

**Université Kasdi MERBAH Ouargla**  
**Faculté des Mathématiques et Sciences de la Matière**  
**Département de Chimie**



Thèse présentée en vue de l'obtention  
du diplôme de

**Doctorat en sciences**

**Spécialité : Chimie**

Présenté par :

**Zehour RAHMANI**

*Thème :*

**Etude de la relation structure-activité antioxydante  
et antihémolyse des érythrocytes humaines par  
quelques dithiolethiones et composés phénoliques**

Soutenu le : 24-05-2015

Devant le jury :

<b>Mahfoud HADJ MAHAMMED</b>	<b>Professeur</b>	<b>Président</b>	<b>Université d'Ouargla</b>
<b>Mokhtar SAIDI</b>	<b>Professeur</b>	<b>Rapporteur</b>	<b>Université d'Ouargla</b>
<b>Touhami LANEZ</b>	<b>Professeur</b>	<b>Examineur</b>	<b>Université d'El-Oued</b>
<b>Ahmed MEGHAZI</b>	<b>Professeur</b>	<b>Examineur</b>	<b>Université de Biskra</b>
<b>Mohamed HADJADJ</b>	<b>M. C (A)</b>	<b>Examineur</b>	<b>Université d'Ouargla</b>
<b>Mohamed YOUSFI</b>	<b>Professeur</b>	<b>Co-rapporteur</b>	<b>Université de Laghouat</b>

Année Universitaire : 2014-2015

## **Remerciements**

**Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail.**

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Valorisation et Promotion des Ressources Sahariennes (*VPRS*) de l'université Kasdi Merbah *Ouargla* (Algérie), sous la direction des Professeurs **SAIDI Mokhtar** et **YOUSFI Mohamed**.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur le professeur **SAIDI Mokhtar** pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce travail, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce travail. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Au même titre, je remercie Monsieur **YOUSFI Mohamed**, professeur à l'université Amar Telidji *Laghouat* (Algérie), qui a codirigé ce travail malgré ses nombreuses obligations, a accepté de nous encadrer et de nous choisir un thème. Ses connaissances en chimie, sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien et son enthousiasme ont fortement contribué à ma formation.

A cette même occasion je tiens à remercier les Professeurs : **HADJ MAHAMMED Mahfoud**, **LANEZ Touhami**, **HADJADJ Mohamed**, **MEGHAZI Ahmed** pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à tous mes professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Ouargla, un grand merci pour vous mes professeurs : **DADA MOUSSA Belkheir**, **LANEZ Touhami**, **HADJADJ Mohamed**, **LOUNAS Ali**, **HADJ MAHAMMED Mahfoud**, **DENDOUGUI Houcine**, **DOUADI Ali**, **DEHAK Karima**, **ZEGHDI Saad**, **DEKMOUCHE Messouda**, **SAMARA Ouanissa**, **TERKI Belkacem**, **BENNOUNA Abdelaziz**, **RAHIM Oumelkheir** et que dieu vous bénisse.

Je remercie beaucoup **SLOUGUI Nabila**, **HADEF Derradji**, **DELHOUM Nourelhouda**, M<sup>elle</sup> **MESROUK Houria** ingénieure au laboratoire des analyses physico-chimiques, madame **MEFTAH Nabiha**, **SIBOUKER Mohamed saleh**, **BOUREGUBA Yacine**, mes collègues dans le laboratoire de VPRS surtout **CHERBI Rekia**, **GHIABA Zineb**, **KANDOUR Zaouia**, **BELFAR Assia**, **BENSASSI Chaima** et **BELGUEDOUM Mahdi**.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père, mes sœurs : **Zineb**, **Safia**, **Sarah**, **Saadia** et mes frères : **Zaid**, **Ilias**, **Imad eddine**, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances.

### **Résumé**

Ce travail est une contribution à l'étude de l'activité antioxydante des polyphénols et dithiolethiones aussi de déterminer le coefficient de partage n-octanol/eau de quelques 1,2-dithiole. Les méthodes utilisées sont les tests chimiques et une méthode électrochimique pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

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

Les globules rouges sont sensibles au stress oxydatif, qui se fait par de nombreuses interactions ponctuées par quelques radicaux libres qui nuisent à l'intégrité structurale et les composants fonctionnels du globule rouge représentée par l'hémoglobine et la membrane plasmique qui conduisent finalement à l'hémolyse. Par conséquent, diverses dithiolethiones ont été proposés pour atténuer l'hémolyse.

Ces dithiolethiones étudiées présentent aussi une activité anti-hémolyse plus importante que le standard vitamine C.

Une approche physicochimie intégrée et de relations structure-activité a été mise en œuvre afin d'étudier l'activité chélatrice des ions ferreux et anti-hémolyse des dithiolethiones.

Dans ce but, nous avons déterminé le coefficient de partage n-octanol/eau des composés 1,2-dithiole, à l'équilibre en utilisant la méthode "shake flask". Ensuite, nous avons évalué les corrélations entre l'activité chélatrice/anti-hémolyse et six propriétés moléculaires : l'hydrophobie,  $E_{HOMO}$ ,  $E_{LUMO}$ ,  $\mu$ , MR et  $\chi$ .

Notre démarche d'étude des relations structure-activité a consisté à étudier des dithiolethiones en fonction d'une particularité structurale donnée afin de révéler les particularités de la structure qui influent sur l'activité chélatrice et anti-hémolyse.

Les corrélations impliquant l'hydrophobie, confirment que les interactions polaires sont favorables à l'activité antioxydante.

**Mots clés :** dithiolethiones, polyphénols, QSAR, activité antioxydante, activité anti-hémolyse.

### **Abstract**

This work is a contribution to the study of the antioxidant activity of polyphenols and dithiolethiones also to determine the partition coefficient n-octanol/water for some 1,2-dithiole compounds. The methods used are chemical tests and electrochemical method for evaluation the antioxidant activity. The results of this work allowed us to assert that all of the compounds studied have important antioxidant properties.

Exposure of erythrocytes to stress oxidatif results in a myriad of free radical-mediated reactions which negatively affect the structural and functional integrity of heme protein and cell membrane components that ultimately lead to hemolysis.

Therefore, various dithiolethiones have been suggested to attenuate the hemolysis.

In addition, the studied dithiolethiones present an anti-hemolysis activity more than vitamin C.

An integrated approach physicochemistry and structures activity relationships has been carried out to study the chelation of ferrous ions /anti-hemolysis activity of dithiolethiones.

For this purpose, we have determined the partition coefficient n-octanol/water of 1,2-dithiole compounds, at equilibrium conditions using the "shake flask" method. Then, we have estimated correlations between the chelation of ferrous ions /anti-hemolysis activity and six molecular properties: hydrophobicity,  $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ ,  $\mu$ , MR and  $\chi$ .

Our methodology concerning the structure-activity relationships study consisted on studying a varied range of dithiolethiones to a given structural particularity in order to reveal which structural particularities control the chelation /anti-hemolysis activity.

Correlations implying hydrophobicity confirm that polar interactions are favourable in antioxydant activity.

**Keywords:** dithiolethiones, polyphenols, QSAR, antioxidante activity, anti-hemolysis activity.

## ملخص

يعتبر هذا العمل مساهمة في دراسة النشاطية المضادة للأوكسدة للمركبات متعددة الفينول و الثنائي ثيول ثيون الحلقي وتحديد معامل الفصل ن-الأوكتانول/ماء لبعض 1،2-ثنائي ثيول. الطرق المستخدمة هي اختبارات كيميائية وتقنية كهروكيميائية لقياس النشاطية المضادة للأوكسدة. نتائج هذه الأعمال سمحت لنا بالتأكد من أن جميع المركبات المدروسة لديها خصائص جد مضادة للأوكسدة.

كريات الدم الحمراء حساسة للاجهاد التأكسدي والذي يتم عن طريقه تفاعلات عديدة يتخللها انطلاق بعض الجذور الحرة التي تؤثر سلبا على السلامة الهيكلية والوظيفية لمكونات الخلية متمثلة بالهيموغلوبين الموجود داخل الكرية والغشاء البلازمي المحيط بها مما يؤدي في النهاية الى تلف وانحلال الدم، ولأجل التقليل من خطر هذه الحالة تم اقتراح استخدام مركبات الثنائي ثيول ثيون الحلقي كمضادات لانحلال الدم. مركبات الثنائي ثيول ثيون الحلقي أظهرت أيضا نشاطية مضادة لانحلال الدم أكثر من المركب القياسي فيتامين C.

وقد تم تنفيذ تقريب فيزيوكيميائي وعلاقة بنية - نشاطية لدراسة نشاطية التمثل مع ايونات الحديد الثنائي والنشاطية المضادة لانحلال الدم بالمركبات ثنائي ثيول ثيون الحلقي.

لهذا الهدف، حددنا معامل الفصل ن-الأوكتانول/ماء لمركبات ثنائي ثيول ثيون الحلقي، عند الاتزان باستخدام طريقة القارورة الهزازة .

قمنا بتقييم الارتباطات بين نشاطية التمثل مع ايونات الحديد الثنائي / النشاطية المضادة لانحلال الدم و ستة خصائص جزيئية: الهيدورفوبية،  $E_{HOMO}$ ،  $E_{LUMO}$ ،  $\mu$ ،  $MR$  و  $\chi$  .

في منهجيتنا حول دراسة علاقات بنية - نشاطية نستخدم مركبات ثنائي ثيول ثيون الحلقي وفقا لسمة بنيوية معينة للكشف عن تفاصيل البنية التي تؤثر على النشاطية الممخلبة والمضادة لانحلال الدم . الارتباطات التي تنطوي على الهيدورفوبية تؤكد أن التداخلات القطبية مواتية للنشاطية المضادة للأوكسدة.

**الكلمات الدالة:** ثنائي ثيول ثيون الحلقي، متعدد الفينول، QSAR، النشاطية المضادة للأوكسدة، النشاطية المضادة لانحلال الدم.

## **Abréviations utilisées**

<b>Abs</b> : Absorbance	<b>HAT</b> : Hydrogen Atom Transfer
<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>i<sub>p</sub></b> : densité du courant de pic
<b>BHA</b> : 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole	<b>i<sub>pa0</sub></b> : densité du courant anodique en absence de substrat
<b>BHT</b> : 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène	<b>i<sub>pas</sub></b> : densité du courant anodique en présence de substrat
<b>CCM</b> : Chromatographie sur Couche Mince	<b>IR</b> : Infra-Rouge
<b>CFU/mL</b> : Colony Forming Unit/ milliliter	<b>log P</b> : Coefficient de partage
<b>CI<sub>50</sub></b> : Concentration d'inhibition à 50%	<b>log P<sub>exp</sub></b> : Coefficient de partage expérimental
<b>CMC</b> : Critical Micelle Concentration	<b>MNDO</b> : Modified Neglected of Differential Overlap
<b>CV</b> : Carbone Vitreux	<b>NADH</b> : Nicotinamide – Adénine – Dinucléotide
<b>DMF</b> : Diméthylformamide	<b>NADPH</b> : Nicotinamide – Adénine - Dinucléotide – Phosphate
<b>DPPH</b> : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl	<b>nBu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup></b> : Tetra n-butyl ammonium Hexafluorophosphate
<b>E°</b> : Potentiel standar	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline:
<b>E<sub>pa</sub></b> : Potentiel anodique	<b>pf</b> : Point de fusion
<b>ERO</b> : Espèces Réactives de l'Oxygène	<b>pH</b> : Potentiel d'hydrogène
<b>ET</b> : Electron Transfert	<b>PI</b> : Potentiel d'ionisation
<b>F</b> : Fischer's test	<b>QSAR</b> : Quantitative Structure Activity Relationship
<b>FRAP</b> : Ferric Reducing Antioxidant Power	<b>R<sub>f</sub></b> : Rapport frontal (CCM)
<b>GSH</b> : Glutathion réduit	<b>RMS</b> : Root-Mean-Square
<b>GSH-Px</b> : Glutathion peroxydes	<b>SCF</b> : Self Consistent Field
<b>GSSG</b> : Glutathion oxydé	<b>SOD</b> : Superoxide dismutase
<b>GST</b> : Glutathion-S-transférase	<b>UV</b> : Ultra Violet

Liste des figures

Titre	Page
<b>Figure I.1:</b> Répartition des électrons dans les orbitales liantes (L) et antiliantes (AL) de la molécule d'oxygène, de l'anion superoxyde et du peroxyde.....	8
<b>Figure I.2:</b> Structure du glutathion (GSH), $E^{\circ}(\text{GSSG}/\text{GSH}) = 0,24 \text{ V}$ .....	12
<b>Figure I.3:</b> Structure de l'acide urique.....	13
<b>Figure I.4:</b> Structure de la vitamine E (ou $\alpha$ -tocophérol).....	14
<b>Figure I.5:</b> Structure de la vitamine C.....	14
<b>Figure I.6:</b> Squelette de base des flavanoïdes.....	15
<b>Figure I.7:</b> Différentes classes de flavonoïdes.....	17
<b>Figure I.8:</b> Structure de dérivés de l'acide p-hydroxycinnamique.....	20
<b>Figure I.9:</b> Structures chimiques de quelques stilbènes.....	21
<b>Figure I.10:</b> La forme générale de 1,2-dithiole-3-thione.....	22
<b>Figure I.11:</b> Photo de comprimée de sulfarlem.....	26
<b>Figure I.12:</b> Spectre UV-visible de sulfarlem récupérée.....	27
<b>Figure I.13:</b> Spectre UV-visible de sulfarlem synthétisée.....	27
<b>Figure I.14:</b> Spectre IR de sulfarlem récupérée.....	28
<b>Figure I.15:</b> Spectre UV-visible de sel de sulferlem C1.....	29
<b>Figure I.16:</b> Spectre IR de sel de sulfarlem.....	31
<b>Figure I.17:</b> Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C).....	36
<b>Figure I.18:</b> Courbes représentants le pouvoir réductrice de quelques dithiolethiones et composés phénoliques étudiés.....	37
<b>Figure I.19:</b> Classification de la capacité réductrice selon les valeurs d'AEAC.....	39
<b>Figure I.20:</b> La relation d'AEAC et le potentiel d'oxydation.....	41
<b>Figure I.21:</b> La relation d'AEAC et le potentiel d'ionisation.....	42
<b>Figure I.22:</b> Activité chélatrice des quelques composés phénoliques et dithioliques.....	45
<b>Figure I.23:</b> Comparaison de potentiel chélateur des dithiolethiones / polyphénols selon $CI_{50}$ .....	47
<b>Figure I.24:</b> Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques..	48
<b>Figure I.25:</b> Effet piègeur du radical DPPH $\cdot$ par les que des graines de quelques composé phénoliques/dithiolethiones.....	52
<b>Figure I.26:</b> La réaction de DPPH $\cdot$ avec l'acide ascorbique.....	53
<b>Figure I.27:</b> Classification de la capacité d'inhibition du DPPH $\cdot$ selon les valeurs $CI_{50}$	54
<b>Figure I.28:</b> Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	55
<b>Figure I.29:</b> La relation entre l'activité anti radicalaire de DPPH $\cdot$ et le $\log P$ .....	56
<b>Figure I.30:</b> La dissociation de la liaison O-H dans le BHA.....	56
<b>Figure I.31:</b> La relation entre l'activité anti radicalaire de DPPH $\cdot$ et le BDE.....	57
<b>Figure I.32:</b> L'oxydation électrochimique des composés phénoliques.....	58
<b>Figure I.33:</b> La relation entre l'activité anti radicalaire de DPPH $\cdot$ et PI.....	60
<b>Figure I.34:</b> Effet piègeur du radical $\cdot\text{OH}$ par quelques composés étudiés.....	62
<b>Figure I.35:</b> La relation entre l'activité d'inhibition $\cdot\text{OH}$ et la lipophilie.....	64
<b>Figure I.36:</b> Classification de la capacité d'inhibition de $\cdot\text{OH}$ selon les valeurs de $CI_{50}$	66
<b>Figure I.37:</b> La relation entre l'activité inhibitrice de $\cdot\text{OH}$ et la BDE.....	68
<b>Figure I.38:</b> La relation entre l'activité antioxydante pour $\cdot\text{OH}$ et le potentiel d'oxydation.....	69
<b>Figure I.39:</b> La relation entre l'activité antioxydante pour $\cdot\text{OH}$ et le potentiel d'ionisation.....	69
<b>Figure I.40:</b> La relation entre l'activité inhibitrice de $\cdot\text{OH}$ et de la DPPH $\cdot$ .....	70
<b>Figure I.41:</b> Les courbes concernant la vitesse d'auto oxydation du pyrogallol en présence d'antioxydant.....	72

<b>Figure I.42:</b> Classification du pourcentage d'inhibition du ( $O_2^{\bullet-}$ ) à concentration de $4.85.10^{-4}$ M.....	75
<b>Figure I.43:</b> La relation entre l'activité antiradicalaire de $O_2^{\bullet-}$ et le BDE.....	76
<b>Figure I.44:</b> La relation entre l'activité anti radicalaire de $O_2^{\bullet-}$ et le potentiel d'oxydation.....	77
<b>Figure I.45:</b> La relation entre l'activité anti radicalaire de $O_2^{\bullet-}$ et $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ .....	78
<b>Figure I.46:</b> Les électrodes utilisées dans cette étude: (A) électrode de travail en carbone vitreux, (B) électrode de référence au calomel saturée, (C) contre-électrodes en platine.....	80
<b>Figure I.47:</b> Voltammogramme de l'électrolyte support [milieu DMF – $nBu_4N^+ PF_6^-$ 0,1M ; électrode CV ; vitesse de balayage $0,1V.s^{-1}$ ].....	81
<b>Figure I.48:</b> Voltammogramme de l'oxygène [milieu DMF - $nBu_4N^+ PF_6^-$ 0,1M ; électrode CV ; vitesse de balayage $0,1V.s^{-1}$ ].....	82
<b>Figure I.49:</b> Voltammogramme de l'oxygène à la présence des dérivés dithioliques [milieu DMF- $nBu_4N^+PF_6^-$ 0,1M; électrode CV ; vitesse de balayage $0,1V.s^{-1}$ ].....	84
<b>Figure I.50:</b> Le rapport de ( $i_{pas}/i_{pa0}$ ) en fonction de la concentration des dithiolethiones (A,B,C,D).....	85
<b>Figure I.51:</b> La structure de la rutine.....	88
<b>Figure I.52:</b> Classification de la capacité d'inhibition du $O_2^{\bullet-}$ selon les valeurs $CI_{50}$ .....	88
<b>Figure I.53:</b> La relation entre l'activité inhibitrice du radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le coefficient de partage $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ .....	91
<b>Figure I.54:</b> La relation entre le pourcentage inhibitrice (UV-Vis) et l'activité inhibitrice (électrochimie) du radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ .....	91
<b>Figure I.55:</b> Spectre IR de 3-Méthylthio-4p-Tolyl-1,2-dithiolylium contre ion (I) <b>B1</b>	185
<b>Figure I.56:</b> Spectre IR de 3-Méthylthio-4-phényl-1,2- dithiolylium contre ion (I) <b>A1</b>	186
<b>Figure I.57:</b> Spectre IR de 3-Méthylthio-4-p-Tolyl-1,2-dithiolylium contre ion ( $CH_3SO_4^-$ ) <b>B2</b> .....	187
<b>Figure I.58:</b> Spectre IR de 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione <b>A</b> .....	188
<b>Figure I.59:</b> Spectre IR de 3-Méthylthio-4-phényl-1,2-dithiolylium contre ion ( $CH_3SO_4^-$ ) <b>A2</b> .....	189
<b>Figure I.60:</b> Spectre IR de 4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione <b>B</b> .....	190
<b>Figure II.1:</b> Diagramme de la différenciation des cellules sanguines.....	106
<b>Figure II.2:</b> Schéma de la membrane érythrocytaire.....	107
<b>Figure II.3:</b> Classification de dithiolethiones selon le pourcentage d'inhibition d'hémolyse.....	111
<b>Figure II.4:</b> La relation de pourcentage anti-hémolyse et $\log P$ .....	112
<b>Figure II. 5:</b> Représentation schématique des principales voies de transport à travers la membrane des érythrocytes.....	113
<b>Figure II. 6:</b> La relation entre l'activité chélatrice et des pourcentages d'anti-hémolyse	116
<b>Figure III.1:</b> L'appareil d'agitation du brassage lent pour la mesure de coefficients de partage eau/n-octanol.....	124
<b>Figure III.2:</b> Courbes d'étalonnage de quelques dithiolethiones pour déterminer les valeurs de coefficient de partage.....	130
<b>Figure III.3:</b> Les structures des dérivés de dithiolethiones : <b>D</b> , <b>NOS</b> et <b>C12</b> .....	132
<b>Figure III.4:</b> Les valeurs de coefficient de partage obtenues par la méthode expérimentale (UV-Vis) et la méthode théorique (REKKER).....	137
<b>Figure IV.1:</b> Représentation des niveaux énergétiques.....	159
<b>Figure IV.2:</b> Vue "ball and sticks" de conformation la plus stable des dithiolethiones...	160
<b>Figure IV.3:</b> Stage initiale d'optimisation de géométrie.....	161
<b>Figure IV.4:</b> Principes d'une génération de modèle QSAR en 3D.....	164



<b>Figure IV.5:</b> Représentation de la HOMO de la structure optimisée des dithiolethiones (méthode semi-empirique MNDO-PM3).....	168
<b>Figure IV.6:</b> Représentation de la LUMO de la structure optimisée des dithiolethiones (méthode semi-empirique MNDO-PM3).....	168
<b>Figure IV.7:</b> Structure de calcéine.....	169
<b>Figure IV.8:</b> Corrélation entre les $CI_{50}$ (chélation) calculés et observés.....	172
<b>Figure IV.9:</b> Corrélation entre les pourcentages (anti-hémolyse) calculés et observés....	176

**Liste des tableaux**

<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I.1:</b> Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....	10
<b>Tableau I.2:</b> Les absorptions de bandes dans le spectre IR de sulfarlem.....	27
<b>Tableau I.3:</b> Les absorptions de bandes dans le spectre IR du sel de sulfarlem.....	30
<b>Tableau I.4:</b> Les structures et les abréviations des dérivés dithioliques.....	33
<b>Tableau I.5:</b> Les structures des composés phénoliques.....	34
<b>Tableau I.6:</b> Les résultats de test du pouvoir réducteur (AEAC).....	38
<b>Tableau I.7:</b> Les potentiels d'oxydation.....	40
<b>Tableau I.8:</b> La concentration de chélation de Fe <sup>2+</sup> (CI <sub>50</sub> ) des dithiolethiones et polyphénols.....	46
<b>Tableau I.9:</b> Les valeurs CI <sub>50</sub> pour tous les composés étudiés (Inhibition du DPPH').....	53
<b>Tableau I.10:</b> Les BDE de quelques composés étudiés.....	57
<b>Tableau I.11:</b> Les valeurs de PI de composés phénoliques et dithioliques.....	59
<b>Tableau I.12:</b> Les résultats d'inhibition de 'OH de tous les composés étudiés sauf l'acide gallique.....	63
<b>Tableau I.13:</b> Le coefficient de partage de tous les composés étudiés <i>log P</i> <sub>n-octanol/eau</sub> expérimentales et calculées des dithiolethiones étudiés.....	65
<b>Tableau I.14:</b> Les pourcentages inhibitrice du radicale l'anion superoxyde des composés étudiés.....	73
<b>Tableau I.15:</b> Les résultats de CI <sub>50</sub> obtenue pour les produits dithioliques.....	87
<b>Tableau I.16:</b> Réactifs et matériels nécessaire dans le chapitre I.....	94
<b>Tableau I.17:</b> Matériels nécessaire dans le chapitre I.....	95
<b>Tableau II.1:</b> Réactifs et matériels nécessaire dans le chapitre II.....	109
<b>Tableau II.2:</b> Les pourcentages d'inhibition d'hémolyse.....	111
<b>Tableau III.1:</b> Valeurs des fragments.....	131
<b>Tableau III.2:</b> Valeurs de <i>log P</i> <sub>n-octanol/eau</sub> expérimentales et calculées des dithiolethiones étudiés.....	134
<b>Tableau III.3:</b> Réactifs et matériels nécessaires pour la détermination du <i>log P</i> .....	140
<b>Tableau IV.1:</b> Valeurs d'enthalpie de formation.....	160
<b>Tableau IV.2:</b> Les nombres des atomes et les donnés structurelle de composé (C).....	161
<b>Tableau IV.3:</b> Paramètres moléculaires et CI <sub>50</sub> (L'activité chélatrice) entrés dans la relation quantitative structure-activité étudiés.....	165
<b>Tableau IV.4:</b> Paramètres de validation croisée (relation quantitative structure activité chélatrice).....	171
<b>Tableau IV.5:</b> Valeurs des activités prévues et expérimental de l'ensemble de dérives de 1,2-dithiole-3-thione.....	172
<b>Tableau IV.6:</b> Le facteur de corrélation entre les différentes propriétés moléculaires de impliqués dans le modèle relation structure activité de chélation (valeurs de R).....	173
<b>Tableau IV.7:</b> Paramètres moléculaires et (le pourcentage anti-hémolyse) entrés dans la relation quantitative structure-activité étudié.....	174
<b>Tableau IV.8:</b> Paramètres de validation croisée (activité anti-hémolyse).....	175
<b>Tableau IV.10:</b> Valeurs de pourcentage anti-hémolyse expérimentales et prédiction des dithiolethiones étudiés.....	177

## Sommaire

Remerciements.....	i
Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
ملخص.....	iv
Abréviations.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Sommaire.....	x
Introduction générale.....	1
<b>CHAPITRE I : Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques et des dithiolethiones</b>	
<b>I.1.DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>7</b>
<i>I.1.1. Systèmes oxydants et systèmes antioxydants.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.1.1. Radicaux libres biologiques.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.1.2. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ERO) en biologie.....</i>	<i>7</i>
<i>a. Nature de la réactivité des ERO.....</i>	<i>7</i>
<i>b. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène.....</i>	<i>8</i>
<i>c. Les cibles des ERO.....</i>	<i>10</i>
<i>d. Conséquences du stress oxydant sur l'organisme.....</i>	<i>11</i>
<i>I.1.2. Systèmes de défense antioxydants.....</i>	<i>11</i>
<i>I.1.2.1. Systèmes enzymatiques.....</i>	<i>11</i>
<i>a. Les superoxydes dismutases (SOD).....</i>	<i>12</i>
<i>b. La catalase.....</i>	<i>12</i>
<i>c. Les glutathion peroxydases.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.2. Systèmes non enzymatiques.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.2.2.1. Les antioxydants endogènes.....</i>	<i>12</i>
<i>a. Le glutathion.....</i>	<i>12</i>
<i>b. L'acide urique.....</i>	<i>13</i>
<i>I.1.2.2.2. Les antioxydants exogènes.....</i>	<i>13</i>
<i>a. La vitamine E (ou <math>\alpha</math>-tocophérol).....</i>	<i>13</i>
<i>b. La vitamine C (ou acide ascorbique).....</i>	<i>14</i>
<i>c. Les antioxydants phénoliques.....</i>	<i>15</i>
<i>c.1. Les antioxydants phénoliques naturels.....</i>	<i>15</i>
<i>c.1.1. Les flavonoïdes.....</i>	<i>15</i>
<i>c.1.1.1. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes.....</i>	<i>17</i>
<i>a. Solubilité des flavonoïdes.....</i>	<i>17</i>
<i>b. Stabilité des flavonoïdes.....</i>	<i>19</i>
<i>c.1.2. Les non-flavonoïdes.....</i>	<i>20</i>
<i>c.1.2.1. Les acides phénoliques.....</i>	<i>20</i>
<i>c.1.2.2. Les stilbènes.....</i>	<i>20</i>
<i>c.1.3. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires des composés phénoliques.....</i>	<i>21</i>
<i>d. Les dithiolethiones.....</i>	<i>22</i>
<i>d.1. Les propriétés physico-chimiques des dithiolethiones.....</i>	<i>24</i>
<i>d.1.1. Moments dipolaires.....</i>	<i>24</i>
<i>d.1.2. Aromaticité des 1,2-dithiole-3-thiones.....</i>	<i>24</i>
<i>d.1.3. Conformation de quelques 1,2-dithiole-3-thiones substituées par un groupement aryle.....</i>	<i>24</i>
<b>I.2.TRAVAUX EXPERIMENTALS.....</b>	<b>25</b>
<i>I.2.1. Synthèse des 1,2-dithiole-3-thiones.....</i>	<i>25</i>
<i>I.2.1.1. Récupération de la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione.....</i>	<i>26</i>
<i>I.2.1.2. Préparation de la 3-Méthylthio-5p-méthoxyphényl-1,2-Dithiolylium contre ion (I) (C1).....</i>	<i>29</i>
<i>I.2.2. Détermination de l'activité antioxydante in vitro.....</i>	<i>32</i>

I.2.2.1. Activité réductrice sur le ferricyanure de potassium.....	36
<i>Résultats et discussion</i> .....	36
I.2.2.2. Chélation du fer ferreux.....	43
<i>Les procédés Fenton</i> .....	43
<i>Résultats et discussion</i> .....	44
I.2.2.3. Application du test chimique (Test du DPPH').....	50
<i>Principe</i> .....	50
<i>Résultats et discussion</i> .....	50
I.2.2.4. Piégeage du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ .....	61
<i>Résultats et discussion</i> .....	61
I.2.2.5. La capacité d'inhibition de radical l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ .....	71
<i>Systèmes de production de l'anion (<math>\text{O}_2^{\bullet-}</math>)</i> .....	71
a. <i>Méthode chimique</i> .....	71
<i>Résultats et discussion</i> .....	71
b. <i>Méthode électrochimique</i> .....	79
b.1. <i>Détermination la capacité inhibitrice du radical anion superoxyde par la voltamétrie cyclique</i> .....	79
b.1.1. <i>Matériels utilisés</i> .....	79
b.1.2. <i>Le milieu utilisé</i> .....	80
b.2. <i>La méthode</i> .....	80
b.2.1. <i>Voltamétrie cyclique sans oxygène</i> .....	80
b.2.2 <i>Voltamétrie cyclique d'oxygène</i> .....	81
b.2.2.1. <i>Voltamogramme d'oxygène en absence des dithiolethiones</i> .....	81
b.2.2.2. <i>Voltamogramme d'oxygène à la présence des dithiolethiones</i> .....	82
b.3. <i>Capacité antioxydante</i> .....	87
I.2.3. <i>Comparaison des cinq méthodes</i> .....	92
<i>Conclusion</i> .....	93
I.2.4. <b>TECHNIQUES EXPERIMENTALES</b> .....	94
a. <i>Solvants et réactifs</i> .....	94
b. <i>Enregistrement des spectres et mesures physico-chimiques</i> .....	95
I.2.4.1. <i>Partie expérimentale</i> .....	95
I.2.4.1.1. <i>La synthèse</i> .....	95
a. <i>Récupération de 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione</i> .....	95
b. <i>Synthèse de 3-Méthylthio-5p-méthoxy phényl-1,2-Dithiolylium contre ion (I) (C1)</i> .....	96
I.2.4.1.2. <i>Activité antioxydante</i> .....	96
a. <i>Test de réduction de Fe (III)</i> .....	96
b. <i>Test de chélation des ions ferreux</i> .....	97
c. <i>Test de DPPH'</i> .....	97
d. <i>Test d'<math>\cdot\text{OH}</math></i> .....	98
e. <i>Test de radical anion superoxyde <math>\text{O}_2^{\bullet-}</math></i> .....	98
<i>Références</i> .....	99

**Chapitre II : Evaluation du l'activité anti-hémolyse des dithiolethiones sur les érythrocytes humaines**

II.1. <b>DONNÉES PUBLIOGRAPHIQUES</b> .....	105
II.1. <i>Erythropoïèse et durée de vie des hématies dans les conditions physiologiques</i> .....	105
II.1.1 <i>Les globules rouges</i> .....	106
II.1.2. <i>Les hématies face à l'oxydation et l'hémolyse</i> .....	108
II.2. <b>TRAVAUX EXPERIMENTALS</b> .....	109
II.2.1. <i>Test, in vitro, de la résistance des globules rouges humains prétraités par les dithiolethiones à l'attaque radicalaire</i> .....	109
<i>Résultats et discussion</i> .....	110
<i>Conclusion</i> .....	117
<i>Références</i> .....	118

### **Chapitre III : Détermination du Coefficient de partage $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ des dithiolethiones**

<b>III.1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	121
III.1.1. Une brève vue d'ensemble historique de hydrophobicité.....	121
III.1.2. Les techniques expérimentales.....	123
III.1.2.1. La méthode par agitation en flacon "Shake-flask".....	123
III.1.2.2. La méthode du brassage lent.....	124
III.1.2.3. La méthode potentiométrique.....	125
III.1.2.4. Voltamétrie cyclique à l'interface entre deux solutions d'électrolytes non miscibles.....	126
<b>III.2. TRAVAUX EXPERIMENTALS</b> .....	128
III.2.1. Introduction.....	128
III.2.2. Détermination expérimentale de $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ .....	129
Résultats et discussion.....	129
III.2.2.1. Méthode théoriques de calcul de REKKER.....	131
Conclusion.....	139
<b>III.3. TECHNIQUES EXPERIMENTALES</b> .....	140
a. Solvants et réactifs.....	140
b. Préparation.....	140
c. La Spectrophotométrie UV-Vis.....	141
Références.....	141

### **Chapitre IV : Modélisation moléculaire et étude de QSAR**

<b>IV.1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	144
IV.1.1. Introduction.....	144
IV.1.2. Les outils de la Chimie Théorique.....	145
IV.1.3. Les méthodes de HARTREE-FOCK (HF).....	146
IV.1.4. Méthodes Post HARTREE-FOCK.....	147
IV.1.5. Calcul de l'énergie potentielle dans l'approximation de Born-Oppenheimer.....	148
IV.1.5.1. Calcul de l'énergie potentielle en Chimie Quantique.....	148
IV.1.5.2. Calcul de l'énergie potentielle en Mécanique Moléculaire.....	149
IV.1.5.3. Concept de Surface d'Energie Potentielle (SEP).....	150
a. Définition de la Surface d'Energie Potentielle (SEP).....	150
b. Points d'intérêts chimiques sur la SEP.....	151
IV.1.5.4. Minimisation d'énergie.....	151
a. Utilisation de la Mécanique Moléculaire.....	153
b. Utilisation de la Dynamique Moléculaire.....	153
c. Méthodes quantiques et semi-empiriques.....	154
IV.1.6. Les descripteurs de QSAR.....	155
<b>IV.2. TRAVAUX EXPERIMENTALS</b> .....	158
IV.2.1. Modélisation moléculaire et calcul de propriétés moléculaires.....	158
Etude conformationnelle.....	160
IV.2.2. Analyse de la relation quantitative structure-activité chélatrice (QSAR).....	162
Régression linéaire multiple (MLR).....	162
IV.2.3. Analyse de la relation quantitative structure-activité anti-hémolyse (QSAR).....	174
Conclusion.....	178
Références.....	178
Conclusion générale et perspectives.....	180
Annex.....	184

# **Introduction générale**

Les constituants de notre organisme (lipides, protéines, ADN) peuvent être oxydés par les espèces réactives de l'oxygène (*ERO*) incluant des radicaux libres ( $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $^\bullet\text{OH}$ ). Les *ERO* sont produits continuellement à partir de l'oxygène que nous respirons [1,2]. Les dommages oxydatifs provoqués par les *ERO* portent le nom de Stress Oxydant est responsable de nombreuses maladies dégénératives. Dans les conditions physiologiques normales, nos cellules sont équipées de systèmes de défense antioxydante, qui leur permettent de neutraliser les *ERO* pour les maintenir à un faible taux dans ces cellules, et par conséquent, empêcher le déclenchement d'un stress oxydant. La première barrière de défense est synthétisée par les cellules comme les enzymes antioxydantes quant à la seconde barrière nous sont apportées par notre alimentation [3].

Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $^\bullet\text{OH}$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^\bullet$ ) [4].

Les dithiolethiones entrent également dans le système de défense contre le stress oxydant [5]. De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des dithiolethiones est essentiellement liée à leur capacité à piéger le peroxyde d'hydrogène [6]. La première dithiolethione découverte pour laquelle une propriété pharmacologique particulièrement intéressante est la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione : sulfarlem<sup>®</sup>). Cette molécule est commercialisée dès 1949 pour ses propriétés cholérétiques. Depuis, ses propriétés sont démontrées et la font prescrire, aussi, pour des troubles de sécheresse de la bouche consécutifs à certains traitements antidépresseurs. Le sulfarlem se révèle aussi bon antioxydant que le gallate de propyle. Il est beaucoup plus efficace que la vitamine E. Il semble réagir directement, surtout avec les radicaux libres carbonés [7].

Une autre dithiolethione, la 4-méthyl 5-(2-pyrazinyl)-1,2-dithiole-3-thione (Olipraz) a d'abord été décrit comme un puissant schistosomicides, essentiellement contre *schistosoma Mansoni* [7]. Des antioxydants bien connus comme le tertibutylhydroxyanisole BHA et l'éthoxyquine, et qui ont des effets similaires mais à dose beaucoup plus élevées que l'olipraz.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage des radicaux différents, comme,  $\cdot\text{OH}$ , DPPH $\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , ... par les polyphénols.

A notre connaissance l'inhibition des radicaux libres comme :  $\cdot\text{OH}$ , DPPH $\cdot$ , et la chélation des ions ferreux, la réduction des ions ferriques en présence de dithiolethiones n'ont fait l'objet d'aucune étude antérieure. Ce travail se justifie par les nombreux travaux d'ordre physico-chimique consacrés aux dithiolethiones [8] et par des considérations pharmaceutiques, puisque ces composés font l'objet de nombreux travaux récents faisant état, entre-autres, de leurs propriétés préventives de cancers et aussi de leurs propriétés antiradicalaires.

De plus, rappelons que de nombreuses corrélations statistiquement significativement sont établies entre les propriétés pharmacologiques et les effets électroniques des substituants de molécules actives.

Enfin, nous révélons d'autres études qui sont portées sur la caractérisation physicochimique des dithiolethiones et ses dérivés en vue de leur application dans l'inhibition de la corrosion des métaux, aussi les dithiolethiones ont été utilisés comme copolymères avec l'aniline. Ces deux applications ont été réalisées au niveau de notre laboratoire d'électrochimie à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla (UKMO) [9,10]. Ces études ont montrés un effet inhibiteur de corrosion très important dans les milieux acides, c'est-à-dire que ces molécules s'adsorbent fortement sur la surface des métaux.

Ainsi, les objectifs de ce travail se résument à :

Puisque l'effet antioxydant est évalué par deux mécanismes différents :

- (i) L'abstraction directe de l'atome H $\cdot$  (HAT).
- (ii) Transfert d'électron à partir de l'antioxydant vers le radical libre.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante des dithiolethiones et polyphénols, à ce niveau, nous déterminerons si les dithiolethiones sont plus actives que les polyphénols.

Des composés naturels lipophiles ou hydrophiles connus pour leur activité antioxydante au sein de l'organisme comme la vitamine C et les polyphénols (acide gallique en particulier) augmentent la résistance du sang total et des hématies à l'attaque radicalaire [11], de la découle notre deuxième objectif visant la démonstration de l'activité anti-hémolyse des dithiolethiones.



Puis nous procéderons expérimentalement à présenter le facteur de lipophilie, en particulier, le coefficient de partage  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ , des dithiolethiones et leurs dérivés comme les sels. A notre connaissance, aucune valeur de  $\log P$  des sels dithioliques n'est donnée dans la littérature sauf les travaux précédents réalisés par BONA M.[7] qui a déterminé ce coefficient pour plusieurs dithiolethiones neutres.

Le dernier objectif, de notre étude, est l'approche de modélisation moléculaire qui a été utilisée pour détecter la conformation des dithiolethiones la plus stable. A partir des propriétés structurales, électroniques et stériques obtenues après la minimisation des énergies, la relation structure-activité a été également déterminée.

Pour réaliser ces objectifs tracés, nous avons adopté quatre chapitres : la première intitulée évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques et des dithiolethiones. Dans **ce chapitre**, nous avons commencé par quelques notions de base sur les radicaux libres et les différents systèmes d'antioxydant, l'étude bibliographique des composés phénoliques et quelques activités biologiques/antioxydantes attribués à différentes familles de ces composés, nous avons également rappelé certaines propriétés physico-chimiques des dithiolethiones qui nous semblent intéressantes de les préciser afin d'expliquer les valeurs expérimentales de  $\log P$  obtenues et leurs activités antioxydantes.

Pour **les travaux expérimentaux** de ce chapitre, nous nous intéresserons à évaluer le pouvoir antioxydant des dithiolethiones et des polyphénols par cinq méthodes chimiques et une technique électrochimique puis nous discuterons les résultats obtenus.

Dans **le chapitre 2** intitulée évaluation de l'activité anti-hémolyse des dithiolethiones, nous rappellerons, certaines définitions sur l'hémolyse et les constituants du sang, ensuite, nous effectuerons un test, *in vitro*, de la résistance des globules rouges humains prétraités par les dithiolethiones à l'attaque radicalaire.

Dans **le chapitre 3** intitulée détermination du coefficient de partage  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ , nous donnerons quelques notions de base sur la lipophilie, ensuite, nous déterminerons et discuterons les valeurs de  $\log P$  obtenues pour les dithiolethiones neutres et les sels.

Enfin, dans **le chapitre 4**, Modélisation moléculaire et étude de QSAR, nous procéderons à l'approche de modélisation moléculaire pour étudier les structures des dithiolethiones et nous utiliserons les valeurs de  $\log P_{\text{exp}}$  et les propriétés moléculaires obtenues théoriquement pour une première étude de relation quantitative structure-activité chélatrice et relation quantitative structure-activité anti-hémolyse.

**Référence :**

- [1] WANG Y.; *Chem Res Toxicol*, **21**, pp 276-281(2008).
- [2] DALLE-DONNE I., ROSSI R., COLOMBO R., GIUSTARINI D. et MILZANI A.; *Clin Chem*, **52**, pp 601-623(2006).
- [3] ANTHONI J., Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomère de flavoinoïdes, thèse de doctorat, Nancy- université INPL, 2007.
- [4] BARTOSZ G.; *Comments on Toxicology*, **9**, pp 5-21 (2003).
- [5] SOLER M., RIERA M., et BATLLE D.; *Experimental Diabetes Research*, pp 1-8 (2012).
- [6] OSSENI R. A., DEBBASCH C., CHRISTEN M. O., RAT P. et WARNET J. M.; *Toxicology in Vitro*, **13**, pp 683-688 (1999).
- [7] BONA M.; Détermination du  $\log P_{\text{eau/n-octanol}}$  de 1,2-dithiole-3-thiones et de 1,2-dithiole-3-ones règles de calcul, thèse de doctorat, université de Renne I (1995).
- [8] ABASQ M. L., SAÏDI M., BURGOT J. L. et DARCHEN A.; *Journal of Organometallic Chemistry*, **694**, pp 36–42 (2009).
- [9] HADJAD M., Etude électrochimique de la réactivité de quelques composés 1,2-dithioliques : co-polymérisation avec aniline et interaction avec les métaux, thèse de doctorat, université de Kasdi Merbah Ouargla (2010).
- [10] DAKMOUCHE M., SAÏDI M., HADJADJ M., YOUSFI M. et RAHMANI Z.; *Asian Journal of Chemistry*, **24(11)**, pp 4887-4891(2012).
- [11] ROSSI R., PASTORELLI G. et CORINO C.; *Research in Veterinary Science*, **94**, pp 372-377 (2013).

# **Partie 1 :**

**Activité antioxydante et anti-  
hémolyse de quelques  
dithiolethiones et polyphénols**

# **Chapitre I :**

**Évaluation de l'activité  
antioxydante des composés  
phénoliques et des  
dithiolethiones**

## **I.1. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES**

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

### **I.1.1. Systèmes oxydants et systèmes antioxydants**

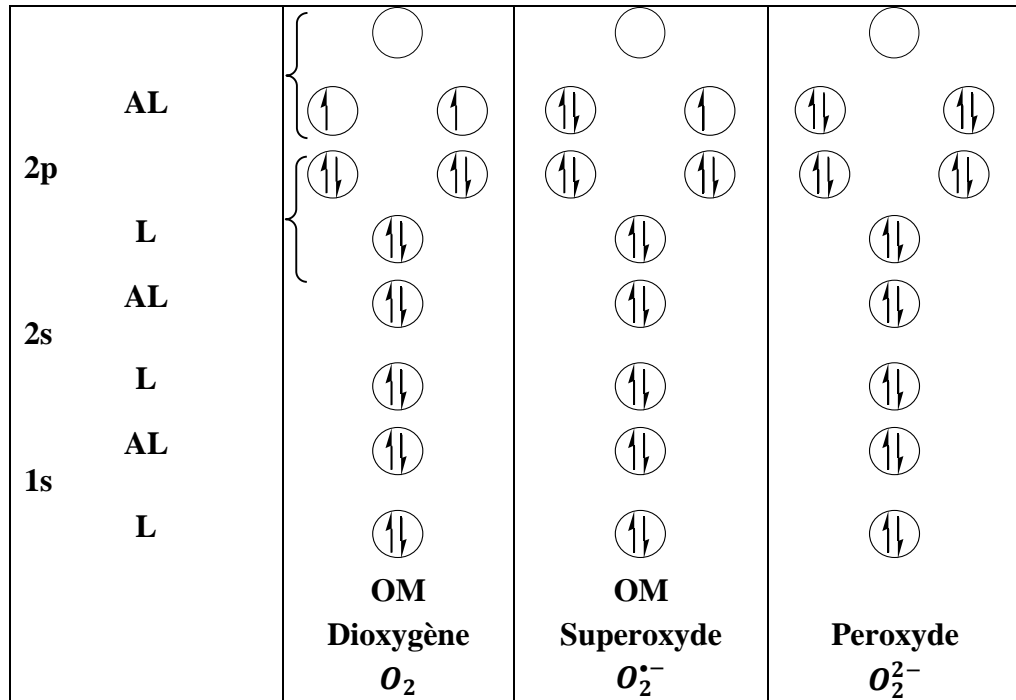
#### **I. 1.1.1. Radicaux libres biologiques**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capable d'exister indépendamment [1]. Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (*ERO*) ou d'autres atomes comme l'azote (*ERN*). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques; leurs constantes de vitesse réactionnelles variables selon leurs natures, elles sont très élevées et peuvent aller de  $10^8$  à  $10^{10}$  mol<sup>-1</sup>.L. s<sup>-1</sup> [2].

#### **I.1.1.2. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (*ERO*) en biologie**

##### **a. Nature de la réactivité des *ERO***

A l'état fondamental, le dioxygène est un biradical avec deux électrons célibataires à spins parallèles placés dans des orbitales antiliantes,  ${}^{\circ}\text{O}=\text{O}^{\circ}$ . L'oxygène moléculaire est relativement peu réactif car il réagit seulement avec les molécules ayant comme lui un ou deux électrons célibataires à spins parallèles.



**Figure I.1 :** Répartition des électrons dans les orbitales liantes (L) et antiliantes (AL) de la molécule d'oxygène, de l'anion superoxyde et du peroxyde

L'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  est un monoanion radical avec un électron célibataire. Il est plus instable et plus réactif que la molécule d'oxygène car il possède trois électrons sur des orbitales antiliantes au fait que l'électron supplémentaire se place dans une orbitale antiliante.

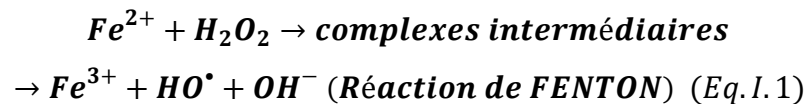
L'anion peroxyde,  $O_2^{2-}$  n'est pas un radical. Cependant il est très instable du fait de l'existence d'un quatrième électron dans une orbitale antiliante. Dans l'eau, l'anion peroxyde  $O_2^{2-}$  se transforme en peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée,  $H_2O_2$ , par acceptation de deux protons. L'eau oxygénée joue un rôle très important dans les réactions radicalaires car elle peut donner des radicaux  $\cdot OH$ [105].

### **b. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène**

Parmi les espèces radicalaires susceptibles qui se forment dans les cellules, il convient de distinguer celles dites "primaires", qui jouent un rôle particulier en physiologie, et celles connues par "secondaires" qui se dérivent des premières par réaction avec des composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxyle  $\cdot OH$  [3].

D'autres espèces dérivées de l'oxygène tel que l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou le nitroperoxyde ( $\text{ONOOH}$ ) ne sont pas des radicaux libres, mais des réactives qui peuvent être des précurseurs de radicaux libres [3].

En effet, le peroxyde d'hydrogène, qui n'est pas un radical libre mais une molécule avec tous ses électrons appariés, présente une toxicité par l'intermédiaire des réactions de type FENTON (Eq. I.1) auxquelles il peut participer sous l'influence de cations métalliques comme  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$  [4].



Certains radicaux formés chez les êtres vivants tels que l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ou le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) ne sont pas très réactifs, ce qui explique d'ailleurs leur utilisation par l'organisme en tant que médiateurs régulant des fonctions biologiques comme la vasodilatation, la prolifération de neurones. Par contre, des espèces comme les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ) et surtout le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) sont particulièrement réactifs avec la plupart des molécules biologiques. Leur réactivité n'a cependant pas que des conséquences toxiques pour l'organisme ; au contraire ils peuvent être utilisés dans divers mécanismes aboutissant à la destruction de bactéries au sein des cellules phagocytaires ou dans la régulation de fonctions cellulaires létales comme l'apoptose.

Les origines cellulaires des *ERO* sont essentiellement enzymatiques et découlent de plusieurs sources. Deux sources majeures sont principalement concernées. La première résulte d'imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale qui produit par réduction mono électronique des *ERO*. La deuxième source majeure de production des *ERO* est constituée par la NAD(P)H oxydase, essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique. A côté de ces deux sources majeures d'*ERO*, d'autres sources cytosoliques présent dans divers organites cellulaires peuvent jouer un rôle dans la modulation de la signalisation cellulaire, telles que la xanthine oxydase, les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450), les NO synthases et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique. L'autoxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine et norépinéphrine), des flavines et de l'hémoglobine, en présence de traces de métaux, peut également être à l'origine de la production d'*ERO* [5].

