe aussi un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, les acides aminés et les composés phénoliques [10].

I.2.3. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques [11]. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron.

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation [12].

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux ($HOCl$), de l'hydroxyle ($\bullet OH$), des anions superoxyde ($O^{\bullet -}_2$), du peroxyde ($ROO\bullet$) et de l'oxyde nitrique ($NO\bullet$) [13].

Parmi ces techniques, nous citons :

- la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) [14].

- la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) [15].
- la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) [16].
- la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [17].
- la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl-phénylenediamine) [18].
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) [19].
- la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) [20].
- la méthode photochimiluminescence (PCL) [21].
- la méthode d'hémolyse [22].

I.2.4. Définition de l'activité antioxydante:

L'activité antioxydante est considérée comme la capacité à piéger les radicaux libres, par l'apport d'un atome hydrogène ou d'un électron et la stabilisation des espèces formées. Une molécule antioxydante est une espèce chimique réductrice à bas potentiel d'oxydation, comportant des éléments tels que des hydrogènes phénoliques, des cycles aromatiques et des liaisons multiples

I.3. Généralités sur les 1,2-dithiole-3-thiones

Le soufre est un élément dont la chimie est très développée. L'oxydation de Swern [23] est certainement la réaction la plus connue qui utilise cette chimie du soufre. Dans la classification périodique des éléments, le soufre se situe juste en dessous de l'oxygène, on aura donc des fonctions thiols (-SH) dont la réactivité est semblable à celle des fonctions hydroxyles (-OH). De même, on rencontrera des fonctions C=S, comme il existe des fonctions C=O. Néanmoins, il existe une grande différence entre l'oxygène et le soufre, en effet leur structure électronique est bien différente. L'oxygène O₈ a pour structure $1s^2 2s^2 2p^4$ alors que le soufre S₁₆ pour structure le $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4$. Les composés possédant une double liaison C=S sont en général moins stables que leurs homologues qui possèdent une liaison C=O. Et ceci à cause du fait que dans le cas du soufre, il existe des orbitales d libres dans lesquelles les électrons de la liaison π peuvent aller, ce qui n'est pas le cas pour l'oxygène.

Parmi les composés soufrés on trouve les 1,2-dithiole-3-thiones, qui sont des hétérocycles sulfurés dont la structure générale est présentée sur la figure I.1. naturellement trouvés dans végétaux de la famille des crucifères [24].

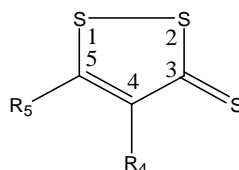


Figure I.1 : Formule générale des 1,2-dithiole-3-thiones

Selon les radicaux R_4 et R_5 on distingue plusieurs composés des dithiolethiones. Il y a principalement deux types des 1,2-dithiole-3-thiones :

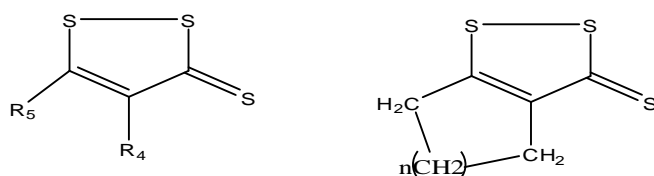


Figure I.2: Les formes les plus célèbres de 1,2dithiole-3-thione

I.3.1.1. Synthèse de 1,2-dithiole-3-thiones :

La première synthèse d'un composé de cette classe semble avoir été par le chimiste italien BARBAGLIA G.A. qui, en 1884, a isolé et a purifié une substance de la formule $C_5H_6S_3$ de la réaction entre l'isovaléraldéhyde (3-méthylbutanal) et le soufre.

BARBAGLIA n'a pas déterminé sa structure, mais il a mesuré son point de fusion et a donné la méthode de synthèse, il a stipulé que cette substance serait le 4,5-diméthyl-1,2-dithiole-3-thione, la dithiolethione parent a été synthétisée pour la première fois en 1948. Nombreux dérivés ont été préparés entre les années 1940 et 1950 [25].

Seules les positions 4 et 5 des 1,2-dithiole-3-thiones sont susceptibles d'être occupées par des groupements qui doivent, le plus souvent, être inclus dans les précurseurs correspondants. Cette condition limite les possibilités de synthèse, ce qui explique le nombre réduit de structures connues dans la série des 1,2-dithiole-3-thiones.

La première synthèse de 1, 2-dithiole-3-thiones a été en 1954 par de E. K. Field [26]. Leurs sels ont été synthétisés par B. Böttcher.

Selon E.K.Field qui est en présence de catalyseurs et sa réaction avec du soufre ou P_4S_{10} , peut donner de bons rendements d'aryl dithiolethione selon la réaction:

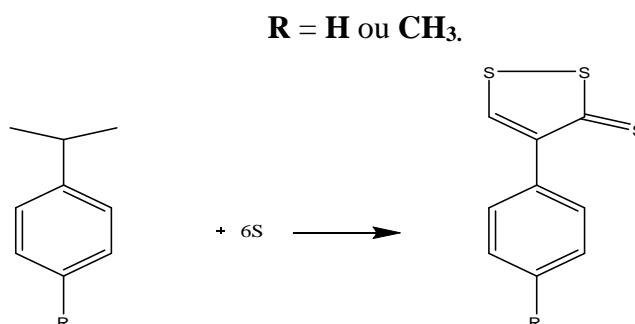
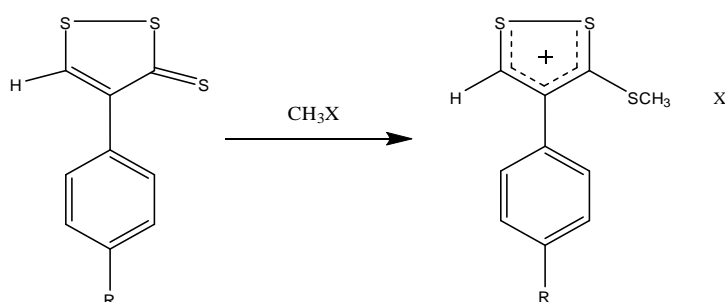


Figure I.3: la méthode de l'E.K. Field.

I.3.1.2. Synthèse de 3- méthylthio-1,2- dithiolium cations:

Les sels de 1,2-dithiole-3-thiones ont été synthétisés d'après B. Böttcher [27]. Cette méthode fondée sur la réaction du sulfate de diméthyle ou iodure de méthyle en excès avec dithiolethiones correspondante, dans le toluène à une température fixe de 35 °C dans les 4h pour réagir avec le sulfate de diméthyle et à 40 °C pendant la journée pour iodure de méthyle. Après, chaque résidu a été filtré et séché selon L'équation suivante: (réaction d'addition)



Avec $X^- = I^-$ ou $CH_3SO_4^-$

I.3.2. Les propriétés de dithiolethiones:

I.3.2.1. Propriété électrochimique:

Beaucoup d'études et d'analyses par des méthodes électrochimiques ont été effectuées sur les propriétés oxydo-réductrices des dithiolethiones substitués en position 5 et 4 par des groupements non électro actifs (aryle ou alkyle). D'une manière générale, le comportement cathodique habituel de ces composés en milieux organiques (DMF) peut être décrit par une réduction à deux électrons, chimiquement réversible, conduisant aux dianions après l'ouverture de cycle dithiolique (Figure I.4) [28].

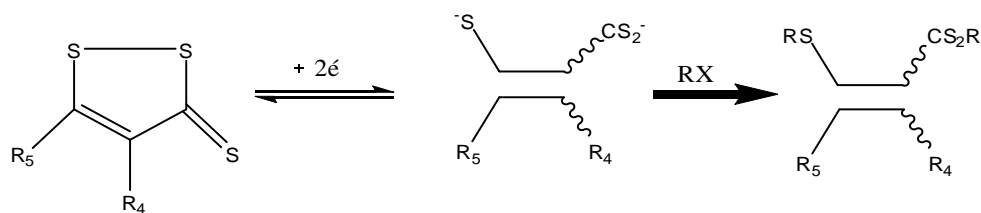


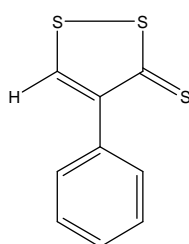
Figure I.4: Propriété électrochimique.

I.3.2.2. Propriétés physiques:

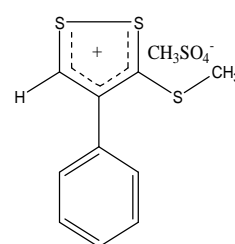
La plus part des 1,2-dithiole-3-thiones sont des cristaux colorés, ceux qui sont substitués par des composés aromatiques ont des couleurs entre le rouge et l'orange foncé et ont des points de fusion supérieur à ceux substitués par des composés aliphatique qui ont la couleur jaune.

Plusieurs des dithiolethiones sont insolubles dans les solvants polaires et peu solubles dans les solvants aliphatique et soluble dans les hydrocarbures aromatiques et dans l'acide sulfurique concentré [29].

Les valeurs de dipôles des sels sont plus élevées que celles de leurs dithiolethiones origine et les facteurs hétérogènes des derniers sont plus petits que ceux de leurs sels (Figure I.5) [30].



3,387 Debye



14,40 Debye

Figure I.5: La densité électronique de différents atomes et les valeurs de moments dipolaires des molécules des inhibiteurs.

I.3.3. Les effets électroniques des restes 5-[1,2-dithiole-3-thiones]-yl et 4-[1,2-dithiole-3-thiones]:

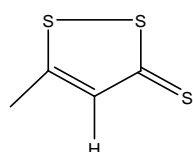
Les effets électroniques attracteurs des restes 5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl et 4-[1,2-dithiole-3-thione]-yl sont confirmés quantitativement par les travaux de M. Saïdi et M. Chollet [31].

Les valeurs de constante de Hammett σ_p^- sont :

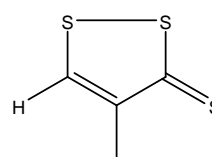
Tableau I.2: Les valeurs de σ_p de reste 5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl et de 4-[1,2-dithiole-3-thione]-yl

Les restes	σ_p^-
5-[1,2-dithiolethione]-yl	1.14
4-[1,2-dithiolethione]-yl	0.17

Ces valeurs expriment que l'effet électro attracteur du reste 5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl



Le reste 5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl

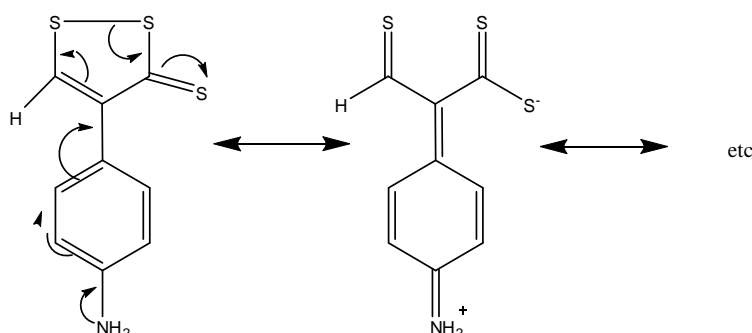


Le reste 4-[1,2-dithiole-3-thione]-yl

Ces valeurs expriment que l'effet électro attracteur du reste 5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl possède un effet mésomère attracteur comparable à celui d'ion reste cyano ou para nitro (0.97 et 1.25) [28].

La valeur de σ_p du reste 4-[1,2-dithiole-3-thione]-yl est très faible et indiquant que les restes 4-[1,2-dithiole-3-thiones]-yl sont faiblement attracteur par effet inducteur.

Il n'y a pas d'effet mésomère attracteur du reste 4-[1,2-dithiole-3-thiones]-yl qui résulterait de la conjugaison entre le groupement amino donneur et ce reste 1,2-dithiole via le noyau phényl selon :



La conjugaison entre le noyau phényl (et donc le groupement amino) et le noyau dithiole, possible d'un point de vue énergétique, est inhibée par le manque de coplanéité des deux noyaux [32].

En conclusion, nous pouvons dire que probablement les restes 4-[1,2-dithiole-3-thione] n'exercent pas d'effet attracteur mésomère.

I.3.3.1. Aromaticité:

L'aromaticité de dithiolethiones est manifestée, par délocalisation de six électrons p dans le système plans du dithiole. La règle de Hückel, indique que toute structure cyclique siège d'une délocalisation électronique couvrant l'ensemble du cycle, et affectant un ensemble de $(4n+2)$ électrons ($n=0 ; 1 ; 2 ; 3 ; \dots$) présente le caractère aromatique.

On peut considérer que quatre électrons proviennent des deux doublets 3p des atomes de soufre 1 et 2 et une double liaison (C_4-C_5), se trouvent rejeter sur le soufre du thiocarbonyle ce dernier se trouve donc chargée négativement tandis que le cycle dithiolique acquiert une charge positive.

Un certain nombre de dithiolethione sont fait l'objet d'études cristallographiques par rayons X [33], elles conduisent aux résultats suivants :

La distance S_1-S_2 de l'ordre de 2.04 \AA possède la valeur trouvée dans les désulfures d'alkyle de l'ordre de 2.08 \AA . Mais il y a une grande différence entre les disulfures d'alkyle et les dithiolethiones. Les longueurs des liaisons C_3-S_2 et C_5-S_1 de l'ordre de 1.7 \AA sont nettement plus courts que la liaison C-S dans un sulfure d'alkyle (longueurs de liaison de l'ordre de 1.83 \AA). Les longueurs des liaisons C_3-C_4 (1.42 \AA) et C_4-C_5 (1.83 \AA) sont celle rencontrées dans les hydrocarbures aromatiques. La longueur de la double liaison du thiocarbonyle est de l'ordre de 1.66 \AA . Elle est légèrement supérieure à la valeur de 1.61 \AA retenue pour un thiocarbonyle typique [34].

Ces résultats confirment, encore l'existence du caractère aromatique des dithiolethiones. En bref, ces considérations indiquent que les dithiolethiones sont des composés aromatiques, très stables.

I.3.4. Domaine d'application des dithiolethiones:

Les dithiolethiones jouent un rôle très important dans plusieurs domaines, elles sont utilisées comme des promoteurs dans le champ de la pharmacologie où la sulfarlem a été utilisées pendant longtemps comme médicament thérapeutique aussi l'Oltipraz qui possède la propriété d'un inhibiteur efficace au HIV-1. Un grand nombre des dithiolethiones sont connus comme des agents chimio protecteurs, et peuvent être accomplis par l'usage de produits chimiques naturels et synthétiques pour retarder, bloquez ou renversez le processus cancérigène [35].

Les dithiolethiones étudiés présentent des capacités inhibitrices importantes que le standard vitamine C. que la 4-tolyl-1,2-dithiole-3-thione présente un fort pourcentage d'inhibition d'hémolyse (plus de 1,85 fois de vitamine C), par contre le faible inhibiteur est la

vitamine C. Cette remarque s'explique par l'influence du facteur de lipophilie. L'anéthol dithiolethione (Sulfarlem[®]) est une molécule lipophile. utilisée en thérapeutique qui associe des propriétés anti radicalaires et antioxydantes à une bonne diffusion tissulaire et une bonne tolérance pour inhiber l'hémolyse des érythrocytes [36].

Certain nombre d'entre eux ont fait l'objet de brevets dans divers domaines d'application: Des inhibiteurs de corrosion [37] et sont utilisés comme des fongicides [30].

Chapitre II :

Le sang et la coagulation

II.1. Le sang

Le sang est un tissu liquide, de coloration rouge circulant à l'intérieur d'un système vasculaire clos.

Chez l'homme, l'appareil circulatoire contient environ cinq litres de sang, Ce qui représente environ 7% du poids corporel (70 kg) le sang est un organe physiologique, constitué du plasma, liquide salin tamponné, de couleur jaune clair, contenant entre autres électrolytes et protéines, dans lequel baignent les éléments figurés du sang les érythrocytes, les leucocytes ou globules blancs (granulocytes, monocytes et lymphocytes) et les thrombocytes (les plaquettes).

L'une des multiples fonctions du sang est le transport d'électrolytes et de substances nutritives (glucose, acides aminés,...) et des gaz respiratoires (O₂, CO₂). Ce dernier est assuré en majeure partie par les érythrocytes et l'hémoglobine [38].

Le sang est constitué de plasma et de différentes populations de cellules produites au niveau des tissus hématopoïétiques (os plats du tronc, extrémités du fémur et de l'humérus).

A partir d'une seule cellule (cellule souche), trois lignées sont formées : celle des globules rouges, celle des globules blancs et celle des plaquettes.

Chaque lignée possède un processus de maturation différent.

Pour les globules rouges, le processus de maturation se nomme l'érythropoïèse [39].

Un mm³ de sang contient normalement 5 millions de globules rouges, 6 à 7 000 de globules blancs, 200 à 400 000 plaquettes.

Constituants du sang et leurs fonctions :

- Plasma (Eau _ Electrolytes)
- Cellules (Erythrocytes _ Leucocytes _ Plaquettes)

II.1.1. Les cellules:

a. L'érythrocyte (globule rouge):

L'érythrocyte, appelé aussi hématie, normocyte ou globule rouge, est une cellule très simplifiée, anuclé chez l'homme et les mammifères, produite essentiellement dans la moelle osseuse à partir de cellules mères, les érythroblastes médullaires (chez le fœtus, les érythrocytes sont également produits par la rate et le foie), l'érythrocyte se présente sous la forme d'un disque biconcave, d'un diamètre de 7 et 8 µm. Il est doué d'une grande déformabilité qui lui permet de franchir des capillaires d'un diamètre inférieur au sien. Ceci permet effectivement le transport d'oxygène depuis les poumons jusqu'aux cellules de l'organisme, mais cette spécialisation

implique: une brève survie cellulaire (environ 120 jours), une orientation spécifique du métabolisme pour protéger le pigment respiratoire .De fait, la couleur rouge de l'érythrocyte provient de ce pigment, et constituant principal, à savoir l'hémoglobine. La figure II.2 ci-dessous schématise la forme de l'érythrocyte (section sagittale) et résume les dimensions moyennes [39].

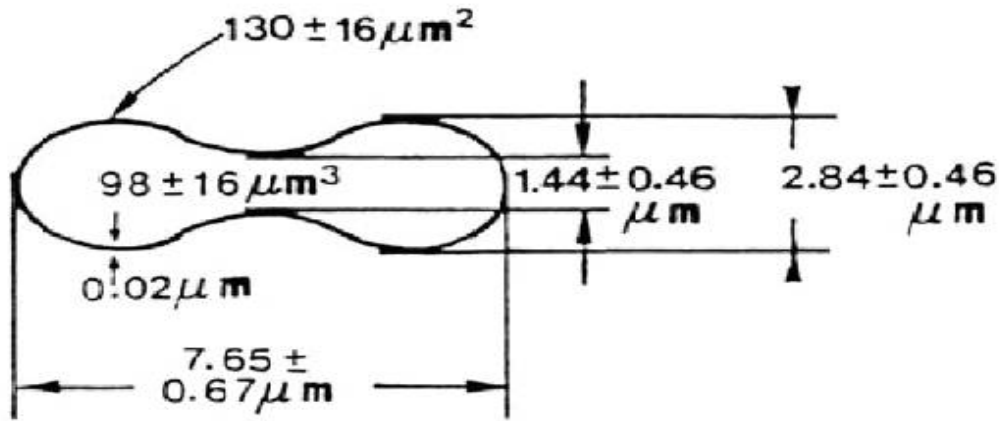


Figure II.1 : Dimensions moyennes du globule rouge humain

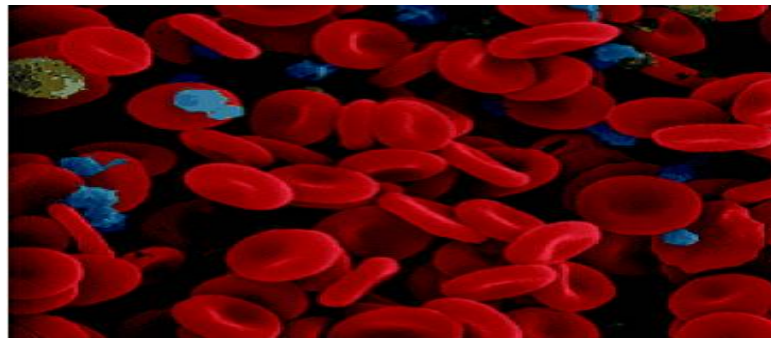


Figure II.2 : Globules rouges vus au microscope électronique à balayage

b. Leucocytes (globules blancs):

Les leucocytes, ou globules blancs du sang, sont les cellules mobiles du système de défense immunitaire de l'organisme, par immunité on entend la capacité de l'organisme à résister à des substances étrangères potentiellement dangereuses ou à des cellules anormales et à les éliminer .les leucocytes et leurs produits ainsi qu'un groupe de protéines plasmatiques constituent le **système immunitaire**, un système de défense interne qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance et la destruction ou la neutralisation de matériaux différents du « soi » normal. Plus spécifiquement, le système immunitaire :

1. Défend contre des **agents pathogènes** (microorganismes bactériens ou viraux responsables de maladie).
2. Fonctionne comme des « équipes de nettoyage » qui débarrassent l'organisme de cellules usées (comme les globules rouges âgés) et de débris tissulaires (par exemple des tissus endommagés par blessure ou maladie). Cette dernière propriété est primordiale pour la cicatrisation et la réparation tissulaire.
3. Identifie et détruit des cellules anormales ou mutantes produites dans l'organisme. Cette fonction, qui est appelée surveillance immunitaire, est le mécanisme primordial de défense contre le cancer.