Les *ERO* sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme.

Les *ERO* apparaissent donc comme des molécules produites par divers mécanismes physiologiques. A certaines doses, elles sont utiles pour l'organisme, mais leur production peut devenir excessive où résulter de mécanismes toxiques exogènes à l'organisme. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau I.1.

**Tableau I.1** : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (D'après BARTOSZ G.)[6]

Nom	symbole
<b>Espèces radicalaires</b>	
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$
Radical hydroxyle	$HO^{\bullet}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$
<b>Espèces non radicalaires</b>	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^-$

### c. Les cibles des *ERO*

La présence d'espèces activées de l'oxygène a des conséquences potentiellement graves pour la cellule [7]. Les organismes vivants possèdent des systèmes de défense ; ainsi à l'état physiologique il existe un équilibre "naturel" entre la production des radicaux libres et les systèmes antioxydants. Sous certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué soit par une production exagérée de radicaux libres soit par une diminution des défenses antioxydantes sous l'effet de certains stimuli pathologiques endogènes (hyper-LDLémie, hypertension, diabète...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme...). On parle alors de stress oxydant dû souvent d'altérations moléculaires participant à de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose, l'inflammation, la dégénérescence neuronale .... Cependant, il est difficile d'évaluer le rôle précis de ces *ERO* au cours des différents stades du processus pathologique.



#### **d. Conséquences du stress oxydant sur l'organisme**

Le stress oxydant conduit à la production de molécules biologiques défaillantes voire cancéreuses et à la surexpression de certains gènes. De ce fait, il est à l'origine de très nombreuses maladies telles que la cataracte, la sclérose, le syndrome de détresse respiratoire aigu [47], l'œdème pulmonaire ainsi que le vieillissement accéléré des tissus, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [3].

De plus, le stress oxydant entraîne des complications diabétiques au niveau macro ou micro-vasculaire ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline [48]. Les *ERO* seraient impliquées dans les maladies neuro dégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer [3] où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. La maladie de Parkinson est due à un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées. Enfin, le stress oxydant joue un rôle non négligeable dans la cancérogénèse. En effet, les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes. Ces molécules carcinogènes créent des lésions de l'ADN, amplifient les signaux de prolifération et inhibent des gènes suppresseurs de tumeurs.

#### **I.1.2. Systèmes de défense antioxydants**

Les antioxydants vont être utilisés afin de neutraliser les effets du stress oxydatif. L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre l'excès de production d'*ERO* et d'*ERN*. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat [8]. Les cellules utilisent ainsi de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires, et selon le milieu intracellulaire ou extracellulaire [3]. Dans le système de défense antioxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques.

##### **I.1.2.1. Systèmes enzymatiques**

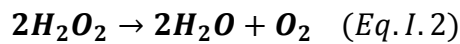
Ces systèmes sont composés d'enzymes telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase, capables d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives.

**a. Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La structure du superoxyde dismutases est bien conservée lors de l'évolution et présente un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde [9].

**b. La catalase**

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



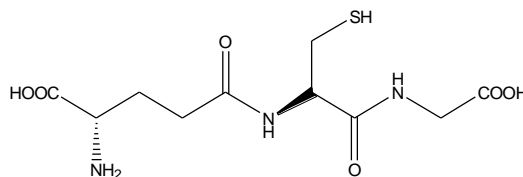
**c. Les glutathion peroxydases**

Les glutathion peroxydases constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases) [7,10]. Toutes les glutathion peroxydases contiennent dans leurs sous-unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme.

**I.1.2.2. Systèmes non enzymatiques** : nous trouvons les antioxydants moléculaires, dont nous trouvons 2 types d'antioxydants :

**I.1.2.2.1. Les antioxydants endogènes** : sont fabriqués par les cellules de notre corps [105].

**a. Le glutathion**



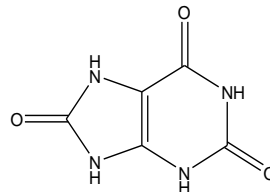
**Figure I.2** : Structure du glutathion (GSH),  $E^\circ_{(GSSG/GSH)} = 0,24 \text{ V}$

Au cœur des défenses antioxydantes, le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants.



### b. L'acide urique

L'acide urique (Figure I.3) est un antioxydant hydrosoluble dont la formule chimique est  $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{H}_4$ .



**Figure I.3** : Structure de l'acide urique

Il a été longtemps associé à la goutte, une maladie autrefois appelée la "maladie des rois" ou "maladie des riches", décrite dès l'époque romaine. Elle est définie comme une surcharge urique liée à une présence endogène exagérée des purines, dont l'acide urique est le catabolite ultime à éliminer. Environ les deux tiers des purines proviennent des cellules apoptotiques, et le dernier tiers résulte des aliments ingérés. La concentration sanguine d'acide urique chez l'homme est une des plus élevées des êtres vivants [112].

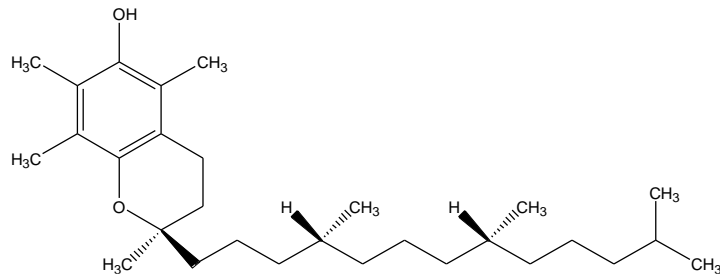
En 1981, AMES B. N. et *Coll.* ont montré que l'acide urique est un piègeur de  $^1\text{O}_2$ , des radicaux peroxy et hydroxyles ( $\text{RO}_2^{\bullet}$  et  $\text{HO}^{\bullet}$ ), de l'ozone et de  $\text{HClO}^{\bullet}$ . La réaction de l'acide urique avec ces *ERO* génère des radicaux moins réactifs que  $\text{HO}^{\bullet}$  [113].

### I.1.2.2.2. Les antioxydants exogènes

Ce sont ceux que nous consommons tous les jours dans notre régime alimentaire, notamment ceux contenus dans les fruits et légumes.

#### a. La vitamine E (ou $\alpha$ -tocophérol)

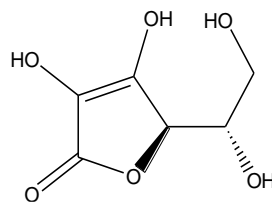
La vitamine E (Fig. I.4) est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celle de la famille des tocophérols ( $E^{\circ} = 0,48 \text{ V}$ ). Elle a besoin d'interagir avec d'autres composés pour agir correctement. Elle se trouve dans tous nos tissus.



**Figure I.4 :** Structure de la vitamine E (ou  $\alpha$ -tocophérol)

L' $\alpha$ -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDL. Chaque particule de LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules de vitamine E [11]. La vitamine E interrompt la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes en limitant la peroxydation des acides gras polyinsaturés [12].

### **b. La vitamine C (ou acide ascorbique)**



**Figure I.5 :** Structure de la vitamine C

La vitamine C agit principalement en piégeant directement les *ERO* (majoritairement l' $O_2^{\bullet-}$ ). La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extra-cellulaires (compartiments hydrophiles) [13]. Ses activités biologiques viennent de son puissant potentiel réducteur ( $E^\circ = - 0,29$  V).

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser cette vitamine, sauf le cochon d'inde, la roussette, certains oiseaux et les primates (dont l'être humain) et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase. L'acide ascorbique, essentiel au bon fonctionnement de notre organisme, doit alors être apporté par notre alimentation [105].

### **c. Les antioxydants phénoliques**

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines. Les décès dus aux infarctus du myocarde ou par athérosclérose coronarienne sont associés au taux élevé des cholestérols de type LDL circulant dans le sang [14].

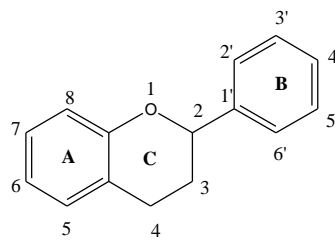
#### **c.1. Les antioxydants phénoliques naturels**

Les antioxydants présents dans le raisin, le thé ou les fruits sont souvent de type phénolique. Les composés phénoliques présents dans le raisin peuvent être séparés entre les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

##### **c.1.1. Les flavonoïdes**

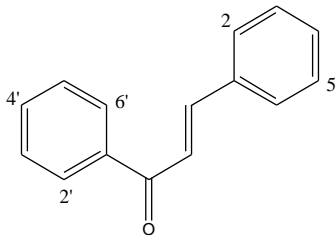
Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les catéchines, la quercétine, les isoflavones ou l'acide gallique. Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes.

Les flavonoïdes, excepté les chalcones, les aurons et les isoflavones, ont une origine biosynthétique commune et comportent un même élément structural de base formé par quinze atomes de carbone appartenant à deux cycles en  $C_6$  (A et B) reliés par une chaîne en  $C_3$  (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) figure I.6 :



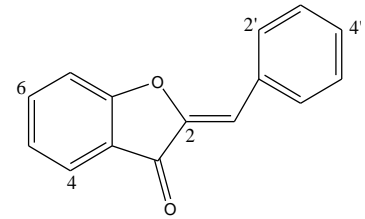
**Figure I.6 :** Squelette de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont subdivisés, comme il est indiqué dans la figure ci dessus, en différentes classes en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C. Les composés appartenant à la même classe diffèrent entre eux par leur degré et la position d'hydroxylation, la présence de substituant sur la génine et le degré de polymérisation.



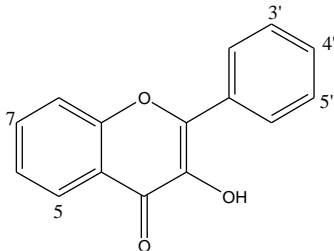
**Chalcones**

Flavonoïde	Substitution					
	2'	3'	4'	5'	6'	4
Davidigénine	OH		OH			OH
Asebogénine	OH		OMe		OH	OH



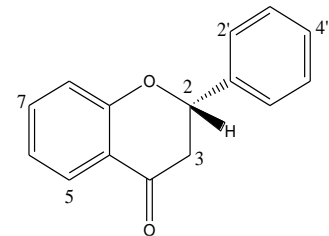
**Aurones**

Flavonoïde	Substitution					
	4	6	7	3'	4'	5'
Leptosidine		OH	OMe	OH	OH	
Maritimétine		OH	OH	OH	OH	



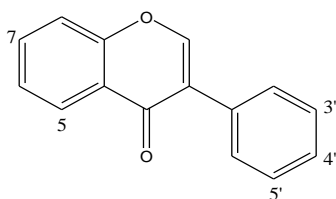
**Flavonols**

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Kamphérole	OH		OH		OH	
Myricétine	OH		OH	OH	OH	OH
Quercétine	OH		OH	OH	OH	



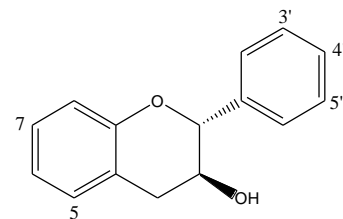
**Flavanones**

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Eriodictyol	OH		OH	OH	OH	
Hesperitine	OH		OH	OH	OMe	
Naringénine	OH		OH		OH	



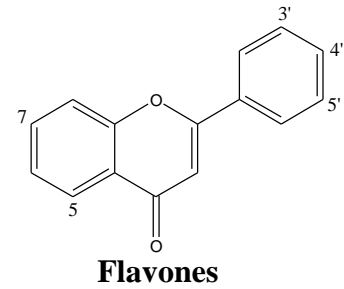
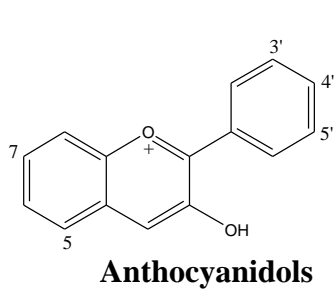
**Isoflavones**

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Daidzeine			OH		OH	
Génisteine	OH		OH		OH	



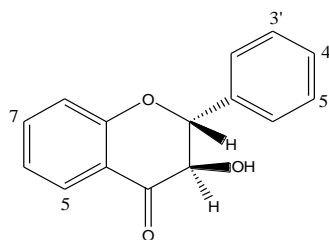
**Flavanols**

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Catéchine	OH		OH	OH	OH	
Gallacatéchine	OH		OH	OH	OH	OH



Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Pelargonidine	OH	OH	OH		OH	
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH

Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Apigénine	OH		OH		OH	
Chrysrine			OH			
Lutéoline	OH		OH	OH	OH	



Flavonoïde	Substitution					
	5	6	7	3'	4'	5'
Taxifoline	OH		OH	OH	OH	
Fusetine			OH	OH	OH	

**Figure I.7** : Différentes classes de flavonoïdes

### c.1.1.1. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes

#### a. Solubilité des flavonoïdes

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes [15] :

- Des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques ; des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle).
- Des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde.
- Des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certains pH.

Selon SAIDMAN *et coll.* [16], le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant.

Les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant. Toutefois, la solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et dépendante du pH [17]. En effet, à un pH 1,5, la solubilité de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée.

D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20°C est respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/L et < 10 mg/L [18,78]. BENAVENTE G. *et coll.* [19] ont évalué la solubilité de la néohesperidine dihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de ce composé à 20°C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g/L, 12 g/L et 123 g/L. La solubilité dans les solvants organiques a été que peu étudiée.

La faible solubilité des flavonoïdes dans les phases aqueuses et lipophiles laisse leurs incorporations dans les formulations pharmaceutiques et alimentaires difficiles. Toutefois, la métabolisation (hydrolyse de la partie glycosylée, sulfatation, glucuronisation) de ces composés par les cellules de l'intestin permet leur absorption par l'organisme [20].

Pour pallier à ces problèmes de solubilité, différentes techniques ont été utilisées ayant pour but de modifier la structure de ces molécules :

- la glycosylation de la naringine par du maltotriose, en présence de l'amylase maltogénique de *Bacillus stearothermophilus*, a permis l'augmentation de sa solubilité dans l'eau de 250 fois [21].
- La complexation de la naringénine et de l'hespéretine avec de la  $\beta$  cyclodextrine a permis d'augmenter leur solubilité dans des milieux hydrophiles à différents pH [22].
- L'acylation par des acides gras ou aliphatiques substitués avec un groupement polaire (sucre, phosphate, carboxylate) a permis d'améliorer la solubilité respectivement dans des phases lipophiles ou en milieu aqueux. Le succinate de quercétine (2-phosphonoinositol) [18], l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine [23] ont une solubilité dans l'eau respectivement 15000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine.

Cependant, PERRIER *et coll.* [24] et SAKAI *et coll.* [25] ont observé, respectivement, une augmentation de la solubilité de l'hespéretine et de la catéchine dans les phases lipophiles après acylation par des acides gras.

- La polymérisation de la rutine a permis d'augmenter sa solubilité dans l'eau [26].



## **b. Stabilité des flavonoïdes**

L'importante réactivité des flavonoïdes donne à ces molécules une instabilité à plusieurs conditions environnantes.

### *\* Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes*

Les paramètres pouvant agir sur la stabilité des flavonoïdes sont la lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique ou non et d'oxydant. Ainsi, une élévation de la température et du pH, la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes. En effet, la stabilité est plus faible à des pH basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules due soit à une déprotonation de ces composés (diminution du potentiel d'oxydation), soit à une stabilisation de l'oxydant (anion superoxyde).

### *\* Effet de la structure du flavonoïde sur la stabilité*

La stabilité des flavonoïdes est affectée par la nature du flavonoïde et la présence de substituant (glycosylation, acylation, polymère). En effet, FRIEDMAN et JURGENS [27] ont observé que la stabilité des flavonoïdes et de certains acides aromatiques, vis-à-vis du pH, est plus élevée que dans le cas d'autres composés phénoliques en raison d'une stabilisation accrue par résonance des intermédiaires de type phénoxy et quinoïque. Il a été aussi rapporté que la stabilité des flavones à la lumière est plus importante que celle des flavonols [28].

Ainsi, l'absence d'un groupe hydroxyle libre en position 3 sur les flavones a un effet positif sur la stabilité en particulier à la lumière. Les flavones et les flavonols glycosylés en position 3 sont donc moins réactifs.

En ce qui concerne l'hydroxylation, MARKKRIS et ROSSITER [29] n'ont pas observé d'effet sur la stabilité en comparant les mécanismes de dégradation de la quercétine et de la morine.

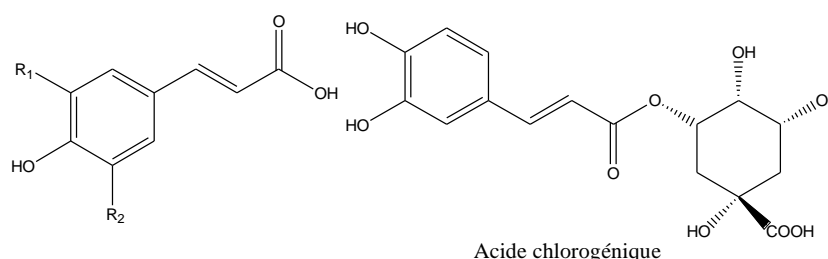
### c.1.2. Les non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques et les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

#### C.1.2.1. Les acides phénoliques

Les composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique qui a très largement démontré son activité antioxydante [31], l'acide férulique et l'acide sinapique [32].

On trouve aussi des dérivés de ces acides, comme l'acide chlorogénique présent dans les pommes. Ce dernier s'avère être un antioxydant intéressant, à tel point que de nombreux laboratoires tentent d'en faire sa synthèse [33].

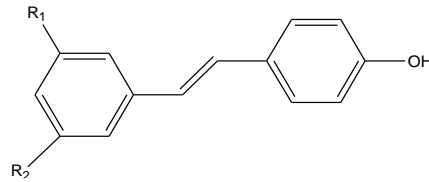


Acide cinnamiques	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Acide caféique	OH	H
Acide p-coumarique	H	H
Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	H
Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figure I.8** : Structure de dérivés de l'acide p-hydroxycinnamique

#### c.1.2.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons  $\pi$  sur la totalité de la molécule. Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité LDL. Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires [34].



Stilbènes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Pterostilbène	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Resvératrol	OH	OH
Picéïde	OGlc	OH

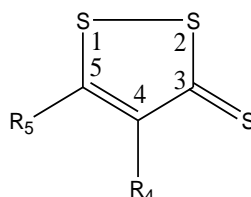
**Figure I.9 :** Structures chimiques de quelques stilbènes

### **C.1.3. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires des composés phénoliques**

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox [8], les flavonoïdes (Fl-OH) capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde sont thermodynamiquement, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène. Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes peut s'exercer par la complexation des métaux de transition. En effet, ces derniers accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives [115].

#### d. Les dithiolethiones

Le soufre est moins électronégatif que l'oxygène. Il possède des électrons sur la 3ème couche dont des électrons d, de ce fait, le soufre est plus volumineux que l'oxygène (polarisabilité plus importante). Parmi les composés soufrés on trouve les 1,2-dithiole-3-thiones, qui sont des composés hétérocycliques flexibles contenant trois atomes de soufre dont l'une est une fonction thione [35].



**Figure I.10 :** La forme générale de 1,2-dithiole-3-thione

Les 1,2-dithiole-3-thiones sont des hétérocycles sulfurés naturellement trouvés dans végétaux crucifère [36]. Les 1,2-dithiole-3-thiones sont une classe de composés d'organosoufrés de la structure générale montrée dans la figure I.10. 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, quand l'intérêt considérable s'est développé, notamment en France, dont les utilisations potentielles de ces composés seraient dans les domaines industriels et pharmaceutiques [37].

Dans les années 1980, l'intérêt pour cette classe de composés a été fortement stimulé par les travaux du groupe de BUEDING. Cette équipe a rapporté que si l'on met l'oltipraz et le sulfarlem dans l'alimentation des souris, les niveaux hépatiques sont significativement élevés de même que pour de la glutathione et la glutathione-S-transférase (GST) et neutralisent l'effet toxique de l'acétaminophène et du tétrachlorure de carbone [37].

Les dithiolethiones (dont l'anéthole (sulfarlem) et oltipraz) ont des propriétés antioxydantes, radioprotectrices et chimiopréventives.

L'administration de cette substance aux fumeurs est corrélée à une nette diminution de cancer du poumon [38].

Les 1,2-dithiole-3-thione (parent), 4-méthyl-5-pyrazinyl-1,2-dithiole-3-thione et 5-tert-butyl-1,2-dithiole-3-thione sont des dithiolethiones qui ont démontré pour leur pouvoir à inhiber la toxicité chimique et la cancérogénicité chez de nombreux organes cibles [39].

MUNDAY et *Coll.* ont étudié, d'une façon comparative, l'activité de 25 dithiolethiones. Il semble que les propriétés chimioprotectrices soient partagées par tous les dithiolethiones à des degrés plus ou moins élevés [107]. Ces 25 dithiolethiones sont substitués en position 4 et 5 ; même la 1,2-dithiole-3-thione (parent non substitué en position 4 ou 5) est active.

**d.1. Les propriétés physico-chimiques des dithiolethiones:** Nous nous intéressons seulement aux propriétés qui ont des effets sur la lipophilie afin d'interpréter les valeurs de  $\log P_{\text{eau/n-octanol}}$  trouvées et les activités antioxydantes des dithiolethiones.

#### **d.1.1. Moments dipolaires**

Les calculs théoriques permettent de déterminer, avec une bonne précision certaines propriétés physico-chimiques et électroniques des dithiolethiones notamment des moments dipolaires. Par exemple pour la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione, la 5-phényl-1,2-dithiole-3-thione et la benzo-1,2-dithiole-3-thione les valeurs théoriques sont : 5.73, 4.70 et 3.88 D, respectivement. Les valeurs expérimentales dans le benzène sont : 5.89, 4.93 et 3.99D [40]. Ces valeurs expriment la grande polarité des composés dithioliques.

#### **d.1.2. Aromaticité des 1,2-dithiole-3-thiones**

L'aromaticité de dithiolethiones est manifestée, par la 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 [41].

On peut considérer que quatre électrons proviennent des deux doublets 3 p 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 chargé négativement tandis que le cycle dithiolique acquiert une charge positive.

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.

#### **d.1.3. Conformation de quelques 1,2-dithiole-3-thiones substituées par un groupement aryle**

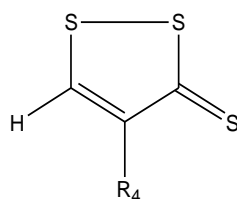
BONA M. [42], dans ses études, concluent que pour la 4,5-diphényl-1,2-dithiole-3-thione, les calculs semi-empiriques sont réalisés à l'aide du logiciel MOPAC 6.00, ces calculs montrent que la conformation de plus basse énergie correspond à un angle dièdre des plans du dithiole et le phényle en est de  $92,9^\circ$ . Aussi pour le phényle en 5 à un angle dièdre de  $104,5^\circ$ .

## I.2. TRAVAUX EXPERIMENTALS

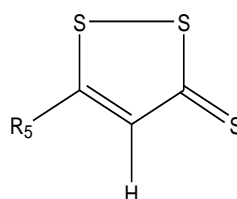
### Introduction

Les noyaux dithiole font l'objet de nombreux travaux dans le domaine de la protection de corrosion notamment pour notre équipe. Cette dernière s'intéresse à l'étude de l'effet de structure des dithiolethiones sur l'activité d'inhibition de corrosion. Certains de ces composés ont montré une activité antioxydante intéressante [37]. Dans cet optique, nous avons travaillé sur deux familles de dithiolethiones :

- Les cycles dithioliques substitués en position 4



- Les cycles dithioliques substitués en position 5



Dans la première partie, nous avons préparé les deux composés 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione **C** et son dérivé **C1**.

Dans la deuxième partie, nous avons déterminé l'activité antioxydante " *in vitro*" par cinq méthodes différentes.

### I.2.1. Synthèse des 1,2-dithiole-3-thiones

Toutes les dithiolethiones que nous avons utilisés sont synthétisées par DEKMOUCHE M. selon la méthode décrite par FIELDS E. [43] et les cations dithiolylium sont préparés par alkylation des dithiolethiones correspondantes [44,45], sauf le composé **C** et son sel correspondant **C1**. Ils ont été préparés dans ce travail par la récupération du composé **C** à partir d'un médicament sulfarlem<sup>®</sup> synthétisé par *Rottendorf Pharma*.

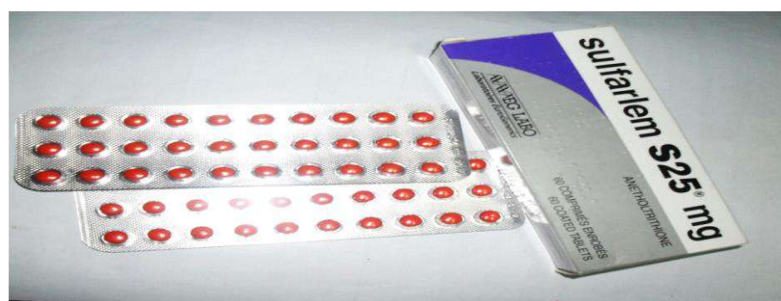
Avant de commencer ce travail, nous avons purifié les dithiolethiones et nous avons déterminé leurs points de fusion dans un capillaire à point de fusion.

Les réactifs de départ sont généralement des produits commerciaux qui n'ont pas été purifiés avant leurs utilisations.

### **I.2.1.1. Récupération de la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione (C)**

Dans cette étape, nous avons récupéré de la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione, du médicament sulfarlem qui est une sorte de comprimés enrobés par un polymère comestible d'une couleur jaune orangé, (boîte de 60 comprimés) chaque comprimé contient 25 mg.

**Excipient :** lactose, gomme arabique, amidon de blé, saccharose, gomme guar, stéarate de magnésium, silice colloïdale, anhydre gélatine, talc dioxyde de titane, jaune orangé cire de carnauba.



**Figure I.11 :** photo de comprimé de sulfarlem

Pour vérifier que le sulfarlem récupéré du médicament a les mêmes caractéristiques que le sulfarlem synthétisé par SAIDI M., nous avons procédé à la détermination des  $R_f$  des deux produits et la comparaison des valeurs de point de fusion et leurs spectres UV-Visible et IR. Les résultats obtenus étaient identiques.

#### **Spectre UV-visible**

Nous avons réalisé un spectre d'UV-visible de sulfarlem et par conséquent, a apparu deux bandes : une forte bande à ( $\lambda= 350\text{nm}$ ) et une faible bande à ( $\lambda=450\text{nm}$ ), qui donne un spectre conforme au spectre du sulfarlem synthétisé par la société des médicaments (Fig. I.12 et I.13).





**Figure I.12** : Spectre UV-visible de sulfarlem récupéré



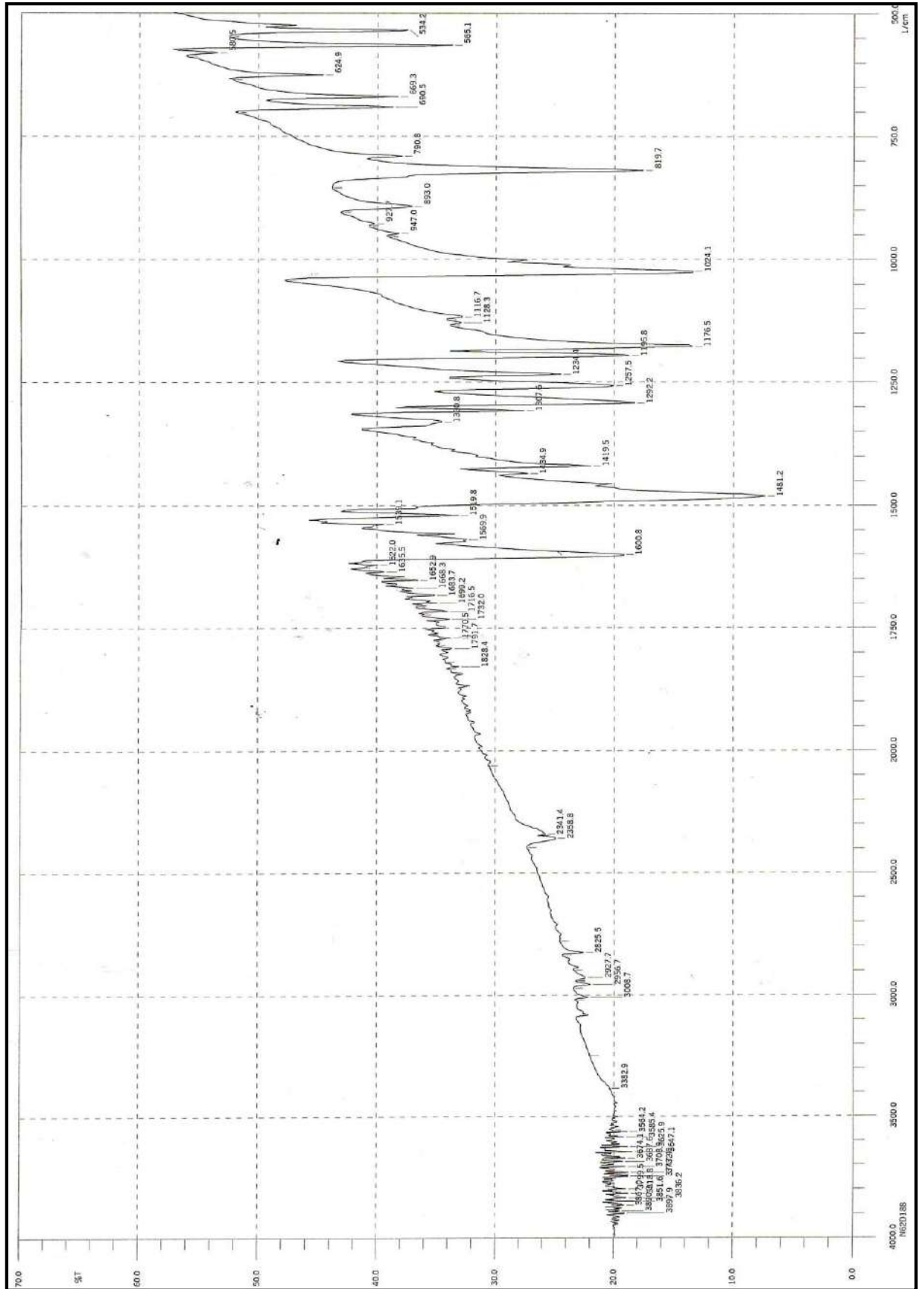
**Figure I.13** : Spectre UV-visible de sulfarlem synthétisé

### Spectre IR

Les valeurs des bandes d'absorptions importantes dans le spectre IR (pastille de KBr) de sulfarlem sont regroupées dans le tableau I.2 :

**Tableau I.2** : Les bandes d'absorptions dans le spectre IR de sulfarlem

Valeur de nombre d'onde	Type de liaison
624 cm <sup>-1</sup> – 690cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-S vibration d'élongation
819,7 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a un cycle aromatique commutable en position para
1026,1 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-O-C aromatique
1195 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C=S
1257cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-O-R aromatique d'élongation non symétrique
1481,2cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-H vibration de déformation
1602,7 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C=C
2887 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-H d'élongation de CH <sub>3</sub>

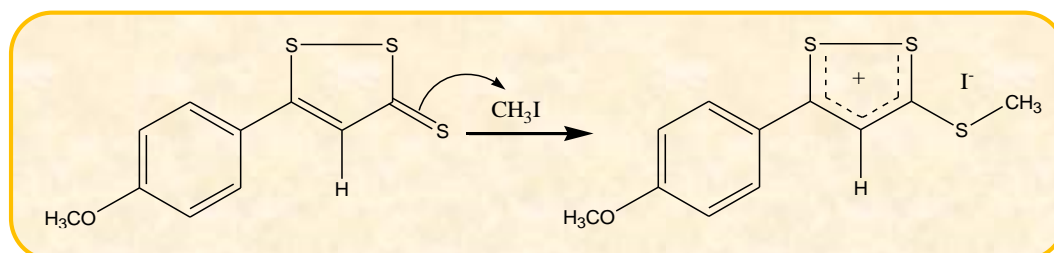


**Figure I.14** : Spectre IR de sulfarlem recuperée

### I.2.1.2. Préparation de la 3-Méthylthio-5p-méthoxyphényl-1,2-Dithiolylium contre ion (I<sup>-</sup>) (C1)

La réaction de la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione avec l'iodure de méthyle conduit au dérivé C1 (sel de sulfarlem) avec un rendement de 95 % cette étape a lieu à une température de 30 °C.

L'équation de la réaction est la suivante :



**Schéma I.1** : Mécanisme de synthèse de sel C1

#### Spectre UV-visible

On a réalisé un spectre d'UV-visible de sel de sulfarlem en utilisant comme solvant l'eau saturé en octanol. Deux bandes sont apparues à ( $\lambda=454\text{nm}$  et  $\lambda=272\text{nm}$ )



**Figure I.15** : Spectre UV-visible de sel de sulfarlem C1

#### Spectre IR

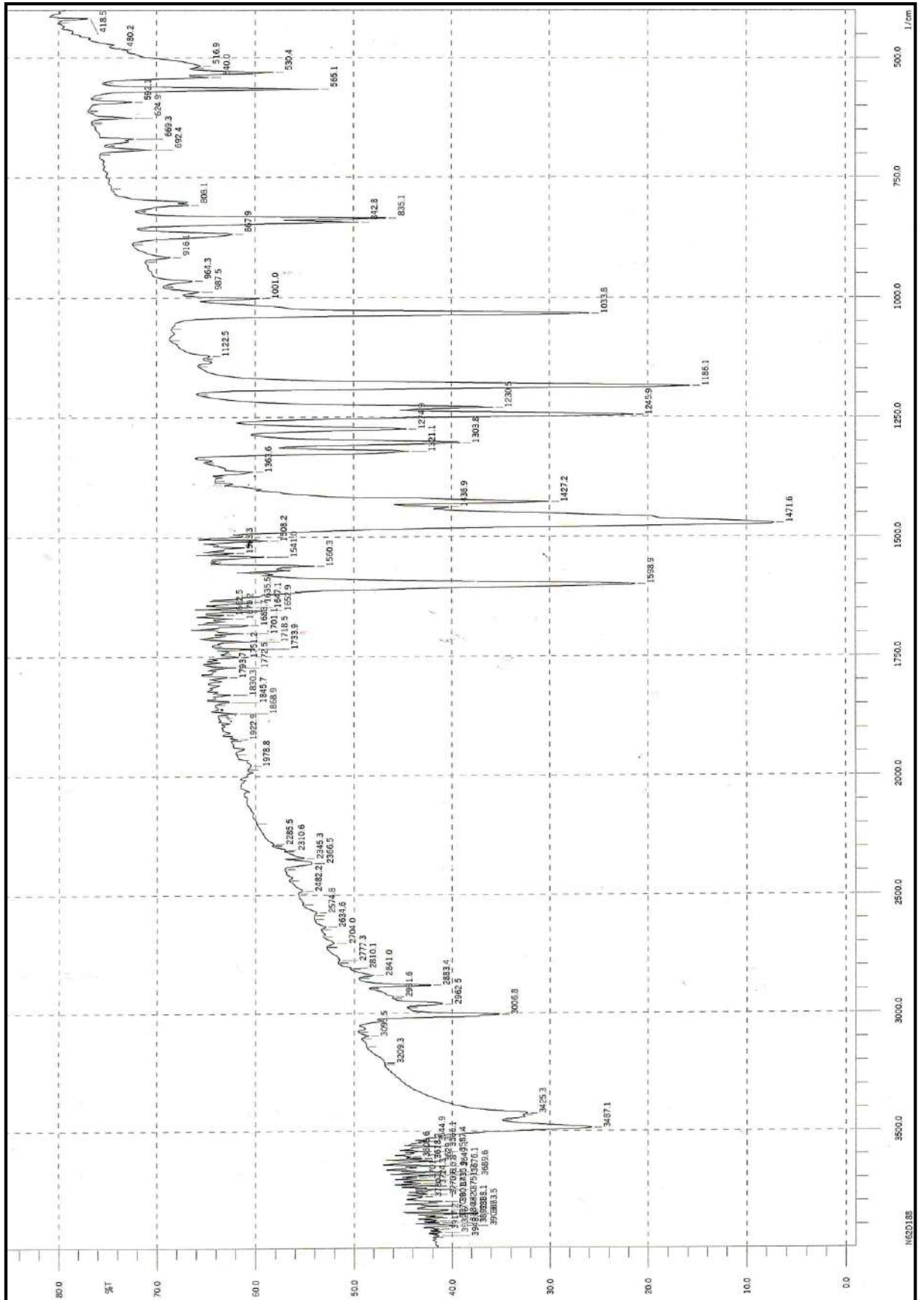
Les bandes d'absorptions les plus importantes sur le spectre IR (pastille de KBr) de la molécule du sel de sulfarlem (Fig. I.16) sont regroupées dans le tableau I.3 :

**Tableau I.3 :** Les bandes d'absorptions dans le spectre IR du sel de sulfarlem

<b>Valeur de nombre d'onde</b>	<b>Type de liaison</b>
(624cm <sup>-1</sup> – 692cm <sup>-1</sup> ) 835 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-S d'élongation indique qu'il y a un cycle aromatique commutable en position para
1033,8 cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-O-C aromatique
1245,9cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-O-R aromatique d'élongation non symétrique
1427,2cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-H vibration de déformation
1598,9cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C=C
3006cm <sup>-1</sup>	indique qu'il y a une liaison C-H dans le cycle aromatique d'élongation

**Remarque**

En comparant entre le spectre de sulfarlem et son sel correspondant nous avons remarqué la disparition de la bande à **1195 cm<sup>-1</sup>** ce qui indique qu'il y a une liaison C=S.



**Figure I.16 :** Spectre IR de sel de sulfarlem

### **I.2.2. Détermination de l'activité antioxydante *in vitro***

Le pouvoir antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure du pouvoir antioxydant.

L'un des objectifs dans ce travail de thèse a consisté à apprécier l'activité antioxydante des composés dithioliques et phénoliques avec deux techniques d'analyse dont l'une est physicochimique (spectroscopie d'absorption UV-Vis notamment) en utilisant différents tests :

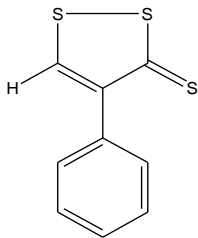
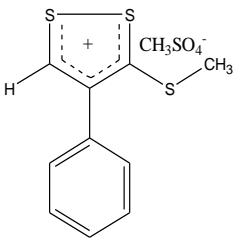
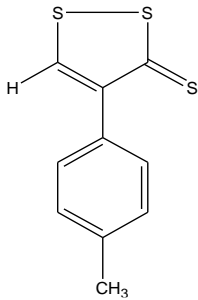
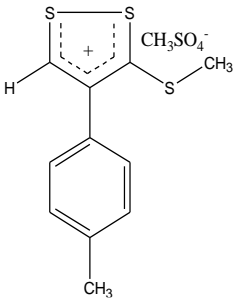
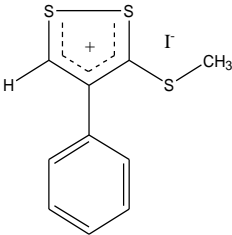
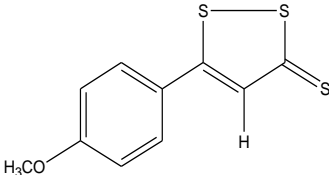
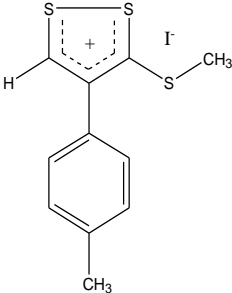
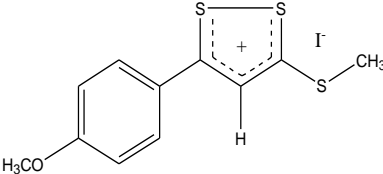
- Le pouvoir réducteur sur le ferricyanure de potassium
- L'activité chélatrice des ions de  $Fe^{2+}$
- DPPH $\cdot$
- $\cdot OH$
- $O_2^{\cdot-}$

L'autre méthode est la méthode électrochimique par génération de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  puis lui neutraliser afin de déterminer les valeurs de  $CI_{50}$ .

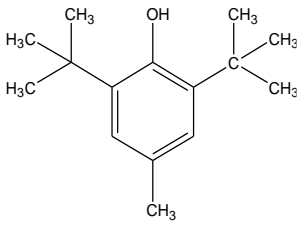
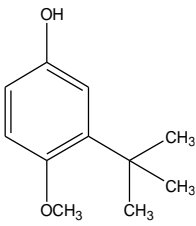
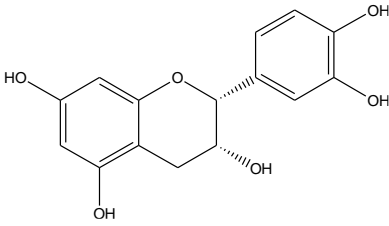
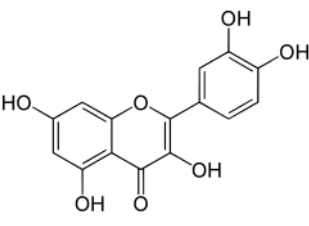
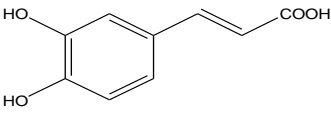
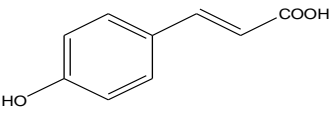
#### **La structure des composés étudiés**

Les composés dithiolethiones, phénoliques et leurs dérivés étudiés dans ce travail sont représentés dans le tableau I.4 et le tableau I.5 respectivement suivant et nous avons utilisé l'acide ascorbique (Vitamine C) comme standard.

**Tableau I.4** : Les structures et les abréviations des dérivés dithioliques

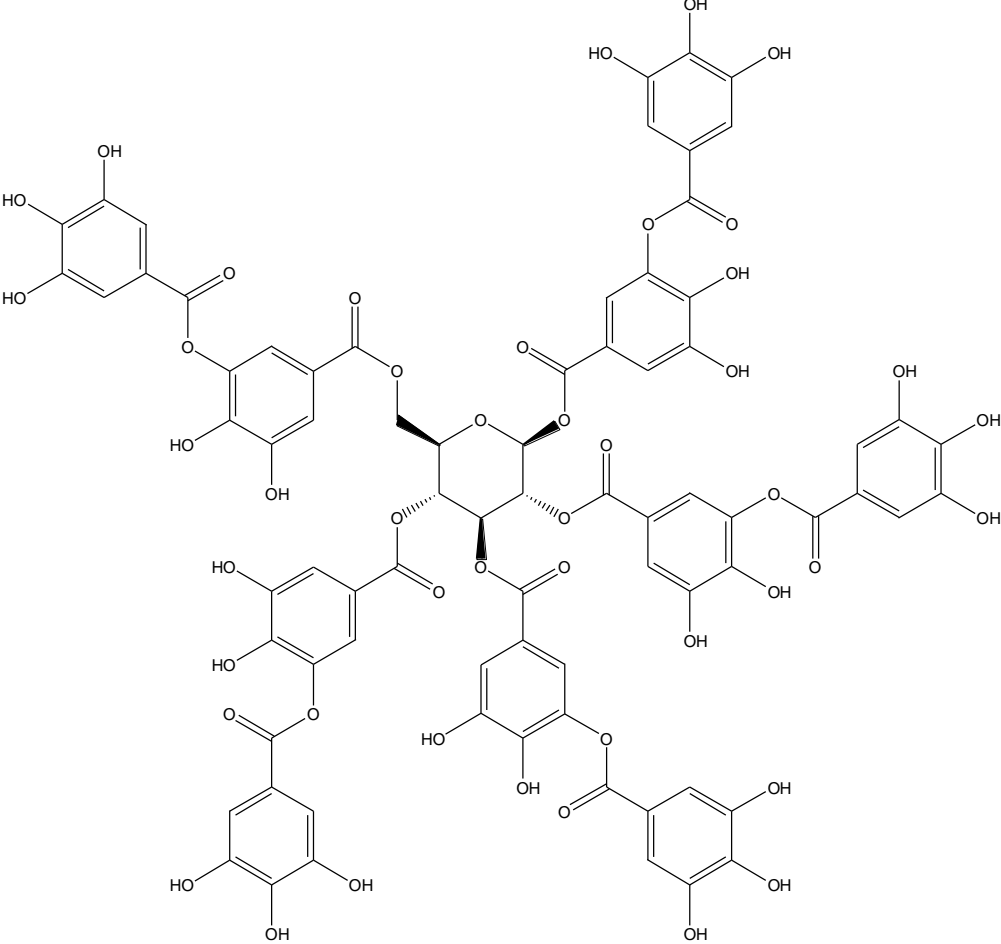
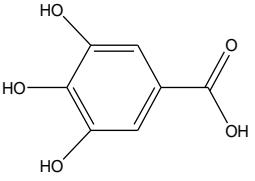
Structure	Nom [abréviation]	Structure	Nom [abréviation]
	4-phényl-1,2-dithiole-3-thione p.f = 120 °C [A]		3-méthylthio-4-phényl-1,2-dithiolylium contre ion (CH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) p.f = 218 °C [A2]
	4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione p.f = 130 °C [B]		3-méthylthio-4-p-tolyl-1,2-dithiolylium contre ion (CH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) p.f = 230 °C [B2]
	3-méthylthio-4-phényl-1,2-dithiolylium contre ion (I <sup>-</sup> ) p.f = 224 °C [A1]		5-p-méthoxy phényl-1,2-dithiole-3-thione p.f = 109 °C [C]
	3-méthylthio-4-p-tolyl-1,2-dithiolylium contre ion (I <sup>-</sup> ) p.f = 234 °C [B1]		3-méthylthio-5-p-méthoxy phényl-1,2-dithiolylium contre ion (I <sup>-</sup> ) p.f = 228 °C [C1]

**Tableau I.5** : Les structures des composés phénoliques

Structure	Nom	Structure	Nom
	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène (BHT)		3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)
	(-)-épicatechine		Quercétine
	Acide caféique		acide p-coumarique



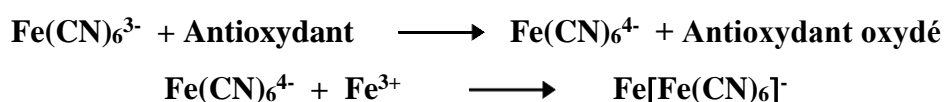
Suite de tableau I.5

Structure	Nom
	Acide tannique
	Acide gallique

### I.2.2.1. Activité réductrice sur le ferricyanure de potassium

Le pouvoir réducteur d'un composé est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice des dithiolethiones et les composés phénoliques sont déterminées selon la méthode de CHEN H. Y. et YEN G. C. [46], basée sur la réaction chimique de réduction du Fer(III) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en Fer (II). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés. La chimie des analyses fer peut être résumée avec l'équation de la réaction suivante :

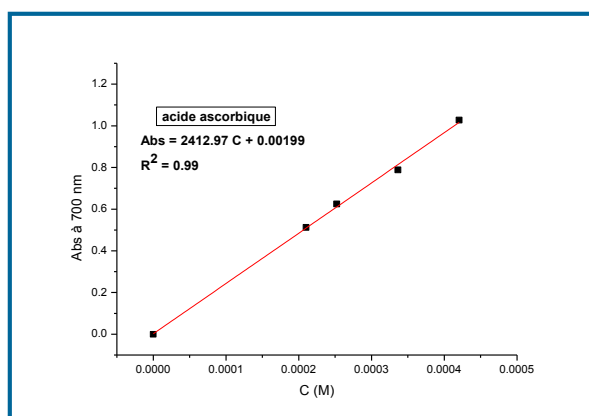


#### Résultats et discussion

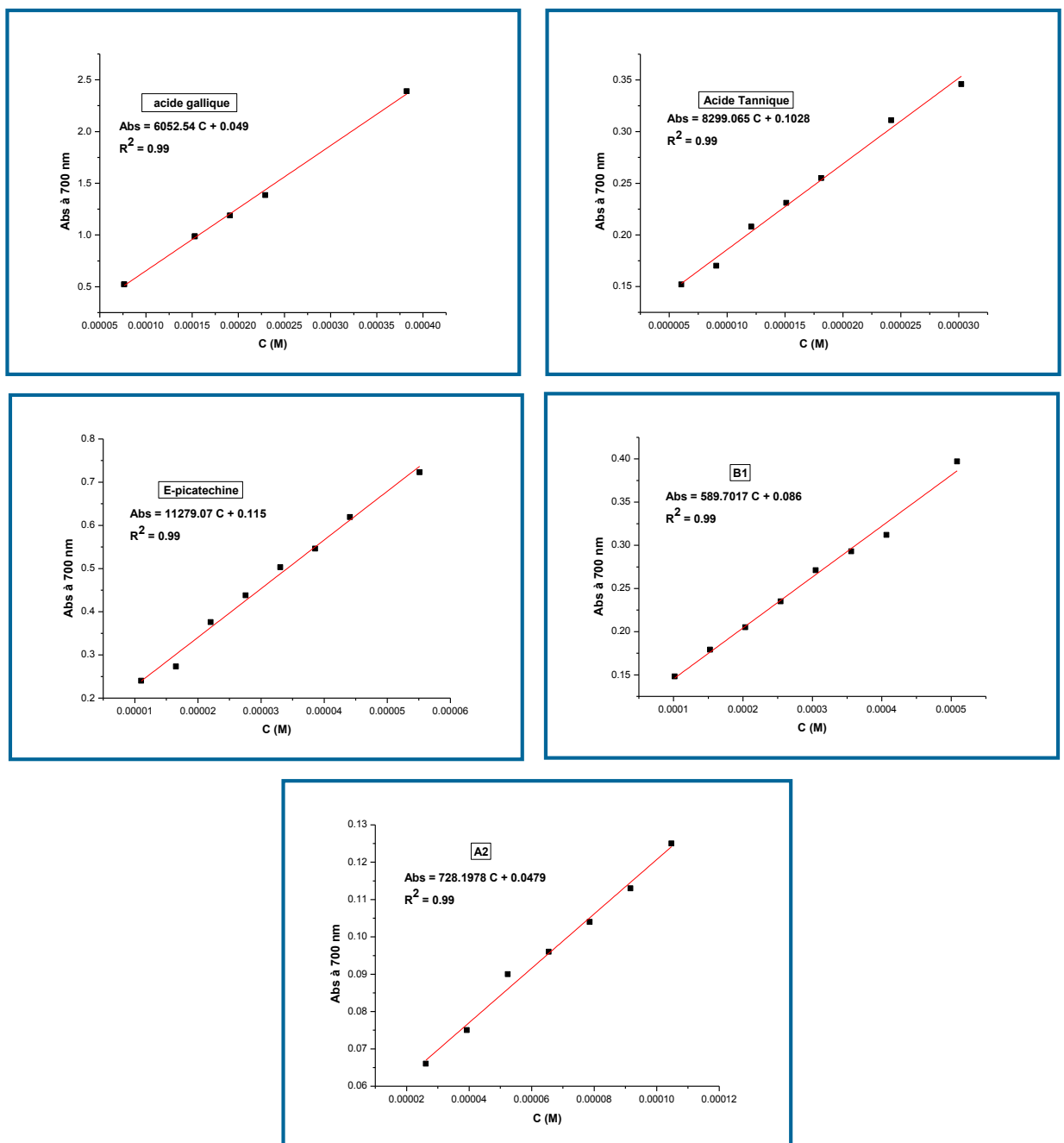
L'activité antioxydante est mesurée selon un nouveau terme appelé **AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity)**. On définit l'AEAC comme la concentration molaire de la solution d'acide ascorbique qui possède un pouvoir réducteur équivalent à solution de concentration 1 M de composé étudié.

$$AEAC = \frac{\text{pente (Antioxydant)} \times (1M) + \text{intercepte (Antioxydant)}}{\text{pente (Vitamine C)}} - \text{pente}((\text{Vitamine C}))$$

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.