Pour remplir leur rôle les leucocytes emploient une stratégie de recherche et d'attaque, c'est-à-dire qu'ils gagnent les tissus agressés ou endommagés. Ils sont continuellement transportés par le sang depuis le site de leur production vers les zones où ils doivent intervenir.

Il y a cinq classes de leucocytes :

Il y a cinq classes de leucocytes – neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes et lymphocytes dont les caractéristiques de structure et de fonction sont différentes. Ils sont dans l'ensemble de plus grande taille que les érythrocytes.

II.2. Plaquettes et hémostase :

Il y a normalement environ 150000 à 350000 plaquettes par mm^3 de sang.

Les plaquettes sont des fragments cellulaires provenant des mégacaryocytes :

Les plaquettes (thrombocytes) sanguines ne sont pas des cellules proprement dites mais des fragments cellulaires qui se sont détachés par bourgeonnement de très grandes cellules résidentes de la moelle osseuse appelées **mégacaryocytes** qui proviennent des mêmes cellules souches indifférenciées que les érythrocytes et les lignées de leucocytes.

Un seul mégacaryocyte produit environ 1000 plaquettes.

Les plaquettes sont schématiquement des vésicules contenant un peu de cytoplasme du mégacaryocyte et entourées par un morceau de sa membrane.

Les plaquettes sont fonctionnelles pendant une dizaine de jours au terme desquels elles sont retirées de la circulation par les macrophages tissulaires de la rate et du foie essentiellement pour être remplacées par de nouvelles plaquettes qui sortent de la moelle osseuse [40].

II.3. La coagulation:

La coagulation correspond à une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la transformation par la thrombine du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui constitue

l'armature du caillot. Ce phénomène est localisé et régulé par un ensemble d'inhibiteurs physiologiques. Les dérèglements de ce système exposent à un risque de thrombose ou à un risque hémorragique [41].

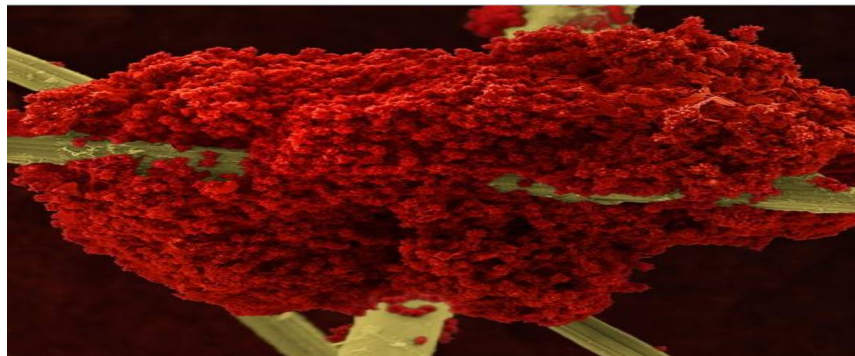


Figure II.3: Sang coagulé

II.3.1. Facteur de la coagulation :

Sont désignés par des chiffres romains et affectés du signe “a” lorsque le facteur est activé.

La synthèse de ces facteurs a lieu pour la plus part dans le foie. Pour certains, la synthèse dépend de la vitamine K ; on les appelle facteurs dépendant de la vitamine K .Ce sont les facteurs X, IX, VII, II [42].

A côté de ces facteurs plasmatiques, d'autres interviennent dans la coagulation, ce sont: laprékallicroïne dont l'activation aboutit à la formation de la kallicroïnekinogène de haut poids moléculaire (KHPM) [43].

II.3.2. Les étapes de la coagulation :

a. L'étapes de la génération de la prothrombinase:

Elle s'effectue selon deux voies :

La première voie dite intrinsèque qui implique des facteurs dits contacts à savoir le KHPM, la prekallicroïne, les facteurs XII, XI et d'autres facteurs plasmatiques qui sont les facteurs IX, X, V, II, le facteur III plaquettaire et le calcium.

Une deuxième voie dite extrinsèque qui implique l'activité des facteurs VIII, X, V, II, la thromboplastine tissulaire et le fibrinogène.

Il y a également une troisième voie dite voie cellulaire qui fait intervenir les monocytes et les macrophages.

b. L'étape de la thrombino formation:

Elle assure la formation de la thrombine à partir de la prothrombine grâce à l'activité catalytique de la prothrombinase.

c. L'étape de La fibrino formation:

Elle aboutit à la formation de la fibrine insoluble à partir du fibrinogène plasmatique [44].

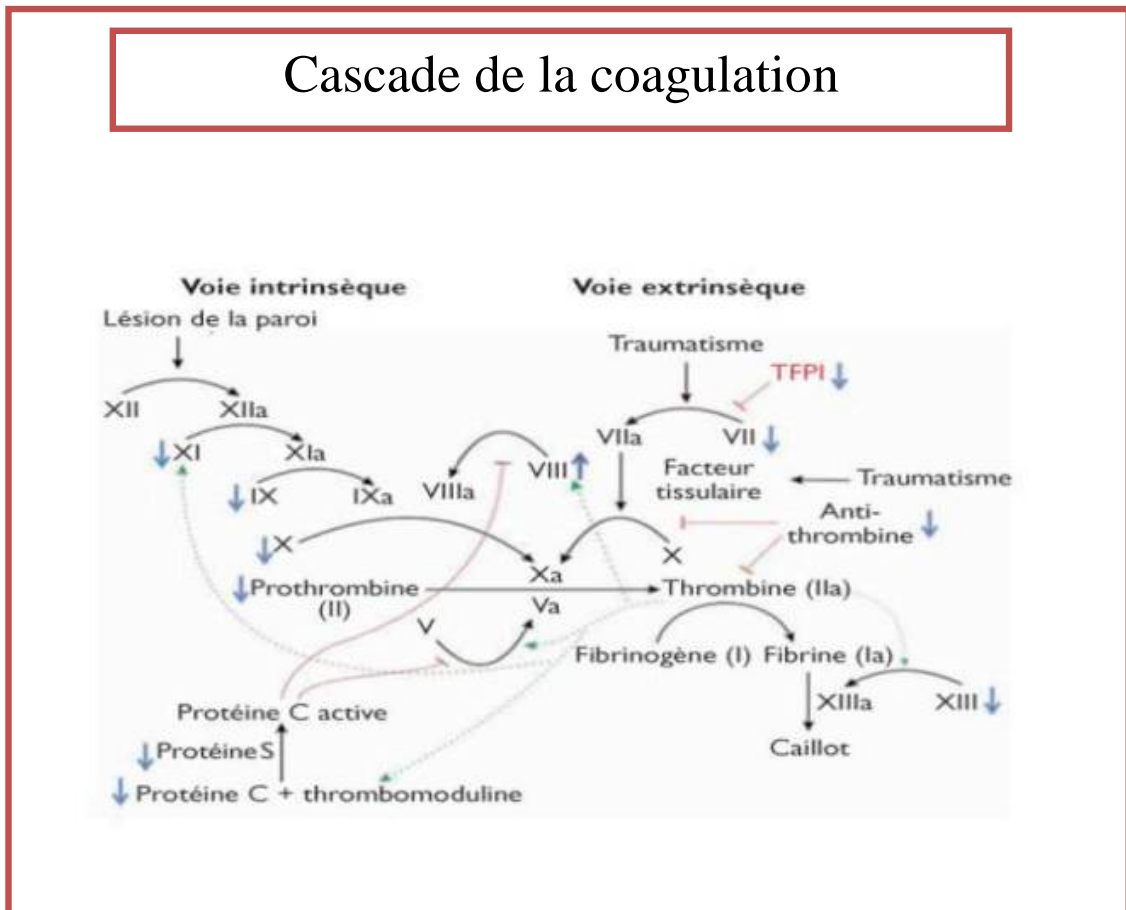


Figure II.4: Mécanismes de la coagulation

Tableau II.1 : Les facteurs de la coagulation, numéro de facteur, nom et particularités

N° de facteur	Nom	Particularité
Facteur I	Fibrinogène	
Facteur II	Prothrombine	Vit K dépendant
Facteur III	Thromboplastine tissulaire	
Facteur IV	Calcium	
Facteur V	Proaccéléline	
Facteur VI	Accéléline	
Facteur VII	Proconvertine	Vit K dépendant
Facteur VIII	Anti-hémoph A	
Facteur IX	Anti-hémoph B	Vit K dépendant
Facteur X	Stuart	Vit K dépendant
Facteur XI	Rosenthal	
Facteur XII	Hageman	
Facteur XIII	Stabilisant de fibrine	

II.4. L'hémophilie :

Le mot « hémophilie » provient de deux mots grecs : haima, qui signifie « sang », et philos, qui signifie « ami » [45].

II.4.1. Définition de la maladie:

L'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle à transmission récessive liée au sexe résultant d'un déficit en facteur VIII (FVIII) pour l'hémophilie A et en facteur IX (FIX) pour l'hémophilie B. L'hémophilie B est environ cinq fois moins fréquente que l'hémophilie A [46].

Il existe une bonne corrélation entre l'intensité du déficit en facteur antihémophilique et la gravité clinique de la maladie On définit ainsi :

- L'hémophilie sévère : Facteurs VIII ou IX : < 1 % ,
- L'hémophilie modérée : Facteurs VIII ou IX : 1 à 5 % ,
- L'hémophilie mineure : Facteurs VIII ou IX : 6 à 35 % .

II.4.2. Historique de l'hémophilie :

-Quand l'hémophilie a-t-elle été découverte ?

La découverte de l'hémophilie, qui n'avait pas encore de nom à l'époque, remonte à l'Antiquité. Le Talmud, recueil d'écrits hébraïques du II^e siècle avant Jésus-Christ, relate que les bébés mâles n'avaient pas besoin de subir la circoncision si deux de leurs frères avaient déjà succombé à cette intervention avant eux.

Abu Al-qasim Al-Zahrawi (1013-1106) fait mention d'une famille de Cordoue, en Andalousie, dont les hommes meurent des suites d'hémorragies consécutives à des blessures mineures.



Mousa Ibn Maimoun (1135-1204) applique la règle concernant la circoncision à une famille en Égypte.



En 1803, un médecin de Philadelphie, le Dr John Conrad Otto, publie un traité sur une certaine prédisposition hémorragique familiale. Il décrit que la maladie est héréditaire et transmise de mère en fils. Il parvient à retracer l'origine de la maladie à une femme qui s'était établie près de Plymouth, dans le New Hampshire, en 1720.

II.4.3. Épidémiologie de l'hémophilie :

-Dans le monde :

L'hémophilie affecte 1 cas sur 10000 naissances dont 80% sont des hémophiles A et 20% des hémophiles B. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il existe actuellement 400 000 cas d'hémophiles dans le monde.

En Algérie : L'Algérie compte quelque 1600 malades recensés par l'Association algérienne des hémophiles (AAH), mais ils seraient plus de 3000 à souffrir de cette maladie orpheline qui touche – sauf cas très rares

– les garçons et qui se caractérise par une grave insuffisance dans la coagulation du sang [47].

II.4.4. Comment démarrer et arrêter le saignement ?

Le sang circule dans le corps à travers les vaisseaux sanguins, on peut résumer le processus de saignement et d'arrêter ce saignement à les points suivants (voir la figure II.5)

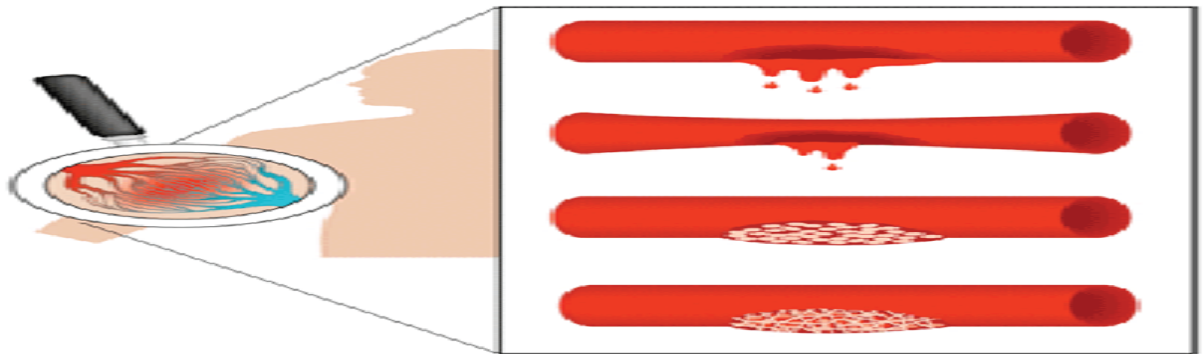
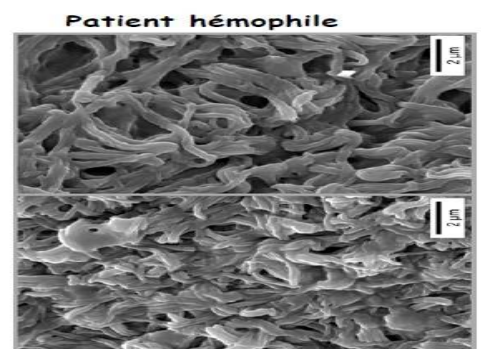
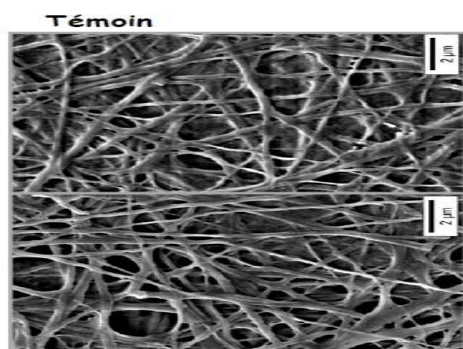


Figure II.5: Étapes pour démarrer et arrêter le saignement

- ✓ l'hémorragie commence lorsque le vaisseau sanguin est exposé à l'infection et le sang se dégage vers l'extérieure.
- ✓ Le vaisseau est diminué pour aider à ralenti l'hémorragie.
- ✓ Les plaquettes sanguines forment un bouchon pour remplir le trou.
- ✓ Enfin, un grand nombre des facteurs se rassembler et déposé sur le bouchon qui se conduit à arrête l'hémorragie.



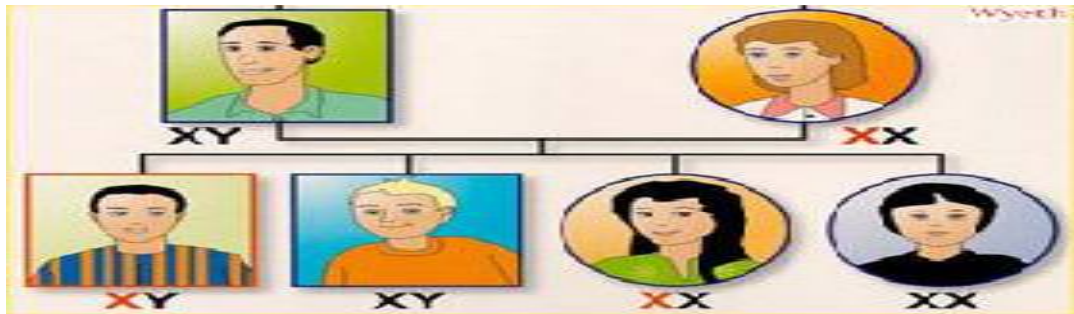
II.4.5. Transmission génétique de l'hémophilie

Trois situations peuvent se présenter :

Si on désigne par X le gène porteur de l'anomalie (sur les figures ça correspond à X écrit en rouge), et par X le gène sain, on aura :

1. Une femme porteuse de l'anomalie (XX) mariée à un homme sans anomalie XY:

- Leurs filles peuvent être : sans aucune anomalie (XX) ou porteuses de la maladie (XX)
- Les garçons peuvent également être : sains ou hémophiles (XY).



2. Une femme non porteuse (XX) mariée à un homme hémophile (XY):

- Leurs filles seront toutes porteuses de la maladie (XX)
- Leurs fils seront tous sains (XY)



3. Autres causes peuvent être à l'origine d'hémophilie chez les femmes :

- Inactivation fortuite pendant l'embryogénèse d'une majorité de X portant l'allèle normal.
- Syndrome de Turner (XO)
- Translocation X/autosome

Isodomie maternelle du X (non disjonction au cours de la deuxième division de méiose), on a alors un zygote avec 2 X identiques maternelles à condition que le X du spermatozoïde ayant participé à la fécondation ait été éliminé.

Pourtant, la notion d'hérédité n'est pas retrouvée chez tous les hémophiles. Dans environ 1/3 des cas, il s'agit d'une mutation spontanée du gène au niveau d'un chromosome X. cette néo-mutation peut avoir lieu dans l'ovule de la mère ou les spermatozoïdes du père, ou plus tard chez le fœtus lui-même. Cependant, cette mutation, bien que spontanée, va se transmettre de façon héréditaire à la descendance du patient [48].



Partie II :
Partie
expérimentales

Chapitre III :

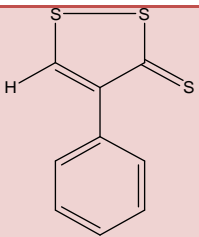
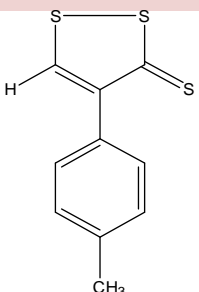
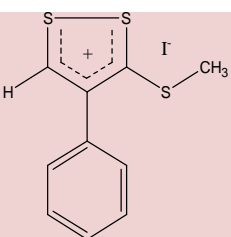
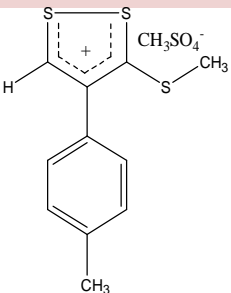
*Activité antioxydante
et activité anti
coagulant*

III.1. Activité antioxydante :

III.1.1. La structure des composés étudiés:

Les composés dithiolethioneset leurs dérivés étudiés dans ce travail sont représentés dans le tableauIII.1:

TableauIII.1: Les structures et les abréviations des dérivés dithioliques [36]

Composé étudié	Structure	Nom (abréviation)
A		4-phényl-1,2-dithiole-3-thione p.f = 120 °C
B		4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione p.f = 130 °C
A1		3-méthylthio-4-phényl-1,2-Dithiolylium (contre) ion (I ⁻) p.f = 224 °C
B1		3-méthylthio-4-p-tolyl-1,2-dithiolylium (contre) ion (CH ₃ SO ₄ ⁻) p.f = 230 °C

III.1.2. Test de Phosphomolybdate (PM)

L'analyse de Molybdate Phosphate est un essai direct qui on emploi principalement pour mesurer la possibilité et la puissance des antioxydants non enzymatique.

Cette méthode dépend de la réduction du Molybdate (VI) au Molybdate (V) et la formation d'un complexe de Molybdate Phosphate de couleur verte, qui est détectée par spectrophotométrie en mesurant le changement de l'absorption à 695 nm [16].

a. Préparation du réactif de molybdate

On prépare 500 ml d'un mélange des trois solutions suivantes :

- 0,6 mM acide sulfurique
- 28 mM phosphate sodium
- 4 mM molybdate ammonium

b. Procédure

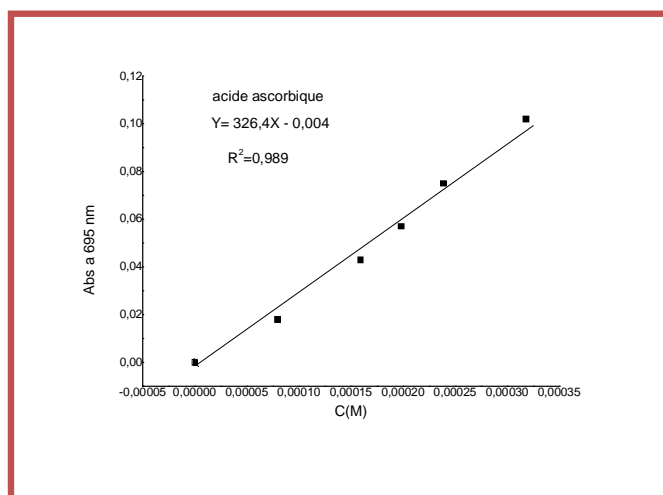
0.1ml de chaque dithiolethione dilué est ajouté à 1ml du réactif de molybdate. Le mélange est placé dans un bain marie à une température de 95 C° pendant 90 min, après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm.