**Figure I.17 :** Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C)



**Figure I.18 :** Courbes représentant le pouvoir réductrice de quelques dithiolethiones et composés phénoliques étudiés

Les différents produits sont traités de la même façon que ceux des solutions standards de l'acide ascorbique. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de la concentration.

**Analyse statistique**

Le coefficient de détermination des propriétés antioxydante a été déterminé en utilisant les programmes Origine 8.

On résume les résultats des tests du pouvoir réducteur dans le tableau I.6 :

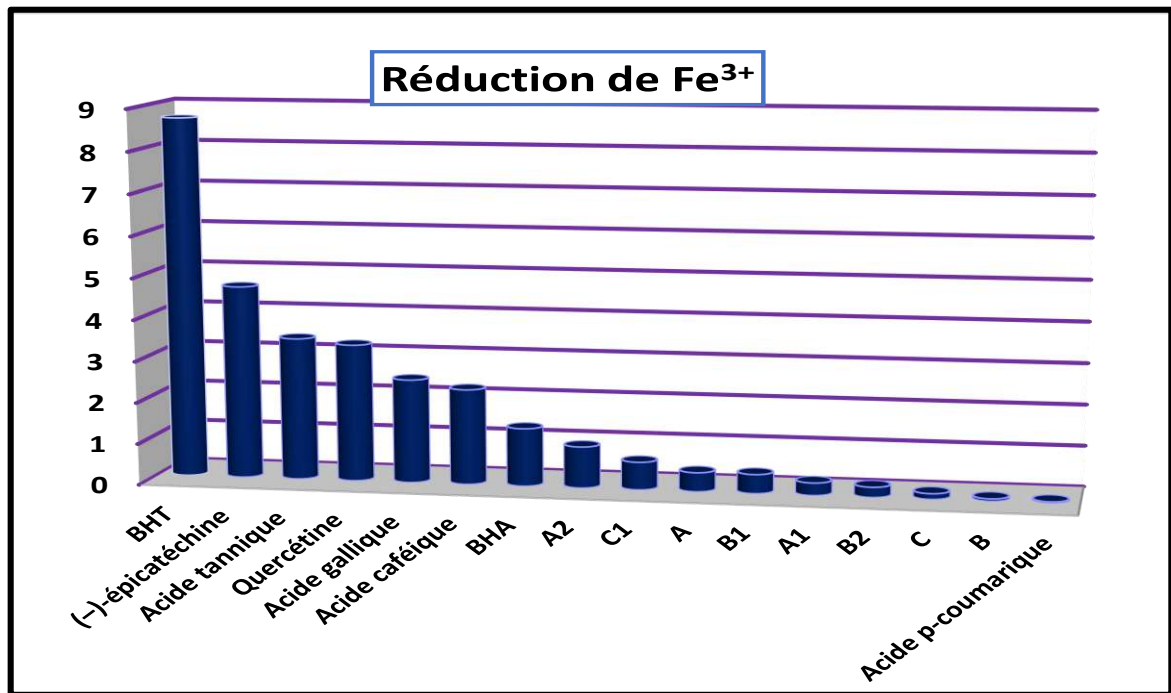
**Tableau I.6** : Les résultats de test du pouvoir réducteur (AEAC)

Échantillons	Activité antioxydante AEAC (M)
A	0,460
B	0,057
C	0,135
A1	0,301
A2	0,999
B2	0,244
B1	0,460
C1	0,670
BHA	1,401
Quercétine	3,319
Acide tannique	3,440
Acide gallique	2,508
BHT	8,701
Acide caféique	2,308
Acide p-coumarique	$3,132 \times 10^{-2}$
(-)-épicatéchine	4,674

La réduction de Fe (III) est souvent employée comme indicateur de l'activité de donneur d'électron, qui est un mécanisme important d'action antioxydante [47]. En analyse d'activité réductrice, la présence des antioxydants dans les échantillons aurait comme conséquence la réduction de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  en donnant un électron. La quantité du complexe de  $Fe^{2+}$  peut être alors soit surveillée en mesurant la formation du Perl's bleu Prussien à 700 nm. La croissance d'absorbance à 700 nm indique une augmentation des capacités réductrices.

On a constaté que les activités réductrices de tous les dithiolethiones et les composés phénoliques 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 fer est directement proportionnelle à la valeur AEAC, elle est dans l'ordre croissant selon le classement suivant :



**Figure I.19** : Classification de la capacité réductrice selon les valeurs d'AEAC

Les résultats obtenus dans le tableau I.6 montrent que les composés étudiés possèdent une activité antioxydante très variée et les valeurs d'AEAC sont entre 0,0313 M et 8,701M. Les valeurs de l'AEAC les plus faibles sont signalées pour le 4-tolyl-1,2-dithiole-3-thione B et l'acide p-coumarique (0,057 M et  $3,132 \times 10^{-2}$  M respectivement).

En effet, l'AEAC la plus élevée est enregistrée pour le BHT, l'(-)-épicatéchine et l'acide tannique (8,7012 M, 4,674 M et 3,44 M respectivement).

De ces résultats, nous remarquons que l'acide caféique possède une capacité réductrice très importante par rapport à l'acide p-coumarique qui donne une faible activité réductrice (AEAC = 0,0313 M).

Pour le classement de la capacité réductrice de Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> nous avons constaté une nette contradiction entre nos résultats concernant de BHT, qui est considéré comme le meilleur réducteur mais les études de GÜLÇİN İ. et *Coll.* [97] prouve que le BHT est moins réducteur que l'acide tannique.

En général, l'interprétation de cette variance entre les valeurs d'AEAC des composés étudiés est attribué au potentiel d'oxydation de chaque composé, ou l'on trouve une relation inverse entre les valeurs de capacités réductives AEAC et le potentiel d'oxydation  $E_{pa}$  (voir le tableau I.7)

En réalité, les groupes donneurs des électrons comme (OH, OCH<sub>3</sub>, alkyle) minimisent le potentiel rédox des polyphénols et augmente leurs capacités antioxydantes.

A partir des valeurs de potentiels d'oxydation (tableau I.7) l'introduction d'un second groupe hydroxyle au niveau de l'acide p-coumarique conduit à la réduction significative du potentiel d'oxydation comme dans le cas de l'acide caféique ( $E_{pa} = 0,45$  V).

**Tableau I.7** : Les potentiels d'oxydation

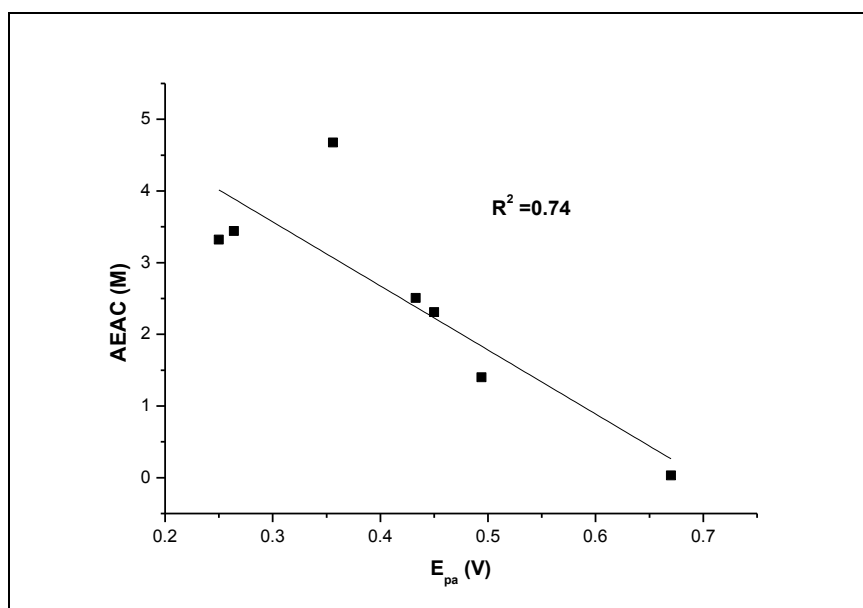
<b>Composés étudiés</b>	<b><math>E_{pa}</math> (V)</b>
BHT	0,736V(ECS)= 0,690V (Ag/AgCl) [48]
BHA	0,540V(ECS)= 0,494V(Ag/AgCl) [48]
acide p-coumarique	0,670V (Ag/AgCl) [49]
Acide caféique	0,450V (Ag/AgCl) [49]
Quercétine	0,250V (Ag/AgCl) [50]
(-)-épicatéchine	0,356V (Ag/AgCl) [50]
Acide gallique	0,433V (Ag/AgCl) [50]
Acide tannique	0,310V (ECS) = 0,264V (Ag/AgCl)[61]
3-méthylthio-5p-méthoxyphényl-1,2-dithiolylium contre ion (I) Cl	0,190V (ECS) = 0,144 V(Ag/AgCl)[98]

Le potentiel d'électrode de calomel (KCl saturé) = 0,2444V vs ENH à 25 °C[99].

Le potentiel d'électrode de AgCl/Ag (KCl saturé) = 0,1989V vs ENH à 25 °C[99].

Nous avons trouvé une bonne corrélation entre les valeurs d'AEAC et le potentiel d'oxydation  $E_{pa}$  pour les composés phénoliques avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,74$  (voir le figure I.20).

Nous rappelons que les composés entrant dans cette corrélation sont : les composés phénoliques sauf le BHT.



**Figure I.20** : La relation d'AEAC et le potentiel d'oxydation  $E_{pa}$

FIRUZI et *Coll.* [49] ont utilisé la voltamétrie cyclique pour la mesure du potentiel d'oxydation et ont observé une corrélation assimilée entre les potentiels d'oxydation et la capacité de réduction des ions ferriques.

Enfin, pour les dithiolethiones nous trouvons que le composé 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione **A** a une grande capacité réductrice, cependant le composé **A1** donne une faible AEAC. 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 ions ferriques Fe(III), ce qui conduit à une bonne activité réductrice.

Nos études montrent que les dérivés dithioliques comme les sels sont des agents réductifs plus important que les composés neutres correspondant à cause de la grande solubilité dans l'eau de ces derniers.

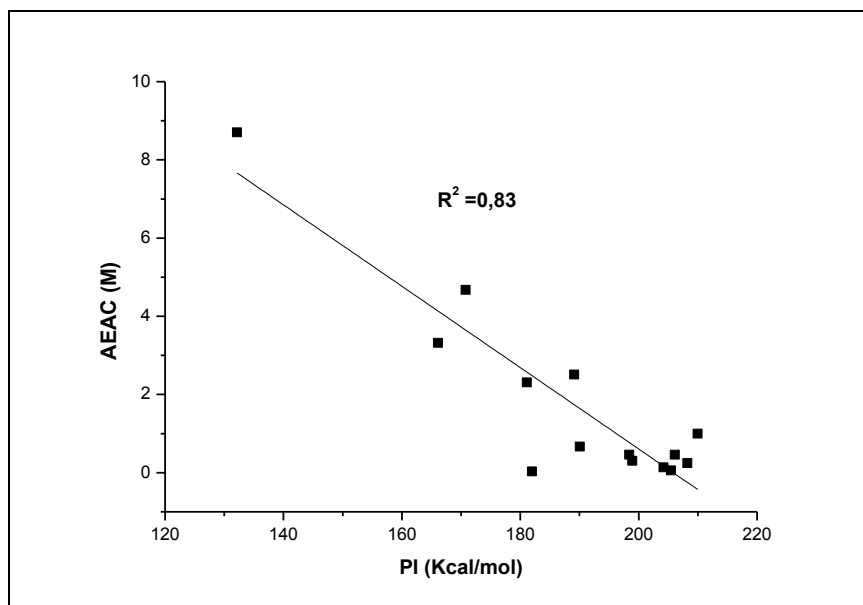
Encore, un autre critère pris en considération pour l'activité réductrice : c'est le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule à laquelle correspond l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est élevé. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant.

Donc, pour rechercher s'il y a une corrélation entre le potentiel d'ionisation des produits étudiés et l'activité réductrice, nous utiliserons les valeurs des PI des composés phénoliques qui sont trouvés dans la littérature et pour les dithiolethiones nous utilisons les valeurs de (-HOMO) (Highest Occupied Molecular Orbital). Ces derniers sont obtenus dans notre laboratoire (voir le chapitre 4). Par ailleurs les valeurs de PI pour le BHA et le BHT sont déterminées par la relation I.5.

De plus, nous rappelons que le potentiel d'ionisation est calculé par la relation suivante :

$$PI = -E_{HOMO} \quad (I.5)$$

Les valeurs de PI sont regroupées dans le tableau I.11.



**Figure I.21** : La relation d'AEAC avec le potentiel d'ionisation

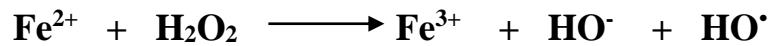
Nous rappelons que les composés entrant dans cette corrélation sont : tous les dérivés dithioliques et les composés phénoliques sauf le BHA. Pour le BHT qui donne une meilleure capacité réductrice AEAC= 8,07M, nous attribuons ce résultat au faible potentiel d'ionisation PI= 132,136 Kcal/mol.

En conclusion, selon la figure I.21 (corrélation AEAC vs PI), nous pouvons dire que presque tous nos dithiolethiones et polyphénols sont des composés réducteurs. Mais les polyphénols ont un pouvoir réductif plus important que celui des dithiolethiones, sauf pour l'acide p-coumarique.



### I.2.2.2. Chélation du fer ferreux

Les ions métalliques à double équivalence jouent un rôle très important comme des catalyseurs d'oxydant, ils provoquent la formation des radicaux hydroxyles et la séparation de l'eau oxygéné selon les réactions de FENTON :



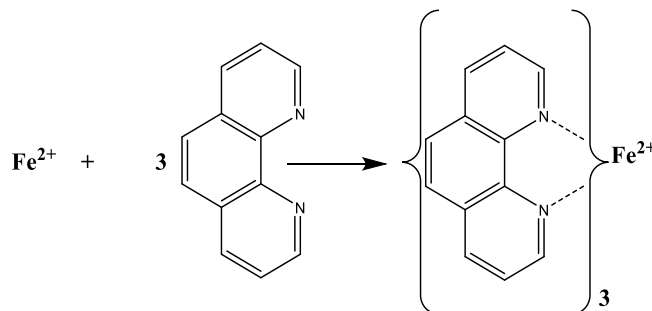
#### Les procédés Fenton

##### Historique

En 1894 FENTON Henry J. remarque qu'il est possible d'activer  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec les sels de Fe(II) et de cette manière d'oxyder l'acide tartrique. Ce n'est que plus tard, en 1934, que HABER et WEISS émettent l'hypothèse que le radical hydroxyle est responsable de cette oxydation. Par la suite, le mécanisme dans lequel la formation de  $\text{HO}^\bullet$  est l'étape clé nommée aujourd'hui le Fenton « classique », elle est développée et approfondie.

Au cours de cette dernière décennie, l'importance de la réaction de FENTON est la plus reconnu notamment pour les réactions environnementales, les systèmes biologiques et le traitement des déchets. Les ions de  $\text{Fe}^{2+}$  sont capables de donner des radicaux libres, ces radicaux provoquent des maladies allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète [52,106].

Une méthode colorimétrique a été utilisée pour le dosage du Fe(II). La technique est basée sur l'utilisation d'un complexant du Fe(II) : l'*ortho*-phénanthroline. La phénanthroline est une base de LEWIS : ses électrons libres, portés par les 2 atomes d'azote, peuvent être partagés avec le Fe(II) qui se comporte comme un acide de Lewis. En présence de ces 2 espèces, il se forme un complexe stable rouge-orangé de Fe (II) coordonné par trois ligands de phénanthroline

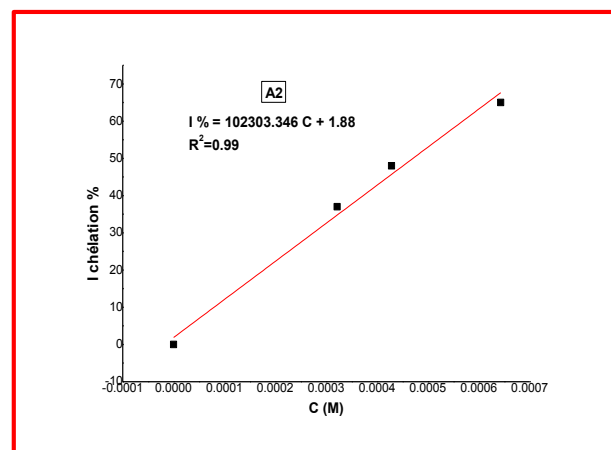
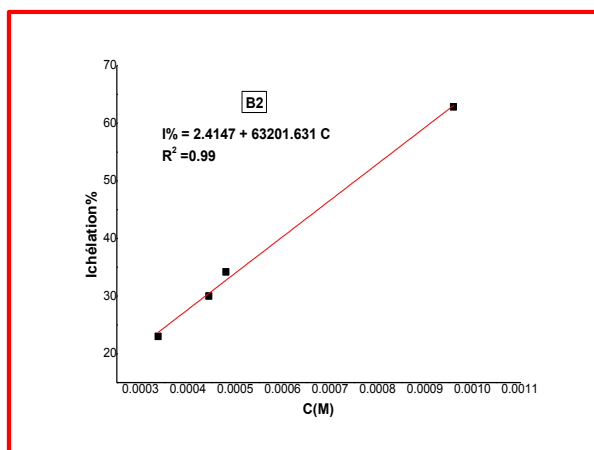
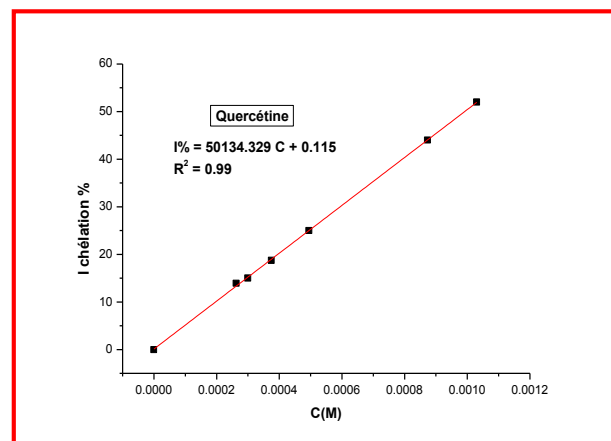
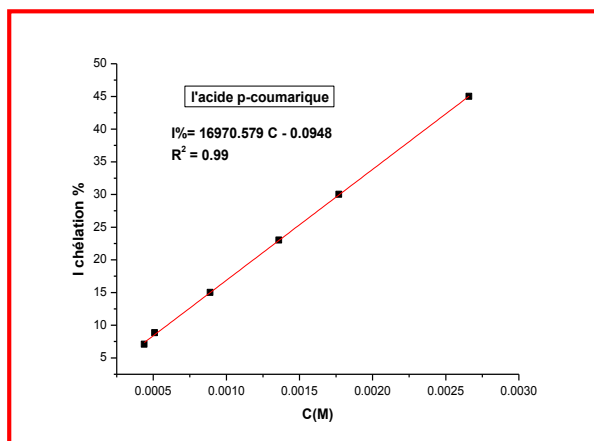
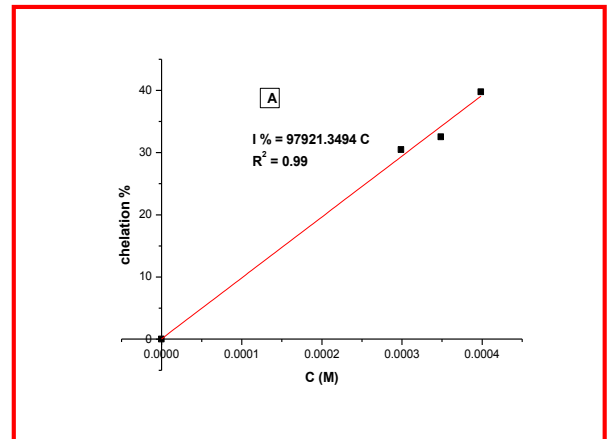
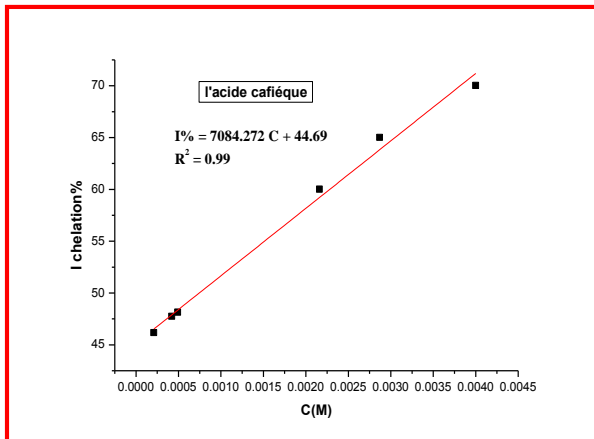


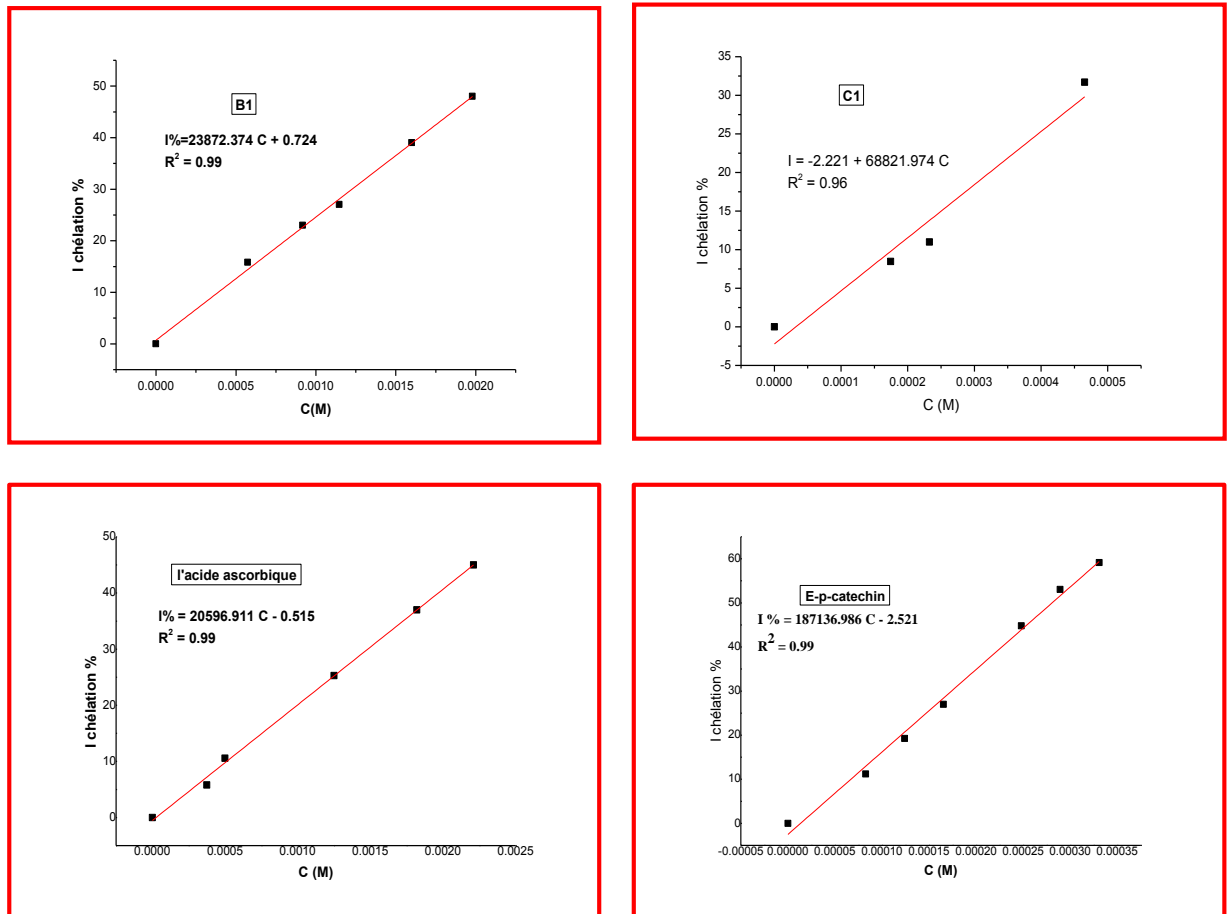
**Schéma I.2 :** La chélation de  $\text{Fe}^{2+}$  avec la phénanthroline ( $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ ) [102]

La capacité des dithiolethiones/polyphénols à chélater le Fe (II) est déterminée suivant une méthode modifiée comme décrit par PUNTEL et *coll.* [53].

### Résultats et discussion

Les valeurs des pourcentages de chélation obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure droite.





**Figure I.22 :** Activité chélatrice des quelques composés phénoliques et dithioliques

Nous avons calculé la concentration  $CI_{50}$  pour déterminer la capacité chélatrice des tous les produits testée (tableau I.8) :

**Tableau I.8** : La concentration de chélation de Fe<sup>2+</sup> (CI<sub>50</sub>) des dithiolethiones et polyphénols

Les produits étudiés	CI <sub>50</sub> (mM)
A	0,510
B	0,507
C	1,158
A1	1,240
A2	0,470
B1	2,064
B2	0,753
C1	0,758
V.C	2,452
BHT	5,019
acide caféique	0,749
BHA	4,125
acide p-coumarique	2,952
(-)-épicatéchine	0,296
acide gallique	3,656
Quercétine	0,991
acide tannique	0,155

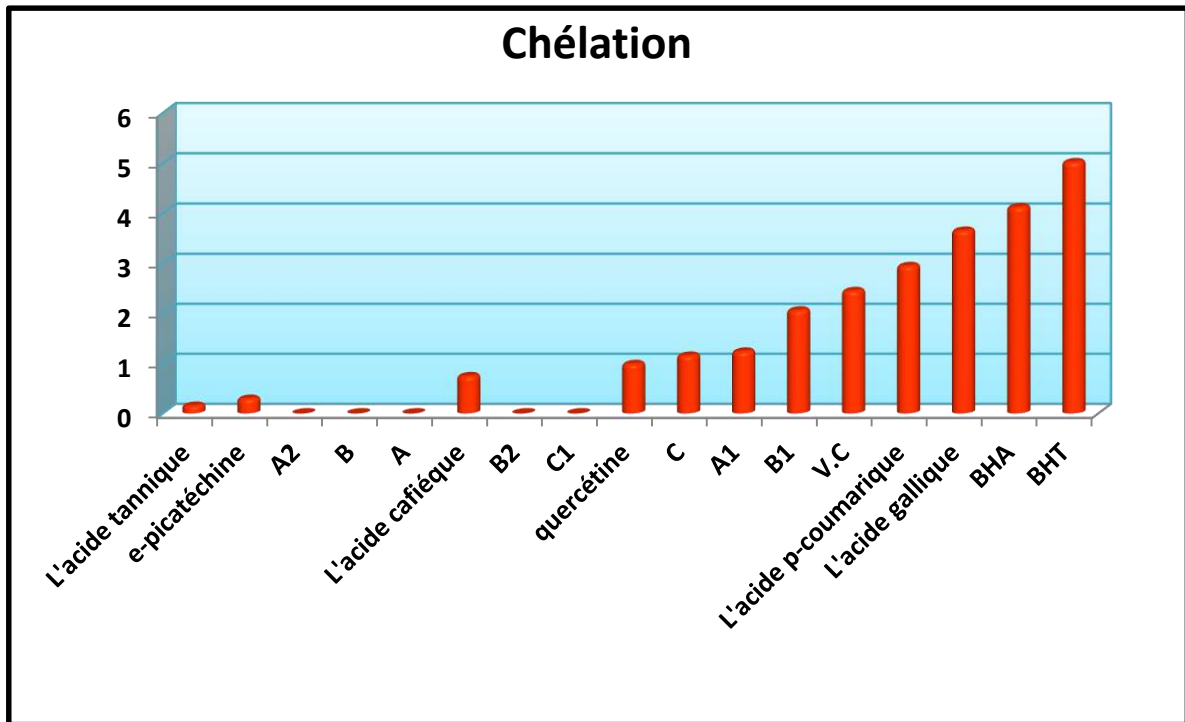
A partir de ces courbes, nous pouvons déterminer les pourcentages de chélation obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur de CI<sub>50</sub> de chaque composé étudié. L'efficacité de chélation de Fe<sup>2+</sup> est inversement proportionnelle à la valeur de CI<sub>50</sub>.

La chélation des ions ferreux a été estimée selon la méthode de PUNTEL R. L. et coll. [53] dont laquelle la phénanthroline peut quantitativement former un complexe avec le fer (Fe<sup>2+</sup>-phénanthroline)  $[(C_{12}H_8N_2)_3Fe]^{2+}$ ; chromophore rouge ayant un maximum d'absorption à 510 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement.

Les résultats obtenus montrent que les différents composés étudiés ainsi que le standard interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe ( $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la phénanthroline.

Ce test va nous permettre de quantifier les résultats précédemment obtenus. On pourra ainsi définir les  $\text{CI}_{50}$  de ces composés. Ceux-ci représenteront la concentration nécessaire en composé pour que 50 % de la quantité totale de  $\text{Fe}^{2+}$  présent dans le milieu soit piégé. Ces résultats vont déterminer un ordre du potentiel chélateur.

A partir de nos résultats, on remarque que le composé **B2** a la moindre valeur de  $\text{CI}_{50}$  c'est-à-dire plus chélateur des ions de ferreux, par contre le composé **B1** a une activité chélatrice moins importante.



**Figure I.23 :** Comparaison de potentiel chélateur des dithiolethiones/polyphénols selon  $\text{CI}_{50}$

Nous expliquons ce cas par la charge sur l'atome d'iode, qui est plus faible que celle sur l'atome d'oxygène donc, les sels du sulfates ont souvent intéressantes activités chélatrice plus par rapport aux sels d'iode.

Selon la nature du substituant sur la position 4, le composé 4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione **B** est plus actif que le 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione **A** car il donne une forte couverture d'ions de fer.

Les dithiolethiones polaires sont solubles dans l'eau et ces derniers sont capables de former des chélateurs avec les ions ferreux.

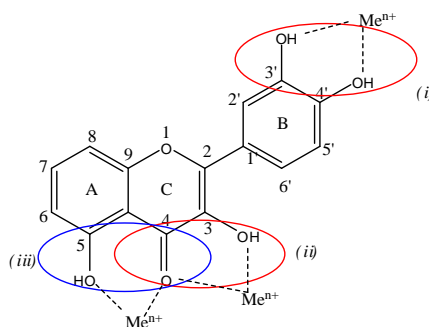
L'importance du moment dipolaire est due à la présence du groupe méthyle sulfate ( $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ ).

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons chélateurs des ions métalliques [54]. Cependant, dans la présente étude sauf les composés phénoliques comme l'acide tannique, l'(-)-épicatéchine et la quercétine sont plus chélateurs mais les autres ont de  $\text{CI}_{50}$  plus élevés c'est-à-dire moins chélateurs par rapport aux dithiolethiones.

C'est pourquoi, nous suggérons que l'acide tannique peut chélater des ions ferreux avec l'hydroxyle et carboxylate groupes. Il a été rapporté que les composés avec des structures contenant deux ou plusieurs des groupes fonctionnels suivants : -OH, -SH, -COOH, - $\text{PO}_3\text{H}_2$ , -C=O, - $\text{NR}_2$ , -S- et -O- dans une configuration favorable structure-fonction peut montrer d'activité chélatrice de métal [97].

Les composés contenant le nitrogène sont généralement des chélateurs plus puissants que les composés phénoliques [55]. De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés.

Les études menées par VAN ACKER et ses collaborateurs [56] sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont pu ressortir les sites potentiels pour la chélation des ions métalliques (Figure I.24) ; (i) un noyau catéchol sur le cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.



**Figure I.24** : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques [57]

Cette explication est appliquée sur les deux composés l'(-)-epicatéchine et la quercétine, à cause des groupes hydroxyles qui comportent des doublets libres d'électrons capables de former des complexes avec  $Fe^{2+}$ .

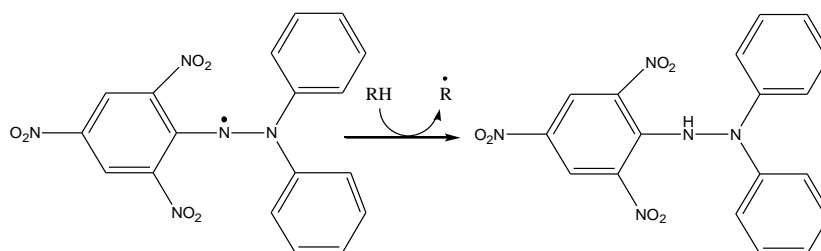
Nous remarquons que le BHT est moins chélateur que le BHA et nous pouvons expliquer ce résultat par la différence au niveau de la structure, où le BHT possède un seul groupe hydroxyle et ce groupe existe entre deux groupes volumineux tertio butyle alors il ya un encombrement stérique empêchant de former un complexe avec les ions ferreux, c'est pour ça que la valeur  $CI_{50}$  est de 5,019 mM. Cette remarque présente des analogies avec celui des études de GÜLÇİN İ. et *Coll.*[97].

La capacité chélatrice est très importante, au fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de FENTON, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne. Il a été rapportés que les agents chélateurs qui forment une liaison de type  $\sigma$  avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique [58].

### I.2.2.3 Application du test du DPPH<sup>•</sup>

#### Principe

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents composés étudiés, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par MANSOURI et *Coll.* [59]. Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH<sup>•</sup> ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazyl, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [60]. (Voir le Schéma I.3)



**Schéma I.3 :** Réduction du radical libre DPPH<sup>•</sup>

Les conditions de réalisation de ce test sont :

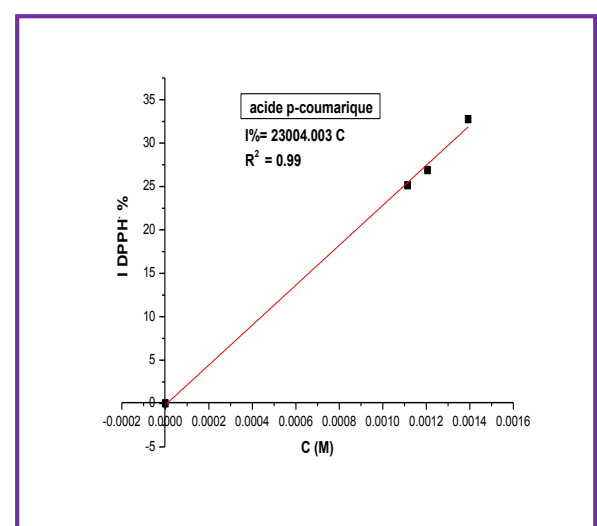
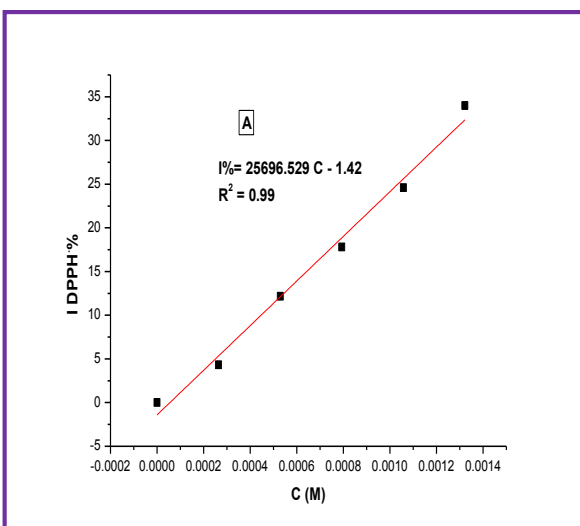
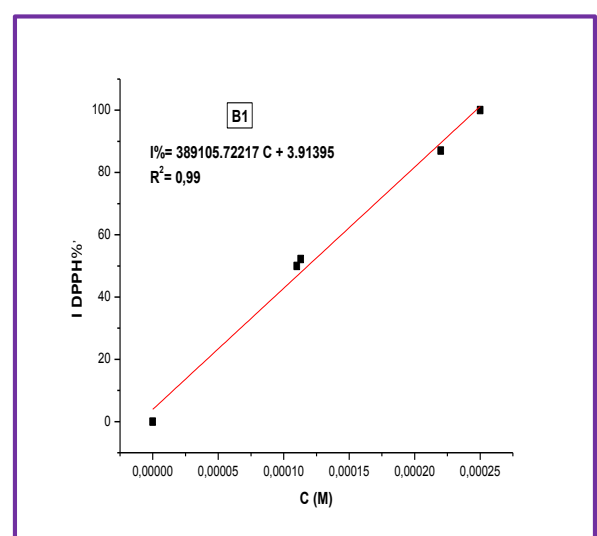
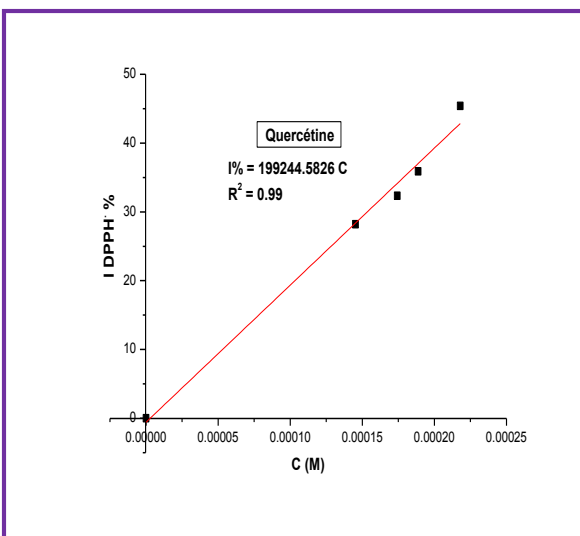
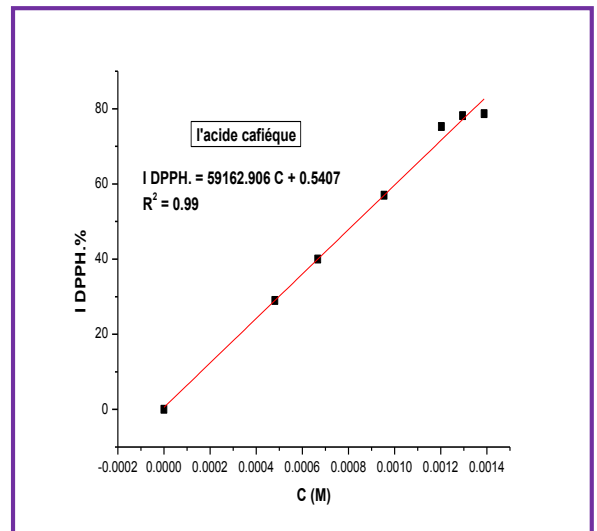
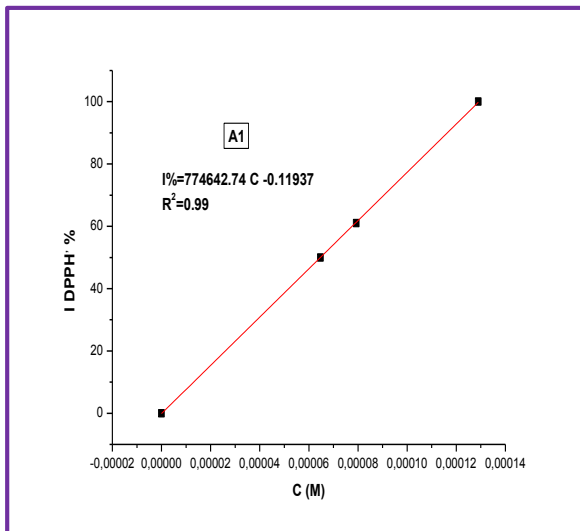
- le solvant peut être le méthanol ou l'éthanol.
- le pH est de 7,4
- la concentration en DPPH<sup>•</sup> doit être égale à 500  $\mu$ M
- l'absorbance est mesurée à 517 nm.
- la durée totale de réaction est généralement fixée à 30 minutes.

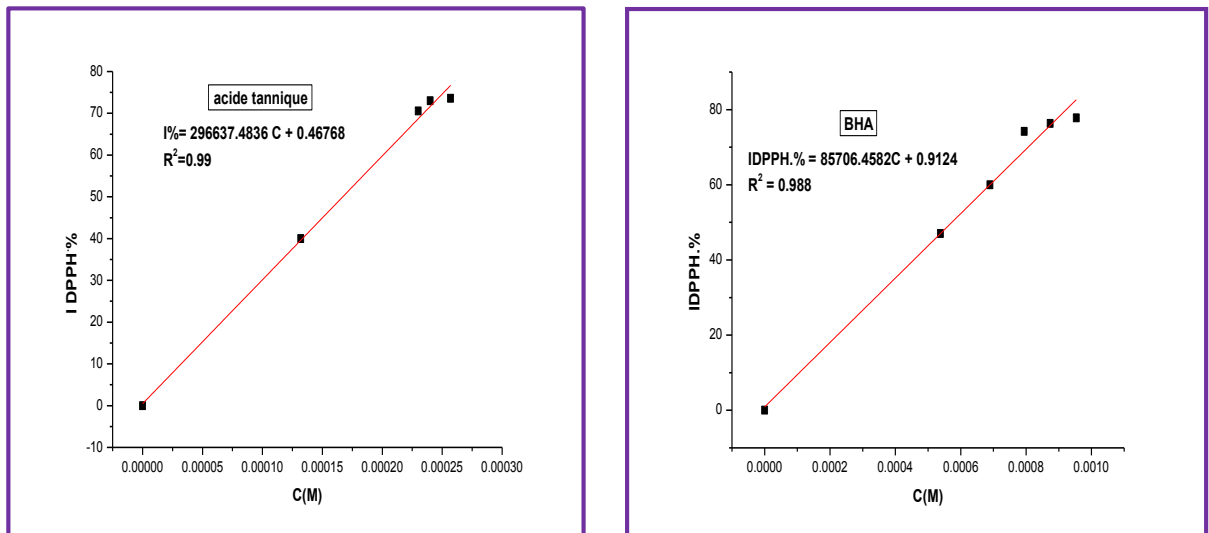
#### Résultats et discussion

Dans notre travail, nous avons étudié l'activité anti radicalaire des différents dithiolethiones et polyphénols afin de déterminer et localiser le composé le plus actif.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes droites (figure I.25) qui signifie la réduction presque totale du DPPH<sup>•</sup> en sa forme non radicalaire.







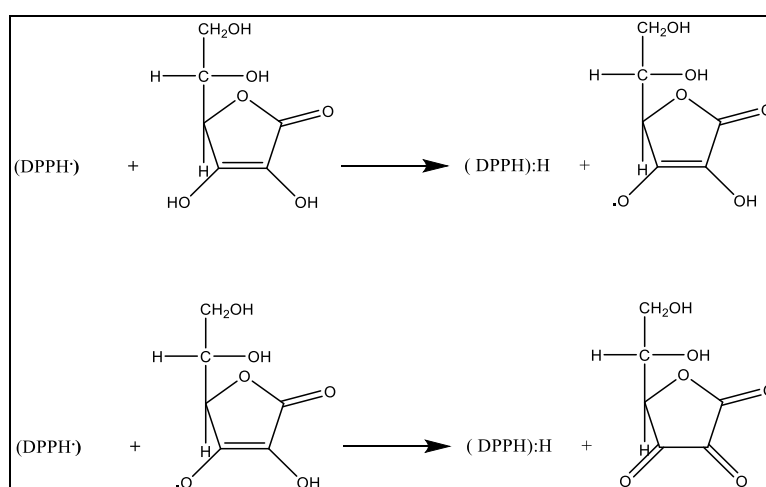
**Figure I.25 :** Effet piègeur du radical DPPH<sup>\*</sup> par quelques composé phénoliques/  
dithiolethiones

À fin de comparer les activités antiradicalaires des composés étudiés, nous calculons les indices  $CI_{50}$ , la concentration inhibitrice à 50% à partir de l'équation correspondant de chaque courbe. Les résultats obtenus à partir de ce test sont regroupés dans le tableau I.9.

**Tableau I.9** : Les valeurs  $CI_{50}$  pour tous les composés étudiés (Inhibition du DPPH')

Composé étudié	$CI_{50}$ (mM)
A	2,0100
B	2,2630
C	1,6387
A1	0,0647
A2	0,8221
B1	0,1184
B2	0,3760
C1	0,0385
Acide p-coumarique	2,1730
Acide caféique	0,8360
Acide tannique	0,1669
Quercétine	0,2510
BHA	0,5727
BHT	0,7988
V.C	0,0210
Acide gallique	0,5390
(-)-épicatéchine	0,3760

Nous notons que c'est l'acide ascorbique qui est le plus efficace ( $CI_{50} = 0,021$  mM), par la donation d'un H' radical d'hydrogène selon la réaction suivante :



**Figure I.26** : La réaction de DPPH' avec l'acide ascorbique [62]

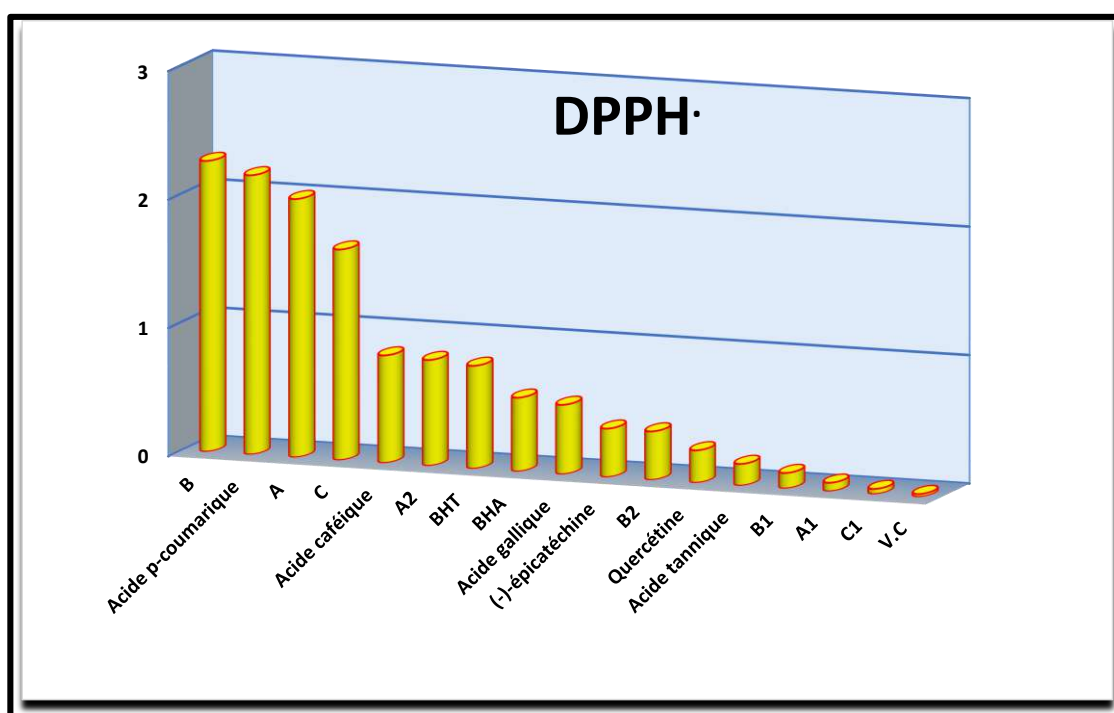
La valeur de  $CI_{50}$  de Vitamine C obtenue est en parfait accord avec celle donné par EBRAHIMZADEH M. A. et *Coll.*[96].

Pour les dérivés de dithiolethiones on trouve que les dithiolethiones neutres (4-phényl-1,2-dithiolethione **A**, 4-p-tolyl-1,2-dithiolethione **B** et la sulfarlem **C**) enregistrent une  $CI_{50}$  plus importante par comparaison avec les sels dithiolylium. Nous expliquons ce résultat par le contre ion des sels (iode ou méthyle sulfate) qui stabilise le radical dithiolylium.

Cette stabilisation est plus appliquée dans les sels iodés où le contre ion est l'iode (**A1**, **B1**, **C1**). La plus grande influence de l'ion iodure est souvent attribuée à son grand rayon ionique, hydrophobicité élevée et sa faible électronégativité par rapport à d'autres halogénures et à l'oxygène de l'ion méthyle sulfate [63].