L'acide ascorbique a été utilisé comme standard [49].

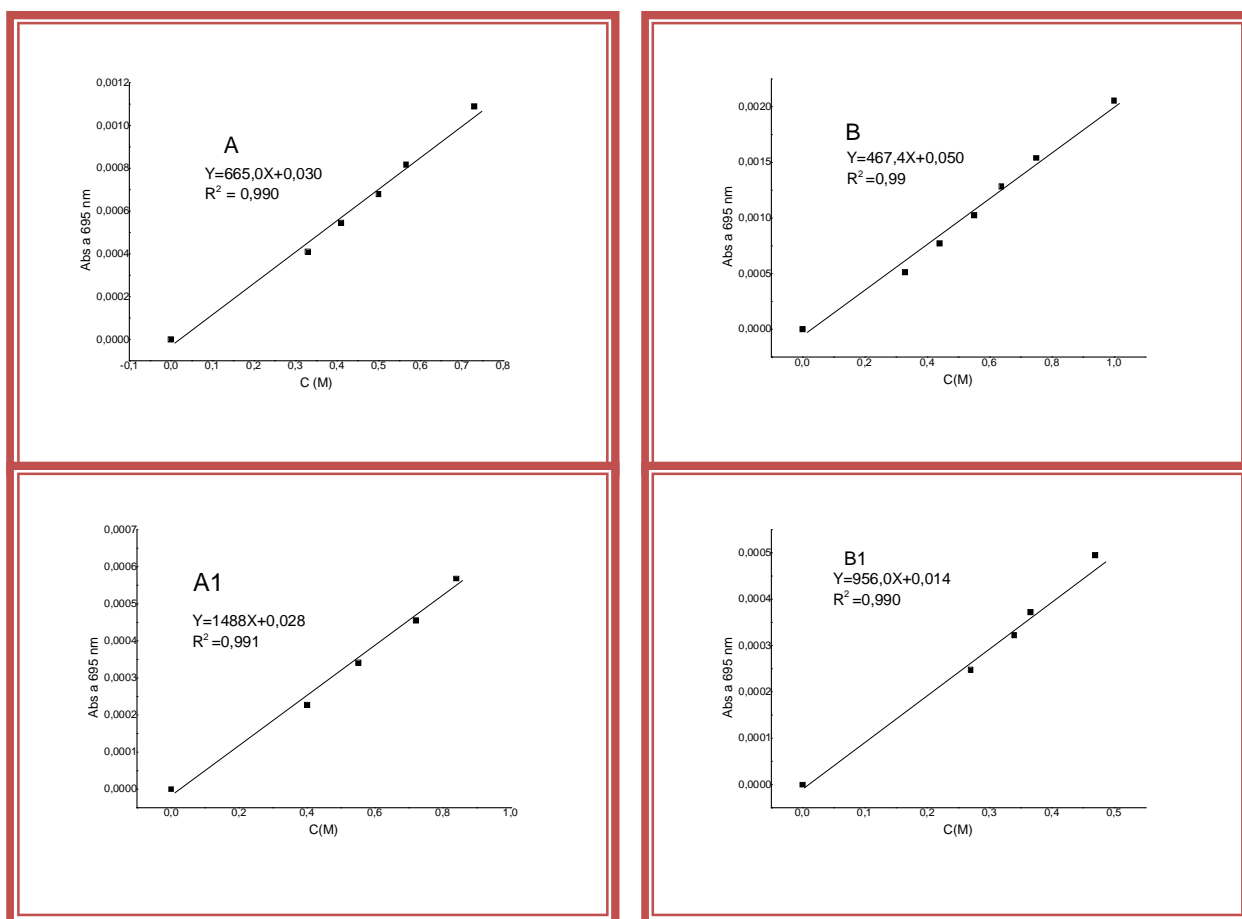
c. Résultats et discussion :

L'activité antioxydante est mesurée selon un nouveau terme appelé **AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity)**. On définit l'AEAC comme la concentration molaire de la solution d'acide ascorbique qui possède un pouvoir réducteur équivalent à solution de concentration 1 M de composé étudié.

L'évolution de l'activité antioxydante de nos produits est comparée par rapport à l'acide ascorbique (vitamine C) et cela en traçant une courbe d'étalonnage de ce dernier.



FigureIII.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C)



FigureIII.2: Courbes représentant le pouvoir réducteur de dithiolethions étudiés.

Le coefficient de détermination des propriétés antioxydante a été déterminé en utilisant le programme Origin 8. On résume les résultats des tests du pouvoir réducteur dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Les résultats de test du pouvoir réducteur (AEAC)

Échantillons	Activité antioxydante AEAC (M)
A	2.166
B	1.7656
A1	4.314
B1	2.73

La présence des antioxydants dans les échantillons aurait comme conséquence la réduction de Mo (VI) en Mo (V) en donnant un électron.

La croissance d'absorbance à 695 nm indique une augmentation des capacités réductrices. On a constaté que les activités réductrices de tous les dithiolethiones étudiés ont également augmenté avec l'augmentation de leurs concentrations.

Nos composés ont montré une bonne activité réductrice qui était comparable à l'acide ascorbique. L'efficacité de la réduction du molybdate est directement proportionnelle à la valeur AEAC, elle est dans l'ordre croissant selon le classement suivant :

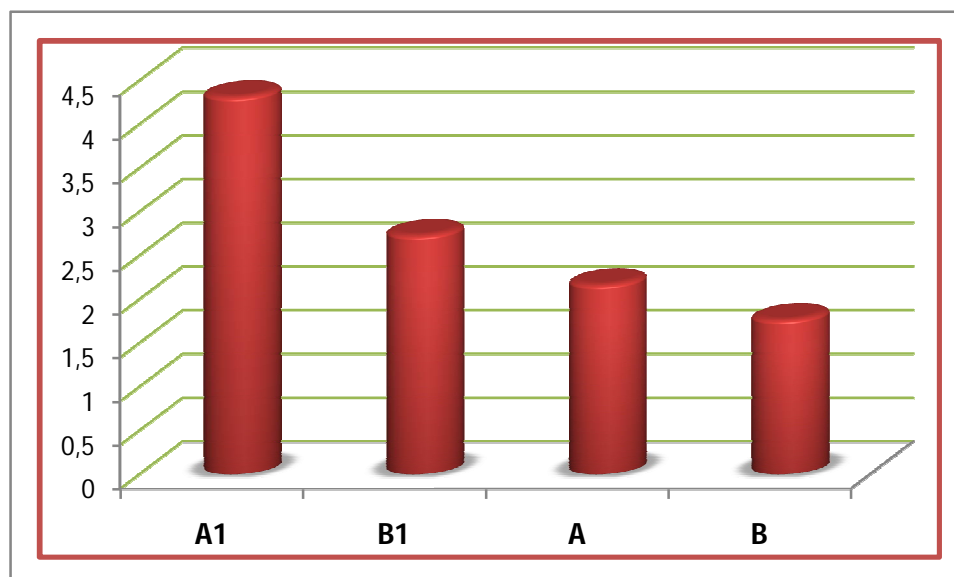


Figure III.3 : Classification de la capacité réductrice selon les valeurs d'AEAC

Les résultats obtenus dans le tableau III.2 montrent que les composés étudiés possèdent une activité antioxydante très variée et les valeurs d'AEAC sont entre 1.7656 M et 4.314M.

La valeur d'AEAC la plus faible est signalée pour le composé **B**. En effet, l'AEAC la plus élevée est enregistrée pour le **A1** et **B1** (4.31 M et 2.73 M respectivement).

On peut expliquer ces résultats par le potentiel d'oxydation des composés étudiés, c'est à dire si le dérivé dithiolique possède un potentiel d'oxydation faible, il donnera des électrons pour participer à la réduction des Mo (VI), ce qui conduit à une bonne activité réductrice.

Encore, un autre critère pris en considération pour l'activité réductrice : c'est le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule à laquelle correspond l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant [36].

Le composé **A1** présente une grande capacité réductrice, nous attribuons ce résultat au faible potentiel d'ionisation PI=198.919Kcal/mol.

Les valeurs de PI sont regroupées dans le tableau III.3:

Tableau III.3 : Les valeurs de PI

Composé étudié	PI (Kcal/mol)
A	206.114
B	205.469
A1	198.919
B1	208.236

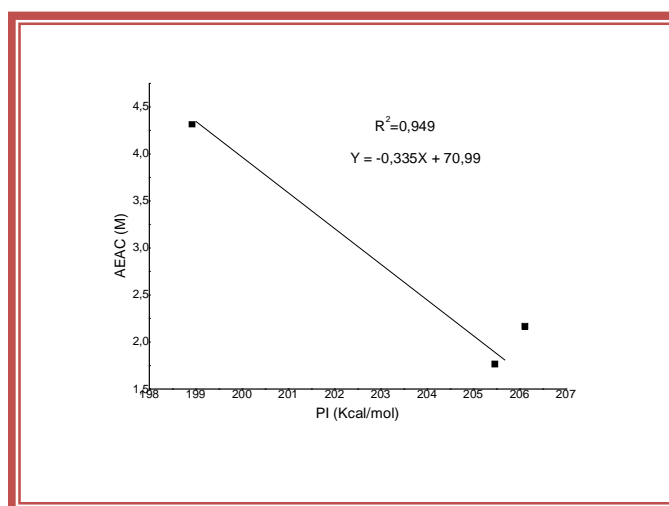


Figure III.4 : La relation d'AEAC avec le potentiel d'ionisation

Nous rappelons que les composés entrant dans cette corrélation sont : tous les dérivés dithioliques sauf **A1**.

En conclusion, selon la figure III.4 (corrélation AEAC vs PI), nous pouvons dire que presque tous nos dithiolethiones sont des composés réducteurs.

Aussi, un autre critère peut être influé sur l'activité réductrice : c'est le coefficient de partage eau/n-octanol (Log P) qui est une mesure de la solubilité différentielle des composés chimiques dans deux solvants non miscible, donc pour la discussion sont basé sur la courbe d'AEAC avec le coefficient de partage [34].

Les valeurs de Log P sont regroupées dans le tableau III.4.