Pour les composés polyphénols, nous remarquons que l'acide tannique est le meilleur donneur de  $H^{\bullet}$  à cause du grand nombre de groupes hydroxyles qu'il porte l'efficacité d'inhibition de  $DPPH^{\bullet}$  est inversement proportionnelle à la valeur  $CI_{50}$ , elle est dans l'ordre décroissant selon le classement suivant :

*Acide tannique > quercétine > (-)-épicatéchine > acide gallique > BHA > BHT > acide  
caféique > acide p-coumarique*



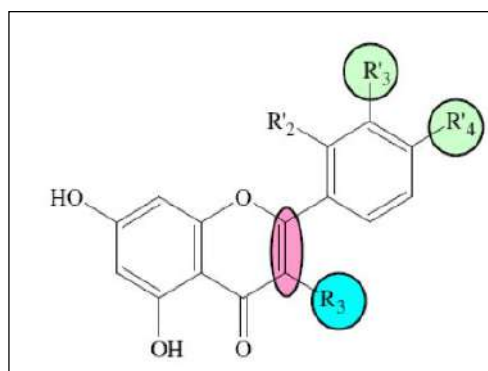
**Figure I.27** : Classification de la capacité d'inhibition du  $DPPH^{\bullet}$  selon les valeurs des  $CI_{50}$

Nous remarquons que les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par SANCHEZ-MORENO et son équipe [64] : l'acide gallique s'est révélé avoir une activité anti radicalaire intermédiaire ( $CI_{50} = 0,539$  mM).

Aussi, le BHA est plus actif que le BHT, ce résultat est en accord avec les travaux d'HUSSEIN M. et *Coll.* [100].

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui regroupent les trois critères suivants :

1. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
2. La double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
3. La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>.



**Figure I.28** : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

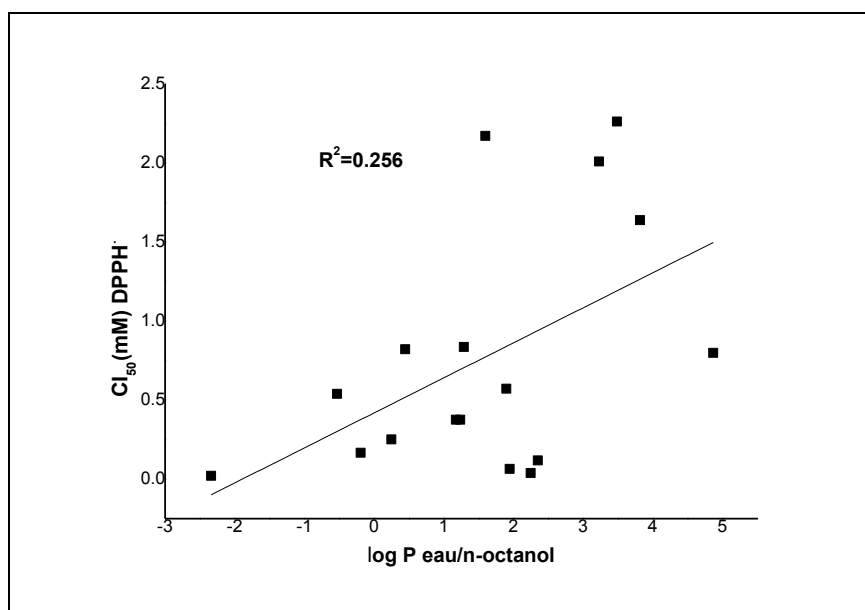
À titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (figure I. 28).

La valeur de  $CI_{50}$  de la quercétine est identique à celle calculée dans le travail de TOMASSOLI I. [65].

Selon la littérature, le radical DPPH<sup>\*</sup> est lipophile [67], donc nous avons fait une corrélation entre les valeurs de  $CI_{50}$  et le coefficient de partage  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  pour tous les composés étudiés, mais il est étonnant de noter que l'hydrophobicité présente une faible corrélation avec l'efficacité d'inhibition du DPPH<sup>\*</sup> (Voir la figure I.29).

Par exemple : l'acide gallique a une valeur de  $\log P$  inférieure à celle du composé le plus hydrophobe BHT, et les deux composés ont presque la même valeur de  $CI_{50}$ .

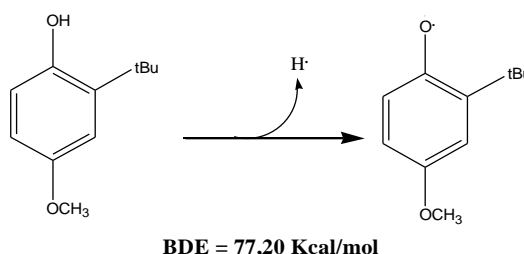
Les valeurs du coefficient de partage sont regroupées dans le tableau I.13.



**Figure I.29** : La relation entre l'activité anti radicalaire de DPPH<sup>•</sup> et le  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$

Les composés phénoliques sont des inhibiteurs reconnus des radicaux libres. L'activité de ces molécules est reliée à leur structure. Ainsi, elle dépend de la capacité du phénol à céder un atome H qui peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (*bond dissociation energy, BDE*), de la délocalisation électronique du radical phénol et de l'encombrement stérique des groupements substituant des atomes d'hydrogène du noyau aromatique [68].

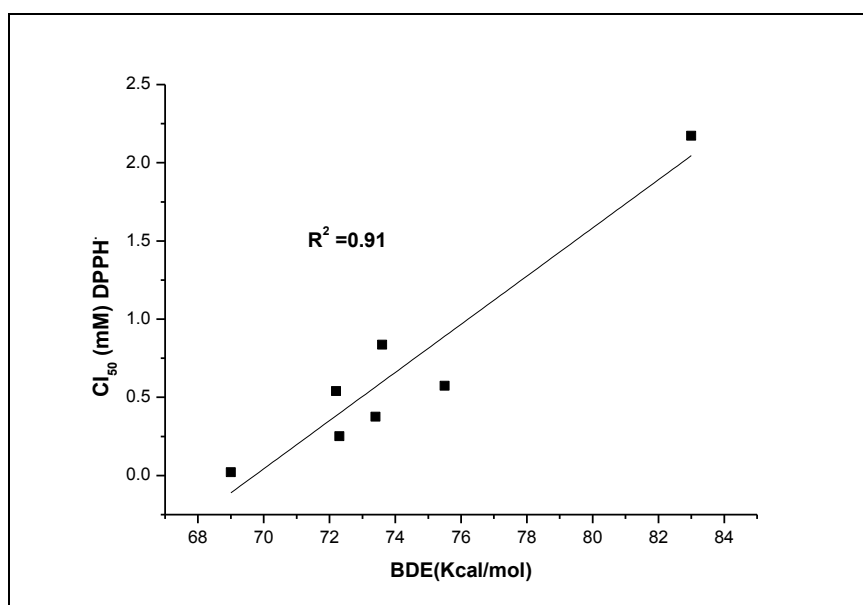
Plus la BDE d'un phénol est faible, plus son caractère donneur d'hydrogène est élevé. Depuis le pH optimal de la méthode DPPH<sup>•</sup> est proche de celui physiologique (7,4), il n'y aurait pas de risque de sous-estimation (dans des conditions acides) ou surestimation (sous conditions de base) de l'activité antioxydante, en raison soit de la protonation d'antioxydants ou de la dissociation de proton des composés phénoliques, respectivement.



**Figure I.30** : La dissociation de la liaison O-H dans le BHA

**Tableau I.10** : Les BDE de quelques composés étudiés

<b>Composé étudié</b>	<b>BDE (Kcal/mol)</b>
acide ascorbique (V.C)	69,00 [69]
Quercétine	72,30 [70]
acide tannique	75,50 [71]
BHT	80,00 [66]
(-)-épicatéchine	73,70 [70]
L'acide caféique	73,60 [70]
acide p-coumarique	83,00[78]
acide gallique	72,20[70]
BHA	77,20 [69]



**Figure I.31** : La relation entre l'activité anti radicalaire de DPPH<sup>•</sup> et le BDE

Nous avons trouvé une bonne corrélation entre l'activité d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup> et l'énergie de dissociation de la liaison O-H avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,91$  (voir la figure I.31).

Nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont : la vitamine C et les composés phénoliques sauf le BHA et le BHT.

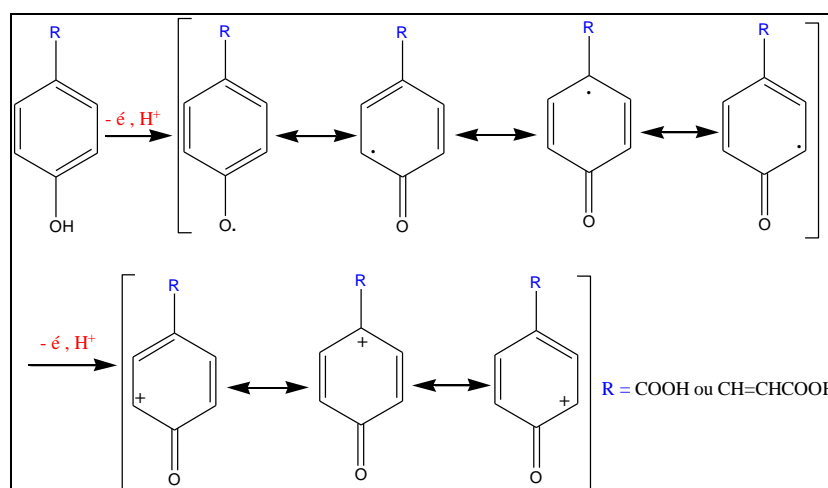
En regardant les résultats reportés dans la figure I.32, nous pouvons remarquer que non seulement les composés phénoliques ont la capacité d'inhiber le radical DPPH<sup>•</sup> mais également les dithiolethiones possèdent une capacité d'inhibition plus importante.

Nous attribuons l'efficacité des dithiolethiones comme inhibiteurs de DPPH<sup>•</sup> au mécanisme (ET) selon VILLANO D. et *Coll.* [73] qui montre que la réaction entre les ArOH et le nitrogène central dans le radical DPPH<sup>•</sup> résulte par deux mécanismes différents :

- (i) L'abstraction directe de l'atome H<sup>•</sup> (HAT)
- (ii) Transfert d'électron à partir de ArOH ou ArO<sup>•</sup> vers DPPH<sup>•</sup> (ET)

La contribution de l'un ou des deux mécanismes dépende de la nature du solvant et/ou les potentiels rédox d'ArOH.

Généralement, les solvants polaires, comme le méthanol ou l'éthanol, sont capables de former une forte liaison hydrogène avec le ArOH, donc, les mécanismes (ET) deviennent importants.



**Figure I.32** : L'oxydation électrochimique des composés phénoliques [49]

Les activités anti radicalaires des dithiolethiones sont attribuées à leur potentiel d'ionisation. Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre.



Donc, pour rechercher s'il y a une corrélation entre le potentiel d'ionisation des produits étudiés et la capacité d'inhibition de DPPH<sup>\*</sup> nous utilisons les valeurs de PI qui sont regroupés dans le tableau I.11.

Le potentiel d'ionisation est calculé selon la relation (I.5):

$$PI = -E_{HOMO}$$

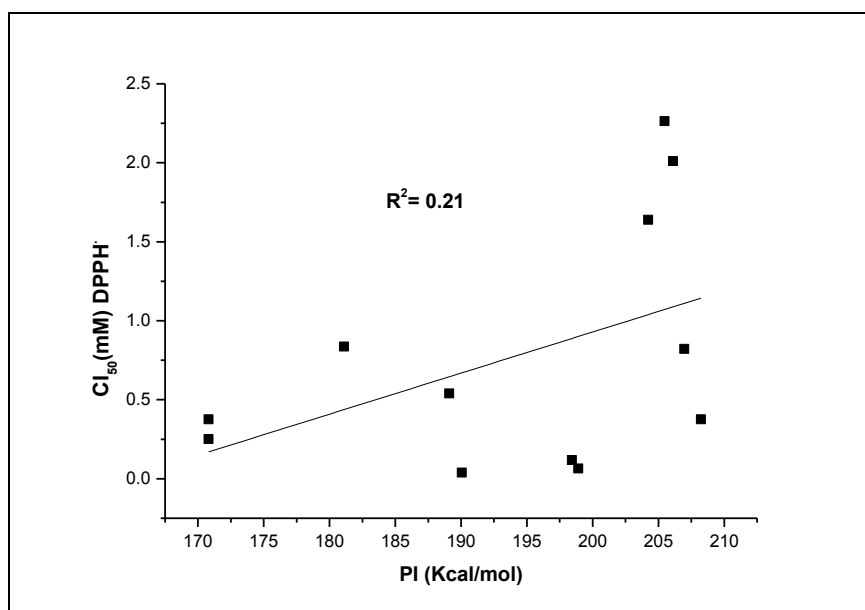
Cette relation a été utilisé pour déterminer les valeurs des potentiels d'ionisation des dithiolethiones étudiées, nous rappelons que les valeurs d'HOMO sont donnés au chapitre IV. Le facteur de conversion est le suivant :

$$1 \text{ ev} = 23.0605 \text{ Kcal/mol}$$

Nous avons trouvé une faible corrélation entre la capacité d'inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup> et PI avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,21$  (Fig. I.33).

**Tableau I.11** : Les valeurs de PI de composés phénoliques et dithioliques

Composé étudié	PI (Kcal/mol)
L'acide gallique	189,100[70]
L'acide caféique	181,100[70]
(-)-épicatéchine	170,800[70]
Quercétine	170,800[70]
L'acide p-coumarique	182,000[78]
BHT	132,136[72]
BHA	118,070[72]
A	206,114
B	205,469
A1	198,919
B1	198,435
A2	209,966
B2	208,236
C	204,223
C1	190,064



**Figure I.33** : La relation entre l'activité anti radicalaire de DPPH<sup>•</sup> et PI

Nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont : l'acide caféique, l'acide gallique, l'(-)-épicatéchine, la quercétine et tous les dithiolethiones.

Le potentiel d'ionisation a été aussi corrélé avec les données expérimentales de l'activité antiradicalaire mais d'une manière moins précise [51,94]. Il semblerait donc que le mécanisme par transfert d'atome d'hydrogène soit la voie prépondérante dans l'activité antioxydante des composés étudiés.

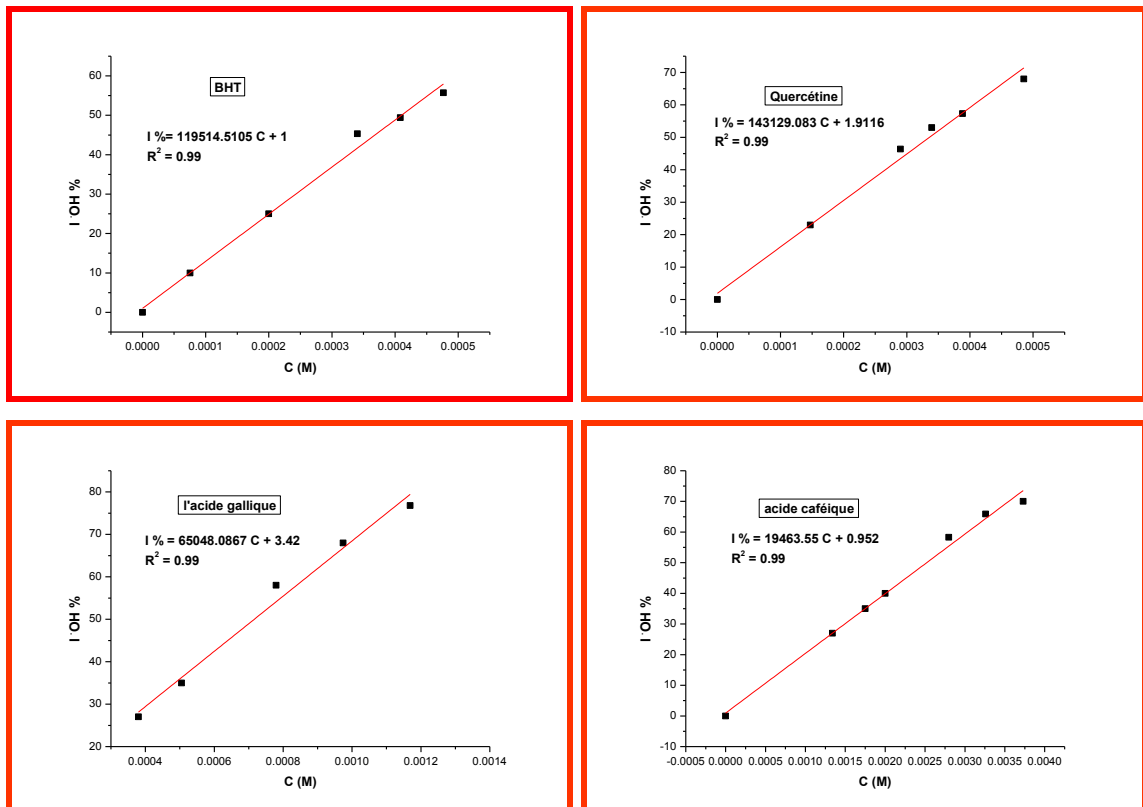
### I.2.2.4. Piégeage du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$

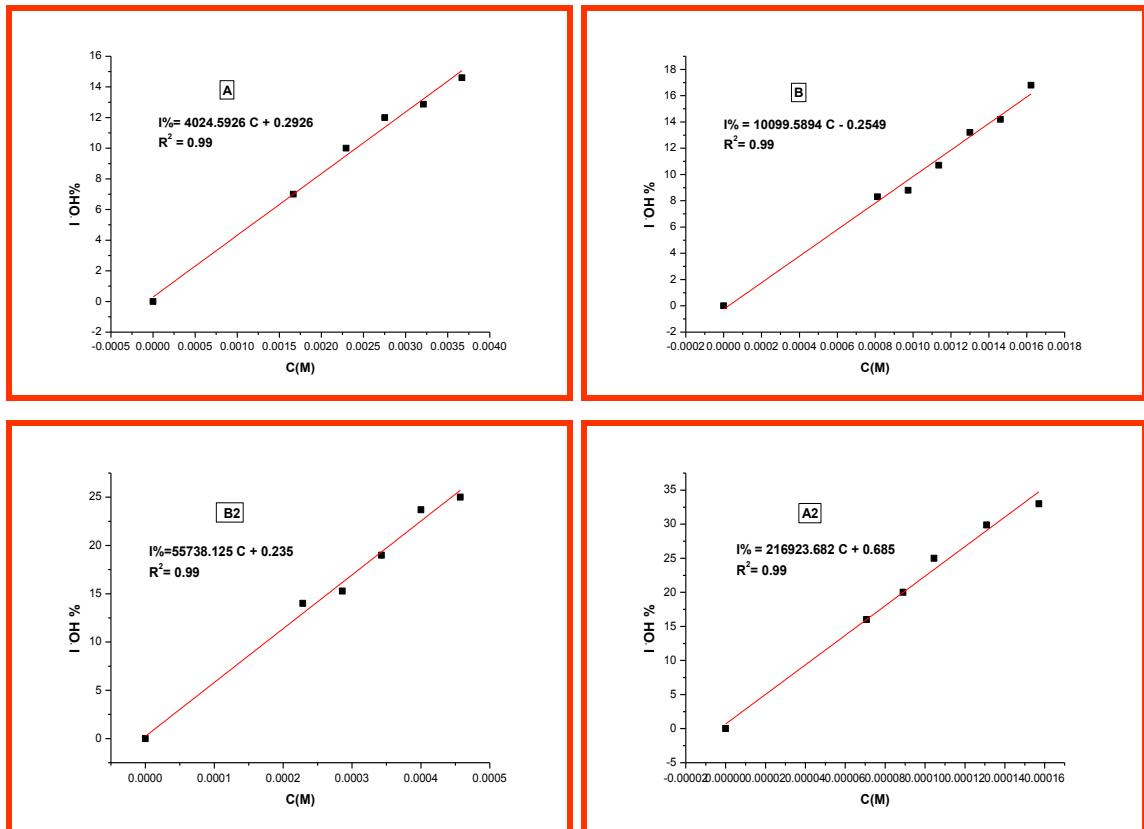
Le  $\cdot\text{OH}$  est le radical libre, extrêmement réactif, formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ; en présence des ions métalliques comme : le fer et le cuivre, suivant la réaction de HABER-WEISS [52]. Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé (2,310 V) qui lui permet de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine [74].

L'activité d'ébouage du radical hydroxyle des échantillons a été mesurée selon la méthode de JIN et Coll [75] avec quelques modifications. Dans ce système, des radicaux d'hydroxyle ont été produits par la réaction de FENTON. Les radicaux d'hydroxyle pourraient oxyder  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ , et seulement  $\text{Fe}^{2+}$  pourrait être combiné avec phénanthroline, afin de former un composé rouge ( $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline) avec une absorbance maximale à 536 nm. La concentration du radical d'hydroxyle a été reflétée par le degré de décoloration de la solution de réaction.

### Résultats et discussion

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure droite.





**Figure I.34 :** Effet piègeur du radical  $\cdot\text{OH}$  par quelques composés étudiés

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées et ainsi la valeur de  $\text{CI}_{50}$  de chaque composé étudié.

**Tableau I.12** : Les résultats d'inhibition de  $\cdot\text{OH}$  de tous les composés étudiés

Composé étudié	CI <sub>50</sub> (mM)
A	12,35
B	4,976
C	01,450
A1	04,515
A2	0,2273
C1	0,5019
B1	0,8221
B2	0,8930
BHT	0,4099
Acide gallique	0,7161
Acide caféique	2,5199
Acide p-coumarique	3,4080
Acide tannique	0,1858
V.C	3,1730
BHA	2,3240
(-)-épicatéchine	0,4006
Quercétine	0,3359

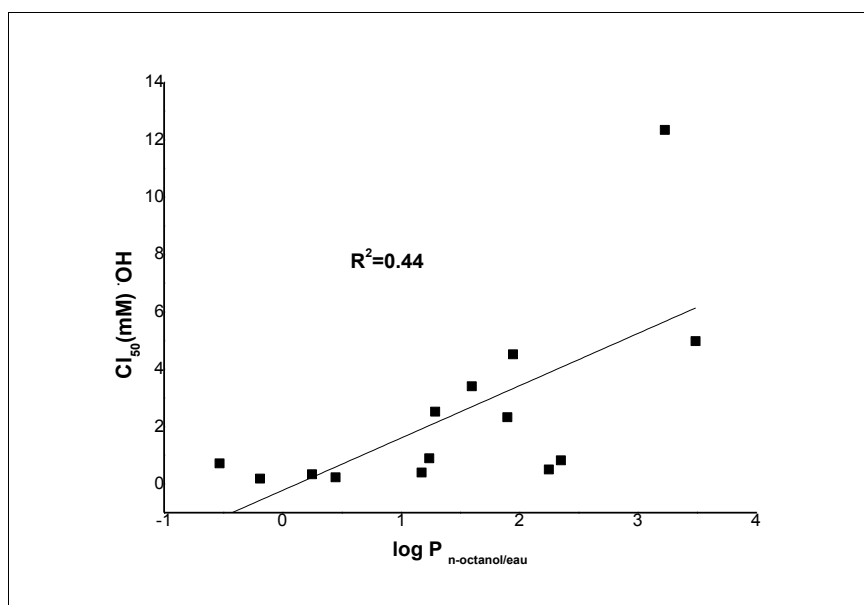
Le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) est une molécule qui se compose d'un atome d'oxygène et d'hydrogène possédant un électron non apparié (électron célibataire) sur son orbital externe.

Contrairement aux ions, les radicaux hydroxyles sont produits à partir d'une rupture homolytique d'une liaison covalente, c'est à dire que les deux électrons mis en jeu, lors de cette liaison, sont également partagés : un électron pour chaque atome. Cette caractéristique lui confère un caractère fortement polaire et, par voie de conséquence, il est très réactif vis-à-vis de nombreux composés organiques (aromatiques et aliphatiques), inorganiques et bactériens. Il s'agit d'espèces hautement réactives caractérisées par une demi-vie de l'ordre de  $10^{-9}$  sec [77].

A partir de cette définition, nous expliquons nos résultats en commençant par l'acide tannique présentant une  $CI_{50} = 0,1858$  mM. Ce composé est le meilleur inhibiteur d' $\cdot OH$  par la sa tolérance de sa solubilité dans l'eau, par contre le composé hydrophobe la 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione **A** ( $\log P_{\text{eau/n-octanol}} = 3,23$ ) possède une activité d'inhibition d' $\cdot OH$  très faible.

En comparaison avec la vitamine C, presque la majorité des dithiolethiones et polyphénols testés s'avèrent plus actifs que ce standard. La vitamine C est 14 à 2 fois moins active que les dithiolethiones et 17 à 1,26 fois moins active que les polyphénols.

Nous avons trouvé une moyenne corrélation entre le coefficient de partage  $\log P_{\text{eau/n-octanol}}$  et les valeurs de  $CI_{50}$  où généralement la relation est directe. Nous avons choisi les composés suivants : l'acide tannique, la quercétine, l'(-)-épicatéchine, l'acide gallique, l'acide p-coumarique, le BHA, l'acide caféïque, **A**, **B**, **C1**, **A1**, **B1**, **B2** et **A2**.



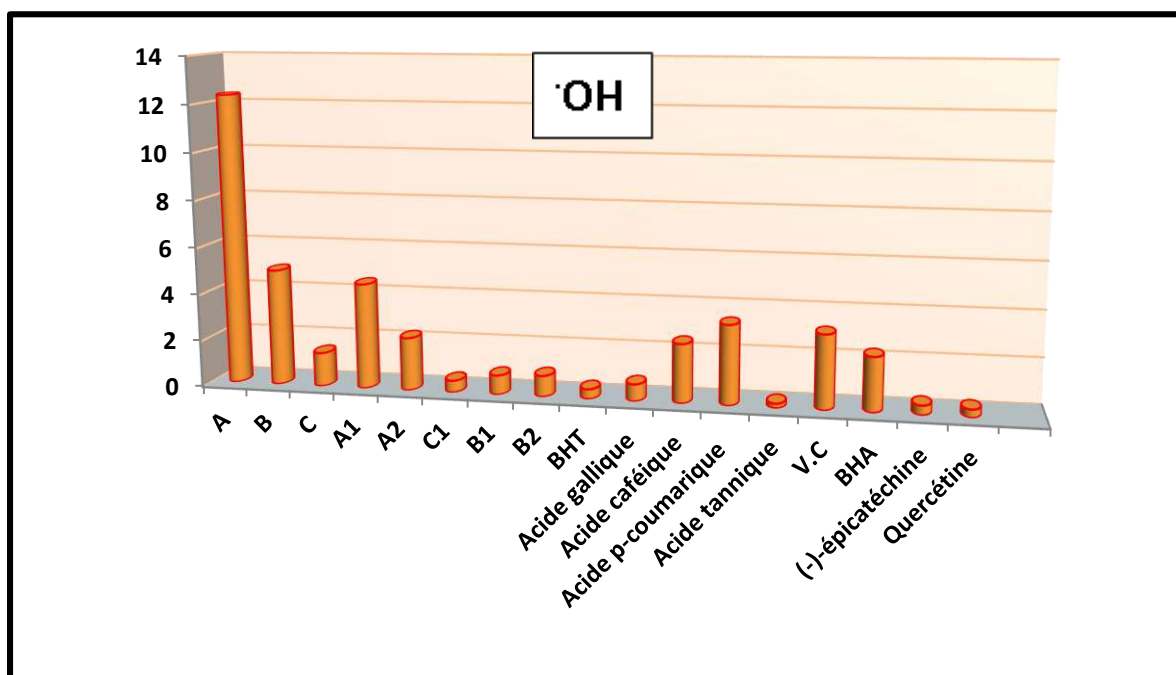
**Figure I.35** : La relation entre l'activité d'inhibition  $\cdot OH$  et la lipophilie

**Tableau I.13** : Le coefficient de partage de tous les composés étudiés

<b>Composés étudiés</b>	<b><i>log P<sub>n-octanol/eau</sub></i></b>
L'acide ascorbique (V. C)	-2,340[77]
L'acide tannique	-0,19[111]
Quercétine	0,250[79]
(-)-épicatéchine	1,175[80]
BHT	4,870[81]
L'acide gallique	-0,530[80]
BHA	1,900[84]
L'acide caféique	1,290[82]
L'acide p-coumarique	1,600[80]
A1	1,947
A2	0,450
B1	2,353
B2	1,240
C1	2,250
A	3,230
B	3,490
C	3,820

Dans notre travail, le classement de la capacité des polyphénols et dithiolethiones à piéger le  $\cdot\text{OH}$  est comme suit :

l'acide tannique > **A2** > la quercétine > l'(-)-épicatéchine > BHT > **C1** > l'acide gallique > **B1** > **B2** > **A1** > **C** > BHA > l'acide caféique > Vitamine C > l'acide p-coumarique > **B** > **A**



**Figure I.36 :** Classification de la capacité d'inhibition de  $\cdot\text{OH}$  selon les valeurs de  $\text{CI}_{50}$

Dans la série de dithiolethiones le 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione (**C**) donne une activité antioxydante plus importante que les dithiolethiones substitués en position 4 comme **A** et **B** à cause du faible potentiel d'oxydation qui mène à une facilité de donner des électrons, l'augmentation du potentiel d'oxydation s'accompagne d'une diminution de capacité d'inhibition du radical  $\cdot\text{OH}$ .

Suite à la comparaison entre les sels et les dithiolethiones neutres, on trouve que les sels sont plus efficaces dans l'inhibition de  $\cdot\text{OH}$  à cause de leur faible hydrophobicité de ces derniers.

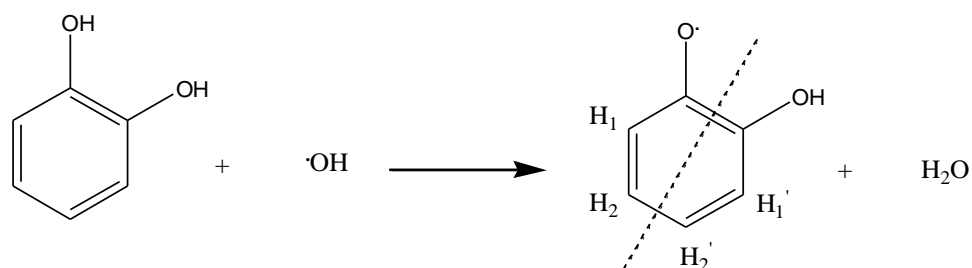
La deuxième série représentant les polyphénols montre que ces composés sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés en particulier les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ), alkoxydes ( $\text{RO}\cdot$ ), superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) et les hydroxydes ( $\cdot\text{OH}$ ), grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique.

La réduction (transfert d'atome H ou d'électron) des radicaux alkoxydes et peroxydes par les phénols ( $\text{ArOH}$ ) est généralement rapide en raison de la stabilisation par délocalisation électronique des radicaux aryloxydes ( $\text{ArO}\cdot$ ) ainsi produits.

Parmi les polyphénols, ceux qui possèdent un noyau catéchol, sont typiquement de bien meilleurs antioxydants, en raison de la stabilité relative de la semiquinone formée lors de la réduction des radicaux (stabilisation par effet électronique et liaison H intramolécule) [109].

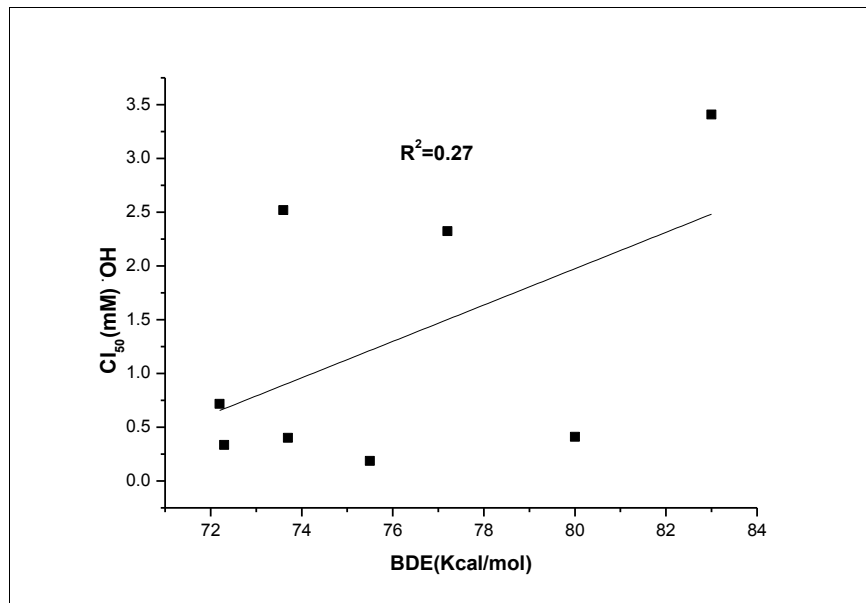


Les antioxydants les plus efficaces sont ceux qui possèdent les énergies de liaisons les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène.



**Schéma I.4** : Mécanisme de la réaction de radical  $\cdot\text{OH}$  avec le catéchol

Selon le mécanisme de la réaction du radical  $\cdot\text{OH}$  avec le catéchol, nous avons trouvé que l'acide tannique enregistre une bonne activité antioxydante avec ( $\text{CI}_{50} = 0,18588 \text{ mM}$ ), par une moyenne BDE dans la série des composés phénoliques (BDE = 75,5 Kcal/mol) [71]. De plus, l'acide p-coumarique est classé comme dernier inhibiteur des radicaux hydroxyles avec BDE = 83 Kcal/mol [78]. Ainsi, l'activité antioxydante des composés phénoliques étudiés dépendent spécialement de BDE sauf le faible antioxydant acide caféique qui donne  $\text{CI}_{50} = 2,5199 \text{ mM}$  malgré la faible valeur de BDE = 73,6 Kcal/mol (voir le tableau I.10). En conclusion, les valeurs de BDE qu'un bon antioxydant de synthèse doit posséder devraient être comprises entre 68,5 et 77 kcal/mol[86]. Dans notre étude, les résultats obtenus (Figure I.37) montrent que la corrélation entre les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  et BDE est positive avec un  $R^2 = 0,27$ .



**Figure I.37 :** La relation entre l'activité inhibitrice de  $\cdot\text{OH}$  et la BDE

Les composés qui sont entrés dans cette corrélation sont tous les composés phénoliques étudiés.

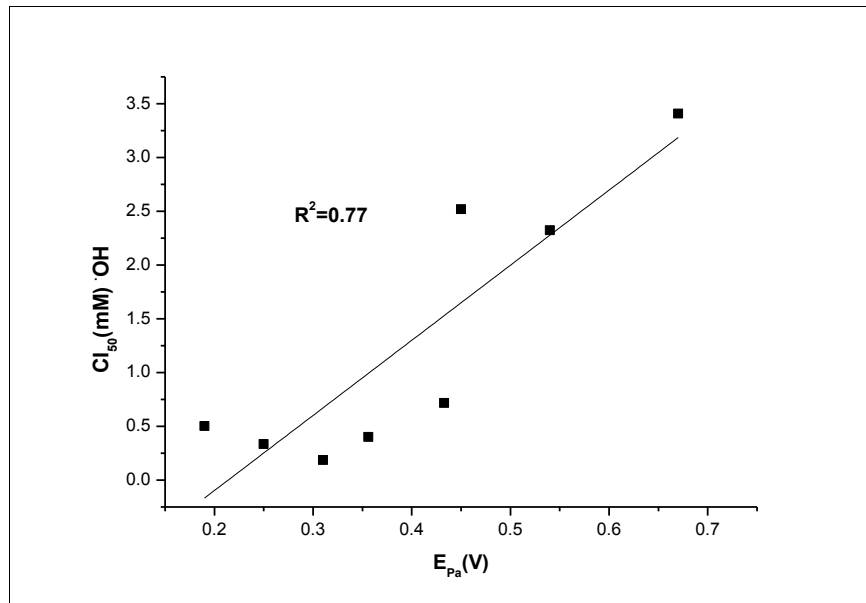
La capacité à céder un atome d'hydrogène peut également être prédite par le potentiel d'oxydoréduction. Tout composé qui a un potentiel redox plus faible que le potentiel de réduction d'un radical libre (ou d'une espèce oxydée) est capable de céder un hydrogène à ce radical tant que la réaction est possible.

Par exemple, des antioxydants comme le catéchol ( $E^\circ = 0.530 \text{ V}$ ) a un potentiel redox inférieur au radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$  ( $E^\circ \cdot\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 2,31 \text{ V}$ ) [74,114], et vont donc facilement céder un hydrogène à ce radical pour former l'eau.

Dans les conditions physiologiques, le potentiel de réduction standard des flavonoïdes est proche de celui d'importants couples rédox biochimiques, et leur énergie d'activation, pour la libération d'électrons est basse. Ainsi, les flavonoïdes sont des donneurs efficaces d'électrons et neutralisent les espèces réactives formées lors des processus physiologiques.

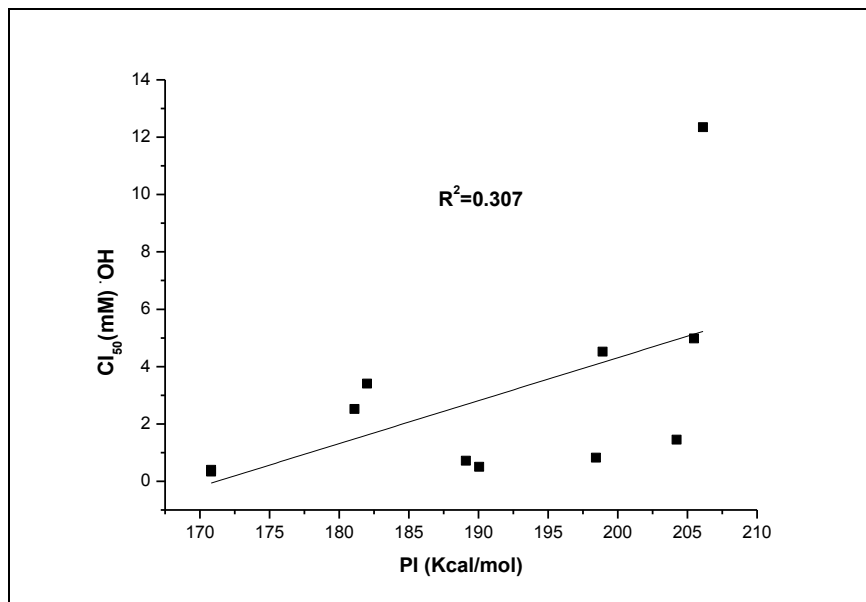
Donc, pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait une corrélation entre la capacité d'inhibition des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et les potentiels d'oxydation et nous avons obtenu une corrélation moyenne avec  $R^2 = 0,77$  (Fig. I.38).

Nous rappelons que les composés qui sont entrés dans cette corrélation sont : BHA, l'acide caféique, la quercétine, l'(-)-épicatéchine, l'acide p-coumarique, l'acide tannique, l'acide gallique et C1.



**Figure I.38 :** La relation entre l'activité antioxydante pour  $\cdot\text{OH}$  et le potentiel d'oxydation

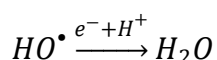
Nous avons trouvé une faible corrélation entre l'activité antioxydante pour  $\cdot\text{OH}$  et le potentiel d'ionisation avec  $R^2 = 0,307$  (Fig. I.39).



**Figure I.39 :** La relation entre l'activité antioxydante pour  $\cdot\text{OH}$  et le potentiel d'ionisation

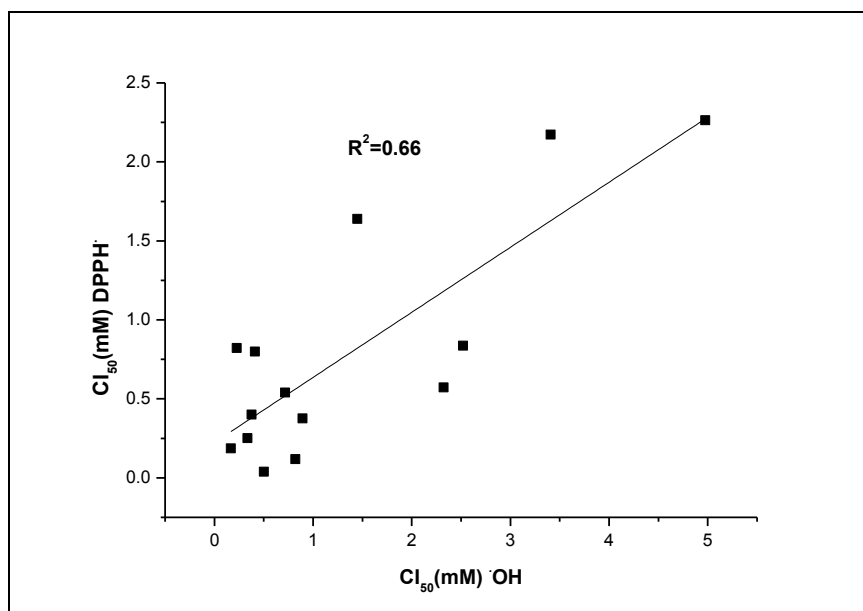
Nous rappelons que les composés qui sont entrés dans la corrélation entre l'activité antioxydante pour  $\cdot\text{OH}$  et le potentiel d'ionisation sont : la quercétine, l'(-)-épicatéchine, l'acide p-coumarique, l'acide gallique, l'acide caféique et tous les dithiolethiones sauf **A2**, **B2**.

En conclusion, nous pouvons dire que le mécanisme d'inhibition de  $\cdot\text{OH}$  est le transfert d'électron (ET) et l'abstraction directe de l'atome H $\cdot$  (HAT) selon les réactions suivantes :



En effet, une corrélation linéaire positive et significative  $R^2 = 0,67$  a été mise en évidence entre la capacité antioxydante du DPPH $\cdot$  et la capacité antioxydante  $\cdot\text{OH}$  (Figure I.40), cela laisse supposer que le mécanisme de piéger les radicaux du DPPH $\cdot$  et  $\cdot\text{OH}$  est attribuée partiellement au transfert d'hydrogène.

Nous rappelons que les composés qui sont entrés dans la corrélation entre l'activité antioxydante pour  $\cdot\text{OH}$  et l'activité antioxydante pour DPPH $\cdot$  sont : tous les composés phénoliques et tous les dithiolethiones sauf **A1**, **A**.



**Figure I.40** : La relation entre l'activité inhibitrice d' $\cdot\text{OH}$  et de la DPPH $\cdot$

### **I.2.2.5. La capacité d'inhibition du radical anion superoxyde**

Les réactions des radicaux libres sont souvent très complexes. Il n'est pas aisé de savoir quel est le radical présent et à quel moment de la réaction il intervient. La méthode classique consiste à ajouter un composé capteur dans un système où une réaction faisant intervenir des radicaux libres. Le problème se posant dans ce cas-là est la non spécificité des capteurs des radicaux libres.

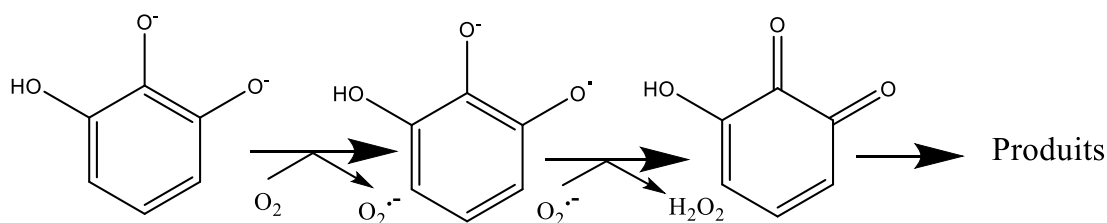
La mesure directe de la présence radicalaire par l'enregistrement des signaux de résonance paramagnétique électronique (RPE) est une bonne solution, mais l'équipement nécessaire n'est généralement pas disponible dans la plupart des laboratoires. C'est pourquoi on fait appel à des techniques de dosages, dites indirectes, comprenant une source de production d'anions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) en solution aqueuse et une molécule détectrice qui est soit oxydée, soit réduite par l'anion ( $O_2^{\bullet-}$ ).

#### **Systèmes de production de l'anion ( $O_2^{\bullet-}$ )**

Dans notre travail, l'anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) peut être généré par deux méthodes : l'une chimique et l'autre électrochimique.

##### **a. Méthode chimique**

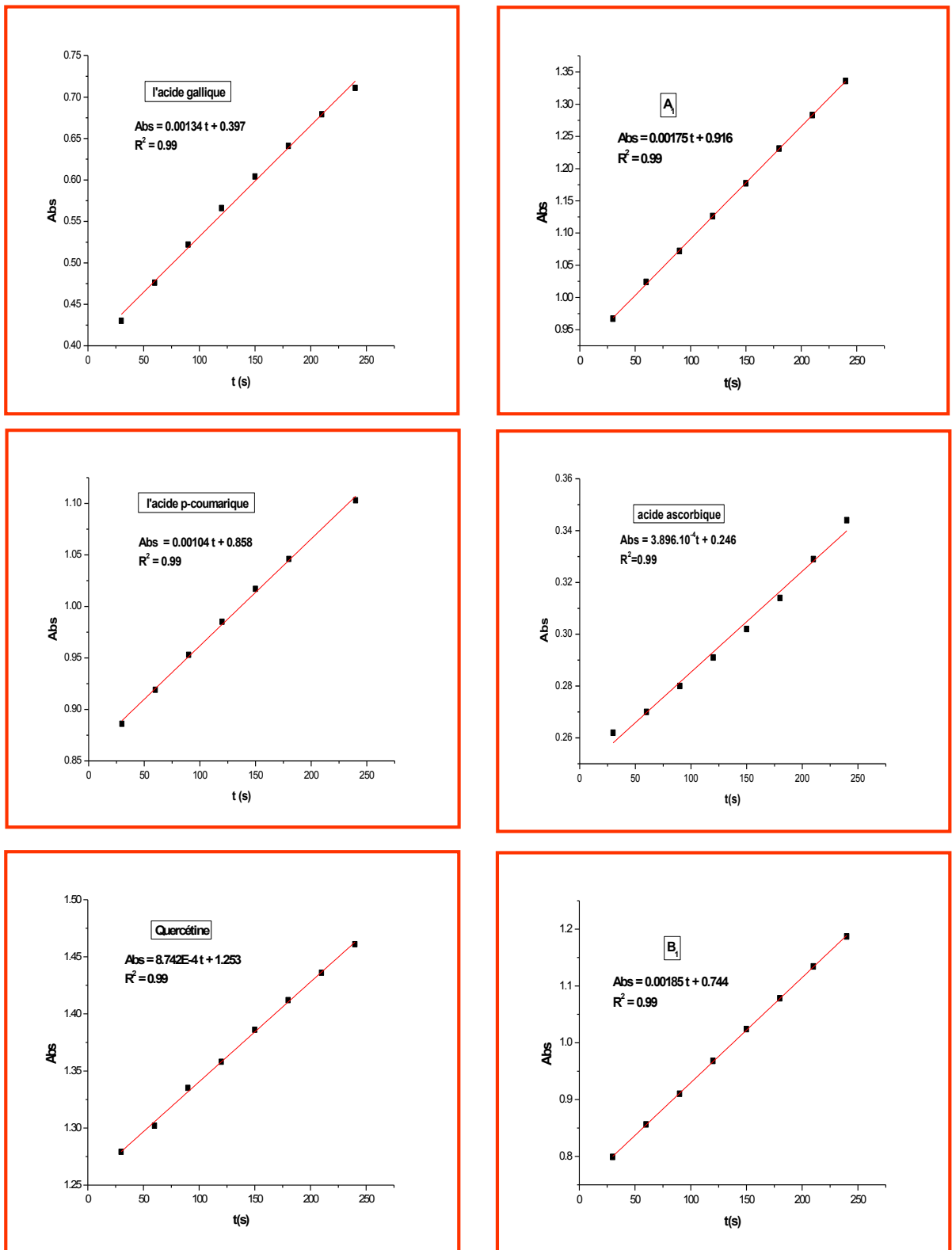
L'autooxydation du pyrogallol (ou le benzène-1,2,3-triol) sera utilisée comme source d'anion ( $O_2^{\bullet-}$ ). L'autooxydation du pyrogallol est inhibée par la SOD. Cette méthode est basée sur l'inhibition de l'autooxydation du catéchol des composés tels que l'adrénaline, la 6-hydroxydopamine ou le pyrogallol. Leur forme anionique comme le phénolate en milieu alcalin est oxydé et donne la quinone accompagnés par la consommation d'oxygène. Voir la schéma I.3 [88]:



**Schéma I.3** : L'autooxydation du pyrogallol.

#### **Résultats et discussions**

Nous traçons l'absorbance en fonction du temps et à partir de ces courbes nous déduisons la pente qui exprime la vitesse de l'autooxydation du pyrogallol.



**Figure I.41 :** Les courbes concernant la vitesse d'autoxydation du pyrogallol en présence d'antioxydant

Les courbes obtenues concernant les résultats de la capture de radical anion superoxyde par les différents composés choisis précédemment sont regroupées dans la figure I.41.

De même que pour le DPPH<sup>\*</sup>, ce test va permettre l'évaluation de l'activité antioxydante de ces classes de composés. Les radicaux libres évalués sont différents. On ne sera pas étonné que l'ordre obtenu pour ce test soit différent de celui obtenu avec le test au DPPH<sup>\*</sup>.

Nous avons ; pour chaque composé, évalué le pourcentage d'inhibition de l'anion superoxyde pour une concentration en molécules testées de  $4,85 \times 10^{-4}$  M. Les résultats sont répertoriés dans le tableau I.14.

**Tableau I.14** : Le pourcentage inhibiteur du radical-anion superoxyde des composés étudiés

<b>Composés étudiés</b>	<b>Pourcentage d'inhibition %</b>
A	38,81
B	25,01
C	01,71
A1	06,91
A2	00,90
B1	01,59
B2	79,53
C1	79,20
Quercétine	22,02
BHT	23,47
BHA	14,05
acide ascorbique	64,25
acide gallique	28,72
(-)-épicatéchine	25,33
l'acide p-coumarique	04,58
L'acide caféique	29,25

L'activité de l'acide tannique n'a pas pu être évaluée en raison d'un problème de stabilité. PULIDO et *Coll.* [92] ont également rapporté que l'absorption de l'acide tannique ne s'est pas stabilisée durant la période de mesure du protocole FRAP (4 min), et elle s'augmentait lentement même après plusieurs heures de temps de réaction.