Tableau III.4: Les valeurs de Log P

Dithiolethiones	Log P
A	3.23
B	3.49
A1	1.947
B1	1.24

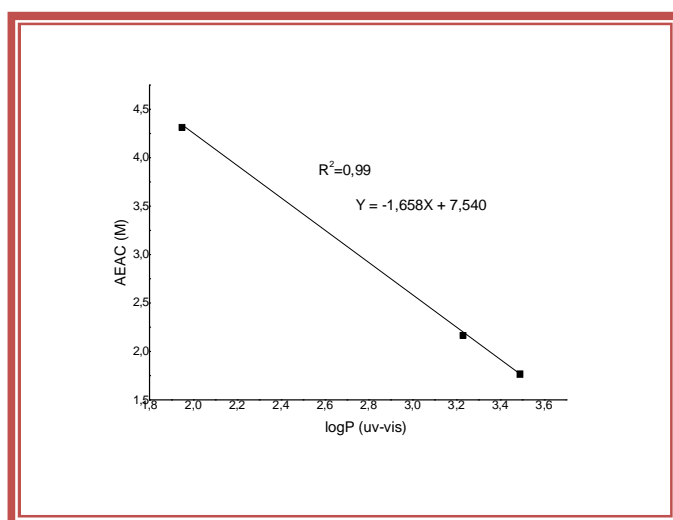


Figure III.5 : La relation d'AEAC avec le coefficient de partage

Nous avons trouvé une bonne corrélation entre la capacité réductrice et le coefficient de partage avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,99$ (voir la figure III.5).

Nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont: tous les dithiolethiones étudiés sauf le composé **B1**.

A la lumière de ces résultats, les composés qui ont une faible lipophilie donnent une grande capacité réductrice.

III.2. Activité anticoagulant :

La coagulation sanguine peut être déclenchée par les voies intrinsèque et/ou extrinsèque, ces deux voies constituant l'hémostase.

C'est pourquoi des bilans d'hémostase sont fréquemment pratiqués, par exemple avant tout acte chirurgical. la plupart de ces analyses médicales reposent sur la mesure de temps de coagulation. Ainsi la voie intrinsèque est explorée par le temps de céphaline + activateur et la voie extrinsèque est explorée par le temps de quick.

En dehors de la numération plaquettaire, le temps de céphaline + activateur (TCA) (appelé aussi TCK si l'activateur de contact utilisé est le kaolin) et le temps de quick (TQ), improprement dénommé TP (taux de prothrombine) sont les deux examens biologiques les plus fréquemment prescrits pour le dépistage d'une maladie hémorragique, qu'elle soit acquise ou constitutionnelle.

Partie pratique:

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de sang dans l'hôpital Mohamed BOUDIAF de (**Ouargla**) service d'hématologie.

Nos recherches ont pour but de faire des explorations d'hémostase : **TCK**, **TP**, à fin de détecter d'éventuelles anomalies sanguines chez les patients d'hémophilie et un volontaire sain.

III.2.1. Temps de Céphaline Kaolin (TCK) :

a. Principe :

C'est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté en présence d'un équivalent des phospholipides plaquettaires (la céphaline), de Ca⁺² et d'un activateur de la phase contact (kaolin, silice, cérite, acide ellagique....) [50].

Les valeurs de référence chez l'adulte sont habituellement comprises entre 30 et 40 secondes (selon le réactif utilisé).

Un allongement significatif du TCA est défini par un rapport temps malade/temps témoin supérieur à 1,2.

b. Echantillonnage :

Préparation des échantillons Pour le dosage de **TP** et **TCK**, il faut suivre les étapes mentionnées: Le plasma pool déplaquettés est un mélange de plasmas déplaquettés de 2 volontaires sains non traités.

Aussi, nous avonstravaillé sur un plasma d'un malade d'hémophilie.

- Prélever du sang sur citrate tri sodique par ponction veineuse.
- Centrifuger à 40 tours/minute et laisser sédimenter afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

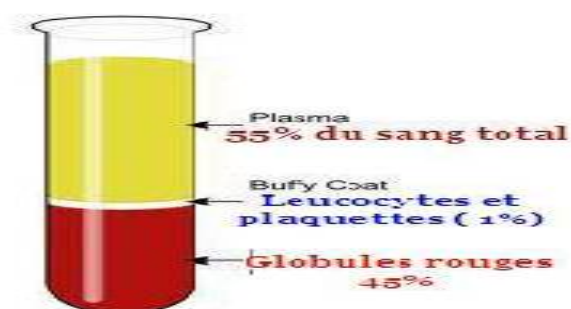


Figure III.6: Tube Citrate après centrifugation

- Le test doit être réalisé dans les quatre heures qui suivent le prélèvement.
- Laisser le plasma à une température entre 20 à 27°C avant le test.

c. Matériel :

- Centrifugeuse
- Bain-marié à 37°C
- Micropipettes réglables (50-200 (J.I))
- Tubes à hémolyse
- Chronomètre
- Appareil de mesure

d. Réactifs:

- Céphaline plus Kaolin à reconstituer selon les recommandations du fabricant.
- Solution Chlorure de calcium (CaCl_2) à 0,025 M.
- Plasma pauvre en plaquettes (PPP)



Figure III.7: Appareil de mesure coagulomètre (thrombotimer 1)

e. Mode opératoire (TCK):

La technique peut se faire soit avec un coagulomètre et bain-marie, on utilise ce dernier à une température constante 37°C.

Les réactifs du TCK sont reconstitués à l'avance, en diluant le réactif (Daptin® TC) par l'eau distillée, Ensuite, on dépose le réactif dans les eppendorfs qui doivent être conservés à 2-8°C.

- prendre 4 tubes à hémolyse de 5 ml et verser dans chaque tube 240µl Plasma (témoin, malade et contrôle)
- verser dans chaque tube 60µl de dithiolethiones (A – A1 – B – B1)
- placé dans un bain marie à 37°C pour mélanger/ incuber exactement pendant 5 à 15 min
- Pour débiter la manipulation, préchauffer la solution de CaCl₂ et le réactif reconstitué Daptin® TC à 37°C,
- Puis on met deux cupules (pour avoir la moyenne) dans les puits de L'appareil coagulometre et on distribue la bille magnétique. Ensuite introduit dans chaque cupule : 100 µl d'échantillon de (plasma+DTT)
- Agiter par le vortex et incuber 3 minutes exactement à 37°C
- ajouter 100 µl de la solution de TCK
- Puis ajouter 100 µl de la solution de CaCl₂ 0,025 M (25 mmol/L ; 37°C)
- puis noter le temps de coagulation.

f. Résultats et discussion:

Tableau III.5 : Les résultats de dosage TCA de témoin

Composé étudié	A	A1	B	B1	Contrôle
TCA (s)	53.1	50.1	43.5	50	38.2

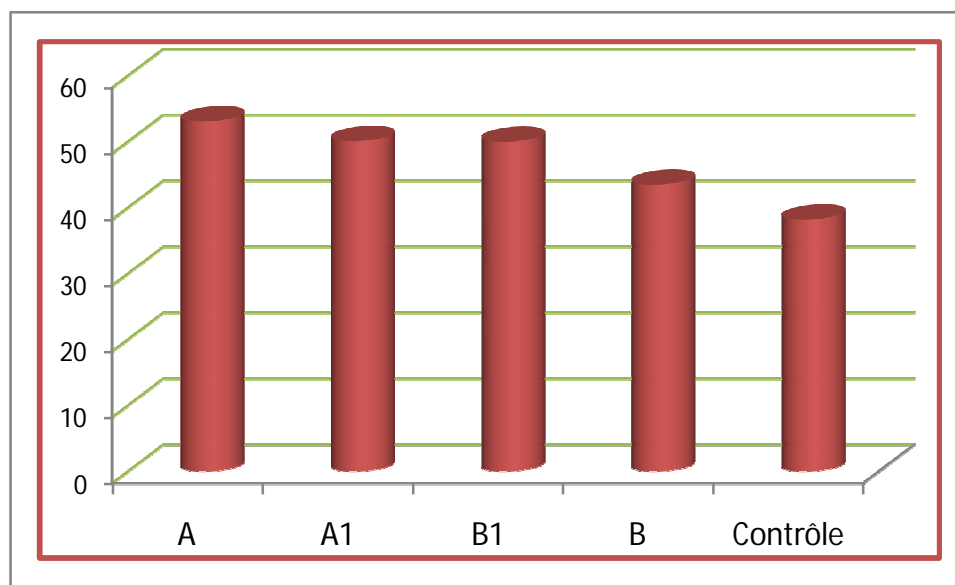


Figure III.8: Classification des valeurs TCA de témoin

Les résultats est exprimé en secondes par rapport à un témoin (mélange de plasmas de sujets normaux) dont la valeur se situe en moyenne entre 25 et 40 seconde selon le réactif utilisé

Le TCA du patient est considéré comme allongé s'il excède de 20% celui du témoin [50].

Le TCK est allongée dans les cas suivants :

- Déficit important en fibrinogène (inférieur à 1g/l)
- Déficit en facteurs anti-hémophiliques A et B et en facteur XII et XI.
- Déficit acquis des facteurs K-dépendant.

Tableau III.6 : Les résultats de dosage TCA de malade

Composé étudié	A	A1	B	B1	Contrôle	Malade pure	Témoin Pure
TCA (s)	124.2	253.4	150.7	28.1	38.2	38	25.4

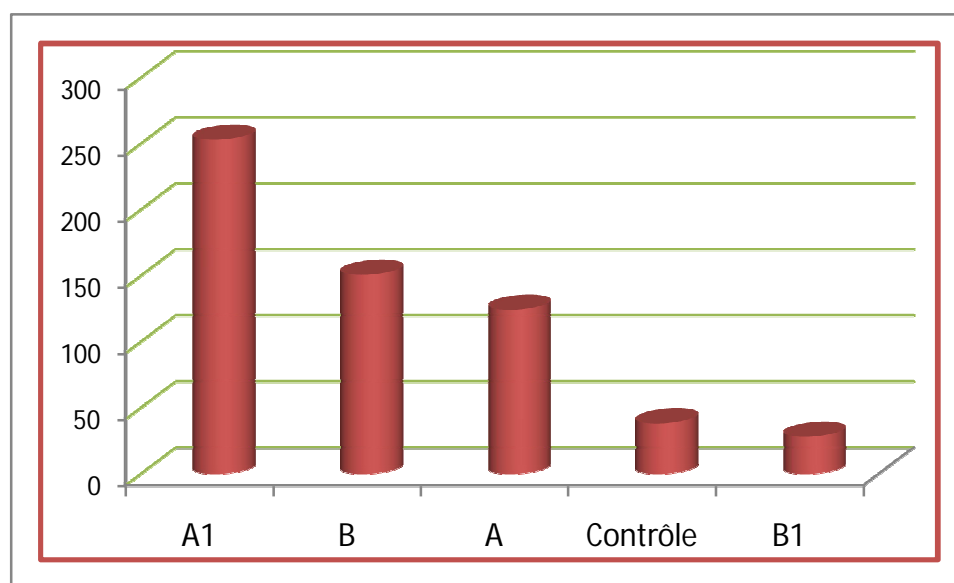


Figure III.9: Classification des valeurs TCA de malade

À la lumière des résultats obtenus, il apparaît clairement que les dithiolethiones étudiées exercent une activité anticoagulante positivement.