Le composé, qui a été pris en référence, est l'acide ascorbique. Rappelons que ce test permet d'évaluer le potentiel de nos composés à piéger les radicaux ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Cependant les composés **B2** et **C1** ont un pourcentage d'inhibition supérieur à la référence vitamine C.

Pour quelques composés à titre d'exemple est le composé **A2**, nous avons remarqué que son activité envers les radicaux ( $O_2^{\bullet-}$ ) est presque nulle 0,9%. Les composés **B1** et **A1** ont des faibles pourcentages de piéger les radicaux ( $O_2^{\bullet-}$ ) (1,59 % et 6,91% respectivement). Ceci pourrait s'expliquer par la structure voisine des composés **B1** et **A1**.

À la comparaison de **B1** et **B2**, on remarque que **B2** enregistre un pourcentage d'inhibition supérieure que celui de **B1** bien que la différence entre les composés **B1** et **B2** est au niveau du contre ion ( $I^-$ ) ou ( $CH_3SO_4^-$ ).

D'après la figure I.42, nous constatons que dans nos conditions opératoires, le composé le plus actif est l'acide caféique, parmi la série des composés phénoliques. Ils inhibent 29,25% de radicaux superoxydes produits par l'autoxydation du pyrogallol à une concentration de  $4,85 \times 10^{-4}$  M. Ceci peut être expliqué par la diminution du potentiel d'ionisation qui est égale 73,7 Kcal/mol (cf le tableau I.11).

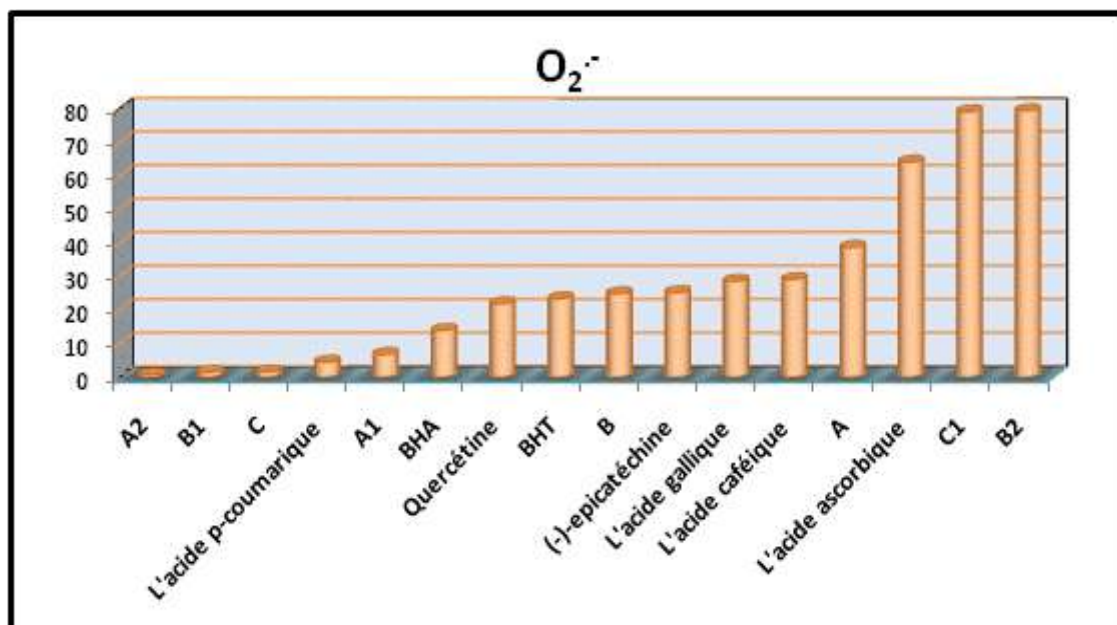
D'ailleurs, malgré la différence de structure entre l'acide gallique et l'acide caféique ces composés donnent un même pourcentage d'inhibition d'environ 29%.

Ceci peut être expliqué par la présence de la double liaison dans l'acide caféique qui prend le même rôle de troisième groupe hydroxyle dans l'acide gallique.

Cette affirmation est plus entendu dans l'acide p-coumarique qui ne possède qu'un seul groupe hydroxyle avec le groupe  $CH=CH-COOH$ , pour cette raison l'acide p-coumarique possède un pourcentage d'inhibition inférieur à celui de l'acide caféique et l'acide gallique. WANASUNDARA et *Coll.* [62] ont montré que la participation de la liaison  $C=C$  est importante à la stabilisation de radical d'antioxydant.



A partir des résultats reportés dans le tableau I.14 une représentation graphique peut être faite afin de classer les composés du moins antioxydant au plus antioxydant (cf le Fig. I.42).

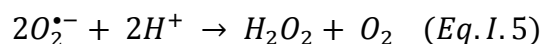


**Figure I.42 :** Classification du pourcentage d'inhibition du ( $O_2^{\bullet-}$ ) à concentration de  $4,85 \times 10^{-4}$  M

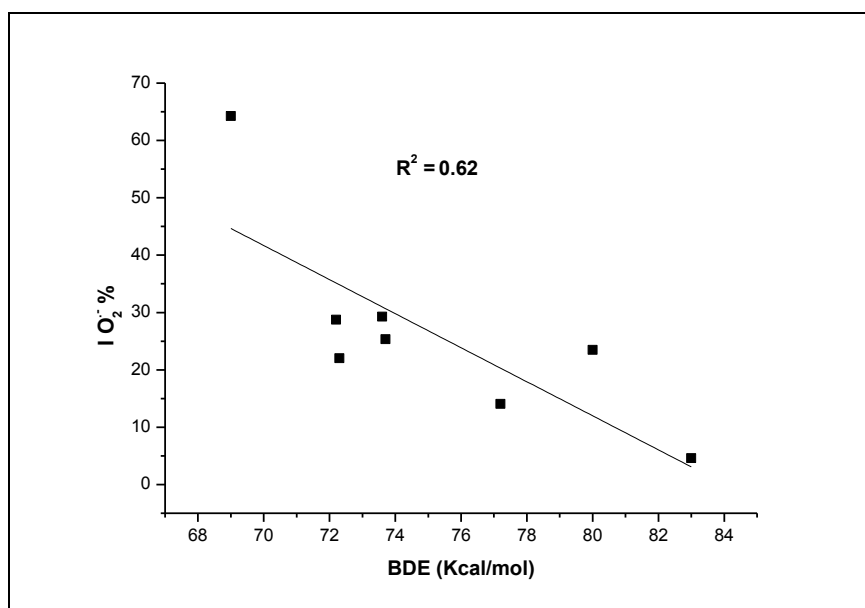
En comparant ces différentes structures, nous pouvons conclure que l'acide p-coumarique et l'(-)-épicatéchine sont moins actifs que la l'acide caféique.

Nous pouvons constater que la quercétine et le BHA possèdent l'activité de capture la plus importante parmi la série des polyphénols (50% de radicaux superoxydes inhibés).

Selon la réaction suivante I.5 [93], nous nous attendons à ce qu'il existe une relation entre la  $CI_{50}$  et BDE.



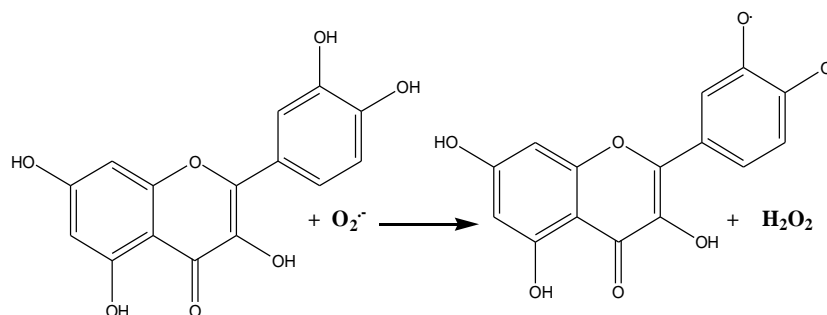
L'énergie de dissociation de liaison (BDE) de la liaison O-H est un paramètre important pour évaluer l'activité antioxydante [95]. En effet, plus cette liaison est faible, plus la réaction avec le radical libre sera facilitée.



**Figure I.43 :** La relation entre l'activité antiradicalaire de  $O_2^{\bullet-}$  et le BDE

Nous avons trouvé une bonne corrélation entre l'activité d'inhibition du radical  $O_2^{\bullet-}$  et l'énergie de dissociation de la liaison O-H avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,62$  (voir le figure I.43) ; nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont : le standard V.C et les composés phénoliques sauf l'acide tannique.

Dans les études de JOVANOVIC V. et *Coll.* ont supposé que le site d'attaque préférentiel des radicaux superoxydes sur les flavonoïdes est le cycle B. Les résultats enregistrés à partir de cette étude ont permis à JOVANOVIC et ses collaborateurs [90] de proposer le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ces radicaux oxygénés (Schéma I.5). Ces réactions conduisent à la formation du peroxyde d'hydrogène et des radicaux flavonoxy. On déduit que l'inhibition des radicaux superoxydes par les flavonoïdes, se fait par un transfert d'électron et également par un transfert de proton.

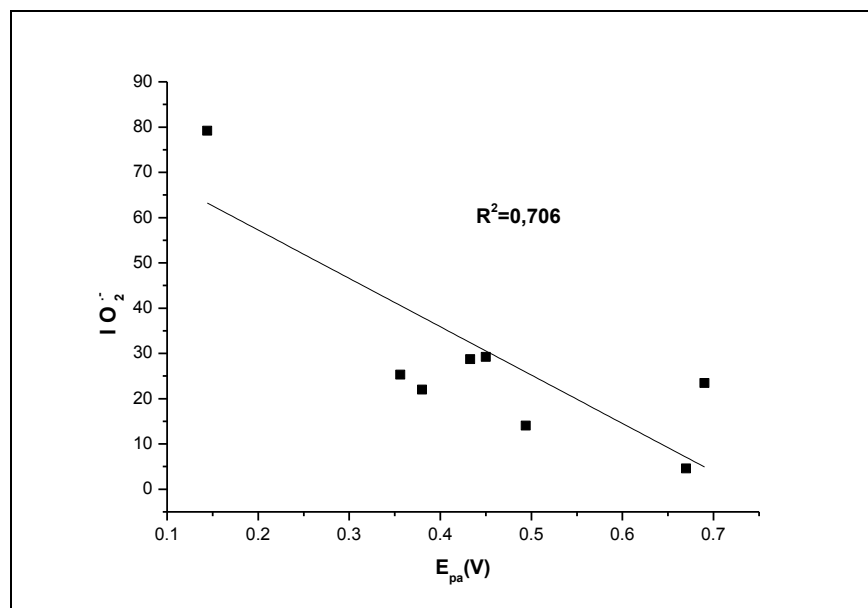


**Schéma I.5 :** Mécanisme proposé pour l'inhibition du radical superoxyde par les flavonoïdes. D'après (JOVANOVIC) [90]

Un potentiel d'oxydation ( $E_{pa}$ ) peut être affecté à chaque couple oxydant/réducteur impliqué, le couple possédant le potentiel élevé pouvant théoriquement oxyder ceux ayant des potentiels plus faibles.

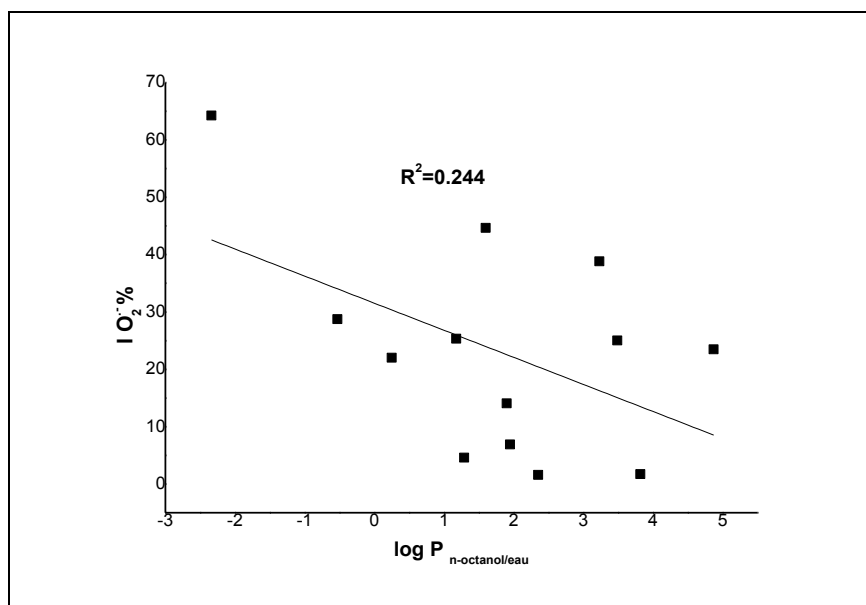
D'après ce concept, nous avons fait une corrélation entre le potentiel redox et le pourcentage d'inhibition de  $O_2^{\bullet-}$  et nous avons trouvé une bonne corrélation entre l'activité d'inhibition du radical  $O_2^{\bullet-}$  et le potentiel d'oxydation avec coefficient de détermination  $R^2 = 0,706$  (voir le figure I.44) ; nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont : le **C1**, l'acide p-coumarique, l'acide caféïque, la quercétine, l'(-)-épicatéchine, l'acide gallique et le BHA.

Donc, le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.



**Figure I.44** : La relation entre l'activité antiradicalaire de  $O_2^{\bullet-}$  et le potentiel d'oxydation

Les antioxydants lipophiles sont particulièrement importants contre les radicaux libres, tels que ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ONOO}\cdot$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , etc) qui sont physiologiquement très réactif [108]. Donc, nous avons fait une corrélation entre les valeurs de pourcentage d'inhibition du radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et le coefficient de partage  $\log P_{\text{n-octanol/eau}}$ , mais nous avons trouvé une faible corrélation avec coefficient de détermination  $R^2 = 0,244$  (voir le figure I.45) ; nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont tous les composés étudiés sauf le **A2**, **B2** et **C1**.



**Figure I.45** : La relation entre l'activité antiradicalaire de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\log P_{\text{n-octanol/eau}}$

## **b. Méthode électrochimique**

### **b. 1. Détermination de la capacité inhibitrice du radical anion superoxyde par la voltamétrie cyclique**

La voltamétrie cyclique consiste à faire varier linéairement le potentiel de l'électrode de travail au cours du temps en effectuant des allers-retours entre deux valeurs limitées. Pendant ce balayage, le potentiostat mesure le courant résultant des réactions électrochimiques qui se produisent à la surface de l'électrode de travail. On obtient alors un voltammogramme cyclique, qui représente la réponse en courant en fonction du potentiel appliqué (Figure I.47).

Pour faire varier le potentiel de l'électrode indicatrice, il faut qu'elle soit associée à une autre électrode pour constituer une cellule d'électrolyte. Les électrodes sont connectées à un circuit extérieur (potentiostat) permettant d'imposer un courant d'électrolyse et de contrôler le potentiel de l'électrode. Chaque technique électrochimique étant différenciée par le régime de transport diffusionnel (modalités expérimentales employées), nous présenterons tout d'abord les rapports théoriques nécessaires à la compréhension de la méthode utilisée dans ce travail. Nous appliquerons, dans un premier temps, cette méthode à l'étude du comportement électrochimique de radicaux  $O_2^{\bullet-}$  et l'étude du comportement électrochimique des composés dithiolethiones avec ce radical.

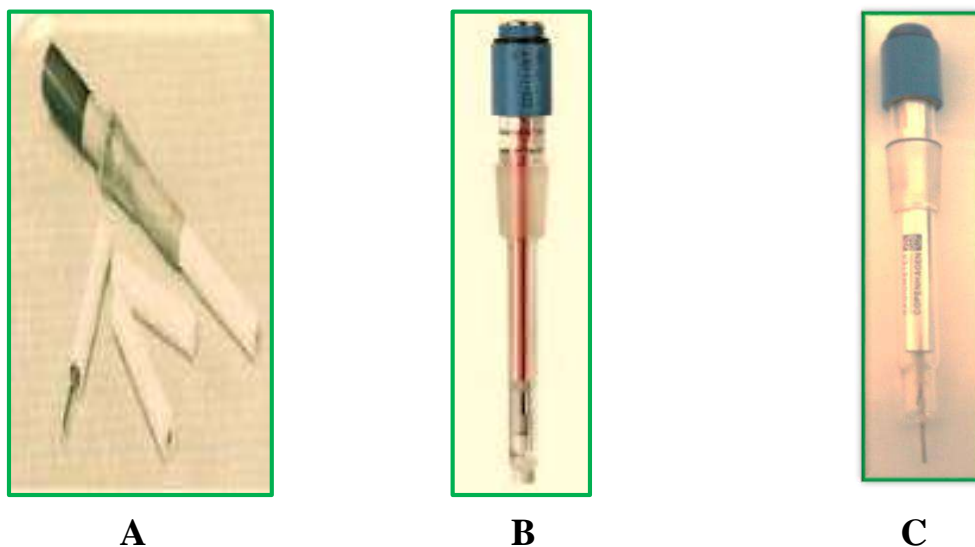
#### **b.1.1. Matériels utilisés**

Les voltammogrammes sont obtenus à l'aide d'un appareil Potentiostat-Galvanostat PGZ301 voltalab 40 piloté par un logiciel de travail voltmaster 4 de l'analytique radiomètre, une cellule électrochimique de 10 mL qui contient les électrodes :

1-Électrode de travail (où s'effectue la réaction redox) : est une électrode de carbone vitreux de diamètre de 3 mm attaché à une tige. L'électrode a été polie mécaniquement par du papier abrasif. La qualité du polissage a été vérifiée avant chaque expérience en voltammétrie cyclique. Une désinfection à l'acétone a été effectuée avant chaque enregistrement.

2-Électrode auxiliaire : est une électrode de platine.

3-Électrode de référence : électrode au calomel saturé (ECS). Il a été conservé dans une solution de KCl saturée.



**Figure I.46 :** Les électrodes utilisées dans cette étude : (A) électrode de travail en carbone vitreux, (B) électrode de référence au calomel saturée, (C) électrode auxiliaire en platine

### **B.1.2. Le milieu utilisé**

DMF (0,05% d'eau) est utilisé pour trois raisons principales :

- a- sa constante diélectrique élevée qui lui permet de dissoudre plusieurs sels supports.
- b- la stabilité du radical d' $O_2^{\bullet-}$
- c- la bonne réponse électrochimique avec les dérivés dithioliques.

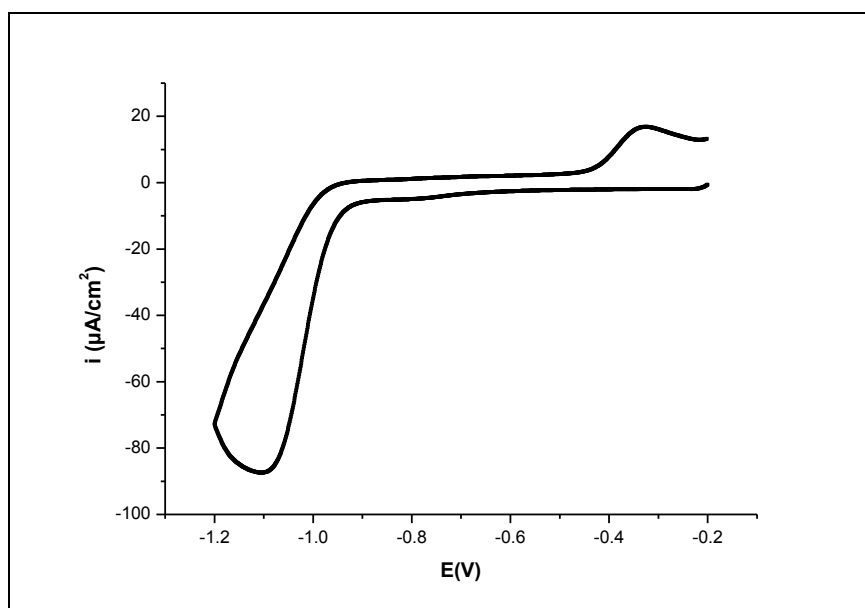
L'électrolyte de support Tetra (n-butyl) ammonium Hexafluorophosphate  $nBu_4N^+PF_6^-$  ( $C_{16}H_{36}F_6NP$ ) avec concentration  $C=0,1M$ .

La désoxygénation des solutions est assurée par un barbotage d'azote.

## **b.2. La méthode**

### **b.2.1. Voltamétrie cyclique sans oxygène**

Avant de commencer l'étude d'activité antioxydante de nos dithiolethiones nous avons précisé le domaine d'électro activité d'électrolyte support  $[-20, -1200mV]$  avec une vitesse de balayage  $0,1V.s^{-1}$  après barbotage d'azote pendant 5 min dans un système fermé et nous avons obtenu le voltammogramme suivant :



**Figure I.47** : Voltammogramme de l'électrolyte support [milieu DMF -  $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{PF}_6^-$  0,1M ; électrode CV ; vitesse de balayage  $0,1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

## b.2.2 Voltamétrie cyclique d'oxygène

### b.2.2.1. Voltamogramme d'oxygène en absence des dithiolethiones

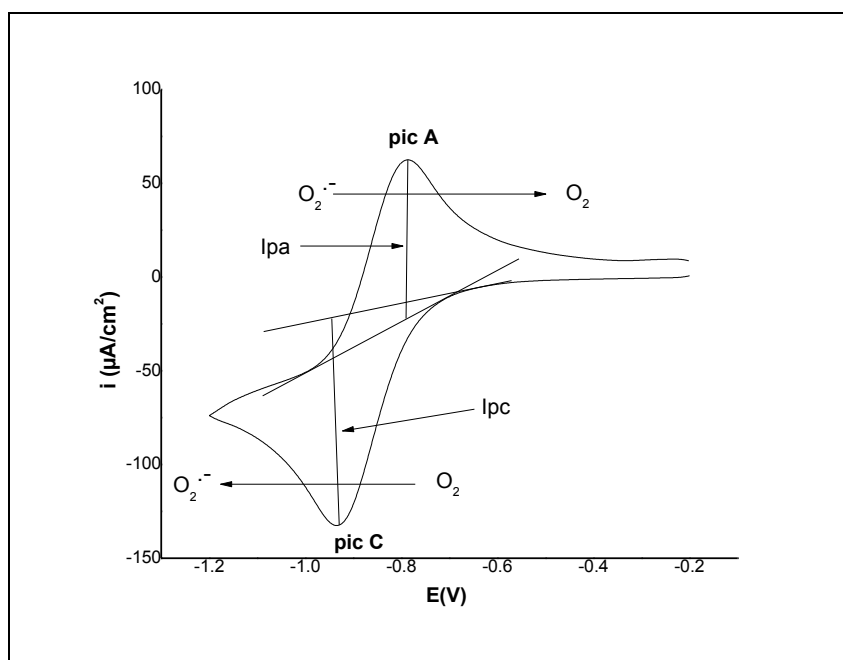
- **Système  $\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$**

Conditions expérimentales

Electrode de carbone vitreux

**DMF/  $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{PF}_6^-$  0,1M ;  $25^\circ\text{C}$  ;  $v = 0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$**

La solution a été agitée pendant 10 minutes en présence d'air avant enregistrement. Dans ces conditions, la concentration de l'oxygène en solution est de 0,94 mM [87].



**Figure I.48 :** Voltamogramme de l'oxygène [milieu DMF -  $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{PF}_6^-$  0,1M ;  
électrode CV ; vitesse de balayage  $0,1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

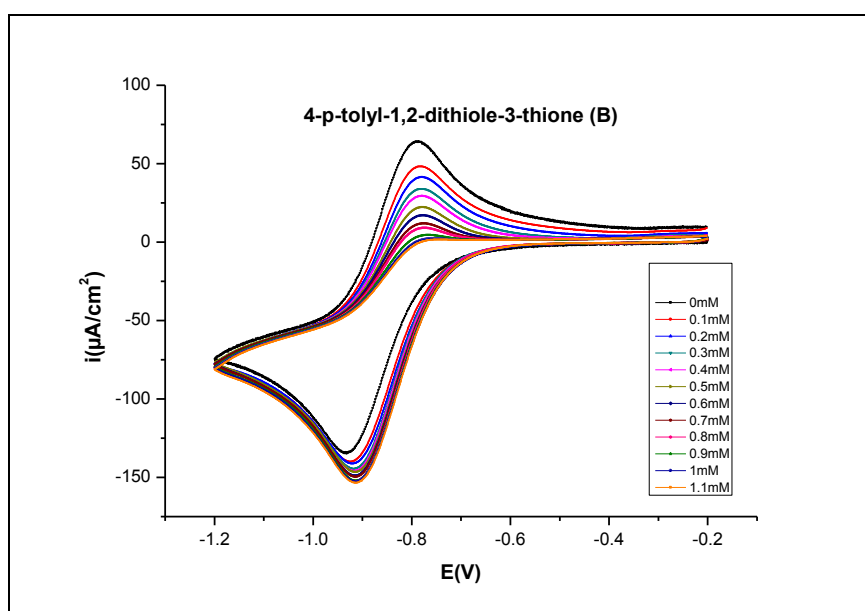
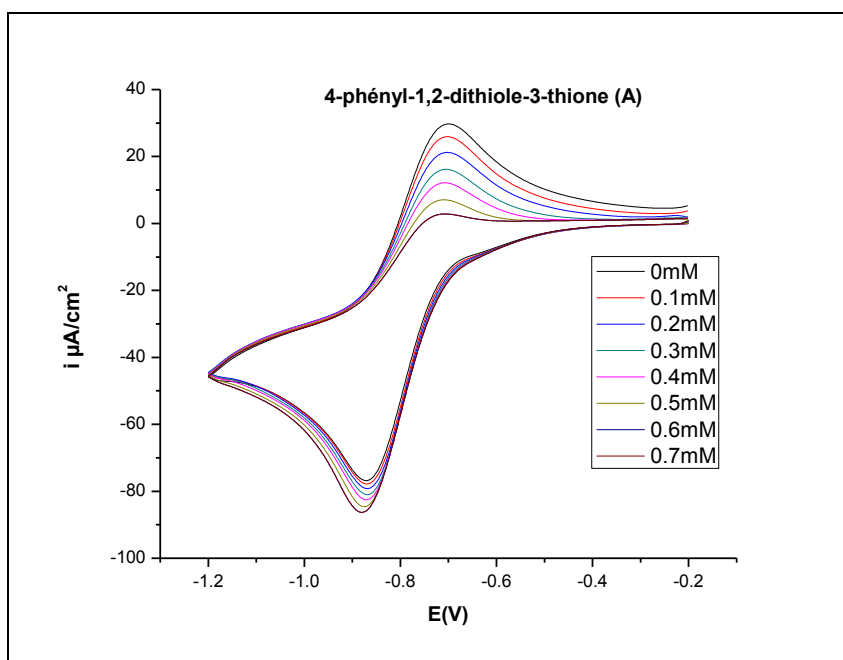
#### **b.2.2.2. Voltamogramme d'oxygène à la présence des dithiolethiones**

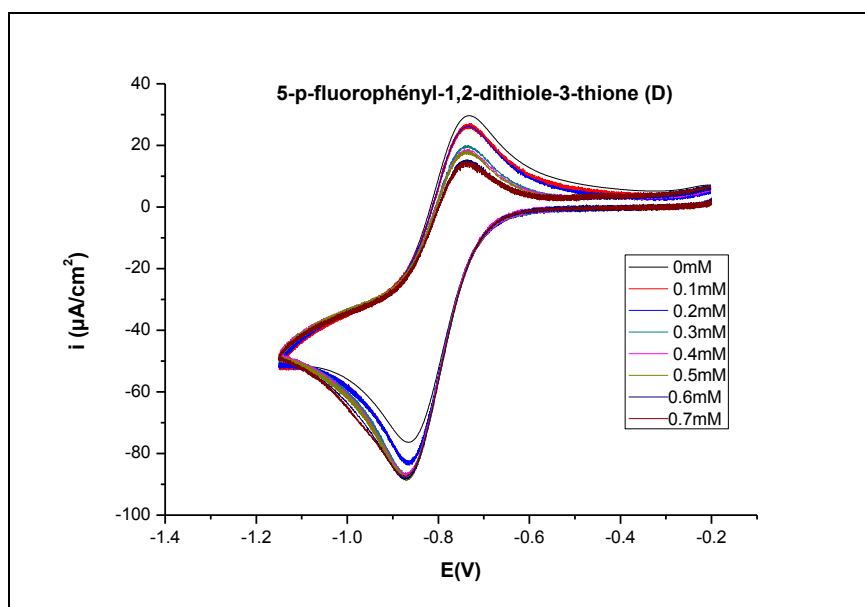
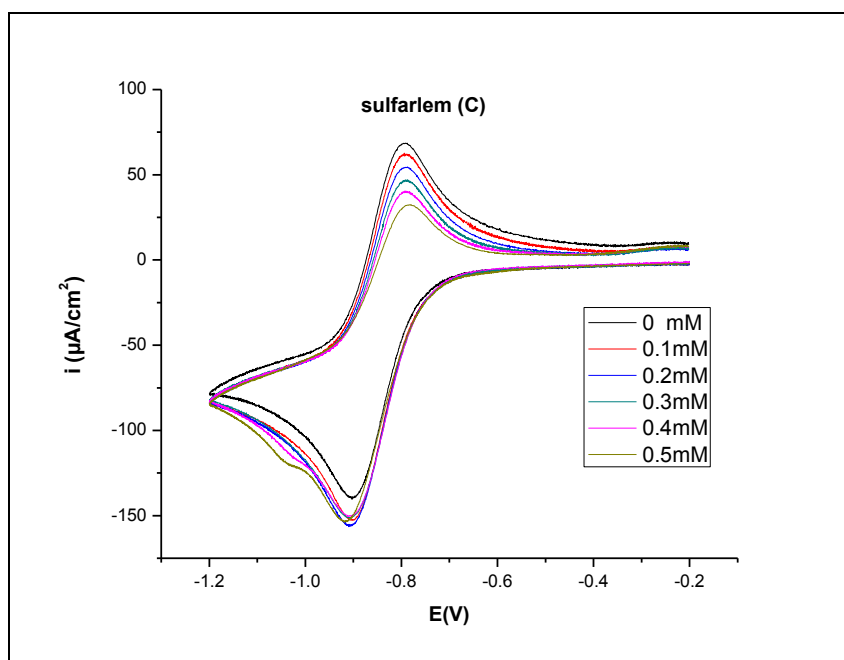
Nous rappelons que les dithiolethiones utilisées dans cette partie électrochimique sont : la 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione (**A**), la 4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione (**B**), la sulfarlem (**C**) et la 5-p-fluorophényl-1,2-dithiole-3-thione (**D**).

On ajoute à 10 mL de solution (DMF + électrolyte support), à chaque fois, des quantités de dithiolethiones, puis on enregistre le voltammogramme après chaque addition.

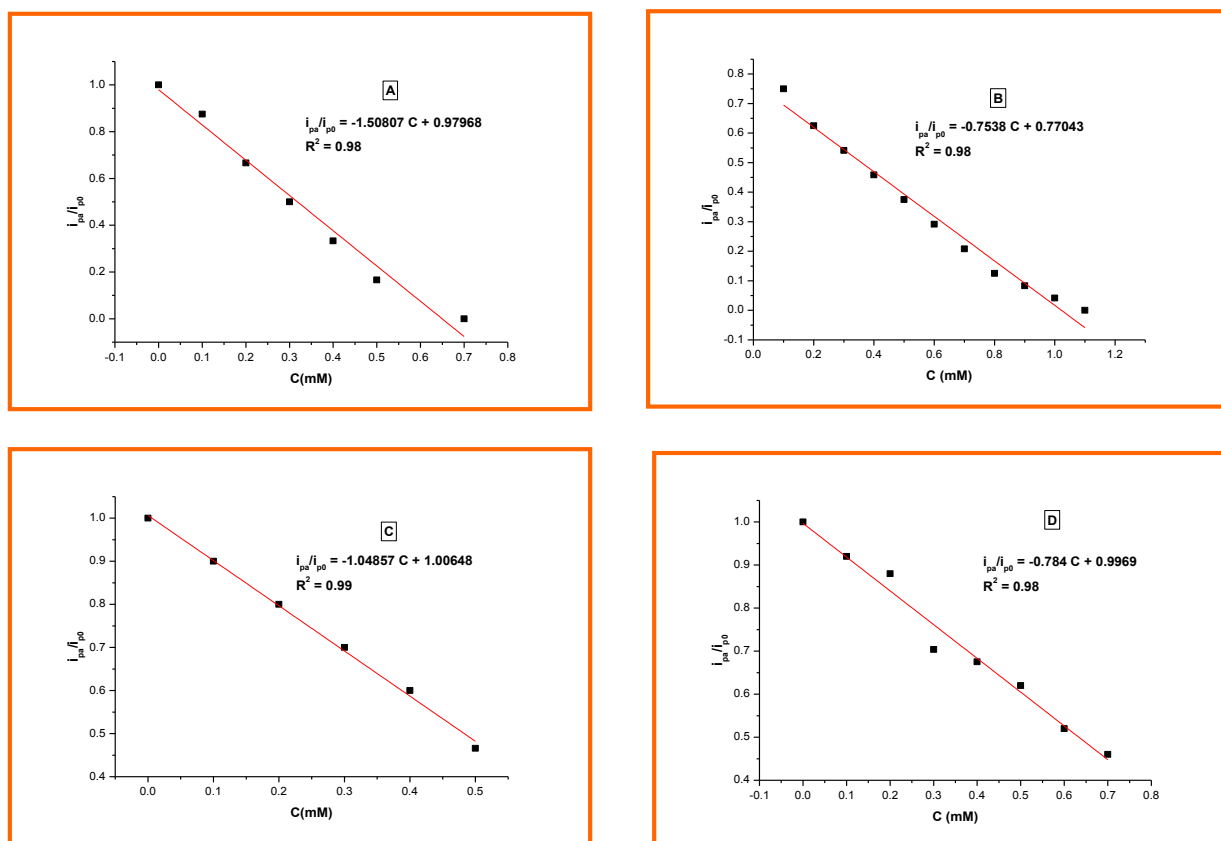
Les résultats obtenus sont les suivants :







**Figure I.49 :** Voltammogramme de l'oxygène à la présence des dérivés dithioliques  
[milieu DMF -  $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{PF}_6^-$  0,1M ; électrode CV ; vitesse de balayage  $0,1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ ]



**Figure I.50 :** Le rapport de ( $i_{pas}/i_{pa0}$ ) en fonction de la concentration des dithiolethiones (A, B, C, D)

La technique de voltamétrie cyclique est utilisée pour générer le radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  dans la couche de diffusion de l'électrode CV par la réduction de l'oxygène à un électron dans le DMF (Fig. I.48 pic C). La présence d'  $O_2^{\bullet-}$  est facilement détectée par son oxydation anodique actuelle mesurée à l'électrode au cours du même revers scan (Fig. I.48 pic A). La réduction d' $O_2$  est une réaction réversible, et il est connu que le radical  $O_2^{\bullet-}$  est stable en milieu aprotique comme le DMF sec [91].

Dans le développement de la procédure, le voltammogramme a été tout d'abord en l'absence de substrat pour déterminer la valeur  $i_{pa0}$  (la densité de courant anodique de l'oxydation de  $O_2^{\bullet-}$ ).

Le potentiel de réduction du  $O_2/O_2^{\bullet-}$  est -0,93 V vs ECS, et le potentiel d'oxydation du  $O_2^{\bullet-}/O_2$  est -0,77 V vs ECS.

Les voltamogrammes de la réduction de  $O_2$  a été enregistrée en présence d'un antioxydant (dithiolethiones) en vue d'évaluer la capacité antioxydante de la molécule à la recherche lors de sa réactivité envers  $O_2^{\bullet-}$ . L'augmentation de la concentration du substrat antioxydant conduit à une diminution de concentration de  $O_2^{\bullet-}$  qui correspondant une diminution de densité de courant anodique ( $i_{pas}$ ) selon la relation de Randles-Sevcik [103 ]:

$$i_{pa} = 0.4463 \left( \frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} \cdot n^{3/2} \cdot D_{Red}^{1/2} \cdot C_{Red} \nu^{1/2}$$

Ce qui donne à 25°C :

$$i_{pa} = (2.69 \times 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot D_{Red}^{1/2} \cdot C_{Red} \nu^{1/2}$$

Où : où  $D_{red}$  est le coefficient de diffusion de l'espèce Red, exprimé en  $cm^2 \cdot s^{-1}$ , R la constante des gaz parfaits ( $R= 8,314 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$ ), T la température absolue (en K), n le nombre d'électrons échangés au cours du transfert électronique,  $\nu$  la vitesse de balyage en mV/s, F la constante de Faraday ( $F = 96500 C \cdot mol^{-1}$ ).

$i_{pas}$  diminue de façon progressive avec l'addition des dithiolethiones et disparaît pour une concentration de  $\approx 1.1mM$  pour la 4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione. Pour une concentration supérieure de sulfarlem ( $C=0,5mM$ ), le pic de réduction de ce dernier apparaît. Tandis que la densité du courant cathodique  $O_2$  n'est pas significativement modifiée comme indiqué dans la (Fig. I.49).

La diminution du pic de densité de courant anodique de  $O_2^{\bullet-}$  suggère que le substrat dithiolethiones réagit de manière réversible avec  $O_2^{\bullet-}$ .

Pour chaque composé antioxydant, une série de valeurs  $i_{pas}$  est déterminé pour des concentrations croissantes antioxydant (Fig. I.50). Tous les substrats antioxydants ont démontré un effet similaire sur la réduction d' $O_2$ .

### **b.3. Capacité antioxydante**

Nous préférons caractériser la réactivité des substrats antioxydants par la concentration inhibitrice d'antioxydant ; nous déterminons un indice  $CI_{50}$  qui se définit par la concentration en mM d'antioxydant et qui est capable de consommer de 50% du radical-anion superoxyde.

$$I\% = \frac{i_{pa0} - i_{pas}}{i_{pa0}} \cdot 100$$
$$\implies I_{50} = \frac{i_{pas}}{i_{pa0}} = 0.5$$

Avec :

**I%** : pourcentage d'inhibition

**I<sub>50</sub>** : pourcentage d'inhibition à 50%

**i<sub>pa0</sub>** : densité du courant anodique en absence de substrat.

**i<sub>pas</sub>**: densité du courant anodique en présence de substrat.

Les valeurs de  $CI_{50}$  a été calculé à partir des courbes  $i_{pas}/i_{pa0}$  en fonction de concentration de dithiolethiones (Fig. I.49).

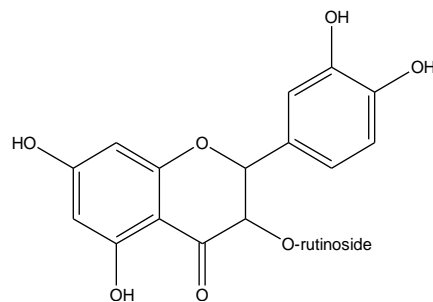
**Tableau I.15** : Les résultats de  $CI_{50}$  obtenue pour les dithiolethiones

<b>Dithiolethiones</b>	<b><math>CI_{50}</math> (mM)</b>
<b>A</b>	0,318
<b>B</b>	0,358
<b>C</b>	0,483
<b>D</b>	0,634

D'après les valeurs de  $CI_{50}$  regroupés dans le tableau I.15, nous pouvons dire que le composé le plus actif est la 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione **A**, par contre la 5-p-fluorophényl-1,2-dithiole-3-thione **D** enregistre une grande valeur de  $CI_{50}$ , ce qui donne une faible activité. Le classement des ces composés selon l'activité antioxydante est le suivant : **A>B>C>D**. Nous avons trouvé une  $CI_{50}$ = 0,483 mM pour le composés **C**.

LE BOURVELLEC C. et *Coll.* [85] ont travaillé sur la détermination de la capacité antioxydante des flavonoïdes pour inhiber le radical anion superoxyde par voie électrochimique et ont trouvé des valeurs de  $CI_{50}$  de l'acide ascorbique (0,64 mM), la quercétine (0,46 mM) et la rutine 1,24 mM.

La figure I.51 illustre les valeurs de  $CI_{50}$  pour les dithiolethiones, les flavonoïdes et le standard : vitamine C.

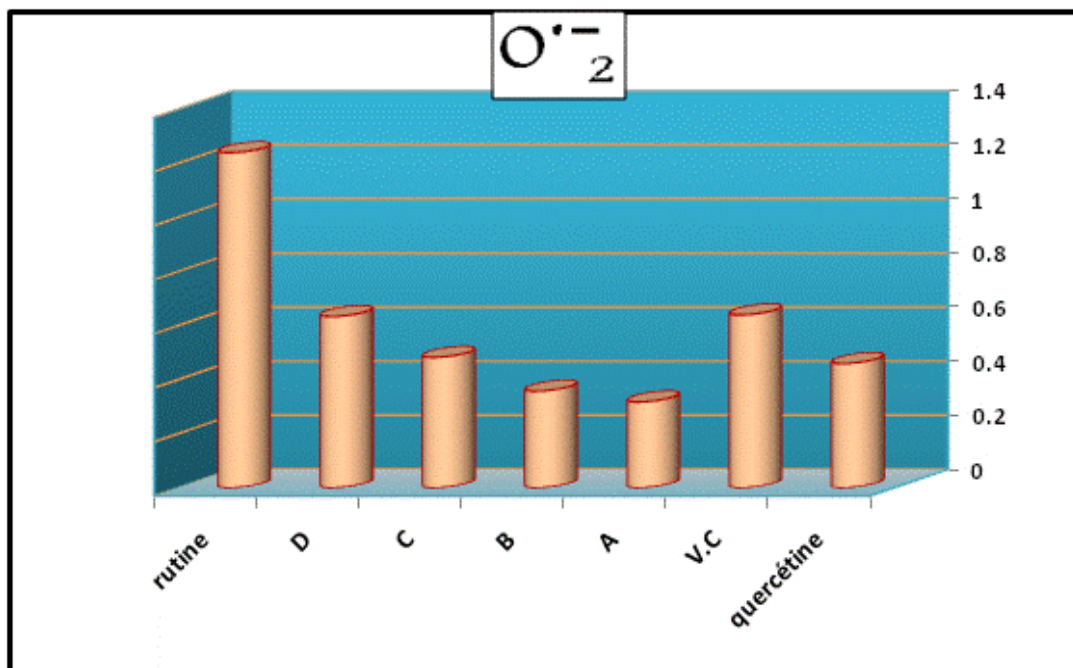


**Figure I.51 :** La structure de la rutine

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) réduit l'activité antioxydante à 1,24 mM (figure I.51).

Par exemple, la rutine est presque trois fois moins active que la quercétine.

Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH adjacent à la double liaison  $C_2-C_3$  et à la fonction 4-oxo.



**Figure I.52 :** Classification de la capacité d'inhibition du  $O_2^{\bullet-}$  selon les valeurs  $CI_{50}$

On remarque d'après ces résultats que les dithiolethiones **A**, **B** et **C** ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui de l'acide ascorbique.

Par contre, aucune variation significative de  $CI_{50}$  n'est constatée chez la 5-p-fluorophényl-1,2-dithiole-3-thione **D** car sa valeur (0,634 mM) n'est pas significativement différente de celle du standard vitamine C. La quercétine donne une faible activité antioxydante par rapport aux dérivés dithioliques **A** et **B**.

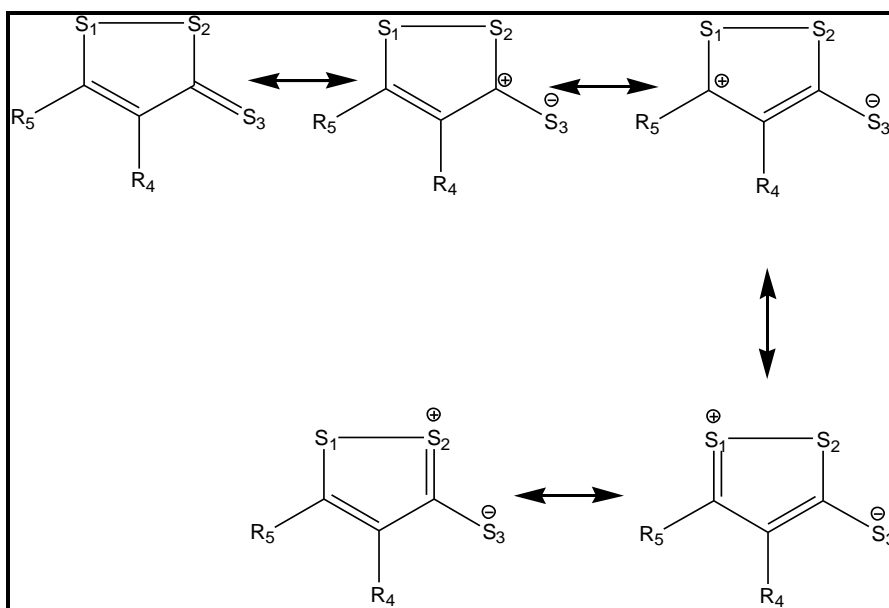
Les dithiolethiones étudiés ont activités antioxydantes importantes (inhibition de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ ).

De ce fait, chaque fois que les substituants sur les positions 4 et 5 sont des groupements donneurs, les résultats seront meilleurs.

La discussion de ces résultats est basée sur la structure chimique des dérivés dithioliques.

On remarque que le  $CI_{50}$  de **A** et le  $CI_{50}$  de **B** sont proches, ce résultat revient au fait que les transitions électroniques se ressemblent dans les deux composés, malgré la présence de groupement méthyle ( $-CH_3$ ) à la position para de **B** qui donne un effet inductif donneur.

Pour la comparaison entre la sulfarlem (5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione) **C** et la 5-p-fluorophényl-1,2-dithiole-3-thione **D**, les deux composés ont un substituant donneur dans la position 5, mais le sulfarlem a donné un meilleur résultat par rapport au composé **D** parce que le groupement méthoxy dans la position para ( $-OCH_3$ ) possède un effet mésomère très donneur. Ce dernier favorise l'accumulation des charges autour des atomes de soufres et spécialement le soufre du groupe ( $C=S$ ) ce qui a facilité la libération d'un électron ou deux électrons.



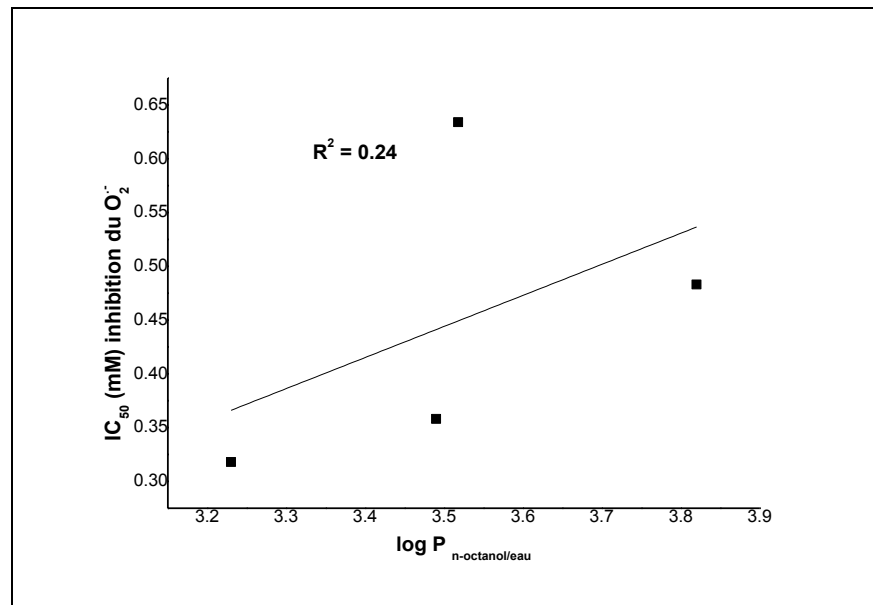
**Schéma I.5** : Délocalisation des électrons dans les dithiolethiones

Ainsi d'après la structure électronique de plusieurs dérivés, ces calculs permettent de déduire que l'atome de soufre de la fonction thione est chargé négativement.

Une faible corrélation est trouvée entre les valeurs de  $CI_{50}$  pour piéger les radicaux  $O_2^{\bullet-}$  et le coefficient de partage  $\log P_{n-octanol/eau}$  ( $R^2 = 0,24$ ), nous expliquons ce résultat par la valeur de coefficient de partage pour le composés **D** (substitué en position 5 par le groupe fluoro phényle) est erroné par ce que ce dernier est déterminé théoriquement par la méthode de calcul. Il faut impérativement déterminer ce coefficient expérimentalement pour le comparer avec la valeur théorique.

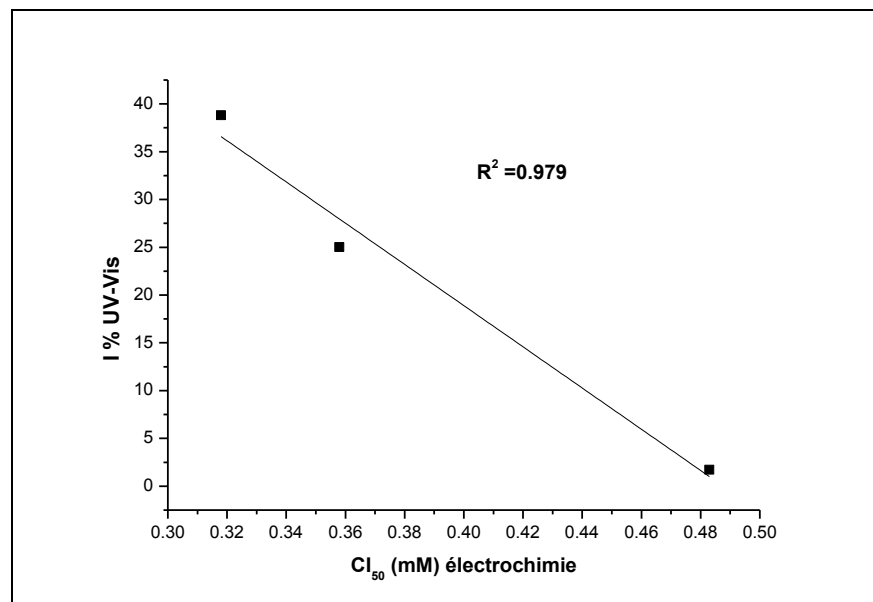
Les composés qui sont entrés dans cette corrélation sont : les dithiolethiones **A**, **B**, **C** et **D** (Fig. I.53).





**Figure I.53 :** La relation entre l'activité inhibitrice du radical anion superoxyde  $O_2^-$  et le coefficient de partage  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$

En fin, en comparant les valeurs de l'activité antioxydante obtenues, soit par voie chimique ou électrochimique, nous trouvons une bonne corrélation avec  $R^2 = 0,979$ . Les composés qui sont entrés dans cette corrélation sont : les dithiolethiones **A**, **B** et **C** (Fig. I.54).



**Figure I.54 :** La relation entre le pourcentage inhibitrice (UV-Vis) et l'activité inhibitrice (électrochimie) du radical anion superoxyde  $O_2^-$

### **I.2.3. Comparaison des cinq méthodes**

Quoiqu'il en soit, la réaction du DPPH<sup>•</sup> est semblable au mécanisme d'inhibition d'<sup>•</sup>OH et on imagine automatiquement que si le processus DPPH<sup>•</sup> est facile, le processus <sup>•</sup>OH doit l'être aussi.

Cependant, dans le cas présent, nous avons obtenu des mesures de CI<sub>50</sub> du DPPH<sup>•</sup> et de CI<sub>50</sub> d'<sup>•</sup>OH généralement cohérentes.

Pour le test de réduction des ions ferriques et les valeurs de CI<sub>50</sub> d'inhibition <sup>•</sup>OH sont généralement cohérentes avec  $R^2 = 0,22$ .

Aussi, une autre corrélation a été obtenue entre la capacité réductrice de Fe<sup>3+</sup> et la chélation des ions ferreux avec  $R^2 = 0,30$ .

Par contre, une faible corrélation a été obtenue entre l'activité de chélation et la capacité d'inhibition de l'anion superoxyde. Cette contradiction est due certainement aux types des tests utilisés et le mécanisme des réactions mises en jeux.

## **Conclusion**

En conclusion, il semble que d'une manière générale, la réactivité du noyau dithiole est la plus meilleure réactivité qui se traduit notamment par des rendements d'activité antioxydante plus importants.

Nous pouvons dire que les composés testés sont des forts antioxydants. Ces résultats montrent l'apport non négligeable d'une fonction dithiole et thione dans les propriétés antioxydantes.

Il en est de même pour les composés phénoliques. La présence d'une fonction hydroxyle directement liée aux phényles augmente les propriétés antioxydantes ; les valeurs obtenues sont tout à fait comparables à celles du composé de référence la vitamine C.

L'activité antioxydante observée qui serait due à leur potentiel d'oxydation, potentiel d'ionisation et l'énergie de dissociation de liaison O-H dans les composés phénoliques pourraient expliquer l'usage de ces composés dans le traitement des affections liées à l'activité antioxydante, en particulier l'usage de dithiolethiones dans le traitement comme le sulfarlem utilisé en tant que cholérétique et sialagogue. Une étude récente a mis en évidence son effet chez l'homme dans la prévention des lésions précancéreuses du poumon chez le fumeur [104].

Dans ce travail nous remarquons généralement que les dithiolethiones sont des bonnes inhibitrices des radicaux superoxydes, des bonnes chélatrices des ions ferreux et des bonnes réductrices des ions ferriques, par contre les polyphénols sont des bons réducteurs des radicaux DPPH<sup>•</sup> et d'<sup>•</sup>OH soit par donation d'un électron ou d'un atome d'hydrogène.

En somme de cette étude *in vitro*, les différents résultats montrent, une plus grande efficacité des dérivés dithiolethiones et polyphénols quel que soit le test.

## I.2.4. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

### a. Solvants et réactifs

Les solvants sont pour l'analyse et devraient être anhydres dans certaines réactions. L'ensemble des réactifs utilisés, lors des expériences, est rassemblé dans le tableau I.16 et tableau I.17.

**Tableau I.16 :** Réactifs et matériels nécessaires dans le chapitre I

Réactifs	Réactifs
Ethanol 95% (BIOCHEM Chemopharma)	Magnesium sulfate (Ph. Eur)
Acide trichloroacétique (BIOCHEM Chemopharma)	Iodure de méthyle (BIOCHEM Chemopharma)
Diméthylformamide (BIOCHEM Chemopharma)	Ferrous Sulfate hepta-hydrate (Riedel-de Haën)
Hydroxyde de sodium (BIOCHEM Chemopharma)	Tris (hydroxyméthyl amino méthane) (Sigma -Aldrich)
Méthanol (BIOCHEM Chemopharma)	<i>Ortho</i> -Phénanthroline (Sigma -Aldrich)
Acide chlorhydrique 37% (BIOCHEM Chemopharma)	Pyrogallol (Sigma -Aldrich)
Chlorure de sodium (Fluka)	Acétone (BIOCHEM Chemopharma)
Acide sulfurique (Sigma -Aldrich)	Chlorure de potassium (Fluka)
1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH') (Sigma -Aldrich)	Tetra (n-butyl) ammonium
Ferricyanure de potassium (Prolabo)	Hexafluorophosphate (Aldrich)
Sodium-dihydrogénophosphate (BIOCHEM Chemopharma)	Quercétine (Sigma -Aldrich)
Di-sodium-hydrogénophosphate (BIOCHEM Chemopharma)	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène (BHT) (Sigma-Aldrich)
Héxane (BIOCHEM Chemopharma)	Acide caféique (Sigma -Aldrich)
Chlorure de fer (Fluka)	(-)-épicatéchine (Sigma -Aldrich)
Toluène (BIOCHEM Chemopharma)	Acide p-coumarique (Sigma -Aldrich)
Acide gallique (Sigma -Aldrich)	3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) (Sigma-Aldrich)
Sulfate de sodium (BIOCHEM Chemopharma)	Eau oxygénée H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (BIOCHEM Chemopharma)
	Acide tannique (Sigma-Aldrich)

**Tableau I.17 :** Matériels nécessaire dans le chapitre I

<b>Matériels</b>
Centrifugeuse (SLW Centrifuge Ultra 8-Place)
Spectromètre UV (Spectro Scan 80DV)
Agitateur magnétique (TMA)
Potentialstat-galvanostat PGZ301 (Radiometre analytical)
Electrode carbone vitreux (Radiometre analytical)
Electrode de platine (Radiometre analytical)
Electrode de calomel saturé de KCl (Radiometre analytical)
Fusionomètre (Gallenkamp)
Spectromètre SHIMADZU IR A20913700919

### **b. Enregistrement des spectres et mesures physico-chimiques**

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés avec un spectrophotomètre SHIMADZU.

Les spectres d'absorption UV-Vis ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Spectro Scan 80DV.

Les points de fusion ont été mesurés en tube capillaire, à l'aide d'un appareil à point de fusion (Gallenkamp).

#### **I.2.4.1. Partie expérimentale**

##### **I.2.4.1.1. La synthèse**

##### **a. Récupération de la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione (C)**

##### **Mode opératoire :**

On dissout 30 comprimés dans 50 mL de toluène après la dissolution complète du composé, filtrer la solution, puis laver avec 50 mL de l'eau distillée 3 fois, on élimine les traces d'eau par  $MgSO_4$  et après l'évaporation de toluène et la recristallisation dans l'héxane, on obtient des cristaux rouges –orangés aiguillés.

Le rendement obtenu la valeur de 70 %, cette valeur est calculée par l'utilisation de la relation suivante :

$$R = \frac{m \text{ (la masse du sulfarlem récupéré)}}{m_0 \text{ (la masse de 30 comprimé du sulfarlem)}}$$

**Facteur de rétention  $R_f$**

Nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince CCM, phase stationnaire gel de silice la phase mobile est le toluène et nous avons obtenu un seul spot avec  $R_f = 0,64$ .

**Point de fusion**

La détermination de point de fusion de sulfarlem donne la valeur :

**pf (sulfarlem synthétisé) = 109 °C**

**pf (sulfarlem récupérée) = 109 °C**

**b. Synthèse de la 3-Méthylthio-5p-méthoxyphényl-1,2-Dithiolylium contre ion ( $I^-$ ) (C1)**

**Mode opératoire :**

Le sel C1 est préparé par alkylation de sulfarlem correspondante. A la 0,5g de sulfarlem dissoute dans le minimum de toluène, on ajoute un excès d'iodure de méthyle puis la solution est chauffée au bain-marie sous la température de 30°C pendant 4 heures. Après refroidissement, nous avons filtré puis laisser le produit à l'aire pour sécher.

Le rendement est 95%.

La détermination de point de fusion de **C1** donne la valeur 228°C.

**I.2.4.1.2. Activité antioxydante**

**a. Test de réduction de Fe (III)**

On prépare des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) de concentrations allant de 0,01 jusqu'à 0,1 g/L. 1mL de chaque solution est introduit dans un tube à essai et mélangés avec 2,5mL d'une solution de  $K_3Fe(CN)_6$  (1%) et 2,5mL d'une solution tampon phosphate (200 mM, pH 6,6). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 2,5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique (10 %) est ajouté. Ensuite, la solution est centrifugée pendant 5 min à 1000 tour. 2,5mL du surnageant est ajouté à 2,5mL d'eau distillée et 0,5mL de la solution de  $FeCl_3$  (0,1%) [46].

L'absorbance de chaque solution a été mesurée à 700 nm contre un blanc, ces lectures ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. Les différentes concentrations des dithiolethiones/polyphénols ont été traitées de la même façon pour tracer les courbes représentantes de la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction des concentrations.

**b. Test de chélation des ions ferreux**

1mL d'échantillons (dithiolethiones/phénoliques ou standard dissout dans l'éthanol) sont mélangés avec 150µL de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2mM) et a été ajouté à un mélange de la réaction contenant 186µL de Tris-HCl (0,1M, pH=7,4) et 218µL saline (0.9 % NaCl). Le mélange de réaction a été incubé pendant 5 min, avant l'addition de 13µL de la phénanthroline 0,25% (poids/volume).

La complexation du fer résiduelle et la formation d'un chromophore rouge (Fe (II) – phénanthroline) ayant un maximum d'absorption à 510 nm dans un spectrophotomètre. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un mL de l'éthanol.

L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en activité de chélation selon l'équation suivante :

$$\text{Activité de Chélation} = \frac{\text{Abs } 510_{\text{contrôle négative}} - \text{Abs } 510_{\text{échantillon}}}{\text{Abs } 510_{\text{contrôle négative}}} \times 100$$

**c. Test de DPPH\***

1mL d'échantillons (dithiolethiones/phénoliques ou standard) dilué dans le tampon Tris (100 mM, pH=7,4) est additionné à 1mL d'une solution de DPPH\* (500µM) préparé dans le méthanol ou l'éthanol, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négative contenant la solution de DPPH\* et 1 mL de tampon Tris est mesurée à 517 nm.

L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité antiradicalaire} = \frac{\text{Abs } 517_{\text{contrôle négative}} - \text{Abs } 517_{\text{échantillon}}}{\text{Abs } 517_{\text{contrôle négative}}} \times 100$$

**d. Test d' $\text{OH}^\bullet$**

Dans un tube à essai, contentent (1mL à concentration de  $1,865 \times 10^{-3}$  mol/L) de phénanthroline nous additionnons (2 mL, 0,2 mol/L, pH 7,4) de PBS et (1 mL) des échantillons (dithiolethiones/phénoliques ou standard) à différents concentrations. Puis nous ajoutons 1mL de  $\text{FeSO}_4$  ( $1,865 \times 10^{-3}$  mol/L). La réaction a été lancée quant en ajoutant 1mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,03% v/v). Après l'incubation à  $37^\circ\text{C}$  pendant 60 minutes au bain-marie, l'absorbance du mélange de la réaction a été mesurée à 536 nm. Le mélange de la réaction sans antioxydant a été employé comme négative, et celui sans  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été employé comme blanc. L'activité d'ébouage du radical d'hydroxyle a été calculée par la formule suivante :

$$I\% = \left[ \frac{(A_s - A_b)}{(A_n - A_b)} \right] \times 100$$

Où :

- $A_s$  est l'absorbance de mélange avec les antioxydants étudiés
- $A_n$  l'absorbance de contrôle
- $A_b$  l'absorbance de blanc

**e. Test de radical anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$**

4,5 mL de la solution tampon de tris/HCl (pH=8,2) a été ajoutés dans un tube contenu des échantillons phénoliques/dithioliques (0,5 mL) à concentration ( $4,85 \cdot 10^{-4}$  M). La réaction a été lancée en ajoutant (10  $\mu\text{L}$ , 45 mM) de pyrogallol, l'absorbance du mélange de la réaction a été mesurée à 320 nm chaque 30 seconde [89].

Le pourcentage d'inhibition de l'autoxydation de pyrogallol est calculé par l'utilisation de l'équation suivant :

$$I = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100$$

Où :

- $\Delta A_0$  est la vitesse de l'autoxydation de pyrogallol en absence d'antioxydant
- $\Delta A$  est la vitesse de l'autoxydation de pyrogallol en présence d'antioxydant



## Références

- [1] HALLIWELL B.; *Br J Exp Pathol*, **70**, pp 737 - 757(1989).
- [2] GAEDÈS A. M., BONNEFONT R. D., ABEDINZADEH Z. et JORE D.; *l'actualité chimique*, pp 91-96 (2003).
- [3] FAVIER A.; *L'actualité Chimique*, pp108 - 115 (2003).
- [4] HANDA M., LEE Y., SHIBUSAWA M., TOKUMURA M. et KAWASE Y. ; *J Chem Technol Biotechnol*, **88**(1), pp 88-97 (2013).
- [5] BEAUDEUX J. L., PEYNET J., BONNEFONT R. D., THEROND P., DELATTRE J. et LEGRANDET A. ; *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **64**(6), pp 373-381 (2006).
- [6] BARTOSZ G.; *Comments on Toxicology*, **9**, pp 5-21(2003).
- [7] CHAUDIERE J. et TAPPEL A. L.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **226**(2), pp 448-457 (1983).
- [8] HALLIWELL B. et GUTTERIDGE J. M. C.; Packer L & Glazer AN (Editors), *Methods in Enzymology*, **186**, Academic Press, San Diego pp1-85(1990).
- [9] BARRY H. et JOHN G.; *Free. Radic. Biol. Med.*, Oxford University Press, USA, (1999).
- [10] BRIGELIUS F. R.; *Free Radical Biology & Medicine*, **27**(9), pp 951-965(1999).
- [11] HALLIWELL B.; *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, pp 670-677(1995).
- [12] BURTON G. W., JOYCE A. et INGOLD K. U.; *Lancet.*, **320**, pp 327(1982).
- [13] VERTUANI S., ANGUSTI A. et MANFREDINI S., *Curr. Pharm. Des.*, **10**, pp 1677-1694 (2004).
- [14] KALIORA A. C., DEDOUSSIS G. V. Z. et SCHMIDT H.; *Atherosclerosis*, **187**, pp 1-17 (2006).
- [15] MOMPON B., LEMAIRE B., MENGAL P. et SURBLED M.; *In Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle*, Polyphenols, université de Bordeaux (1996).
- [16] SAIDMAN E., YURQUINA A., RUDYK R., MOLINA M. A. A. et FERRETTI F. H.; *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **585**(1-3), pp1-13 (2002).
- [17] ABOU EI HASSAN M. A. I., TOUW D. J., WIHELM A. J., BAST A. et VAN DER VIJGH W. J. F.; *International Journal of Pharmaceutics*, **211**(2), pp 51-56 (2000).
- [18] CALIAS P., GALANOPOULOS T., MAXWELL M., KHAYAT A., GRAVES D., ANTONIADES H. et d'ALARCAO M.; *Carbohydrate Research*, **292**, pp 83-90 (1996).
- [19] BENAVENTE G. O., CASTILLO J., DEL BAÑO M. J. et LORENTE J.; *J. Agric. Food Chem.*, **49**(1), pp 189 – 191(2001).
- [20] WALLE T.; *Free Radical Biology and Medicine*, **36**(7), pp 829-837 (2004).
- [21] LEE S. J., KIM J. C., KIM M. J., KITAOKA M., PARK C. S., LEE S. Y., RA M. J., MOON T. W., ROBYT J. F. et PARK K. H.; *J. Agric. Food Chem.*, **47**(9), pp 3669-3674 (1999).
- [22] TOMMASINI S., RANERI D., FICARRA R., CALABRÒ M. L., STANCANELLI R. et FICARRA P.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**(2), pp 379-387 (2004).
- [23] SAIJA A., TOMAINO A., TROMBETTA D., LUISA PELLEGRINO M., TITA B., MESSINA C., BONINA F. P., ROCCO C., NICOLOSI G. et CASTELLI F.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **56**(2), pp 167-174 (2003).

- [24] PERRIER E., MARIOTTE A. M., BOUMENDJEL A. et BRESSON R. D.; Nouveaux esters de flavonoïdes, leur utilisation en cosmétique, dermatopharmacie, en pharmacie et en agroalimentaire. FR 2778663-A1 (1998).
- [25] SAKAI M., SUZUKI M., NANJO F. et HARA Y., 3-O-acylated catechins and methods of producing same. EP 0618203 (1994).
- [26] KURISAWA M., CHUNG J. E., UYAMA H. et KOBAYASHI S.; *Biomacromolecules*, **4(5)**, pp 1394-1399 (2003).
- [27] FRIEDMAN M. et JURGENS H.S.; *J. Agric. Food Chem.*, **48(6)**, pp 2101-2110 (2000).
- [28] SMITH G. J., THOMSEN S. J., MARKHAM K., ANDARY C. et CARDON D.; *Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry*, **136**, pp 87-91(2000).
- [29] MAKRES D. P. et ROSSITER J. T.; *Food Chemistry*, **77(2)**, pp 177-185(2002).
- [30] UNGAR Y., OSUNDAHUNSI O. F. et SHIMONI E.; *J. Agric. Food Chem.*, **51(15)**, pp 4394-4399 (2003).
- [31] GÜLÇİN I., *Toxicology*, **217**, pp 213-220 (2006).
- [32] GOETZ G., FKYERAT A., MÉTAIS N., KUNZ M., TABACCHI R., PEZET R. et PONT V.; *Phytochemistry*, **52**, pp 759-767 (1999).
- [33] SEFKOW M.; *Eur. J. Org. Chem.*, **6**, pp 1137-1141(2001).
- [34] FRANKEL E. N., WATERHOUSE A. L. et KINSELLA J. E.; *The Lancet.*, **341**, pp 1103-1104 (1993).
- [35] TOOHEY J. I. et COOPER A. J. L.; *Molecules*, **19**, pp12796 (2014).
- [36] O'DWYER P. J., SZARKA C., BRENNAN J. M., LAUB P. B. et GALLO J. M.; *Clinical Cancer Research*, **6**, pp 4692-4696 (2000).
- [37] ZHANG Y. et MUNDAY R.; *Mol Cancer Ther*, **7(11)**, pp 3470-3479 (2008).
- [38] LAM S., MAC A. C., LE RICHE J. C., DYACHKOVA Y., COLDMAN A., GUILLAUD M., HAWK E., CHRISTEN M. O. et GAZDAR A. F.; *J. Natl. Cancer Institute*, **94(13)**, pp 1001-1009 (2002).
- [39] TRAN Q. T., XUL L., PHAN V., GOODWIN S. B., RAHMAN M., VICTOR JIN X., SUTTER C. H., ROEBUCK B. D., KENSLER T. W., GEORGE E. O. et SUTTER T. R.; *Carcinogenesis*, **30(3)**, pp 480-486 (2009).
- [40] BOTREL A., ILLIEN B., RAJCZY P., LEDOUX I. et ZYSS J.; *Theor Chim Acta*, **87**, pp 175-194 (1993).
- [41] PROCHASKA H. J., YEH Y., BARON P. et POLSKY B.; *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, pp 3953-3957 (1993).
- [42] BONA M.; Détermination du  $\log P$  eau/n-octanol de 1,2-dithiole-3-thiones et de 1,2-dithiole-3-ones règles de calcul, thèse de Doctorat, université de Rennes 1(1995).
- [43] FIELDS E.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, p 4255 (1955).
- [44] MOLLIER Y. et LOZAC'H N.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, p 614 (1961).
- [45] DUGUAY G. et QUINIOU H.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, p 637 (1972).
- [46] CHEN H. Y. et YEN G. C.; *Food Chemistry* **101** pp 686-694 (2007).
- [47] ÇELİK S. E., ÖZYÜREK M., GÜÇLÜ K. et APAK R.; *Reactive & Functional Polymers*, **67**, pp 1548-1560(2007).
- [48] RAYMUNDO DOS SANTOS M., PAULA MARQUES DA SILVA, FRANCO C. et FETT R.; *LWT Food Science and Technology*, **40(7)**, pp 1133-1139 (2007).
- [49] SIMIĆ A., MANOJLOVIĆ D., ŠEGAN D. et TODOROVIĆ M.; *Molecules*, **12**, pp 2327-2340 (2007).
- [50] PERRON N. R., HODGES J. N., JENKINS M. et BRUMAGHIM J. L.; *Inorg. Chem.*, **47(14)**, pp 6153-6161(2008).

- [51] TROUILLAS P., MARSAL P., SIRI D., LAZZARONI R. et DUROUX J. L.; *Food Chemistry*, **97(4)**, pp 679 (2006).
- [52] HADDOU M.; Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse, thèse de doctorat, université de Toulouse III-Paul Sabatier (2010).
- [53] PUNTEL R. L., NOGUEIRA C. W. et ROCHA J. B. T.; *Neurochemical research*, **30(2)**, pp 225-235(2005).
- [54] BROWN J. E., KHODR H., HIDER R. C. et RICE-EVANS C. A.; *The Biochemical journal*, **330**, p.1173-1178 (1998).
- [55] CHAN E. W. C., LIM Y. Y. et MOHAMMED O.; *Food Chemistry*, **104**, pp 1586-1593 (2007).
- [56] VAN ACKER S. A. B. E., VAN DEN VIJGH W. J. F. et BAST F.; *Free radical biology & medicine*, **20(3)** pp 331-342 (1996).
- [57] KEBIECHE M.; Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine, thèse de doctorat, université de Mentouri Constantine (2009).
- [58] SURESH KUMAR K., GANESAN K. et SUBBA RAO P. V.; *Food Chemistry*, **107**, pp 289-295(2008).
- [59] MANSOURI A., EMBAREK G., KOKKALOU E. et KEFALAS P.; *Food Chemistry*, **89(3)**, pp 411-420 (2005).
- [60] FOURNET A. et MUÑOZ A. V.; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2(11)**, pp 1213-1235(2002).
- [61] QU X., YIN H., SUN Y. et ZHANG S.; *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **30(2)**, pp 192-194 (2002).
- [62] WANSUNDARA P. K. J. P. D. et SHAHIDI F.; Antioxidants: Science, Technology, and Applications, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Sixth Edition, Six Volume Set, pp 441-442 (2005).
- [63] HADJADJ M., MEDDOURA N., DAKMOUCHE M. et SAÏDI M.; *Annales des Sciences et Technologie*, **3(1)**, pp 62-69 (2011).
- [64] SÀNCHEZ-MORENO C.; *Journal of Food Science and Technology International*, **8(3)**, pp 121-137 (2002).
- [65] TOMASSOLI I.; Synthèse et évaluation de nouveaux dérivés quinoléiques impliqués dans les maladies neurodégénératives, thèse de doctorat, université de Franche - Comté (2010).
- [66] FOTI M. C.; *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **59(12)**, pp 1673-1685(2007).
- [67] LU Z., NIE G., BELTON P. S., TANG H. et ZHAO B.; *J. Neurochemistry International*, **48(4)**, pp 263-274(2006).
- [68] DANGLES O.; Propriétés chimiques des polyphénols. In *Polyphénols en agroalimentaire*. Ed Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp 29-54 (2006).
- [69] WANG Y. N., LAU K. C., LAM W. W. Y., MAN W. L., LEUNG C. F. et LAU T. C.; *Inorganic Chemistry*, **48(1)**, pp 400-406 (2009).
- [70] LEOPOLDINI M., RUSSO N. et TOSCANO M.; *Food Chemistry*, **125(2)**, pp 288-306 (2011).
- [71] HARRIS C. S., MO F., MIGAHED L., CHEPELEV L., HADDAD P. S., WRIGHT J. S., WILLMORE W. G., ARNASON J. T. et BENNETT S. A. L.; *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **85**, pp 1126 (2007).

- [72] CELESTINO M. T., MAGALHÃES U. O., FRAGA A. G. M., CARMO F. A., LIONE V., CASTRO H. C., SOUSA V. P., RODRIGUES C. R. et CABRAL L. M.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **48(3)**, pp 405-415 (2012).
- [73] VILLAÑO D., FERNÁNDEZ-PACHÓN M. S., MOYÁ M. L., TRONCOSO A. M. et GARCÍA-PARRILLA M. C.; *Talanta*, **71**, pp 230-235 (2007).
- [74] SIDDHURAJU P. et BECKER K.; *Food Chem.*, **101(1)**, pp 10-19(2007).
- [75] JIN M, CAI Y. X., LI J. R. et ZHAO H.; *Prog Biochem. Biophys.*, **23**, pp 553-555(1996).
- [76] ZAVISKA F., DROGUI P., MERCIER G. et BLAIS J. F.; *Revue des Sciences de l'Eau*, **22(4)**, pp 535-564 (2009).
- [77] VOISIN-CHIRET A. S., BAZIN M. A., LANCELOT J. C. et RAULT S.; *Molecules*, **12**, p 2536 (2007).
- [78] URBANIAK A., MOLSKI M. et SZELAG M.; *Computational methods in science and technology*, **18(2)**, p 5 (2012).
- [79] SAIJA A., TOMAINO A., TROMBETTA D., PELLEGRINO M. L., TITA B., MESSINA C., BONINA F. P., ROCCO C., NICOLOSI G. et CASTELLI F.; *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **56**, pp 167-174 (2003).
- [80] TAHERPOUR A. A. et TAHERPOUR A.; Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection ISBN 978-953-307-393-4 (2011).
- [81] YEHYE W. A., ABDUL RAHMAN N., A. ALHADI A., KHALEDI H., WENG S. et ARIFFIN A.; *Molecules*, **17**, p 7653(2012).
- [82] NOUBIGH A., ABDERRABBA M. et PROVOST E. ; *J. Iran. Chem. Soc.*, **6(1)**, pp 168-176 (2009).
- [83] EASTWOOD M. A.; *Q. J. Med.*, **92**, pp 527-530 (1999).
- [84] KOZUMBO Walter J., SEED J. L. et KENSLER T. W.; *CANCER RESEARCH*, **43**, p 2557 (1983).
- [85] LE BOURVELLEC C., HAUCHARD D., DARCHEN A., BURGOT J. L. et ABASQ M. L.; *Talanta*, **75**, pp 1098-1103 (2008).
- [86] BOUGURNE B.; Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaire (athérosclérose), thèse de doctorat, université de Toulouse III -Paul Sabatier (2012).
- [87] DAPREMONT-AVIGNON C., CALAS P., AMATORE C. et COMMEYRAS A.; *J. Fluorine Chem.*, **54(1-3)**, p 218 (1991).
- [88] RAMASARMA T. et RAO A. V. S.; *Current Science* **92(11)** pp 1481-1482 (2007).
- [89] LI H. M., GUO P., HU X., XU L. et ZHANG X. Z.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **47**, pp 169-174 (2007).
- [90] JOVANOVIĆ V., STEENKEN S., TOSIC M., MARJANOVIĆ B. et SIMIĆ M. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, pp 4846-4851(1994).
- [91] ARAKI T. et KITAOKA H.; *Chem. Pharm. Bull.*, **49(5)**, pp 541-545 (2001).
- [92] PULIDO R.; BRAVO L. et SAURA-CALIXTO F.; *J. Agric. Food Chem.*, **48(8)**, pp 3396-3402(2000).
- [93] BANNISTER J. V., BANNISTER W. H. et ROTILIO G.; *Crit. Rev. Biochem.*, **22**, pp 111-180 (1987).
- [94] TROUILLAS P., FAGNERE C., LAZZARONI R., CALLISTE C., MARFAK A. et DUROUX J. L.; *Food Chemistry*, **88(4)**, pp 571-582(2004).
- [95] XUE Y., ZHENG Y., ZHANG L., WU W., YU D. et LIU Y.; *J Mol Model*, **19(9)**, pp 3851-3862 (2013).

- [96] EBRAHIMZADEH M., NABAVI S. M., NABAVI S. F., BAHRAMIAN F. et BEKHRADNIA A. R.; *J. Pharm. Sci.*, **23(1)**, pp 29-34 (2010).
- [97] GÜLÇİN İ., HUYUT Z., ELMASTAŞ M. et ABOUL-ENEIN H. Y.; *Arabian Journal of Chemistry*, **3**, pp 43–53 (2010).
- [98] HADJADJ M.; Etude électrochimique de la réactivité de quelques composés 1,2-dithioliques : co-polymérisation avec aniline et interaction avec les métaux, thèse de doctorat, université de Kasdi Merbah Ouargla (2010).
- [99] MENDHAM J., DENNEYC., BARNES J. D. et THOMAS M. J. K.; Analyse chimique quantitative de Vogel, de boeck 6 édition, p 558 (2006).
- [100] HUSSEIN M. A. et OTHMAN S. M.; *IJPI's Journal of Medicinal Chemistry*, **1**, pp 7-20 (2010).
- [101] ABASQ M.-L., BURGOT J.-L., DARCHEN A. et SAÏDI M.; *Electrochimica Acta*, **50**, pp 2219–2225 (2005).
- [102] ABOUL-ENEIN M. A., EL-WASSEEF D. R., EL-SHERBINY D. T. et EL-ASHRY S. M.; *Int J Biomed Sci*, **5(3)**, pp 261-266 (2009).
- [103] BARUS C., Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques, thèse de doctorat, université de Toulouse III - Paul Sabatier (2008).
- [104] FAYETTE J. et KIAKOUAMA L.; *Bull Cancer*, **96**, pp 25-34 (2009).
- [105] BELKHEIRI N., Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes, thèse de doctorat, université de Toulouse III - Paul Sabatier (2012).
- [106] PINCEMAIL J., BONJEAN K., CAYEUX K. et DEFRAIGNE J. O.; *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**, pp 233-239 (2002).
- [107] MUNDAY R., ZHANG Y., PAONESSA J., MUNDAY C., WILKINS A. L. et BABU J.; *J Med Chem.*, **53(12)**, pp 4761–4767(2010).
- [108] PRIOR R. L., WU X. et SCHAICH K.; *J. Agric. Food Chem.*, **53**, p 4291 (2005).
- [109] NKHILI E., Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant, thèse de doctorat, université de CADI AYYAD MARRAKECH et université D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE MONTPELLIER (2009).
- [110] FATIBELLO-FILHO O. et VIEIRA I.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **11(4)**, pp 412 – 418 (2000).
- [111] Safety data sheet according to Regulation (EC) No. 1907/2006 Version number 1, p 5 (2012).
- [112] SEKLI-BELAIDI F., Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin, thèse de doctorat, université Toulouse III - Paul Sabatier (2011).
- [113] AMES B. N., CATHCART R., SCHWIERS E. et HOCHSTEIN P.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 6858-6862(1981).
- [114] SCHWEIGER N., ZEHNDER Alexander J. B. et EGGEN Rik I. L.; *Environmental Microbiology*, **3(2)**, 81-91(2001).
- [115] Latifa CHEBIL, Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida Antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle, thèse de doctorat, L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, 2006.

# **Chapitre II :**

**Évaluation de l'activité anti-hémolyse des dithiolethiones**

## **II.1. DONNÉES PUBLIOGRAPHIQUES**

Dans le but de relier l'activité biologique mise en évidence par les tests antioxydants décrits précédemment, et la structure chimique des composés considérés, nous avons choisi d'étudier l'activité anti hémolyse des dérivés de dithiolethiones.

Selon nos connaissances, aucun résultat de l'activité anti-hémolyse de dithiolethiones n'est donné dans la littérature. Pour la détermination de l'activité anti-hémolyse, nous avons choisi d'étudier les propriétés et les constituants de sang humain, et plus particulièrement les globules rouges qui sont impliqués dans les processus hémolyse en biologie.

Les éléments figurés sanguins sont répartis en cellules de la lignée rouge (hématies, réticulocytes), de la lignée blanche (lymphocytes, granulocytes, monocytes) et plaquettes.

Dans les conditions physiologiques, la proportion de chaque type cellulaire est comprise dans un intervalle déterminé pour chaque espèce. La quantité absolue ou relative des différents types cellulaires peut varier suite à l'exposition à un milieu toxique ou dans les conditions pathologiques.

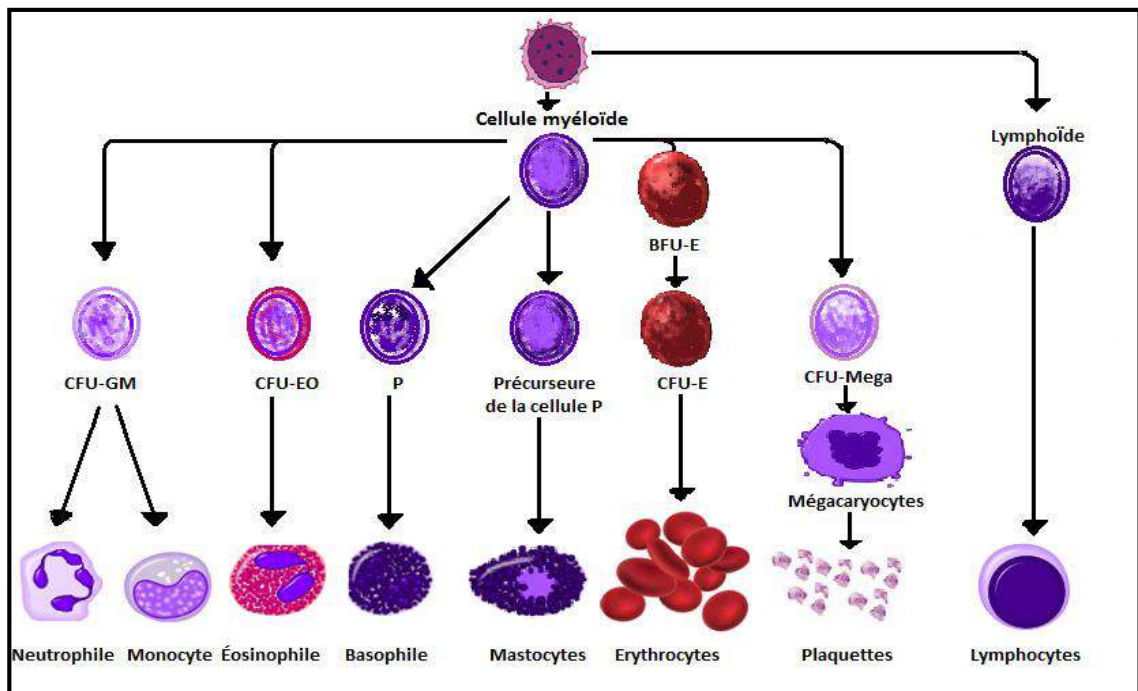
### **II.1. Erythropoïèse et durée de vie des hématies dans les conditions physiologiques**

L'hématopoïèse est physiologiquement limitée à l'âge adulte à la cavité médullaire des os du squelette axial et de l'épiphyse des os longs, mais en cas d'augmentation de la demande en cellules, une hématopoïèse qualifiée d'extra- médullaire peut s'étendre au foie, à la rate et aux nœuds lymphatiques.

Une population de cellules souches multipotentes non déterminées, les Colony Forming Unit spleen (CFU-s), est à l'origine de la production des érythrocytes, mais aussi des mégacaryocytes, granulocytes et monocytes.

Ces cellules ont des capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation et sont à l'origine des différents types cellulaires sous l'influence du microenvironnement et des facteurs de croissance. Excepté les lymphocytes, les cellules

sanguines ont une durée de vie limitée et sont incapables de se régénérer. La présence de précurseurs viables est une condition nécessaire au remplacement des cellules consommées ou lésées [1].



**Figure II.1** : Diagramme de la différenciation des cellules sanguines [2]

**Légende:**

**CFU-GM**=Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage

**CFU-EO**=Colony Forming Unit Eosinophile

**BFU-E**=Burst Forming Unit Erythrocyte

**CFU-Mega**=Colony Forming Unit Mégacaryocyte

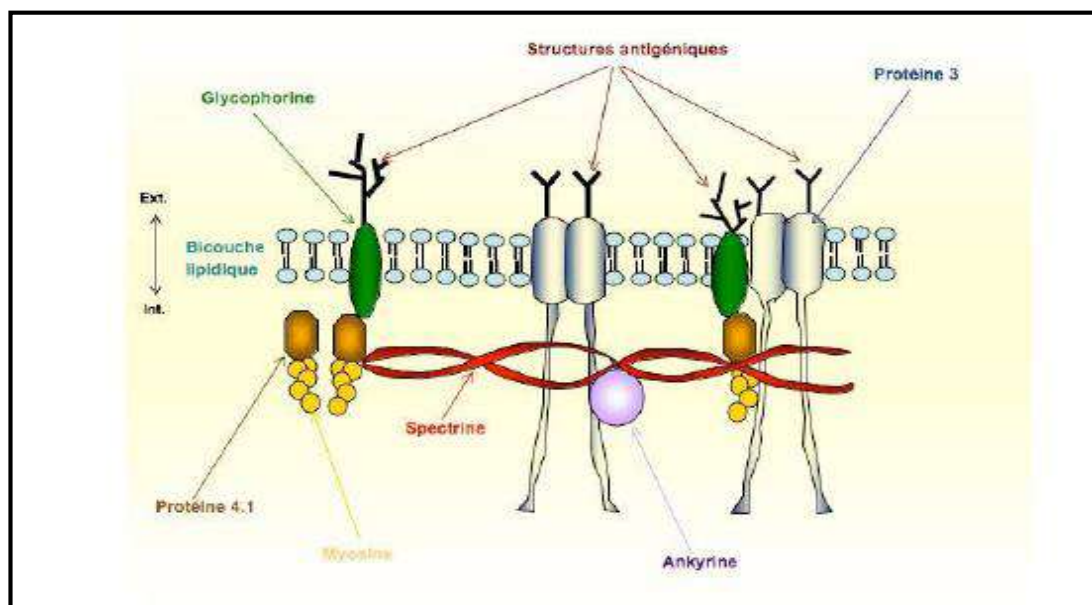
### **II.1.1 Les globules rouges**

Les globules rouges, aussi appelé hématies ou érythrocytes sont des cellules sanguine responsable du transport des gaz du sang ( $O_2$ ,  $CO_2$ ). C'est une cellule très simplifiée incapable d'effectuer toute synthèse protéique de par l'absence de noyau et d'organites cytoplasmiques. Sa forme de disque biconcave lui permet d'offrir une surface d'échange maximale, et sa déformabilité lui permet de franchir des capillaires dont le diamètre ( $3\mu m$ ) est bien inférieur au sien ( $7\mu m$ )[3].



- Le contenu de l'érythrocyte est caractérisé par :
  - une faible teneur en H<sub>2</sub>O (60% environ) par rapport aux autres cellules.
  - une forte teneur en hémoglobine (Hb) est en quasi-saturation ; sa concentration corpusculaire moyenne en Hb est de 35%.
  - une forte pression osmotique colloïdale (ou pression oncotique) due à sa forte teneur en hémoglobine.
  - un équilibre entre les ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> régulant la déformabilité cellulaire.
- Sa membrane est constituée de :
  - 44% de lipides dont 65 à 70% de phospholipides, 25% de cholestérol essentiellement sous forme libre, d'acides gras et de glycolipides.
  - 49% de protéines.
  - des glucides membranaires pour la plupart liés aux protéines (93%) et aux lipides.

Le modèle structural membranaires proposé est celui de la mosaïque fluide de SINGER et NICHOLSON (analogue à celui de la majorité des cellules) [4]. La membrane est formée d'une double couche de phospholipides à choline séparé par un espace virtuel du feuillet interne (phospholipides à sérine et éthanolamine). Les protéines membranaires sont soit intrinsèques transmembranaires dont les protéines 3 est la principale, soit extrinsèques (spectrine, actine, protéine). Ces dernières constituent le squelette membranaire (Fig. II.2).



**Figure II.2 :** Schéma de la membrane érythrocytaire

La durée de vie des globules rouges en circulation, qui est normalement de 120 jours, est nettement diminuée. La destruction accélérée des globules rouges (hémolyse) est due à la présence anormale dans le sang du malade de certains anticorps (substances fabriquées par le système immunitaire de défense de l'organisme). Ces anticorps sont des « auto-anticorps » car ils sont dirigés contre les propres globules rouges du malade. Du fait du rôle majeur de ces « auto-anticorps », on parle d'anémie hémolytique «auto-immune » [5].

### **II.1.2. Les hématies face à l'oxydation et l'hémolyse**

La toxicité hématologique d'origine oxydative sur les globules rouges survient plus fréquemment que les dommages oxydatifs dans d'autres tissus. En effet, par leur rôle de transporteur d'oxygène, les hématies sont continuellement exposées à des radicaux libres oxygénés. Le sang étant le vecteur des xénobiotiques oxydants après leur absorption, les hématies sont également soumises à un stress oxydatif. L'oxydation qui en résulte peut concerner l'hémoglobine ou la membrane érythrocytaire [1].

L'hémolyse est la lyse (destruction) des globules rouges. Il s'agit de soumettre un échantillon de sang ou une suspension d'hématies à une agression radicalaire linéaire et progressive dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des cellules jusqu'à leur lyse. Pendant phénomène, l'érythrocyte ce passe de sa forme de disque biconcave à une forme de sphère [2].

## II.2. TRAVAUX EXPERIMENTALS

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-hémolyse des dithiolethiones. Pour cela, nous avons maintenu en incubation dans un premier temps les cellules érythrocytes avec les dithiolethiones en présence d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et dans un deuxième temps en évaluer la libération d'hémoglobine en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm.

**Tableau II.1** : Réactifs et matériels nécessaire dans le chapitre II

Réactifs	Matériels
Ethanol (BIOCHEM Chemopharma)	Spectromètre UV Spectro Scan 80DV
Eau oxygénée H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (BIOCHEM Chemopharma)	Centrifugeuse (SLW Centrifuge Ultra 8-Place)
Hydroxyde de sodium (BIOCHEM Chemopharma)	Agitateur magnétique (TMA)
Acide chlorhydrique (BIOCHEM Chemopharma)	
Chlorure de sodium (Fluka)	
Sodium-dihydrogénophosphate (BIOCHEM Chemopharma)	
Di-sodium-hydrogénophosphate (BIOCHEM Chemopharma)	
Chlorure de potassium (Fluka)	

### II.2.1. Test *in vitro* de la résistance des globules rouges humains prétraités par les dithiolethiones à l'attaque radicalaire

Les tests d'activités anti-hémolyse des dithiolethiones synthétisés ont été effectués sur une suspension à 4% d'érythrocytes d'homme dans du PBS.

La résistance des érythrocytes prétraités par les dithiolethiones à l'attaque radicalaire est évaluée selon le protocole décrit par MANNA et *Coll.* [7] avec quelques modifications. Le sang humain utilisé dans ce test est obtenu par prélèvement veineux d'un volontaire non fumeur. Le sang collecté dans un tube hépariné est centrifugé à 1500g/5min, après élimination du plasma, le culot est lavé trois fois par 5 volumes de tampon phosphate (PBS sans potassium, pH 7,4 et 0,1 M).

Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement du tube, le surnageant et la couche d'interface est éliminée juste après la centrifugation. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire obtenu est dilué avec le même tampon

phosphate pour obtenir un hématicrite de 4%. Deux millilitres de la suspension d'érythrocytes sont mélangés avec 5 mL de solution de PBS.

L'attaque radicalaire est induite par l'addition de 0,5 mL du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (15 min) avec 1 mL des dithiolethiones à une concentration de 4,85x10<sup>-4</sup> M. Après deux heures d'incubation avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 37C°, le mélange réactionnel est centrifugé à 1500g/10min et l'hémolyse (libération d'hémoglobine) est évaluée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm.

La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le mélange réactionnel a été ajustée pour provoquer 90% d'hémolyse des globules rouges après 2 h d'incubation.

La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le pourcentage d'inhibition :

$$\%inhibition\ d'hémolyse = \frac{Abs\ 540_{contrôle} - Abs\ 540_{échantillon}}{Abs\ 540_{contrôle}} \times 100$$

### **Résultats et discussion**

Dans le but d'évaluer les propriétés antioxydantes des dithiolethiones, nous avons évalué leur activité anti-hémolytique vis-à-vis des globules rouges.

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en l'hémoglobine, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs [8]. L'exposition des érythrocytes à une attaque radicalaire conduit donc à la rupture de leurs membranes plasmiques avec libération du contenu cellulaire mesurable à 540 nm.

Il a été démontré que l'interaction de l'hémoglobine avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit des espèces réactives de l'oxygène et induit la peroxydation lipidique [9].

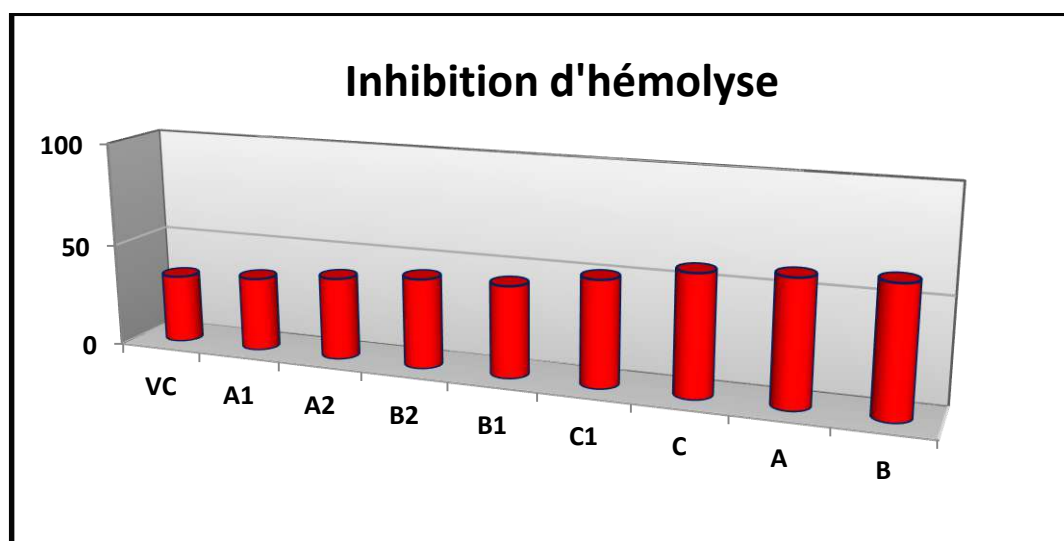
Pour ce faire, nous avons examiné l'oxydation de l'hémoglobine, à l'intérieur de l'érythrocyte, induite par des molécules en absence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et ce après 2 heures à concentration de 4,85.10<sup>-4</sup> M.

Les résultats obtenus à partir de ce test sont regroupés dans le tableau II.2.

**Tableau II.2 :** Les pourcentages d'inhibition d'hémolyse

Composés étudiés	pourcentage d'anti-hémolyse %
A	59,73
B	61,29
C	57,86
A1	35,71
A2	39,66
B1	44,04
B2	43,33
C1	50,95
V.C.	33,00

De ce tableau nous avons tracé l'histogramme suivant qui montre bien l'ordre décroissant de la capacité anti-hémolyse des dithiolethiones :

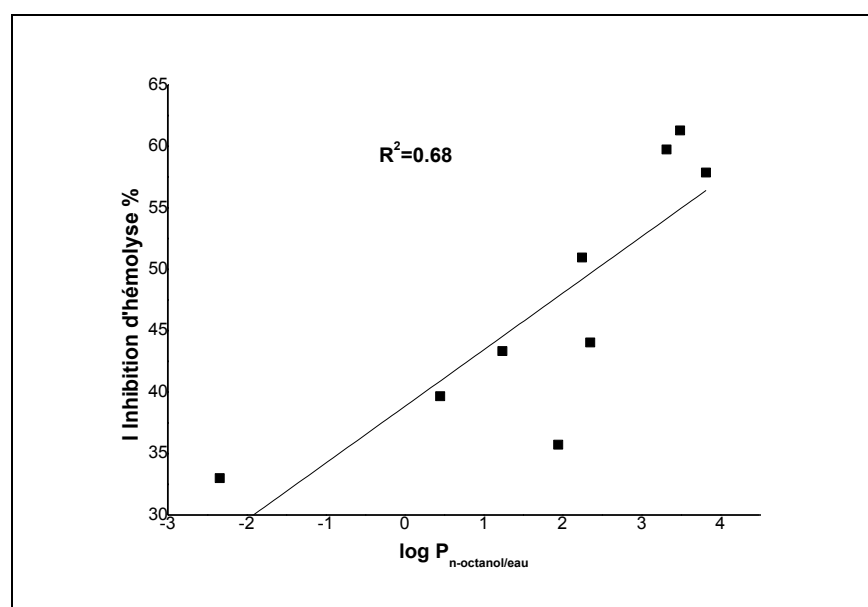


**Figure II.3 :** Classification de dithiolethiones selon le pourcentage d'inhibition d'hémolyse

Les dithiolethiones étudiés présentent des capacités inhibitrices importantes que le standard vitamine C. Nous observons que la 4-tolyl-1,2-dithiole-3-thione **B** présente un fort pourcentage d'inhibition d'hémolyse (plus de 1,85 fois de V.C), par contre le faible inhibiteur est la vitamine C. Cette remarque s'explique par l'influence du facteur de lipophilie. L'activité antioxydante semble être liée à plusieurs paramètres physico-chimiques.