En effet, les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre le contrôle négatif (38.2 Sec) et le plasma standard (25.4 Sec pour le volontaire sain) ce qui confirme que l'effet de DMSO sur la coagulation est négligeable, alors qu'en présence des dithiolethiones l'allongement du TCK est significatif.

Le dérivé dithiolique **B1** présente un faible temps de TCA 28.1 Sec inférieur au contrôle, Nous pensons que cette molécule exerce un effet coagulant.

Nous observons que la 4-tolyl-1,2-dithiole-3-thione **B** présente un fort temps de TCA, par contre le faible temps est le sel B1 (résultat de patient d'hémophilie). Cette remarque s'explique par l'influence du facteur de lipophilie.

Donc, nous devons établir une relation entre le temps TCA et le coefficient de partage $\log P$

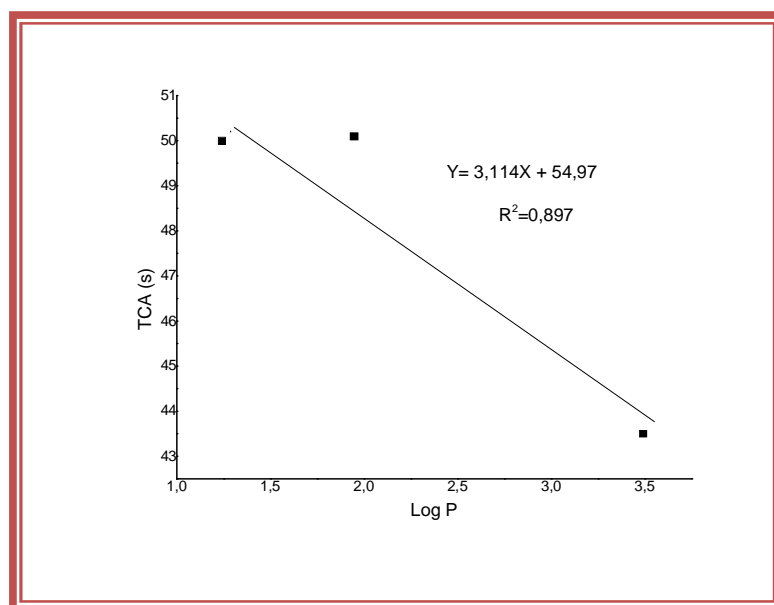


Figure III.10: La relation de TCA témoin avec le coefficient de partage

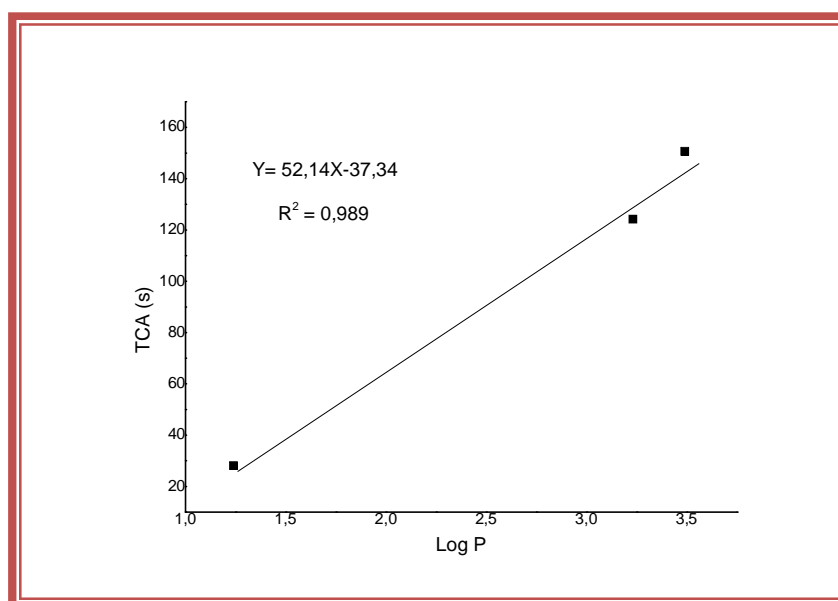


Figure III.11: La relation de TCA malade avec le coefficient de partage

A cause de la nature de plasma, l'effet de la lipophilie est très important permettre de diffuser les anticoagulants à travers de celle-ci.

Jared Blum. Et *Coll.* ont constaté que l'effet anticoagulant par la Dabigatran (médicament anticoagulant lipophile utilisé à USA) est corrélé avec la lipophilie [51].

En générale, à la comparaison des résultats de malade d'hémophilie et le témoin nous trouvons que les dérivés dithioliques donnent une activité anticoagulante très importante bien que le malade administre leur médicament qui contient les facteurs coagulante au matin de réalisation les expériences de mesure le TP et le TCA.

III.2.2. Le temps de quick TQ

a. Principe :

Le temps de Quick est le temps nécessaire à la coagulation du plasma traité dans une certaines conditions. Cela permet d'explorer les facteurs de la coagulation dits vitamine K dépendants.

Il est possible de convertir ce temps en taux de prothrombine **TP** par rapport à un plasma témoin définit à 100 % (ou pourcentage d'activité prothrombique globale)

b. Mode opératoire(TP) :

- Thromboplastine calcique (Néoplastine® CI) = Tube TP est préalablement Chauffé à 37°C (15 minutes), puis on met deux cupules (pour avoir la moyenne) dans les puits de l'appareil coagulometre et on distribue la bille magnétique.
- Dans chaque cupule on introduit : 100 µl plasma du patient.
- Agiter la cupule par le vortex et incubé 3 minutes exactement à 37°C.
- Puis ajouter 100 µl de la solution de Thromboplastine (réactif Néoplastine®)
- noter le temps de coagulation(en seconde).
- La dernière étape consiste à ranger les réactifs, décontaminer le matériel utilisé et le ranger, retirer les gants et les jeter dans la poubelle adéquate, enregistrer les résultats et faire la transmission en tenant compte de la confidentialité.

c. Résultats et discussion:

Tableau III.7 : Les résultats de dosage TQ

Composé étudié	A	A1	B	B1	Contrôle	Malade pure	Témoin pure
TQ(s)	78.4	66.5	37.2	38.4	15	11.5	11.5
TP (%)	3.8	4.9	11.5	11	/	100	100

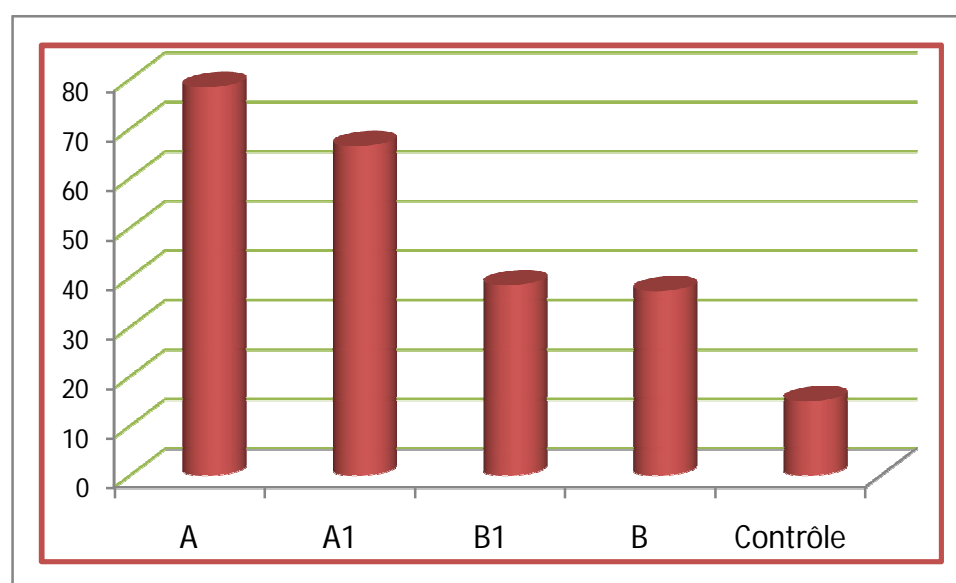


Figure III.12: Classification de les valeurs TQ

Les résultats obtenus lors de la mesure du TQ peuvent varier avec l'origine de la thromboplastine, la normale étant de 10 à 14 secondes .c'est pourquoi le TQ est converti en pourcentage d'activité (appelé improprement "taux de prothrombine ") par rapport à un plasma témoin dont différentes dilutions ont permis de tracer une droite d'étalonnage.la normale se situe entre 70 % et 100 % d'activité .le taux vraie physiologiquement peu avec l'âge, sauf au moment de la naissance ou il peut baisser jusqu'à 15% pour revenir a la normale vers le huitième jour [50].

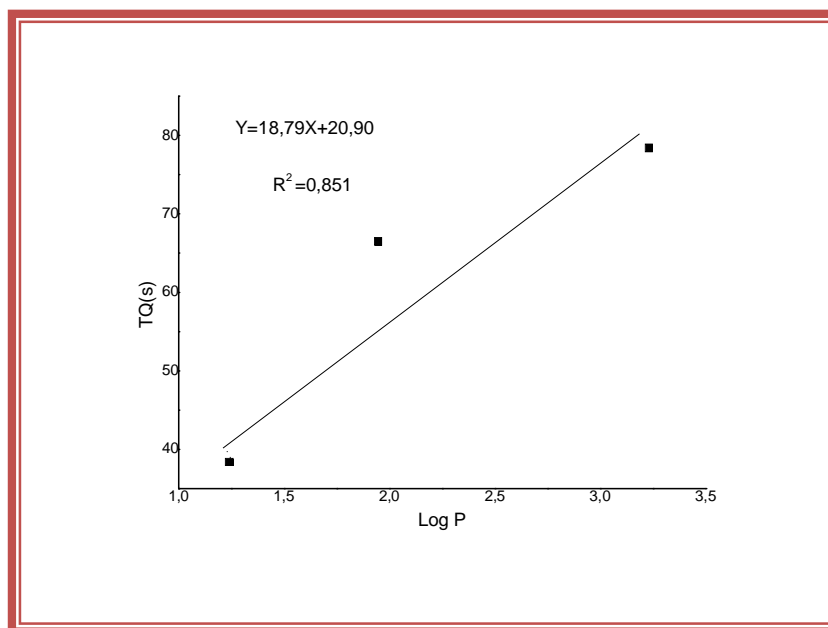


Figure III.13: La relation de TQ avec le coefficient de partage

Nous avons trouvé une bonne corrélation entre le TQ et le coefficient de partage avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,851$.

Nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont : tous les dithiolethiones étudiés sauf le composé A1.

A la lumière de ces résultats, les composés qui ont une faible lipophilie donnent un faible temps de quick.

*Conclusion
générale:*

Conclusion générale:

Au cours de ces travaux, nous avons étudié deux composés dithiolethiones et leur dérivés :

- 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione (**A**)
- 3-méthylthio-4-phényl-1,2- Dithiolyliumcontreion (Γ) (**A1**)
- 4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione(**B**)
- 3-méthylthio-4-p-tolyl-1,2- dithiolyliumcontreion (CH₃SO₄⁻) (**B1**)

Comme nous avons étudié les propriétés physicochimiques de quelques dithiolethiones.

Ce travail est une contribution à l'étude de l'activité antioxydante des dithiolethiones et l'effet anti coagulation de ces composés.

Enfin, pour les dithiolethiones nous trouvons que le composé 4-phényl-1,2-dithiole-3- thione a une grande capacité réductrice **AEAC=0,460 M**, cependant le composé A1 donne une faible valeur d'**AEAC=0,301M**.

Alors les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que l'ensemble des composés étudiés présentent de très bonnes propriétés antioxydantes.

Notre travail de PFE "Paramètres de l'Hémostase (TP, TCK) et le suivi des patients hémophiles de sang au sein du laboratoire du sang " Ouargla " ; nous donne l'occasion de confirmer l'intérêt pratique des tests du taux de prothrombine (TP), du temps de céphaline

Kaolin (TCK), Ces paramètres jouent un rôle à la fois dans le diagnostic et le suivi thérapeutique.

Les dithiolethiones étudiées présentent une activité anticoagulation très importante.

Ce travail a aussi permis d'établir la relation et le rôle des trois responsables sanitaires, qui sont le médecin, le biologiste et le pharmacien, qu'on peut aussi appeler, les trois points du triangle de sanitaire dont leurs fonctions sont attachées et enchaînées.

*Référence
bibliographique:*

Références bibliographiques

- [1] Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. et Chapelle J.P. ; *Rev Med Liege*, **62(10)**, p. 628 (2007).
- [2] Favier A.; *L'actualité Chimique*, p108 - 115 (2003).
- [3] Benaissa B., thèse de doctorat, université de Toulouse (2012).
- [4] Halliwell B. ; *Br J Exp Pathol*, **70**, p 737 - 757(1989).
- [5] Paster J. O. C., thèse de doctorat, université de Paul-Sabatier de Toulouse, (2005).
- [6] Lee J., Koo N. et Min D.B., *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*,**3**, p 21-33, (2004).
- [7] Sies H.; *Am J Med.*,**91**, p 31-38, (1991).
- [8] Igor P. L. B., thèse de doctorat, université de Mali (2003).
- [9] Lisu W., Jui H. Y., Hsiao L. L. et Ming J. W.; *Journal of Food and Drug Analysis*, **11(1)**, p 60-66 (2003).
- [10] Cavin A. L., thèse de doctorat, université de Genève, p. 24 (2007).
- [11] Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A. et Bora U.; *Food Res Int*, **41**,p 1–15(2008).
- [12] Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A. et Saura-Calixto F.; *J. Sci Food. Agric*, **76**, p 270–276(1998).
- [13] Sanchez-Moreno C., *Food Sci Tech Int*, **8(3)** p 121-137(2002).
- [14] Cao G.H., Alessio H.M. et Cutler R.G.; *Free Radical Biol Med*, **14**, p 303-311(1993).
- [15] Miller, N. J., Rice-Evans C, Davies M. J. Gopinathan V. et Milner A. ; *Clin Sci*, **84**, p 407–412(1993).
- [16] Benzie I. F. F. et Strain J. J.; *Analytical Biochemistry*, **239**, p 70-76(1996).
- [17] Brand-Williams W., Cuvelier M. E. et Berset C.; *Food. Sci. Technol*, **28**, p 25–30(1995).
- [18] Oldham Li. C., May C. D. , S.W.N.; *Biochem. J.*, **300**, p 31-36(1994).
- [19] Winston G.W., Regoli F., Dugas A., Fong J. J. H. et Blanchard K. A.; *Free Radical Biol. Med*, **24**, p 480–493 (1998).
- [20] Wayner D. D. M., Burton G. W., Ingold K. U. et Locke S.; *FEBS Letters*, **187**, p 33-37(1985).
- [21] Popov I., Lewin G. et Baehr R.; *Biomed Biochim Acta*, **46**, p 775–779(1987).
- [22] Charfi D., Thèse de doctorat, université de Sfax.(1995).
- [23] Nicolas R., Chimie organique : 2. Hétéro éléments, stratégies de synthèse et chimie organométallique, De Boeck Supérieur, p 189(2009).

Référence bibliographique:

- [24] O'dwyer P. J., szarka C., brennan J. M., laub P. B. et GALLO J. M.; *Clinical Cancer Research*, **6**, p 4692–4696 (2000).
- [25] Zhang Y. et munda Y.; *Mol Cancer Ther*, **7(11)**, pp 3470-3479 (2008).
- [26] Fields E.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, p 4255 (1955).
- [27] Mollier Y. et lozach N.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, p 614 (1961).
- [28] Saïdi M., Thèse de Doctorat, l'université de Rennes 1, (1988).
- [29] Dietzsch W., Olk R. M., Puaux J. P. et Anorg Z.; *Allg. Chem.* **31** p 600 (1991).
- [30] Rahmani Z., Saïdi M., Dakmouche M. et Yousfi M., *Journal of Life Sciences*, **8(1)**, p82-88(2014)
- [31] Chollet M., Thèse de Doctorat de l'université de Rennes 1, (1997).
- [32] Chollet M., Legouin B. et Burgot J. L., *Chem J. Soc., Perkin Trans.*, **2**, p2228-2229 (1998)
- [33] Kehl, N.L.; Jeffrey, G. A, *Acta cryst.*, **11**,p 813(1958)
- [34] Bona M., Thèse de Doctorat de l'université de Rennes **1**, (1995)
- [35] Rahmani Z., Saïdi M. et Dakmouche M., *Annales des Sciences et Technologie*, **6(2)**, p 129-131 (2014).
- [36] Rahmani Z., thèse de doctorat, université d'ouargla, (2015).
- [37] Dakmouche M., thèse de doctorat, université d'ouargla, (2014).
- [38] Medkour T., thèse de doctorat université de Paris XII, (2008).
- [39] Bouckert I. V., walravens Th et isicht M., *Revue scientifique des ISILF*, **19**, p 91-107(2005).
- [40] Lauralee Sh, physiologie humaine, 2^e édition, de boeck (2006).
- [41] Butenaset S., Mann K. G., *Biochemistry (Moscow)*, **67(1)**, p. 3-12 (2002).
- [42] Weston B.W. et. monahan P. E., *Haemophilia*, **14**, p. 1209–1213(2008)
- [43] Monsieur I. P.B., thèse de doctorat, université de Mali (2003)
- [44] James P. R., Bradley E. A., Christine M., David P. L., *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, **24(3)**, p 123-131(2007).
- [45] Belhani M., *Santé-MAG*, **7**, p.22-23, (2013).
- [46] Sonny I. G., thèse de doctorat, université Cheikh antadiop de DAKAR (2006).
- [47] Santé M - **05** p 37 Avril (2012)
- [48] Rkain M., thèse de doctorat, université de de Rabat p7-25(1981)
- [49] Prieto P., Pineda M. et Aguilar M., *Anal Biochem*, **269**, p 337-341(1999).
- [50] Kramoroff A., Thèse de Doctorat de l'université de cergy-pontoise, p.37 (1999).

Référence bibliographique:

[51] Jared B., Stephanie C., et Jason B. Hack, *Academic Emergency Medicine*, **20(10)**, (2013).

Résumé

Ce travail vise à étudier l'activité réductrice des dithiolethiones qui sont déterminées selon la méthode de Phosphomolybdate (PM), basée sur la réaction chimique de réduction du Molybdate (VI) au Molybdate (V).

Ainsi, les dithiolethiones présentent une activité anticoagulante très importante, pour cette raison nous étudions l'effet d'anticoagulante des dithiolethiones.

Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que l'ensemble des composés étudiés présentent de très bonnes propriétés antioxydantes comparativement aux antioxydants pris comme référence.

Et les composés dithioliques donnent une activité anticoagulante très importante Sauf le dérivé dithiolique **B1** cette molécule exerce un effet coagulant.

Mots clés : dithiolethiones, le stress oxydant, anti coagulation, Molybdate.

ملخص:

يعتبر هذا العمل مساهمة في دراسة النشاطية المضادة للأكسدة للمركبات ثنائي ثيولثيون الحلقي، حيث نحددها بطريقة مولبيدات الفوسفور التي تعتمد على إرجاع مولبيدات (VI) إلى مولبيدات (V).

أيضاً، مركبات ثنائي ثيولثيون لها دور كبير في النشاطية المضادة للتخثر، و لهذا السبب قمنا بدراسة نشاطية المضادة للتخثر لمركبات ثنائي ثيولثيون. نتائج هذه الأعمال سمحت لنا بالتأكد من أن جميع المركبات المدروسة لديها خصائص مضادة للأكسدة معتبرة مقارنة بمضادات أكسدة التي أتخذت كمرجع.

كل المركبات الثيولية المدروسة كانت لها خاصية مضادة لتخثر ما عدا المركب **B1** فكانت له خاصية مخثرة

الكلمات الدالة: مركبات ثنائي ثيولثيون الحلقي، مضادات الأكسدة، مضادات التخثر، المولبيدات.

Abstract :

This work aims to study the reducing activity of dithiolethiones which are determined by the method of phosphomolybdate (PM), based on the chemical reaction of reduction of molybdate (VI) in Molybdate (V).

Thus, dithiolethiones have very significant anticoagulant activity, for this reason we study the anticoagulant effect of dithiolethiones.

The results of this work allowed us to confirm that all the compounds studied have very good antioxidant properties compared to antioxidants as a reference.

And dithioliques compounds give a major anticoagulant activity Except dithiolique **B1** derivative molecule that has a coagulant effect.

Key words: dithiolethiones, oxidative stress, anti coagulation, Molybdate.