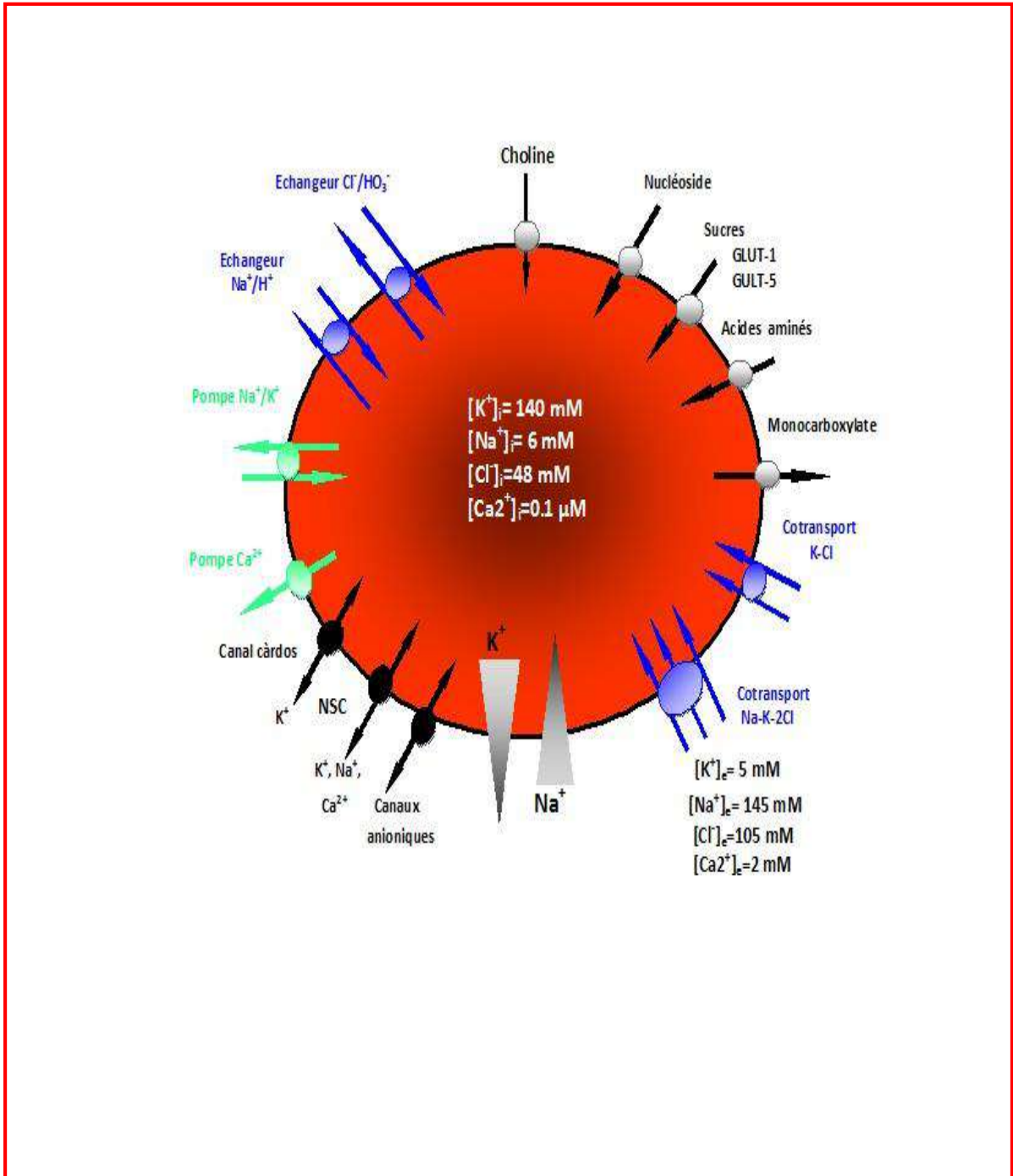
Elle est dépendante de la structure moléculaire, en particulier la lipophilie des molécules. La lipophilie corrélée au nombre d'atomes polarisés (OH et NH<sub>2</sub>), capable de former des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau ; augmenté leur solubilité dans les solvants polaires (l'eau dans notre cas). Les études précédentes de la partition de molécules relativement petites dans les globules rouges en particulier les molécules organiques cationiques, anioniques et non-électrolytiques ont montré que la lipophilie, la taille moléculaire et les caractéristiques chirales de molécules influencent leur pénétration dans les globules rouges [10].

Donc, nous devons établir une relation entre le pourcentage d'inhibition et le coefficient de partage  $\log P$  (Fig. II.4).



**Figure II.4** : La relation de pourcentage anti-hémolyse et  $\log P$

La plupart des composés actifs ont une lipophilie dans l'intervalle de 2,3 à 4. Des études précédentes ont généralement mis l'accent sur l'importance de la lipophilie pour une bonne capacité inhibitrice [11].



**Figure II. 5 :** Représentation schématisée des principales voies de transport à travers la membrane des érythrocytes

A cause de la nature de la membrane des érythrocytes, l'effet de la lipophilie est très important permettre de diffuser les inhibiteurs d'hémolyse à travers de celle ci.

Ainsi, les composés lipophiles pénètrent dans les globules rouges en se dissolvant dans les bicouches lipidiques membranaires tandis que les composés de petite taille hydrophiles entrent dans les globules rouges par des canaux aqueux. Cela laisse suggérer que, les composés **A**, **B** et **C**, qui sont lipophiles, pourraient pénétrer dans la membrane des globules rouges, expliquant ainsi leur importante propriété anti-hémolyse.

L'anéthol dithiolethione (Sulfarlem<sup>®</sup>) 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.

Le coefficient de partage  $\log P_{\text{eau-n-octanol}}$  de **A** est inférieur à celui de **B** (3,23 contre 3,49 (voir le chapitre III)), ce qui indique que **B** peut avoir une affinité plus grande pour des lipides des globules rouges comparée à **A**. Nous avons observé que **A**, dont le  $\log P$  est plus grand que 1, réduit significativement l'hémolyse des globules rouges induite par  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Seules les molécules avec  $\log P$  relativement élevée peuvent prévenir l'hémolyse des globules rouges. Mais les molécules avec des valeurs de  $\log P$  relativement faible (**A1** ; 0,45, acide ascorbique -2,34) sont inefficaces pour protéger le globule rouge de l'hémolyse, ou faciliter les radicaux à induire des dommages plus importants

Dans les conditions de ce test, les radicaux libres sont générés dans le milieu aqueux et réagissent avec les lipides membranaires des érythrocytes durant l'hémolyse. Néanmoins, les antioxydants lipophiles sont les plus efficaces, en effet les antioxydants hydrophiles agissent de façon significative mais ils ne peuvent pas protéger directement la membrane des hématies. En outre, les composés hydrophobes qui s'insèrent dans la double couche lipidique où indirectement régénèrent d'autres antioxydants et/ou entrent dans divers processus enzymatiques [12].

L'acide ascorbique s'est avéré l'antioxydant primaire dans le plasma [13] il est classé parmi les antioxydants les plus puissants connus, or si l'on se base sur la concentration utilisée ( $4,85 \cdot 10^{-4}$  M), on constate que tous les dithiolethiones sont plus efficace contre l'oxydation des lipides dans la membrane d'érythrocyte que l'acide ascorbique. Cette différence d'activité pourrait être due à l'effet de la solubilité des composés dans le milieu réactionnel.



Puisque l'acide ascorbique (vitamine C) est classé comme un composé hydrosoluble, il peut agir alors contre la propagation radicalaire dans la phase aqueuse. Or nos dithiolethiones montrent des activités à l'encontre des radicaux libres plus efficaces que celle observée pour l'acide ascorbique, ce qui nous amène à déduire que ces substances peuvent s'insérer dans la membrane érythrocytaire pour se défendre contre l'agression radicalaire.

Un déséquilibre dans le statut l'oxydant / antioxydant d'un globule rouge avec un excès de radicaux libres a conduit à la formation d'un stress oxydant, qui semblent causer plusieurs maladies [14].

Les radicaux libres peuvent modifier les propriétés chimiques et physiques des membranes cellulaires des érythrocytes en modifiant la composition, la protection et la distribution de leurs lipides. Ceci aboutit à une altération structurale de la membrane cellulaire ce qui se manifeste par une réduction de sa fluidité qui peut modifier l'activité des protéines membranaires [15].

Une certaine quantité de méthémoglobine se forme physiologiquement lors de l'autoxydation de l'hémoglobine mais les différents systèmes de réduction endogènes la maintiennent à l'état réduit de sorte qu'elle ne dépasse pas 1 à 3% chez les individus sains.

La méthémoglobine donne une coloration marron au sang qualifiée de brun- chocolat [16]. Elle est chargée positivement par rapport à l'hémoglobine comme elle a une affinité élevée pour les anions comme les cyanures, les fluorures ou les chlorures (CN<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>).

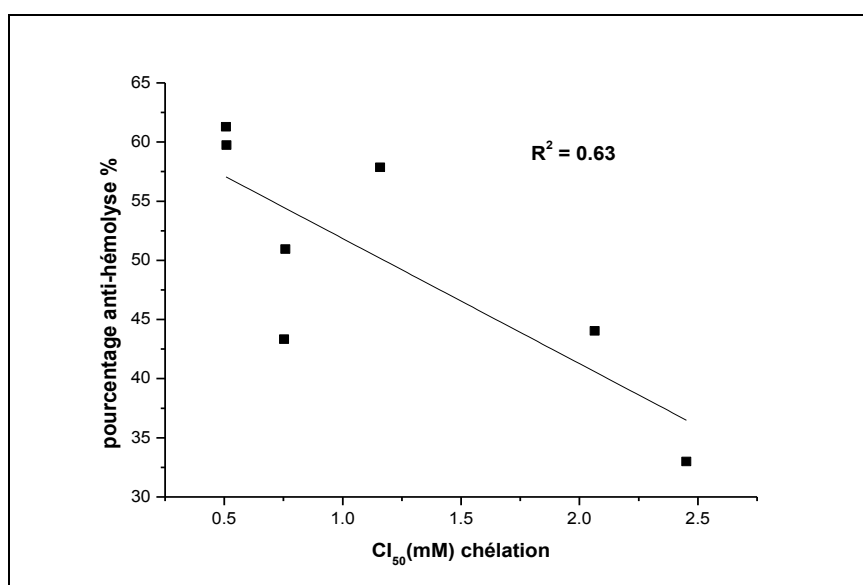
La réaction affecte également la capacité de l'hémoglobine à transporter l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>, conduisant à l'hypoxémie ; les symptômes peuvent varier de la tachypnée et l'acidose au coma ou à la mort.

Ce système cellulaire aurait pu être très utile pour l'étude de l'effet protecteur des dithiolethiones contre l'hémolyse oxydative induite par l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Enfin, les dithiolethiones trouvés pour inhiber efficacement l'hémolyse d'érythrocytes induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, révélant sa capacité à piéger la plupart des radicaux libres générés. Les dithiolethiones ont également montré leur potentiel à améliorer la résistance des globules rouges au stress oxydatif, *in vitro*.

Il est possible qu'un autre mécanisme de protection d'érythrocytes à hémolysé par les dithiolethiones. Ces derniers peuvent également chélater les ions de fer intra-érythrocyte qui sont libérés de l'hémoglobine sous des conditions d'oxydation.

FERRALI M. et *Coll.* ont constaté que l'effet inhibant de la peroxydation les lipides par la quercétine et le kaempferol est corrélé aussi bien à la capacité chélatrice de fer [17], donc nous avons fait une corrélation entre les valeurs de  $CI_{50}$  de la capacité chélatrice et les pourcentages d'anti-hémolyse pour toutes les dithiolethiones étudiées et la vitamine C.



**Figure II.6 :** La relation entre l'activité chélatrice et des pourcentages d'anti-hémolyse

Nous avons trouvé une moyenne corrélation entre l'activité chélatrice les pourcentages d'anti-hémolyse avec coefficient de détermination  $R^2 = 0,63$  (voir le figure II.6 ; nous rappelons que les composés entrés dans cette corrélation sont : le standard Vitamine C et les dithiolethiones sauf l'**A1** et l'**A2**).

## **Conclusion**

L'évaluation de l'activité anti-hémolyse en utilisant le test du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme test biologique, a révélé une réponse anti-hémolyse variable d'un échantillon à un autre et toutes les dithiolethiones possèdent une activité anti-hémolyse plus importante que la standard vitamine C.

Les résultats montrent que le classement des dithiolethiones en fonction de leur pouvoir anti-hémolyse dépend de la lipophilie et la capacité de dithiolethiones pour chélater les ions ferreux.

Nous avons trouvé une corrélation linéaire entre les valeurs de pourcentages anti-hémolyse et le coefficient de partage ( $R^2=0,68$ ).

**Références :**

- [1] GERAUD M. E. F., Les syndromes hématologiques d'origine toxique chez les carnivores domestiques : Etude clinique et synthèse bibliographique, thèse de doctorat, université de *Paul-Sabatier de Toulouse* (2007).
- [2] LESEVE J. F., HARISTOY X., FISHER B., GOUPIL J. J. et LECOMPTE T.; *Annales de Biologie Clinique*, **59(4)**, pp 497-501(2001).
- [3] CHWALEK M., Hémissynthèse de saponosides à hédéragénine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique, thèse de doctorat, université de Reims Champagne-Ardenne (2004).
- [4] SINGER S. J. et NICOLSON G. L.; *SCIENCE*, **175(4023)**, (1972).
- [5] LOUKILI N. H., NOEL E., BLAISON G., GOICHOT B., KALTENBACE G., RONDEAU M. et ANDRÈS E.; *La Revue de Médecine Interne*, **25(8)**, pp 556-561 (2004).
- [6] WRIGHT R. O., LEWANDER W. J. et WOOLF A. D.; *Ann Emerg Med*, **34(5)**, pp 646-656 (1999).
- [7] MANNA C., D'ANGELO S., MIGLIARDI V., LOFFREDI E., MAZZONI O., MORRICA P., GALLETTI P. et ZAPPIA V.; *Journal of agricultural and food chemistry*, **50**, pp 6521-6526 (2002).
- [8] ARBOS K. A., CLARO L. M., BORGES L., SANTOS C. A. M. et WEFFORT-SANTOS A. M.; *Nutrition Research*, **28(7)**, pp 457-463 (2008).
- [9] D'SOUZA H. P. et PRABHU R. H.; *Ind. J. Clin. Biochem.*, **29**, pp 305-312 (2006).
- [10] SHA'AFI R. I., GARY-BOBO C. M. et SOLOMON A. K.; *Journal of General Physiology*, **58**, pp 238-258 (1971).
- [11] KIRK K. et HORNER H. A.; *Biochem. J.*, **311**, pp 761-768 (1995).
- [12] STOCKER P., LESGARDS J. F., VIDAL N., CHALIER F. et PROST M.; *Biochim Biophys Acta.*, **1621(1)**, pp 1-8 (2003).
- [13] FREI B., ENGLAND L. et AMES B. N.; *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, **86(16)**, pp 6377-6381(1989).
- [14] KUMARAPPAN C. T., THILAGAM E. et MANDAL S. C.; *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19(3)**, p 354 (2012).
- [15] PORTIER K., KIRSCHVINK N., FELMAN N., COUDERT J. et LEKEUX P.; *Ann. Méd. Vét.*, **151**, p103 (2007).
- [16] MANALO M. O. U., QUINGKING C. G. G. et DIOQUINO C. P. C.; *ACTA MEDICA PHILIPPINA*, **47(3)**, p 81 (2013).
- [17] FERRALI M., SIGNORINI C., CACIOTTI B., SUGHERINI L., CICCOLI L., GIACHETTI D. et COMPORTI M.; *FEBS Letters*, **416**, pp123-129 (1997).

# **Partie 2 :**

**Détermination du coefficient de  
partage et étude de la relation  
structure - activité**

# **Chapitre III :**

**Détermination de coefficient de  
partage  $\log P$  n-octanol/eau de  
dithiolethiones**

## III.1. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

### III.1.1. Une brève vue d'ensemble historique de hydrophobicité

Avant le tournant du 20<sup>ème</sup> siècle, l'importance des interactions hydrophobes dans des phénomènes biologiques en particulier l'activité de drogue, a été identifiée par le travail de MEYER et d'OVERTON [1,2]. En 1937, BULTER a montré un rapport linéaire entre la chaleur d'hydratation et l'entropie de l'hydratation [3]. Il a estimé les énergies de l'interaction de différents groupes fonctionnels avec de l'eau comme il a prouvé que les chaleurs d'hydratation sont additives en nature.

Il a également expliqué que la chaleur d'hydratation ne détermine pas l'énergie libre des interactions, mais qu'il y a une proportionnalité directe entre elles. Les origines de ces phénomènes étaient peu claires à ce moment la, mais on l'a présumé que l'entropie pourrait dépendre de la taille de la "cavité" qui contient la molécule. L'importance de liaison hydrogène a été également brièvement discutée pendant que la formation de liaison hydrogène entre les parties polaires causent une augmentation de l'entropie, qui favorise la dissolution d'une molécule autrement non polaire.

FRANK et EVANS, au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, ont décrit la formation des "icebergs" de l'eau autour des parties non polaires de molécules [4]. Leurs résultats ont été basés sur la déviation de l'entropie de la vaporisation pour certaines substances une fois dissous dans les solutions aqueuses et non aqueuses. La structure des molécules d'eau entourant des parties non polaires a été expérimentalement validée avec la cristallographie [5].

KAUZMANN a inventé, pour la première fois, le terme de "la liaison hydrophobique" en 1959, qui a attrapé l'attention de beaucoup de scientifiques alors ; cette notion a été soutenue par un certain nombre d'investigations de recherches [6]. Le travail de NÉMETHY et *Coll.* a également soutenu l'utilisation de ce terme [7,8].

Cependant, la stabilité des protéines dépend non seulement de ces "liaisons hydrophobiques", mais également de liaisons hydrogènes. Ceux-ci ont un comportement inverse, d'une autre façon, ils deviennent plus faibles avec l'augmentation de la température.

Ainsi, à mesure que la température augmente, les interactions hydrophobes diminueraient dans la force et les liens d'hydrogène seraient prédominants en maintien de structure de protéine.

En 1970, HERMANN R. a publié une série de trois articles sur "*la théorie de liaison hydrophobe*" [9,10] où la grande entropie négative de diviser une molécule hydrophobique dans un solvant non polaire a été expliquée par la perte d'ordre en molécules d'eau en contact direct avec la surface hydrophobe. L'arrangement commandé des molécules d'eau sur la surface d'une molécule est dû aux interactions de dipôle - dipôle avec la prochaine couche immédiate des eaux. En effet, ce phénomène est surface-tension semblable où la première couche s'arrange afin de réduire le contact avec de l'air hydrophobe, alors que moins d'ordre existe dans la seconde et les couches qui se suivent.

Depuis les travaux de COLLANDER à la fin des années 1950 [11], puis ceux du groupe de HANSCH quelques années plus tard [12,13], le coefficient de partage  $\log P$  d'une molécule dans un système biphasique constitué de deux solvants non miscibles (le plus souvent le système octanol/eau), est reconnu pour sa faculté à mimer le passage de cette molécule à travers les membranes biologiques. Pour des solutions diluées, ce coefficient de partage octanol/eau est le rapport de la concentration d'une molécule de soluté dans l'octanol sur sa concentration dans l'eau lorsque le système biphasique est en équilibre :

$$\log P = \log \left( \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}} \right) \quad (\text{Eq. III. 1})$$

En fait, comme les valeurs de  $P$  mesurées s'étendent sur au moins douze unités de grandeur, on utilise de préférence les logarithmes décimaux

Pendant plusieurs années, le coefficient de partage d'une substance entre l'eau et l'octanol ( $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ ) a émergé comme informations extrêmement utiles en sciences pharmaceutiques et environnementales.  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ , s'est avéré un des paramètres principaux dans des études quantitatives de la relation de structure-activité/property (QSAR/QSPR) [14].

Puisque la plupart des drogues en partie ou en grande partie sont ionisées au pH physiologique, une compréhension de l'hydrophobie de leur forme neutre et ionique est importante [17].



Quand plus d'une espèce électrique est présente en solution, comme peut être le cas avec les composés ionisables, le rapport observé des concentrations est le coefficient de distribution (D), qui tient compte du lipophilie intrinsèque du présent électrique différent d'espèce et de leurs concentrations relatives. À un pH donné, la lipophilie d'un composé ionisable est ainsi décrit par Eq. III.2,

$$\log D^{pH} = \log [f_N P^N + \sum (f_I \cdot P^I)] \quad (Eq. III.2)$$

Où  $f_N$  et  $f_I$  sont les fractions molaires des formes neutres et ionisés.

Le  $P^N$  et les  $P^I$  sont les coefficients de partage des espèces neutres et ionisés, respectivement.

Après la définition de  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ , la question qui se pose est: quelles sont les méthodes qui permettent de déterminer le coefficient de partage ?

Pour répondre à cette question nous essayons de mentionner quelques méthodes que nous avons trouvé dans la littérature :

### **III.1.2. Les techniques expérimentales**

Beaucoup de méthodes expérimentales sont disponibles pour mesurer les coefficients de partage eau/n-octanol, chacune d'elle présentant des avantages et des inconvénients. Seulement quelques unes, principalement employées, seront présentées ici.

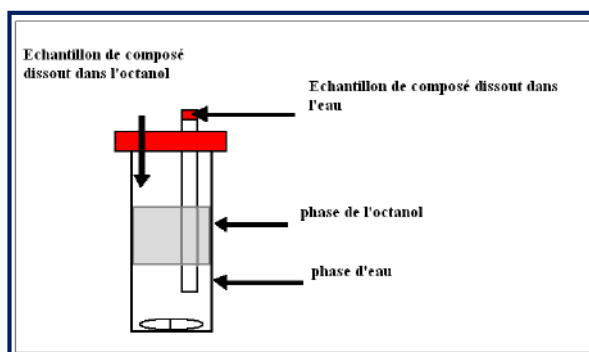
#### **III.1.2.1. La méthode par agitation en flacon "Shake-flask"**

La méthode par agitation en flacon est un procédé standard pour déterminer expérimentalement les valeurs de  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ . A raison que cette méthode n'exige aucuns matériaux standards pour le calibrage [19]. C'est une méthode classique pour mesurer le  $P_{n\text{-octanol/eau}}$  qui a été employé beaucoup dans les décennies passées [20]. Elle implique à dissoudre dans la phase octanolique une quantité exactement connue de soluté ; à mettre en contact cette phase avec la phase aqueuse et à réaliser l'équilibre de partage par agitation mécanique. Cette solution doit être conservée dans des conditions qui assurent sa stabilité. Cependant, plusieurs paramètres doivent être pris en considération pour que la mesure soit valide. La Pré-saturation des deux solvants est essentielle pour obtenir des nombres précis pour le volume de chaque phase. L'agitation peut être faite manuellement ou à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 minutes, approximativement.

Depuis la forme d'octanol et d'eau une émulsion, les deux phases doivent être séparées par centrifugation. De préférence, celle-ci est faite à la température de l'essai. Malheureusement, les micros gouttelettes pourraient encore être présentes dans chaque phase qui peut présenter une grande erreur dans les mesures finales particulièrement pour les composés hydrophobes. N'importe quel genre de technique peut être employé pour analyser les deux phases.

### III.1.2.2. La méthode du brassage lent

Cette technique a été développée en raison des erreurs présentées dans la mesure par l'émulsion se produisant entre l'octanol et l'eau particulièrement pour les composés hydrophobes [21].



**Figure III.1 :** L'appareil d'agitation du brassage lent pour la mesure de coefficients de partage n-octanol/eau

Comme représenté sur la figure III.1, l'appareil du brassage lent se compose d'une fiole en verre de 40 mL avec un barreau magnétique. 15 mL d'eau saturée avec l'octanol sont introduit. Puis, 15 mL d'octanol saturés avec de l'eau contenant également les échantillons qui sont soigneusement introduits sur la phase de l'eau, en évitant n'importe quelle création d'émulsion.

La fiole est scellée avec un chapeau, à couvercle serti de vis et un septum faits de deux couches, du premier de téflon et puis du second de la silicone sur lui. Un tube de téflon est utilisé pour prendre des échantillons de la phase d'eau sans passer par la phase d'octanol, évitant n'importe quelle contamination. Un septum en caoutchouc est employé pour sceller le tube pour qu'aucune évaporation des solvants n'est permise. Des seringues en verre avec des aiguilles d'acier inoxydable sont utilisées pour prendre des échantillons des deux phases. Le téflon, le verre et le métal sont employés parce qu'ils ne sont pas dissous par l'octanol.

### III.1.2.3. La méthode potentiométrique

La technique potentiométrique permet la mesure des constants d'ionisation et des valeurs de  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  des corps dissous ionisables exclusivement [22]. Cette méthode est basée sur l'observation quand un composé ionisable dans la solution aqueuse est titré en présence d'une phase organique, la courbe de titrage décale vers la droite pour des acides et vers la gauche pour des bases.

Ce décalage est lié au rapport de phase et au lipophilicité des deux espèces électriques du corps dissous [23]. Dans le cas simple d'une drogue monobasique B, le  $pK_a$  apparent ( $pK_a^{app}$ ) de la substance mesurée en présence de la phase organique est donné par Eq. III.3 :

$$pK_a^{app} = pK_a - \log \left( \frac{r \cdot P^B + 1}{r P^{BH^+} + 1} \right) \quad (E_q. III. 3)$$

Où le  $P^B$  et le  $P^{BH^+}$  sont les coefficients de partage du neutre et du composé protoné, respectivement, et le  $r$  est le rapport de volume de phase. Ainsi la détermination des valeurs de  $\log P$  du (mono-acide) ou d'un composé monobasique exige la connaissance de son  $pK_a$  et deux titrages au minimum en présence de deux rapports différents de volume de phase, rapportant deux valeurs de  $pK_a^{app}$ .

En supposant que le  $P^{BH^+}$  est une constante, la résolution du système donné par Eq. III.4 (2 équations, 2 paramètres inconnus) rapporte alors le  $P^B$  et les valeurs de la  $P^{BH^+}$ .

$$\begin{cases} pK_a^{app1} = pK_a - \log \left( \frac{r_1 \cdot P^B + 1}{r_1 \cdot P^{BH^+} + 1} \right) \\ pK_a^{app2} = pK_a - \log \left( \frac{r_2 \cdot P^B + 1}{r_2 \cdot P^{BH^+} + 1} \right) \end{cases} \quad (E_q. III. 4)$$

L'avantage de la méthode de potentiométrie est la possibilité d'employer un grand ensemble de solvants et de mesurer une gamme étendue des valeurs de  $\log P$ .

Néanmoins sa limitation principale vient de l'hypothèse que le  $P^{BH^+}$  est une constante puisque Eq. III.4 montre clairement la dépendance de la  $P^{BH^+}$  à des conditions expérimentales, et en particulier des volumes de phase.

Quelques considérations générales doivent être prises en compte lorsqu'on analyse les résultats :

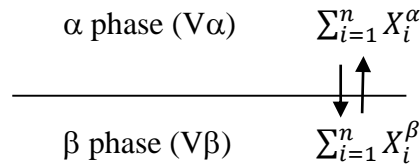
- quand le  $P^B \gg P^{BH^+}$ , décalages de  $pK_a$  obtenus par Eq. III.4, ne dépendent pas de la  $P^{BH^+}$  et de la méthode potentiométrique rapporte des teneurs fiables en  $P^B$ .
- quand  $P^{BH^+}$  ne peut pas être négligé relativement au  $P^B$ , les résultats donnés par des titrages potentiométriques doivent être considéré avec prudence.

### III.1.2.4. Voltamétrie cyclique à l'interface entre deux solutions d'électrolytes non miscibles

Voltamétrie cyclique a été récemment introduit en chimie médicinale pour déterminer la lipophilie des ions et d'étudier leurs mécanismes de transfert à l'interface [24]. Cette méthode exige l'utilisation d'une interface polarisable qui est disponible avec un système de solvant tel que le 1,2-dichloroéthane/eau, à l'exclusion du système (n-octanol/eau). Le solvant classique utilisé dans les études de partage, le n-octanol, ne peut être pas utilisé dans ces études, par ce que les électrolytes ne peuvent pas être dissous dans ce solvant [25].

Le principe d'expériences de voltamétrie cyclique est décrit dans la référence [26]. Le principal avantage de cette méthode est doit fournir des valeurs standard de  $\log P$  pour des ions, indépendantes des conditions expérimentales sauf la température et les solvants [24].

Le partage des sels peut être décrit par un système du deux phases non-miscible (par exemple l'eau et 1,2-dichloroéthane) et contenant des  $n$  ions  $X_i$  [27] :



Où  $V_\alpha$  et  $V_\beta$  sont les volumes de deux phases. À l'équilibre, le potentiel électrochimique de chaque ion  $X_i$  est le même dans les deux phases :

$$\tilde{\mu}_i^\alpha = \tilde{\mu}_i^\beta \quad (E_q. III. 5)$$

Le potentiel électrochimique de l'ion  $X_i$  est la somme de terme chimique et électrique :

$$\tilde{\mu}_i^\alpha = \mu_i^\alpha + z_i \cdot F \Phi^\alpha \quad (E_q. III. 6)$$

le  $\mu_i^\alpha$  est le potentiel chimique de l'ion  $X_i$  dans la phase  $\alpha$ , le  $z_i$  est la charge de l'ion  $X_i$ ,  $F$  est la constante de Faraday ( $9.65 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et  $\Phi^\alpha$  est le potentiel de Galvani du la phase  $\alpha$  en volt.

Le potentiel chimique est défini par :

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^{0,\alpha} + R \cdot T \cdot \ln a_i^\alpha \quad (E_q. III. 7)$$

$\mu_i^{0,\alpha}$  et  $a_i^\alpha$  sont les potentiels chimique standard et l'activité  $X_i$  dans le de phase  $\alpha$  respectivement,  $R$  est la constante de gaz ( $8,31 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et  $T$  est la température en Kelvin.

À partir d'Eq. III.5, nous obtenons :

$$\Delta_\beta^\alpha \phi = \phi^\alpha - \phi^\beta = \frac{\mu_i^{0,\beta} - \mu_i^{0,\alpha}}{z_i \cdot F} + \left( \frac{R \cdot T}{z_i \cdot F} \right) \cdot \ln \left( \frac{a_i^\beta}{a_i^\alpha} \right) \quad (E_q. III. 8)$$

Le  $\Delta_{\beta}^{\alpha}\Phi$  est la différence de potentiel de Galvani entre les deux phases  $\alpha$  et  $\beta$ .

Eq. 4,8 peuvent être écrits comme :

$$\Delta_{\beta}^{\alpha}\phi = \Delta_{\beta}^{\alpha}\phi_i^0 + \left(\frac{R.T}{z_i.F}\right) \cdot \ln\left(\frac{a_i^{\beta}}{a_i^{\alpha}}\right) \quad (Eq. III. 9)$$

$\Delta_{\beta}^{\alpha}\Phi_i^0$  est le potentiel standard de transfert de l'ion  $X_i$  entre les deux phases  $\alpha$  et  $\beta$ . En supposons que les transferts d'ion sans formation de n'importe quelle ion-paire et sans n'importe quelle réaction chimique ou redox,  $\Delta_{\beta}^{\alpha}\Phi_i^0$  peuvent être exprimés par :

$$\Delta_{\beta}^{\alpha}\phi_i^0 = \frac{\mu_i^{O,\beta} - \mu_i^{O,\alpha}}{z_i.F} = \frac{\Delta G_{tr,i}^{0,\alpha\rightarrow\beta}}{z_i.F} \quad (Eq. III. 10)$$

$\Delta G_{tr,i}^{0,\alpha\rightarrow\beta}$  est l'énergie standard de Gibbs du transfert de l'ion  $X_i$  à partir du  $\alpha$  au  $\beta$ . le coefficient de partage 1,2-dichloroethane/eau de l'ion  $X_i$  ( $\log P_{dce}^i$ ) entre les deux phases est dépendant de potentiel est donné par Eq. III.11 :

$$\log P_{dce}^i = \log\left(\frac{a_i^{\beta}}{a_i^{\alpha}}\right) = -\frac{z_i.F}{R.T.ln10} \cdot \Delta_{\beta}^{\alpha}\phi_i^0 + \frac{z_i.F}{R.T.ln10} \cdot \Delta_{\beta}^{\alpha}\phi \quad (Eq. III. 11)$$

$\log P_{dce}^0$  représente le coefficient de partage de  $X_i$  quand l'interface n'est pas polarisée et dépend seulement de la structure chimique de  $X_i$  et de la température. Le coefficient standard de partage est donné par :

$$\log P_{dce}^{0,i} = -\frac{z_i.F}{R.T.ln10} \Delta_{\beta}^{\alpha}\Phi_i^0 \quad (Eq. III. 12)$$

Cette propriété physico-chimique pu être mesurée, mais ces mesures sont généralement longues et coûteuses. Par conséquent, différentes méthodes de prédiction du  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  ont été mises au point, et il existe un nombre important de logiciels de prédiction de cette propriété. Ceux-ci s'appuient aussi bien sur des méthodes de contribution de groupes (ACD/Log  $P$  [28], KowWin [29], CLog  $P$  [30]...).

## III.2. TRAVAUX EXPÉRIMENTALS

### III.2.1. Introduction

La solubilité d'une molécule dépend de sa capacité à créer des interactions fortes intermoléculaires avec l'eau. Elle nécessite d'abord de rompre les interactions hydrogène entre les molécules d'eau de façon à créer des « cavités » pour les molécules. Les molécules doivent ensuite créer des interactions avec les molécules d'eau (solvation), en « concurrence » avec les liaisons hydrogène des molécules d'eau entre elles. Les molécules organiques qui présentent des structures polaires capables de créer des liaisons hydrogène (de type O-H) seront donc plus facilement solubilisées que des structures apolaires qui interagissent avec leur environnement par des interactions plus faibles dipôle-dipôle de type Van der Waals. Les molécules organiques sont donc d'autant moins solubles dans l'eau qu'elles sont très apolaires, condensées et de grande taille. A l'inverse, ces molécules seront facilement miscibles dans un solvant organique peu polaire (alcanes, ou n-octanol par exemple).

Le n-octanol possédant des propriétés structurales analogues aux tissus lipidiques des organismes,  $P_{n\text{-octanol/eau}}$  permet une estimation du caractère lipophile du contaminant [31], et donc indirectement de sa capacité à être accumulé dans les tissus lipidiques des organismes vivants.

Puisque 1,2-dithiole-3-thiones sont des composés fortement lipophiles [32], et puisqu'un lipophilicité trop haut peut avoir comme conséquence une basse perméabilité, il y a un besoin d'un point de vue biopharmaceuticale de synthétiser des dithiolethiones ionisés et de déterminer leurs coefficient de partage  $\log P$  afin d'éviter le bas et l'absorption fortement variable généralement vus avec un tel produits.

### III.2.2. Détermination expérimentale de $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$

Chaque fois que cela sera possible, le  $\log P_{\text{eau/n-octanol}}$  d'une molécule fera l'objet d'une détermination expérimentale. La méthode dite des flacons agités ou «*shake-flask*», utilisée dans notre étude est la plus ancienne. Elle reste cependant la méthode de choix pour des molécules organiques originales et de ce fait, elle est préconisée comme procédure standard de caractérisation par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) [33].

En effet, on a vu précédemment que ce coefficient de partage est donné par la relation (III.1) :

$$\log P = \log \left( \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}} \right) \quad (E_q, III.1)$$

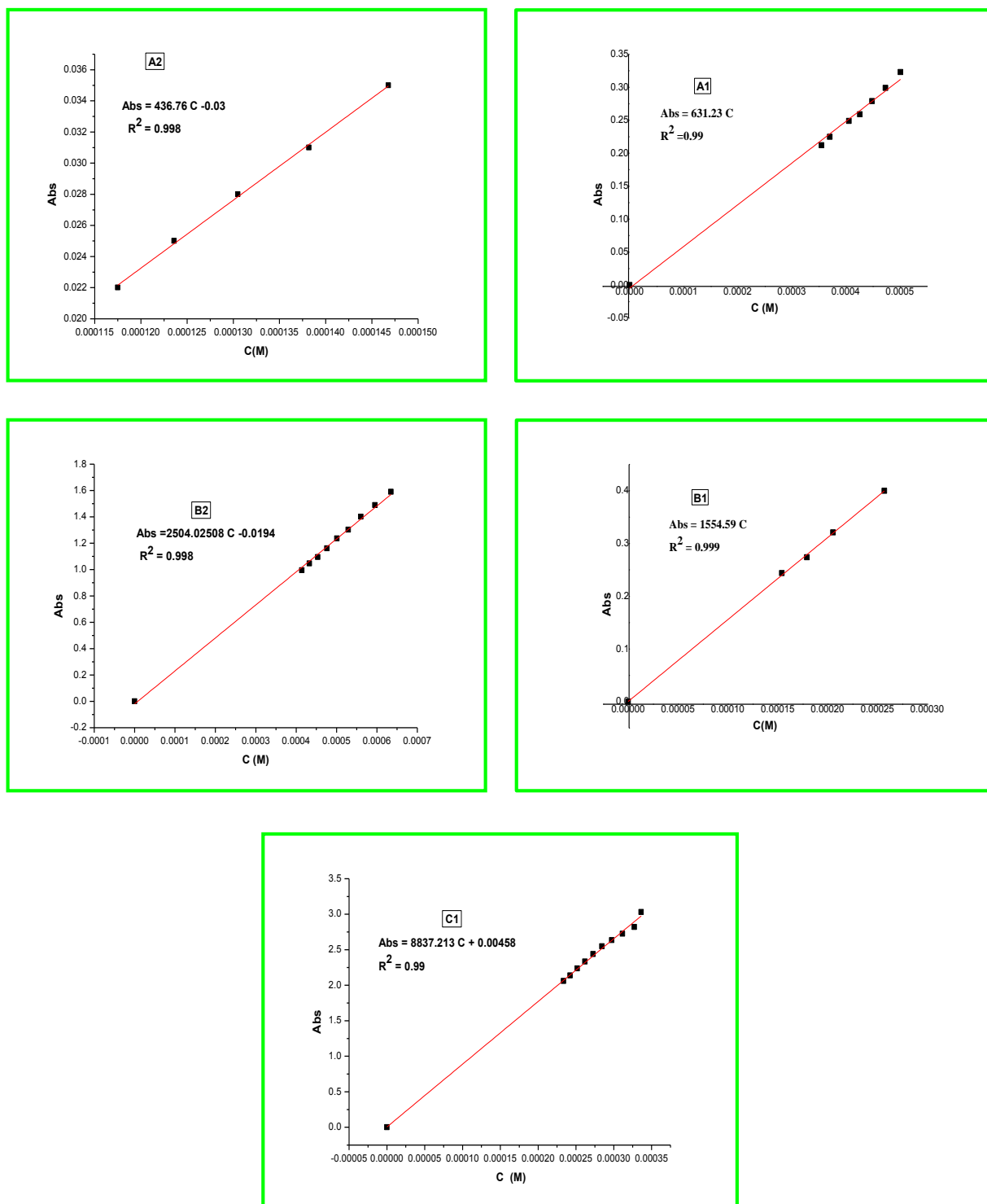
Remarquons que :

- si  $\log P_{n\text{-octanol/eau}} > 0$ , alors  $C_{\text{oct}} > C_{\text{aq}}$ , le composé a une tendance hydrophobe
- si  $\log P_{n\text{-octanol/eau}} < 0$ , alors  $C_{\text{oct}} < C_{\text{aq}}$ , le composé a une tendance hydrophile
- si  $\log P_{n\text{-octanol/eau}} = 0$ , alors  $C_{\text{oct}} = C_{\text{aq}}$ , le composé se répartit de manière égale entre les deux phases.

### Résultats et discussion

Nous avons pour chaque composé de dithiolethiones évalué le coefficient de partage. D'après les courbes d'étalonnage nous avons estimé les valeurs de coefficient pour les dithiolethiones étudiés.

Les résultats sont répertoriés dans le tableau III.2.



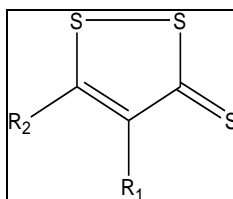
**Figure III.2 :** Courbes d'étalonnage de quelques dithiolethions pour déterminer les valeurs de coefficient de partage

Le coefficient de partage de certains dithiolethions n'existe pas dans la littérature, donc nous l'avons déterminé, pour la première fois il est très important de vérifier les valeurs

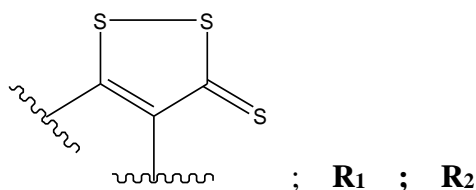


expérimentales de ce coefficient par des valeurs théoriques calculées avec la méthode des fragments de REKKER (**Version révisée**) [16].

Nous admettons donc que toute dithiolethione :



Se décompose en trois fragments constitutifs

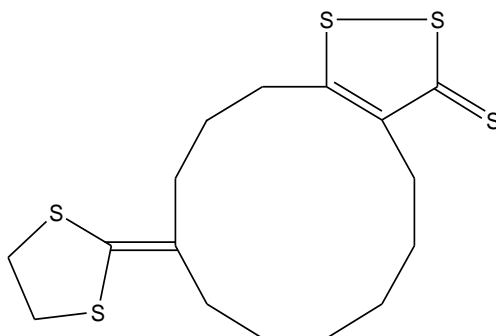


### III.2.2.1. Méthode théoriques de calcul de REKKER

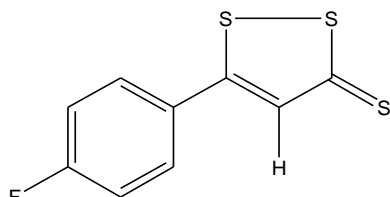
Etant donné la structure des substituants R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> constituant les dithiolethiones étudiés (cf tableau III.2), les constantes dont nous avons besoin pour nos calculs sont :

**Tableau III.1 : Valeurs des fragments**

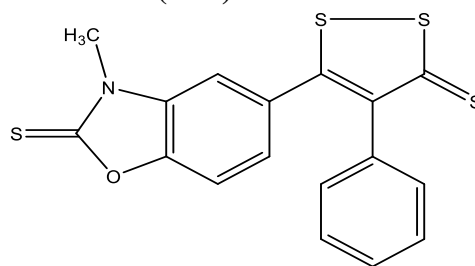
<b>Substituant x</b>	<b><math>f_x</math></b>
$f_{C_6H_5}$	1,902 [16]
$f_F$ aromatique	0,444 [16]
$f_H$	0,204 [16]
$f_{CH_3-O}$ aromatique	0,274 [16]
$f_I$ aliphatique	0,570 [16]
constante magique $C_M$	0,219 [16]
$f_{CH_3}$	0,724 [16]
$f_s$ aliphatique	-0,558 [16]
$f_O$ aromatique	-0,450 [16]
$f_{SO_4}$ aromatique	-2,070 [16]
$f_{SCH_3}$ aliphatique	0,166 [16]
$\log P_{exp}$ (dithiolethione parent)	1,580 [15]
$f_I^-$ aromatique	0,570 [16]
$f_s$ aromatique	0,099 [16]



10-(1,3-dithiolan-2-ylidene)-4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-decahydro-cyclododeca[c][1,2]dithiole-3-thione (**C12**)



5-p-fluorohényl-1,2-dithiole-3-thione (**D**)



3-méthyl-5-(4-phényl-3-thioxo-1,2-dithiole-5-yl) benzo oxazole-2-thione(**NOS**)

**Figure III.3** : Les structures des dérivés de dithiolethiones : **C12**, **D** et **NOS**

La lipophilie d'un composé peut être estimée par la somme de la lipophilie de ses fragments et de termes de corrections.

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i + \sum_{j=1}^m b_j F_j \quad (\text{Eq. III. 13})$$

Où :  $f_i$  = constante de lipophilie du fragment  $f_i$

$a_i$  = nombre de fragments  $f_i$

$F_j$  = facteur de correction de correction  $F_j$

$b_j$  = nombre de facteurs de correction  $F_j$

Termes de correction proportionnels à une constante :

**Facteur de correction ( $F_i$ ) =  $K_n \cdot C_M$**

Où :  $C_M$  = constante magique = 0,219.

$k_n$  = entier caractéristique de chaque facteur de correction.

**A:** R<sub>1</sub>= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub>=H

$$\log P_A = \log P (\text{exp de DTT parent}) - f_H + f_{C_6H_5}$$

$$\log P_A = 1,58 - 0,204 + 1,902$$

$$\log P_A = \mathbf{3,278}$$

**B:** R<sub>1</sub>=p-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R<sub>2</sub>=H

$$\log P_B = \log P (\text{exp de DTT parent}) - f_H + [f_{C_6H_5} + f_{CH_3} - f_H]$$

$$\log P_B = 1,58 - 0,204 + 1,902 + 0,724 - 0,204$$

$$\log P_B = \mathbf{3,798}$$

**C:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= p-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

$$\log P_C = \log P (\text{exp de DTT parent}) - [f_H + C_M (\text{H porté par un groupement électro attracteur groupe (5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl) [15])}] + [f_{C_6H_5} - f_H + f_{CH_3-O \text{ aromatique}}] + C_M (\text{conjugaison})$$

$$\log P_C = 1,58 - (0,204 + 0,219) + (1,902 - 0,204 + 0,274) + 0,219$$

$$\log P_C = \mathbf{3,348}$$

**A1:** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, le contre ion I<sup>-</sup>

$$\log P_{A1} = 2f_{S \text{ aliphatique}} + f_{SCH_3} + f_H + f_{(C_6H_5)} + 3f_C + f_{(I^-)}$$

$$= 2(-0,558) + 0,166 + 0,204 + 1,902 + 0,333 + 0,57$$

$$\log P_{A1} = \mathbf{2,059}$$

**A2:** R<sub>1</sub>= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub>= H, le contre ion CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>

$$\log P_{A2} = 2f_{S \text{ aliphatique}} + f_{SCH_3} + f_H + f_{(C_6H_5)} + 3f_C + f_{S \text{ aromatique}} + f_{OCH_3 \text{ aromatique}} + 3f_{O \text{ aromatique}}$$

$$= 2(-0,558) + 0,166 + 0,204 + 1,902 + 0,333 + 0,099 + 0,274 - 0,45 \times 3$$

$$\log P_{A2} = \mathbf{0,512}$$

**B1:** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= p-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, le contre ion I<sup>-</sup>

$$\log P_{B2} = 2f_{S \text{ aliphatique}} + f_{SCH_3} + f_H + f_{(C_6H_5)} + 3f_C + f_{(I^-)} + f_{CH_3} - f_H$$

$$= 2(-0,558) + 0,166 + 1,902 + 0,333 + 0,57 + 0,724$$

$$\log P_{B2} = \mathbf{2,579}$$

**B2:** R<sub>1</sub>= p-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R<sub>2</sub>= H, le contre ion CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>

$$\log P_{B2} = 2f_{S \text{ aliphatique}} + f_{SCH_3} + f_H + f_{(C_6H_5)} + 3f_C - f_H + f_{CH_3} + f_{S \text{ aromatique}} + f_{OCH_3 \text{ aromatique}} + 3f_{O \text{ aromatique}}$$

$$= 2(-0,558) + 0,166 + 1,902 + 0,333 + 0,724 + 0,099 + 0,274 - 0,45 \times 3$$

$$\log P_{B2} = \mathbf{1,032}$$

**C1 :** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= p-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, le contre ion I<sup>-</sup>

$$\log P_{C1} = 2f_{S \text{ aliphatique}} + f_{SCH_3} + f_H + f_{(I^-)} + f_{(C_6H_5)} - f_H + f_{CH_3O \text{ aromatique}} + 3f_C$$

$$= 2(-0,558) + 0,166 + 0,204 + 0,57 + 1,902 - 0,204 + 0,274 + 0,333$$

$$= \mathbf{2,129}$$

**D:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= p-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

$$\log P_D = \log P (\text{exp de DTT parent}) - [f_H + C_M (\text{H porté par un groupement électro attracteur groupe$$

(5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl) [15] +  $f_{C_6H_5} - f_H + f_{F \text{ aromatique}} + C_M$  (effet de conjugaison)

$$\log P_D = 1,58 - [0,204 + 0,219] + 1,902 - 0,204 + 0,444 + 0,219$$

$$\log P_D = \mathbf{3,518}$$

**NOS:**

$\log P_{NOS} = \log P$  (exp de DTT parent) - [ $f_H + C_M$  (H porté par un groupement électro attracteur groupe (5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl) [15]) +  $2x f_{C_6H_5} - 3xf_H + f_N + f_{CH_3} + f_O + f_S + f_C + C_M$  (conjugaison)

$$\log P_{NOS} = 1,58 - (0,204 + 0,219) + 2x1,902 - 3x0,204 - 2,074 + 0,724 - 1,545 - 0,558 + 0,111 + 0,219$$

$$\log P_{NOS} = \mathbf{1,226}$$

**C12:**

$\log P_{C12} = \log P$  (exp de DTT parent) - [ $f_H + C_M$  (H porté par un groupement électro attracteur groupe (5-[1,2-dithiole-3-thione]-yl) [15]) -  $f_H + 2xf_S + 11xf_{CH_2} + 2xf_C$

$$\log P_{C12} = 1,58 - (0,204 + 0,219) - 0,204 + 2(-0,558) + 11x0,519 + 2x0,111 = \mathbf{5,768}$$

A fin d'analyser les erreurs de nos résultats pour le coefficient de partage calculé, l'erreur absolue AE de  $\log P$  est calculé par la relation suivante :

$$AE = \Delta \log P = |\log P_{cal} - \log P_{exp}|$$

**Tableau III.2** : Valeurs de  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  expérimentales et calculées des dithiolethiones étudiés

Dithiolethiones	$\log P$ (UV-Vis)	$\log P$ calculé REKKER	AE
A	3,23	3,278	0,048
B	3,49	3,798	0,308
C	3,82	3,348	0,472
A1	1,947	2,059	0,112
A2	0,45	0,512	0,062
B1	2,353	2,579	0,226
B2	1,24	1,032	0,208
C1	2,25	2,129	0,121
D	(*)	3,518	----
NOS	1,078	1,226	0,148
C12	(*)	5,768	----

(\*) Le coefficient de partage du composé (**C12**) n'a pas pu être évaluée en raison d'un problème de solubilité, mais pour le composé, 5-p-fluorophényl-1,2-dithiole-3-thione (**D**) le problème est l'insuffisance de quantité.

Le coefficient de partage est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants, et pour la discussion on se base sur la structure.

En comparant les composés neutres substitués à la position 4, on trouve que (**B**) plus hydrophobe que la (**A**) cela revient à la différence entre les deux structures (tolyl et le phényle).

L'accroissement de lipophilie présenté avec les 4-aryl-1,2-dithiole-3-thiones peut s'expliquer probablement par la proximité du substituant en position 4 et du groupement thiocarbonyle selon l'augmentation de la taille d'aryle.

Le sulfarlem (**C**), à cette étude, est plus hydrophobe ( $\log P_{n\text{-octanol/eau}} = 3,82$ ) parce qu'il possède le groupement méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) qui augmente la propriété hydrophobique.

L'accroissement de lipophilie lié à des phénomènes de conjugaison, est bien connu [15] comme le cas de 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione (sulfarlem).

On remarque que les sels des composés dithiolique ont des  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  plus petit que leurs composés neutres, cela est dû à la nature ionique (faible solubilité dans la phase organique).

La présence parfois d'hétéro atome (O, N) diminue considérablement la valeur de  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  à cause des liaisons hydrogène avec l'eau [23], comme le composé **NOS** qui possède un coefficient de partage 1,078.

Tous les dithiolethiones, considérés dans ce travail, sont hydrophobes, mais les petites variations de leur structure moléculaire peuvent causer les changements considérables de leur affinité à la solution aqueuse, ces propriétés moléculaires sont commandés par la taille structurale du composé par exemple: l'iodure a masse moléculaire 127g/mol par contre l'anion méthyle sulfate possède une masse moléculaire égale 111g/mol, donc on peut attribuer la grande lipophilie des sels iodurés par rapport aux sels sulfates à la masse moléculaire élevée de contre ion et son grande hydrophobicité [18].

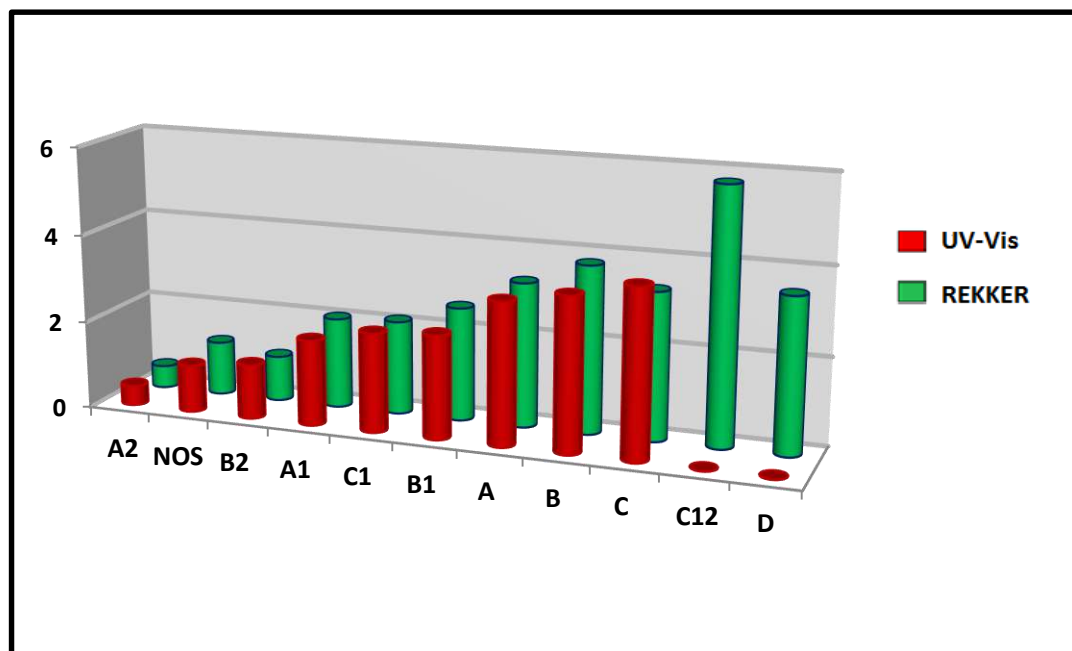
Prenons l'exemple de la **B2** et de la **B1**. Leurs formules éclatées sont sensiblement les mêmes (cf tableau I.2). La seule différence est la présence d'une CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup> dans la **B2**. Ce groupement sulfate est connu pour avoir des propriétés fortement hydrophiles. La **B2** sera donc plus « à l'aise » dans la phase PBS et donc en concentration plus importante dans cette

phase que dans la phase octanol. La **B1** aura donc plus d'affinité avec la phase octanol et sa concentration dans cette phase sera plus importante que sa concentration dans la phase PBS. Cela explique que le coefficient de partage de la **B2** soit plus faible que celui de la **B1**.

La détermination du  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  par méthode de REKKER est rapide. Le principal problème rencontré est le choix des fragments aromatiques ou aliphatiques selon le type de dithiolethione étudié. Ainsi, une valeur de fragment obtenu par REKKER peut être sur estimée, donc les valeurs estimées de  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  peuvent être nettement différentes et variées de plusieurs unités de  $\log$ .

De plus, les propriétés moléculaires ne sont pas intégrées au calcul. En effet, pour le coefficient de partage de composés de « grande » taille (composés de longue chaîne hydrophobes par exemple), la méthode de calcul trouve un  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  théorique différent de celui trouvé expérimentalement (cf Tableau III.2). Nous avons pensé que ceci peut s'expliquer par la formation de micelles, agrégats sphéroïdaux de molécules possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur. C'est l'hydrophobie des chaînes qui entraîne ce regroupement des molécules et la mise en place de structures sphériques visant à éliminer le solvant. Ces agglomérats ainsi formés n'ont pas les mêmes propriétés lipophiliques (et hydrophiliques) que les molécules isolées. Ils peuvent donc perturber la bonne solubilité du dithiolethione et modifier la concentration du composé dans les solvants. Ce phénomène peut expliquer la différence entre le  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  théorique et expérimental.

Nous remarquons que le coefficient de partage de dithiolethiones **NOS** (substitué en position 4 et 5) est moins lipophile par rapport la sulfarlem **C** (substitué en position 5 par méthoxy phényle). Une explication possible est que le substituant phényle en 4 diminue la conjugaison entre le noyau phényle en 5 et le noyau dithiole.



**Figure III. 4 :** Les valeurs de coefficient de partage obtenues par la méthode expérimental (UV-Vis) et la méthode théorique (REKKER)

L'encombrement stérique du substituant en 4 entrainerait la rotation du reste phényle les noyaux phényle et dithiole ne seraient plus coplanaires. Cette explication est confirmée, comme nous l'avons vu, par nos calculs semi-empiriques qui donnent dans la conformation la plus stable un angle dièdre entre les noyaux dithiole et phényle de 90°.

En outre, il peut être intéressant de remarquer qu'une propriété moléculaire aussi complexe que la lipophilie est calculée principalement sur la base de valeurs de fragments ou d'atomes déterminées de façon empirique et en faisant abstraction des processus impliqués dans le phénomène de solvation et des propriétés moléculaires qui les affectent. D'ailleurs, nous avons rencontré un certain nombre de difficultés à dissoudre la **C12** dans l'eau et nous n'avons pas été en mesure de calculer expérimentalement leur coefficient de partage. Cela a mis en évidence que les propriétés fondamentales de certaines molécules telles que leur miscibilité avec l'eau entraînent des difficultés à établir le comportement plus ou moins lipophile de certaines molécules. Cet exemple montre que la méthode « *shake flask* » a aussi ses limites.

En effet, cette méthode expérimentale de détermination de  $\log P$  souffre de plusieurs inconvénients. Tout d'abord leur domaine d'application est relativement étroit (domaine de mesure étroit de l'ordre de  $-2$  à  $+4$ ). Ensuite la durée d'étude est longue (temps de repos de 24h).

Malgré ses imperfections, elle reste cependant la méthode de choix pour des molécules organiques originales. La méthode « *shake flask* » est recommandée lorsque la valeur de  $\log P$  est comprise entre  $-2$  et  $+4$ . Elle ne s'applique qu'aux substances pratiquement pures, solubles dans l'eau et l'octanol.

Nous avons calculé la déviation entre les valeurs de coefficient de partage expérimentales et théoriques, est de 0,048 à 0,472. Ce dernier reste pratiquement accepté.

La méthode de REKKER semble être un bon outil pour prédire le coefficient de partage de composés simples, mais il est évident que le calcul expérimental reste le plus fiable.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication sous titre :

***"Experimental and Theoretical Study on Lipophilicity of Novel 1,2-Dithiole-3-thiones Synthetic"***

*Asian Journal of Chemistry; Vol. 25, No. 16 (2013), 9159-9163.*



## **Conclusion**

Notre travail montre des difficultés expérimentales dans la détermination du  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  de dithiolethiones et leurs dérivés, un de ces difficultés proviennent du fait qu'ils sont très hydrophobique.

En effet, La chimie des dithiolethiones est caractérisée par deux principales propriétés physico-chimique : (i) ils sont des composés aromatiques, (ii) le groupe 3-thioxo-1,2-dithiole-5-yl est très attracteur d'électrons. Ces deux propriétés sont importantes pour la lipophilie des dithiolethiones.

Afin d'approfondir la compréhension des différentes activités antioxydante 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 de modélisation moléculaire et l'obtention des plusieurs paramètres physico-chimiques. La seconde 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.

### III.3. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

#### a. Solvants et réactifs

**Tableau III.3 :** Réactifs et matériels nécessaires pour la détermination du  $\log P$

Réactifs	Matériels
Hydroxyde de sodium (BIOCHEM Chemopharma)	Spectromètre UV (Spectro Scan 80DV)
Sodium-dihydrogénophosphate (BIOCHEM Chemopharma)	Centrifugeuse (SLW Centrifuge Ultra 8-Place)
Chlorure de potassium (Fluka)	Agitateur magnétique (TMA)
Acide chlorhydrique 37% (BIOCHEM Chemopharma)	
Chlorure de sodium (Fluka)	
Di-sodium-hydrogénophosphate (BIOCHEM Chemopharma)	
n-octanol (BIOCHEM Chemopharma)	

#### b. Préparation

L'expérience doit être effectuée à température, pression et pH constants. En raison des équilibres multiples impliqués, cette méthode d'essai ne peut pas être appliquée aux composés ionisables sans appliquer une correction. C'est pourquoi on utilise une solution tampon de PBS (Phosphate Buffer Saline : solution saline à pH physiologique) à la place de l'eau. A ce pH, la dissociation de tous les dithiolethiones est négligeable et on mesure le coefficient de partage vrai. Nous adoptons le mode opératoire suivant : dissoudre dans un 5 mL d'octanol (saturé en eau) une quantité exactement connue de soluté, après l'obtention des solutions octanoliques homogènes, celles-ci sont mises en contact dans une ampoule à décanter avec 25 mL ( $V_{aq}$ ) d'eau, (préalablement saturé en octanol). On agite pendant quelques minute chaque ampoule est laissée décanter d'au moins 24 heures pour que les phases se séparent. Une fois, le système biphasique est à l'équilibre, on va prélever une petite quantité de chaque phase. La concentration dans les deux phases séparées est alors déterminée par spectrophotométrie.

### c. La Spectrophotométrie UV-Vis

Cette méthode d'analyse est intéressante car elle permet de travailler sur de faibles quantités de substances non destructrices vis-à-vis l'échantillon. Pour des études d'UV-Vis, une longueur d'onde correspondant aux maximums des absorptivités molaires ont été choisies pour chacun composé. Dans tous les cas, la concentration d'échantillon a été déterminée par comparaison à une courbe d'étalonnage construite avec quatre à huit concentrations connues dans l'eau saturée par le n-octanol. Nous nous assurons de la linéarité de la gamme d'étalonnage en étudiant les paramètres statistiques de la régression linéaire : Absorbance Abs en fonction des concentrations des solutions (mol.L<sup>-1</sup>), en rappelant a et b sont respectivement la pente exprimée en L.mol<sup>-1</sup> et l'ordonnée à l'origine de la droite. La concentration aqueuse après partage est donc :

$$C_{aq} = \frac{(Abs_x - b)}{a}$$

Où Abs<sub>x</sub> est l'absorbance de composé étudié

De plus, cette simple relation linéaire, entre l'absorbance, la concentration et la facilité relative de mesure de la lumière UV-Vis vont nous permettre de mesurer aisément le coefficient de partage des dithiolethiones étudiés.

### Références

- [1] MEYER H.; *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **42**, pp 109-118 (1899).
- [2] OVERTON E.; *Vieterjahrsschr. Naturforsch. Ges. Zürich*, **44**, pp 87- 136 (1899).
- [3] BUTLER J. A. V.; *Trans. Faraday Soc.*, **33**, pp 229-236 (1937).
- [4] FRANK H. S. et EVANS M. W.; *J. Chem. Phys.*, **13**, pp 507-532 (1945).
- [5] TEETER M. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, pp 6014-6018 (1984).
- [6] KAUZMANN W.; *Adv. Protein Chem.*, **14**, pp 1-63 (1959).
- [7] SCHERAGA H. A., NÉMETHY G. et STEINBERG I. Z.; *J. Biol. Chem.*, **237**, pp 2506-2508 (1962).
- [8] LESK A. M.; *Biophysical Chemistry*, **105**, pp 179–182 (2003).
- [9] HERMANN R. B.; *J. Phys. Chem.*, **75**, pp 363-368 (1971).
- [10] HERMANN R. B.; *J. Phys. Chem.*, **79**, pp 163-169 (1975).
- [11] COLLANDER R.; *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **8**, pp 335-348 (1957).
- [12] HANSCH C., QUINLAN J. E. et LAWRENCE G. L.; *J. Org. Chem.*, **33**, pp 347-350 (1968).
- [13] LEO A. J. , HANSCH C. et ELKINS D.; *Chem. Rev.*, **71**, pp 525-616 (1971).
- [14] GHASEMI J. et SAAIDPOUR S.; *Analytica Chimica Acta*, **604**, pp 99–106 (2007).

- [15] BONA M., Détermination du *log P* eau/n-octanol de 1,2-dithiole-3-thiones et de 1,2-dithiole-3-ones règles de calcul, thèse de doctorat, université de Rennes 1 pp 35-70 (1995).
- [16] CARRUPT P. -A.; *université de Genève – Lausanne LCT Pharmacochimie*, p 118 (2007).
- [17] TESTA B., CARON G., CRIVORI P., REY S., REIST M. et CARRUPT P. A.; *Chimia*, **54**, pp 672-677 (2000).
- [18] HADJADJ M., MEDDOURA N., DAKMOUCHE M. et SAÏDI M.; *Annales des Sciences et Technologie*, **3(1)**, pp 62-69 (2011).
- [19] CHUMAN H., MORI A. et TANAKA H.; *J. Analytical Sciences*, **18**, p 1015 (2002).
- [20] EPA, U.S. Environmental Protection Agency, OPPTS 830.7550, EPA 712-C-96-039, (1996).
- [21] ROPEL L., BELVÈZE L. S., AKI S. N. V. K., STADTHERR M. A. et BRENNECKE J. F.; *Green. Chem.*, **7**, pp 83–90 (2005).
- [22] AVDEEF A.; *Quant. Struct. Act. Relat.*, **11**, pp 510-517 (1992).
- [23] THOMAE A V., ALLENSPACH W. H. et KRÄMER S. D.; *Biophysical Journal*, **89**, pp 1802–1811 (2005).
- [24] BOUCHARD G., CARRUPT P. -A., TESTA B., GOBRY V. et GIRAULT H. H.; *Chem. Eur. J.*, **8(15)**, p 3480 (2002).
- [25] STEYAERT G., LISA G., GAILLARD P., BOSS G., REYMOND F., GIRAULT H. H., CARRUPT P.-A. et TESTA B., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **93**, pp 401-406 (1997).
- [26] REYMOND F. et GIRAULT H. H.; Liquid/Liquid Interfaces, Electrochemistry at Frédéric Reymond and Hubert H. Girault in Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp 9908–9930 (2000).
- [27] GEINOZ S.; Assessment of drug permeation: Theory, methods and applications to skin and bacteria, thèse de doctorat, l'Université de Lausanne (2002).
- [28] ACD/LogP, v. 10, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), (2007).
- [29] SRC KOWWIN software, SRC-LOGKOW Version 1.66, Syracuse Research Corporation, Syracuse, USA, <http://www.syrres.com/eSc/kowwin.htm>.
- [30] HANSCH C. et LEO A. J.; New York, NY: Wiley p 339 (1979).
- [31] GOURLAY C.; biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques: influence de la matière organique naturelle et anthropique, thèse de doctorat, l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts Centre de Paris (2004).
- [32] BONA M., BOUDEVILLE P., ZEKRI O., CHRISTEN M. O. et BURGOT J. L.; *J. Pharm. Sci.* **84** pp 1107-1112 (1995).
- [33] OECD, Test Guideline 107, Decision of the Council C (81) 30 final, (1981).

# **Chapitre IV :**

**Modélisation moléculaire et  
étude de QSAR**

Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer les paramètres des dithiolethiones mis en jeu lors de l'activité chélatrice et anti-hémolyse puis dans un second temps établi une corrélation entre les activités chélatrice, anti-hémolyse et les propriétés des dithiolethiones. Ces études théoriques ont été réalisées par une étude QSAR (Quantitative Structure-Activité Relationships).

## **IV.1.DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **IV.1.1. Introduction**

Le développement d'un médicament demande généralement entre 10 et 15 ans de recherches. Il s'agit en effet de trouver une molécule qui doit à la fois présenter des propriétés thérapeutiques particulières, et posséder le minimum d'effets secondaires indésirables. Le prix de revient d'un médicament est essentiellement dû à ces synthèses longues, coûteuses et finalement inutiles. Pour cette raison, l'industrie pharmaceutique s'oriente vers de nouvelles méthodes de recherche, qui consistent à prédire les propriétés et activités de molécules avant même que celles-ci ne soient synthétisées. Deux disciplines de la « chimie computationnelle » se sont développées en réponse à ce besoin : les relations structure-activité ou QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships), et les relations structure-propriété ou QSPR (Quantitative Structure-Property Relationships). En 1868, CRUM B. et FRASER publiaient une équation considérée comme la première formulation générale en QSAR [1].

Elles consistent essentiellement la recherche de similitudes entre molécules dans de grandes bases de données de molécules existantes dont les propriétés sont connues. La découverte d'une telle relation permet de prédire les propriétés physiques et chimiques et l'activité biologique de composés, de développer de nouvelles théories ou de comprendre les phénomènes observés. Elle permet également de guider les synthèses de nouvelles molécules, sans avoir à les réaliser, ou à analyser des familles entières de composés. Les relations entre les structures des molécules et leurs propriétés ou activités sont généralement établies à l'aide de méthodes de modélisation par apprentissage statistique.

**La modélisation moléculaire** est un outil informatique maintenant indispensable aux chimistes pour concevoir de nouvelles molécules et essayer de faire des prédictions sur l'activité biologique de composés nouveaux.

Les techniques usuelles reposent sur la caractérisation des molécules par un ensemble de descripteurs, nombres réels mesurés ou calculés à partir des structures moléculaires. Il est alors possible d'établir une relation entre ces descripteurs et la grandeur modélisée.

Dans ce chapitre, nous présenterons les principales méthodes de modélisation moléculaire permettant la conception et l'étude de nouvelles molécules, ayant comme objectif final la prédiction d'activité chélatrice des ions ferreux et l'activité anti-hémolyse.

Les méthodes de calcul modernes donnent une description quantitative meilleure que celles de la théorie de champ cristallin et de la théorie de champ des ligands. Elles consistent à appliquer l'équation de Schrödinger en prenant en compte toutes les interactions entre les particules constituant les systèmes étudiés. Ces méthodes peuvent surtout être nécessaires quand on a besoin de précision quantitative assez élevée ou bien de mesurer ou de prédire des paramètres physiques.

Mais en pratique il n'est pas possible ici d'utiliser de telles méthodes, simplement parce que leur temps de calcul est loin d'être raisonnable [2].

Dans les méthodes de la fonctionnelle de la densité (DFT), la corrélation électronique est incorporée implicitement (de façon moyenne). Les méthodes DFT ont montré leur efficacité pour le calcul de complexes de grande taille, comportant quelques centaines d'électrons. Ces méthodes donnent dans des temps de calculs relativement raisonnables des résultats assez corrects de mesures de plusieurs grandeurs physico-chimiques.

Les méthodes de calcul de chimie quantique étant bien décrites dans de nombreux ouvrages scientifiques, nous n'allons pas en donner ici une description complète, mais nous allons nous arrêter sur certaines notions qui nous seront utiles pour l'interprétation de certains de nos résultats.

### **IV.1.2. Les outils de la Chimie Théorique**

Je présente dans ce chapitre les méthodes de la Chimie Théorique qui ont été utilisées au cours de ma thèse. La Chimie Théorique comprend plusieurs aspects : la Chimie Quantique (basée sur la mécanique quantique MQ), la Mécanique Moléculaire MM (basée sur la mécanique classique) et la Dynamique Moléculaire. La taille du système, la problématique, et les moyens de calcul disponibles imposent le choix de la méthodologie à employer.

Utilisation des méthodes de la Chimie Quantique : le système moléculaire ne doit pas dépasser plusieurs centaines d'atomes, autres que les atomes d'hydrogène, car les temps de calculs deviennent très grands et la capacité des disques durs, pour le stockage des fichiers temporaires lors du calcul, sont limités. Par contre, pour des études de réactivité, il est indispensable d'utiliser ces méthodes afin de bien décrire les cassures et les formations des liaisons chimiques. La Chimie Quantique permet de traiter explicitement les électrons et d'avoir accès à des informations précises notamment pour obtenir les propriétés moléculaires et électroniques du système étudié.

MM est basée sur la MQ classique plus l'approximation de Born-Oppenheimer.

Les électrons sont plusieurs milliers de fois plus légères que les noyaux et en conséquence se déplacent beaucoup plus vite. **L'approximation de Born-Oppenheimer** stipule que le mouvement des électrons peut être découplé de celui des noyaux, conduisant à deux équations séparées. On ignore donc les électrons et les atomes sont traités comme des points de masse chargés avec une taille définie. Le mouvement des électrons dépend donc paramétriquement des positions des noyaux.

Parmi les avantages de la mécanique moléculaire citons le prix de calcul. En effet, le coût d'un calcul *ab initio* varie avec  $n^4$  où  $n$  est le nombre de fonctions de base (orbitales) ; cette méthode est donc réservée aux molécules de petites dimensions. Les méthodes semi-empiriques nécessitent un temps de calcul proportionnel à  $n^2$  ou à  $n^3$ , tandis que le temps de calcul en mécanique moléculaire est en fonction de  $m^2$  où  $m$  est le nombre d'atomes.

### IV.1.3. Les méthodes de HARTREE-FOCK (HF)

La méthode de champ self-consistent proposée en 1927 par HARTREE D. R. est un des meilleurs procédés de résolution des problèmes de chimie quantique. Son principe consiste en ce que l'interaction de chaque électron de l'atome avec tous les autres est remplacée par l'interaction avec un champ moyen créé par le noyau et la totalité des autres électrons[28].

L'état électronique d'un système à  $n$  électrons est décrit par la fonction d'onde multiélectronique  $\Psi(x_1, x_2, \dots, x_n)$  qui est la solution de l'équation de Schrödinger à plusieurs électrons.  $x_i$  est le produit de la coordonnée spatiale  $\mathbf{r}_i$  par la coordonnée de spin  $s_i = \pm 1/2$ .

Une des premières approximations faites pour le calcul de la fonction d'onde d'un système à  $n$  particules a été proposée par HARTREE. Le produit de HARTREE consiste à multiplier simplement les fonctions d'onde monoélectroniques pour obtenir la fonction d'onde à  $n$  électrons [2].



$$\Psi = \Psi_1(1)\Psi_2(2) \dots \Psi_n(n) \dots \text{(Eq. IV. 1)}$$

Cependant, on a rapidement constaté que la fonction d'onde qui en découle n'est pas antisymétrique et ne respecte pas la règle de PAULI. Pour ceci, on construit le déterminant dit déterminant de Slater qui mène à une fonction d'onde antisymétrique et qui respecte la règle de PAULI [2,28].

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{bmatrix} \Psi_1(1) & \Psi_1(2) & \dots & \Psi_1(n) \\ \Psi_2(1) & \Psi_2(2) & \dots & \Psi_2(n) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \Psi_n(1) & \Psi_n(2) & \dots & \Psi_n(n) \end{bmatrix}$$

Où  $(n!)^{-1/2}$  est le facteur de normalisation.

L'énergie totale dans l'approximation HF est une fonctionnelle de la fonction d'onde. Elle correspond au résultat de l'application de l'opérateur de FOCK sur la fonction d'onde du système étudié. L'opérateur de FOCK se décompose sur des termes monoélectroniques qui sont l'énergie cinétique et l'attraction coulombienne électron-noyau, et des termes biélectroniques qui sont la répulsion coulombienne  $j$  et le terme d'échange  $k$  entre deux électrons de même spin. L'équation de HARTREE-FOCK [9] s'écrit :

$$\left[ -\frac{\hbar}{2m} \nabla^2 + U_{ri} + V_i(r_i) - \hat{k}(x) \right] \Psi_i(x) = \varepsilon_i \Psi_i(x) \dots \text{(Eq. IV. 2)}$$

Où  $\hbar$  est la constante de Planck  $h$  divisée par  $2\pi$ ,  $\varepsilon_i$  est l'énergie d'une orbitale  $i$

$U_{ri}$  est l'attraction coulombienne électron  $i$  – noyau  $N$       $U_{ri} = -\sum \frac{Z_K e^2}{4\pi\epsilon_0(r_{iN})}$

$V_i(r_i)$  est la répulsion coulombienne entre l'électron  $i$  et  $j$       $V_i(r_i) = -\frac{1}{2} \sum \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0(r_{ij})}$

Cette équation sera résolue d'une façon auto-cohérente SCF (*Self Consistent Field*), i.e on se donne une fonction d'onde de départ  $\Psi_0$ , la résolution de l'équation de HF appliqué sur  $\Psi_0$  nous donne une nouvelle fonction  $\Psi_1$ . On répète le processus jusqu'à l'obtention d'une fonction d'onde auto-cohérente, c'est à dire  $\Psi_n \equiv \Psi_{n-1}$  [8].

L'énergie totale est donc la somme d'un terme d'énergie cinétique et de trois termes d'énergie potentielle.

#### **IV.1.4. Méthodes Post HARTREE-FOCK**

La fonction d'onde HARTREE-FOCK ne prend pas en compte la corrélation qui existe entre le mouvement des divers électrons de spin opposé, l'énergie calculée est nécessairement supérieure à la valeur exacte. La différence d'énergie entre la valeur exacte non-relativiste et la valeur limite HARTREE-FOCK porte le nom d'énergie de corrélation.

Le but des méthodes Post HARTREE-FOCK est d'estimer cette énergie de corrélation.

On définit alors l'énergie de corrélation comme la différence entre l'énergie HF dans une base d'orbitale atomique infinie, appelée limite Hartree-Fock et notée  $E_{lim}^{HF}$ , et l'énergie exacte  $E_{exacte}$  associée à la fonction d'onde électronique exacte :

$$E_{corr} = E_{exacte} - E_{lim}^{HF} \dots (Eq. IV.3)$$

D'autres méthodes Post HARTREE-FOCK dites "d'interactions de configuration" existent, parmi lesquelles on peut trouver la méthode Coupled-Cluster.

Il existe également une autre famille de méthodes qui prend en compte la corrélation électronique appelées méthodes de la fonctionnelle de la densité (DFT). Ces méthodes sont fondées sur des équations dans lesquelles la fonctionnelle énergie est exprimée en fonction de la densité électronique totale du système moléculaire.

### IV.1.5. Calcul de l'énergie potentielle dans l'approximation de Born-Oppenheimer

#### IV.1.5.1. Calcul de l'énergie potentielle en Chimie Quantique [4] [5]

Tout état d'un système constitué de N particules ponctuelles est complètement décrit par une fonction mathématique  $\Psi$  (la fonction d'onde), qui dépend des coordonnées de chacune des particules.

La fonction d'onde ne possède aucune signification physique. Par contre, la quantité  $|\Psi|^2$  permet de déterminer la probabilité de présence des particules dans un élément de volume à un instant donné. De plus à chaque grandeur physique mesurable sur un système correspond à un opérateur mathématique linéaire et hermétique. Ainsi, l'opérateur Hamiltonien  $\hat{H}$  est associé à l'énergie E.

La fonction d'onde exacte est une fonction propre à de l'opérateur Hamiltonien complet :

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \dots (Eq. IV.4)$$

Pour un système multiélectronique, cette équation ne peut se résoudre qu'en effectuant un certain nombre d'approximations.

Expression de l'Hamiltonien total en considérant l'équation de Schrödinger :

Pour une molécule quelconque constituée de K noyaux et de j électrons, l'Hamiltonien s'écrit en unités atomiques :

$$\hat{H}_T = \hat{T}_N + \hat{T}_e + \hat{V}_{eN} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{NN} \dots (Eq. IV.5)$$

$$\hat{H}_T = -\frac{\hbar^2}{2M_K} \sum_K \Delta_K - \frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^n \Delta_i - \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{Z_K e^2}{R_{Ki}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{i>j}^n \frac{e^2}{r_{ij}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{K>L}^N \frac{Z_K Z_L e^2}{r_{KL}} \dots \text{(Eq. IV. 6)}$$

$\Delta$  est l'opérateur Laplacien du K et i défini de la manière suivante :

$$\Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$

Les deux premiers termes représentent respectivement les opérateurs associés aux énergies cinétiques des noyaux et des électrons, et les trois derniers, les opérateurs associés aux interactions électrostatiques entre électrons et noyaux, entre électrons, et entre noyaux.

Avec,

$Z_K$  : numéro atomique du noyau K

$Z_L$  : numéro atomique du noyau L

$M_K$  : masse du noyau K

$r_{KL}$  : distance qui sépare le noyau K du noyau L

$R_{Ki}$  : distance du noyau K d'un point représentant la position de l'électron i

$r_{ij}$  : distance séparant deux points représentant les positions des deux électrons i et j

### IV.1.5.2. Calcul de l'énergie potentielle en Mécanique Moléculaire

Le calcul de l'énergie potentielle se fait ici de façon classique. Ce calcul utilise des fonctions mathématiques simples paramétrées, ne mettant en jeu que les coordonnées nucléaires. Ces paramètres ont été préalablement choisis pour reproduire les résultats expérimentaux ou théoriques (calculs *ab initio*). Cet ensemble est appelé "**Champ de Forces**" et il est représenté par une fonction analytique et un ensemble de paramètres qui lui sont propres.

Les atomes sont considérés comme des points matériels, et les liaisons sont représentés par des ressorts, qui ne peuvent être rompus.

Afin de mieux comprendre le calcul de l'énergie potentielle, nous allons détailler la fonction énergie potentielle pour un champ de forces pris dans son état le plus simple.

### **IV.1.5.3. Concept de Surface d'Energie Potentielle (SEP)**

#### **a. Définition de la Surface d'Energie Potentielle (SEP)**

Comme nous avons décrit précédemment à l'approximation de Born-Oppenheimer, on considère que les électrons peuvent s'ajuster très rapidement à chaque changement de la position des noyaux et l'énergie potentielle de la molécule peut être considérée comme une fonction ne dépendant que des coordonnées nucléaires pour un état électronique donné (la masse des électrons étant beaucoup plus faible que celle des noyaux (le rapport de la masse de l'électron sur la masse du proton est d'environ 1/1800)).

L'Hamiltonien devient :

$$\widehat{H}_T = \widehat{T}_e + \widehat{V}_{eN} + \widehat{V}_{ee} \dots \text{ (Eq. IV. 7)}$$

A chaque position nucléaire correspond une énergie potentielle (énergie électronique + énergie nucléaire de répulsion) de la molécule, appelée point représentatif. L'ensemble des points représentatifs, pour un état électronique donné, définit une Surface d'Energie Potentielle.

Pour un système à N atomes, le système moléculaire est défini à l'aide de 3N coordonnées cartésiennes. Certaines modifications de ces coordonnées engendreront une variation sur l'énergie potentielle et d'autres non. Lorsque tous les atomes se déplacent dans la même direction, ou lorsqu'ils tournent autour d'un même axe, le changement des positions nucléaires n'affecte pas la valeur de l'énergie potentielle. Par conséquent, la Surface d'Energie Potentielle est représentée à l'aide de (3N-6) degrés de liberté pour les systèmes non-linéaires et (3N-5) pour les systèmes linéaires.

L'énergie potentielle pour N atomes peut-être représentée par la fonction :

$$E(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \dots \text{ (Eq. IV. 8)}$$

Avec n = (3N-6) ou (3N-5)

Le calcul d'une grille de points représentatifs de la SEP d'un système contenant beaucoup de degrés de liberté est impossible à l'heure actuelle, compte tenu de la puissance limitée des ordinateurs (puissance des processeurs, capacité de stockage sur disque dur). Heureusement, pour la plupart des études, il n'est pas nécessaire de calculer de nombreux points représentatifs car seuls quelques-uns de ces points ont une signification chimique.

L'exploration de la SEP nous donne, par exemple, des informations sur la structure moléculaire, ainsi que sur la réactivité des différentes espèces.

## **b. Points d'intérêts chimiques sur la SEP**

Sur la SEP, il existe un ou plusieurs points représentatifs qui ont la particularité d'avoir une dérivée première de l'énergie potentielle nulle par rapport à tous les degrés de liberté du système moléculaire.

$$G_i = \left( \frac{\partial E(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)}{\partial x_i} \right)_{j \neq i} = 0 \quad \forall x \dots \text{ (Eq. IV. 9)}$$

Ces points représentatifs sont appelés "points stationnaires".

La nature du point stationnaire est définie par le calcul des dérivées secondes de l'énergie potentielle par rapport à tous les degrés de liberté du système moléculaire, formant le Hessien dont un élément est exprimé par :

$$H_{ij} = \left( \frac{\partial^2 E(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)}{\partial x_i \partial x_j} \right)_{k \neq (ij)} \dots \text{ (Eq. IV. 10)}$$

Après diagonalisation de cette matrice Hessien, nous obtenons les valeurs propres (correspondant aux constantes de force d'un oscillateur harmonique).

Le nombre de valeurs propres négatives nous permet de connaître la nature du point :

- aucune valeur propre négative : le point stationnaire est un minimum sur la SEP (réactif, produit, complexe, intermédiaire de réaction)
  - une valeur propre négative : le point stationnaire est un point selle d'ordre 1 (état de transition).
  - pour un nombre de valeurs propres négatives supérieures strictement à un : le point stationnaire est un point selle d'ordre supérieur
- (Remarque : les points stationnaires ayant plus d'une valeur propre négative ne sont pas des points d'intérêts chimiques)

### **IV.1.5.4. Minimisation d'énergie**

Nous avons rappelé comment calculer l'énergie potentielle de façon quantique et de façon classique (utilisation d'un champ de forces) pour un système moléculaire. Or sur la SEP, seuls quelques points ont un intérêt chimique. Ce sont les minima sur la SEP et les points selle d'ordre 1 (état de transition). Il est important de connaître ces géométries pour pouvoir calculer les différentes propriétés intéressantes.

Pour trouver les minima, des algorithmes de minimisation d'énergie potentielle (d'optimisation de géométrie) ont été développés. A partir d'une géométrie initiale fournie par l'utilisateur, ces algorithmes déplacent les atomes du système moléculaire de manière à converger progressivement vers la structure du point stationnaire la plus proche de la géométrie initiale. En d'autres termes cela consiste à rechercher un jeu de coordonnées d'un minimum de l'énergie potentielle sur la SEP.

La résolution de ce problème ne conduit pas à une solution unique (cela étant dû à la dimension de la SEP) et mène en général au minimum le plus proche de la géométrie initiale. Des méthodes sont basées sur le calcul du gradient de l'énergie, et elles utilisent cette information pour se diriger sur la SEP.

D'autres méthodes sont basées sur le calcul supplémentaire des dérivées secondes de l'énergie potentielle (par rapport aux degrés de liberté de la molécule) et se servent de la courbure pour se déplacer sur la surface.

Les principaux algorithmes utilisés sont :

La méthode de la plus grande pente "Steepest Descent" [6] : Ce premier programme de minimisation pouvant effectuer une optimisation de géométrie est dû à WIBERG (1965). Après le calcul des gradients, l'algorithme suivra la direction imposée par les forces interatomiques.

Cette méthode est très efficace lorsque le système est loin de sa position initiale, mais elle devient vite inadaptée lorsque le système se rapproche d'un minimum sur la SEP ou lorsque la région devient plate (phénomènes oscillants, remontée en énergie).

Le gradient conjugué [6] : cet algorithme est fondé sur le même principe que le "Steepest Descent" mais utilise à chaque nouvelle itération le gradient calculé au nouveau point de référence, et les gradients calculés aux points précédents. La prise en compte de cet historique permet de déterminer plus finement la direction et le pas, et permet une convergence accélérée vers un minimum de l'énergie potentielle.

En règle générale, la minimisation commence par quelques pas en "Steepest Descent" pour se rapprocher très vite du minimum, et pour finir par des pas en "gradient conjugué" pour caractériser le minimum d'énergie potentielle.

Newton-Raphson [6] : cet algorithme reprend le même principe mais ici, la courbure (Hessien) est utilisée pour s'orienter sur la surface. Cette technique est plus gourmande, en temps de calcul, car à chaque point, les dérivées secondes de l'énergie potentielle par rapport aux degrés de liberté doivent être calculées ou estimées

Le procédé de Polak-Ribière [7] : cet algorithme est une méthode conjuguée de gradient en utilisant des recherches unidimensionnelles, comme il améliore d'autres méthodes semblables (telles que Fletcher - Reeves l'algorithme) en considérant également la direction conjuguée précédente. Cette technique n'exige pas de remettre à zéro la direction conjuguée mais elle exige légèrement plus de mémoire tend à converger plus rapidement que la méthode de Fletcher-Reeves.

Nous avons vu que ces différents algorithmes fournissent une géométrie d'équilibre (correspondant à un minimum sur la surface d'énergie potentielle) à partir d'une géométrie initiale fournie par l'utilisateur. Sur la SEP, il y a différents minima dont un minimum global.

### **a. Utilisation de la Mécanique Moléculaire**

Lorsque le nombre d'atomes devient très important (plusieurs milliers d'atomes), il n'est plus possible d'utiliser les méthodes de la Chimie Quantique. Il est indispensable d'avoir recours aux méthodes basées sur la mécanique classique. La Mécanique Moléculaire permet de déterminer la conformation des molécules et leurs propriétés thermodynamiques. Avec cette méthode, nous ne traitons pas explicitement les électrons et nous ne pouvons pas modéliser correctement des phénomènes impliquant des variations importantes de densité électronique mais ce sont des méthodes rapides adaptées aux gros systèmes moléculaires. Quoiqu'il en soit, ces méthodes présentent un inconvénient majeur car elles ne peuvent pas décrire les cassures et formations des liaisons chimiques.

Pour bien pallier cet inconvénient, des méthodes mixtes, notées QM/MM [3] ont été développées et permettent de traiter le cœur du problème au niveau *ab initio* et l'environnement au niveau classique.

### **IV.5. 1. Utilisation de la Dynamique Moléculaire**

La Dynamique Moléculaire consiste à simuler l'évolution du système dans le temps. La simulation génère une trajectoire d'un ensemble fini de particules en intégrant de façon numérique les équations classiques du mouvement. Les trajectoires ainsi déterminées sont utilisées pour évaluer les propriétés statiques et dynamiques par des moyennes temporelles. L'énergie potentielle peut être calculée de façon quantique, pour de petits systèmes moléculaires ou de façon classique en utilisant un champ de forces, pour les plus gros systèmes.

### **c. Méthodes quantiques et semi-empiriques**

En mécanique quantique, on se préoccupe de la distribution des électrons (orbitales) dans l'espace. Les meilleurs programmes comportent des processus d'optimisation de la géométrie. L'objectif de la mécanique quantique est principalement de déterminer l'énergie et la distribution électronique. Ainsi les énergies moléculaires sont calculées en utilisant l'équation de Schrödinger avec le formalisme des orbitales moléculaire (MO). L'équation de Schrödinger d'un système moléculaire peut être résolue sans approximation (*ab initio*), ou en introduisant des approximations (semi-empirique).

Les méthodes semi-empiriques négligent un grand nombre des intégrales multicentriques du terme de répulsion électroniques. Cette réduction du nombre d'intégrale à calculer permet d'utiliser des fonctions de base de Slater pour développer les orbitales atomiques. En outre, seules les orbitales atomiques de la couche de valence sont utilisées. Les intégrales de recouvrement sont négligées dans la procédure SCF, ainsi que toutes les intégrales biélectroniques à trois ou quatre centres. Suivant la méthode de calcul utilisée, certaines intégrales biélectroniques sont également négligées.

Parmi les méthodes semi-empiriques existantes, nous pouvons citer les méthodes suivantes :

- **CNDO/2** : (Complète Neglect of Differential Overlap/version 2) 1ere méthode semi empirique, elle a été proposée par POPLE, SEGAL et SANTRY en 1965. Méthode présentant certains défauts entre autres : elle ne tient compte de la règle de HUND.

- **INDO** :( intermediate Neglect of Differential Overlap) proposée par POPLE et DOBOSH en 1967. Elle permet de distinguer entre les états Singulets et les états triplets d'un système en conservant les intégrales d'échange.

- **MINDO/3** : Proposée par BINGHAM, DEWAR et LO en 1975. Paramétrisation effectuée en se référant aux résultats expérimentaux et non pas aux résultats *ab-initio*, de plus l'algorithme d'optimisation utilise est très efficace (Davidon- Fletcher-Powel).

Cependant, elle surestime la chaleur de la formation des systèmes instables et sous-estime celle des molécules contenant des atomes voisins ayant des paires libres.

- **MNDO** : (Modified Neglect of Diatomic Overlap) proposée par DEWAR et THIEL en 1977. Méthodes basée sur l'approximation NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap) qui consiste à négliger le recouvrement différentiel entre orbitales atomiques sur



des atomes différents. Cette méthode ne traite pas les métaux de transition et présente des difficultés pour les systèmes conjugués.

- **AM 1** : (Austin Model 1) proposée par DEWAR en 1985 qui a tenté de corriger les défauts de MNDO [12].

- **PM3** : (Parametric Method 3) proposée par STEWART en 1989. Elle présente beaucoup de points en commun avec AM1, D'ailleurs il existe toujours un débat concernant les mérites relatifs de paramétrisation de chacune d'elles [13,14].

Au coût d'une précision moindre, les méthodes semi-empiriques permettent le traitement quantique des systèmes dont la taille est importante. Dans cette approximation on peut également envisager de mener des études nécessitant la répétition d'un grand nombre de calculs quantiques.

### IV.1.6. Les descripteurs de QSAR

Dans traditionnel 2D-QSARs (relations quantitative de Structure-Activité), également connu sous le nom approche de HANSCH, des descripteurs pour des effets hydrophobes, stériques, et électroniques sont généralement employés pour corréler et prévoir les activités biologiques [18]. Ces descripteurs sont pris comme constantes de substituant assumées pour être transmissibles d'une série de composés à l'autre. Ils n'impliquent pas les propriétés 3d moléculaires et on rencontre souvent le problème de manquer des valeurs de paramètre.

Ces descripteurs 2D reflètent bien les propriétés physiques dans la plupart des cas, mais sont insuffisants pour expliquer de façon satisfaisante certaines propriétés ou activités, telles que les activités biologiques. Des descripteurs, accessibles à partir de la structure 3D des molécules, ont pu être calculés grâce au développement des techniques instrumentales et de nouvelles méthodes théoriques.

*Les descripteurs 3D* d'une molécule sont évalués à partir des positions relatives de ses atomes dans l'espace, et décrivent des caractéristiques plus complexes ; leurs calculs nécessitent donc de connaître, le plus souvent par modélisation moléculaire empirique ou *ab initio*, la géométrie 3D de la molécule. Ces descripteurs s'avèrent donc relativement coûteux en temps de calcul, mais apportent davantage d'informations, et sont nécessaires à la

modélisation de propriétés ou d'activités qui dépendent de la structure 3D. On distingue plusieurs familles importantes de descripteurs 3D :

– Les *descripteurs géométriques* les plus importants sont le volume moléculaire, la surface accessible au solvant, le moment principal d'inertie.

– Les *descripteurs électroniques* permettent de quantifier différents types d'interactions inter- et intramoléculaires, de grande influence sur l'activité biologique de molécules. Le calcul de la plupart de ces descripteurs nécessite la recherche de la géométrie pour laquelle l'énergie stérique est minimale, et fait souvent appel à la chimie quantique. Par exemple, les énergies de la plus haute orbitale moléculaire occupée et de la plus basse vacante sont des descripteurs fréquemment sélectionnés.

Le moment dipolaire, le potentiel d'ionisation, et différentes énergies relatives à la molécule sont d'autres paramètres importants.

La modélisation moléculaire est aujourd'hui mieux reconnue. D'ailleurs, en 1998, le prix Nobel de chimie a été décerné à JOHN. A. POPLE et W. KOHN pour leurs travaux dans les domaines de la chimie informatique et de la modélisation moléculaire (chimie quantique) [11].

### **Chimie quantique : DFT**

- on traite que des électrons mais pas des noyaux donc on regarde la structure électronique et les noyaux restent fixes
- les électrons sont localisés sur des liaisons
- méthode quantique mais moins exigeante en temps de calcul.
- base utile pour les métaux de transitions

### **Méthodes semi-empiriques :**

- on regarde seulement les électrons de valence
- avec un Hamiltonien plus simple

La chimie quantique donc couvre :

- réarrangements
- intermédiaires de réaction
- états de transition
- réactions de transfert

### **Mécanique moléculaire : à**

- On positionne les atomes avec une distribution implicite des électrons.
- Mais on ne peut pas modéliser, par exemple, un transfert de protons ni une tautomérisation car les longueurs de liaison changent.

### **Temps de calcul HYPERCHEM pour vérification :**

Quantique :  $N^4$

N= nombre d'orbitales

Semi-empirique :  $N^3$

Empirique (MM) :  $n^2$

n= nombre d'atomes

## **IV.2. TRAVAUX EXPÉRIMENTALS**

La partie suivante est majoritairement consacrée à la présentation des travaux théoriques qui ont précédé mes travaux de thèse, pour montrer les domaines d'application de ces méthodes et leur fiabilité. Des encarts sont insérés dans le texte afin d'expliquer certains détails concernant, les travaux présentés, pour aider le lecteur à la compréhension.

L'avantage des méthodes semi-empiriques des calculs est non seulement qu'elles sont plusieurs ordres de grandeur plus rapidement, mais également les calculs pour des systèmes jusqu'à 200 atomes sont possibles avec les méthodes semi-empiriques seulement. La qualité des méthodes semi-empiriques pour un éventail de molécules et le calcul de différentes propriétés a été sujet de plusieurs revues [10].

En général, l'utilisation des méthodes PM3 au niveau HARTREE-FOCK (HF) est suffisante pour la description théorique des composés de dithiolethiones [17].

### **IV.2.1. Modélisation moléculaire et calcul de propriétés moléculaires**

Dans le travail de cette thèse, des calculs de modélisations moléculaires ont été exécutés en utilisant HyperChem 8,0. C'est un logiciel de modélisation moléculaire, qu'a été développé par Autodesk, INC, et distribué par Hypercube, INC (Ontario, Canada).

Le champ de force de mécanique moléculaire de MM<sup>+</sup> était la première course à obtenir près de la géométrie optimisée.

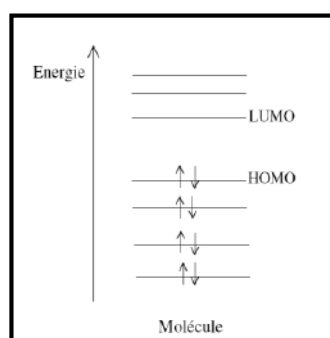
La conformation obtenue à partir de la mécanique moléculaire a été soumise à une optimisation de raffinement de la géométrie en utilisant la méthode semi-empirique PM3. Les calculs de semi-empirique résolvent l'équation de Schrödinger pour décrire les propriétés électroniques des atomes et des molécules.

Nous avons également utilisé l'algorithme conjugué de gradient dû à Polak—Ribière comme technique de minimisation et gradient de RMS de 0,01 kcal mol<sup>-1</sup> pour définir la condition d'arrêt dans le processus itératif.

La stabilité, la réactivité et les effets physiologiques des dithiolethiones sont couramment reliés à leur famille, la nature de leurs substituants et à leur structure moléculaire (géométrie). Afin de corrélérer avec plus de précision les données expérimentales sur les activités avec la structure des molécules et de quantifier ces relations, des études théoriques ont été entreprises par modélisation moléculaire. En effet, la modélisation moléculaire de dithiolethiones par mécanique quantique permet d'accéder à de nombreuses propriétés moléculaires.

A travers ces méthodes de modélisation moléculaire plusieurs paramètres peuvent être obtenus :

- Paramètres structuraux de la molécule : longueurs de liaison, angles de valence, angles de torsion, liaisons hydrogènes,
- Paramètres énergétiques : enthalpie de formation,
- Paramètres stériques : volume et surface moléculaires, réfraction moléculaire.
- Paramètres hydrophobiques :  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$ .
- Paramètres électroniques : énergies et délocalisation des orbitales (HOMO, LUMO), électronégativité ( $\chi$ ), électroaffinité (EA),
- La HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital), c'est la dernière orbitale moléculaire occupée dans un système à couches fermées.
- La LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), c'est la première orbitale moléculaire inoccupée dans un système à couches fermées.



**Figure IV.1 :** Représentation des niveaux énergétiques

Nos calculs semi-empiriques (MNDO-PM3) montrent que la conformation de plus basse énergie donnent des résultats d'enthalpie de formation correspondant aux conformations les plus stables, et qui sont donnés dans le tableau IV.1, alors que les données structurales choisies pour la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione (C) sont présentés dans le tableau IV.2.

**Tableau IV.1 :** Valeurs d'enthalpie de formation

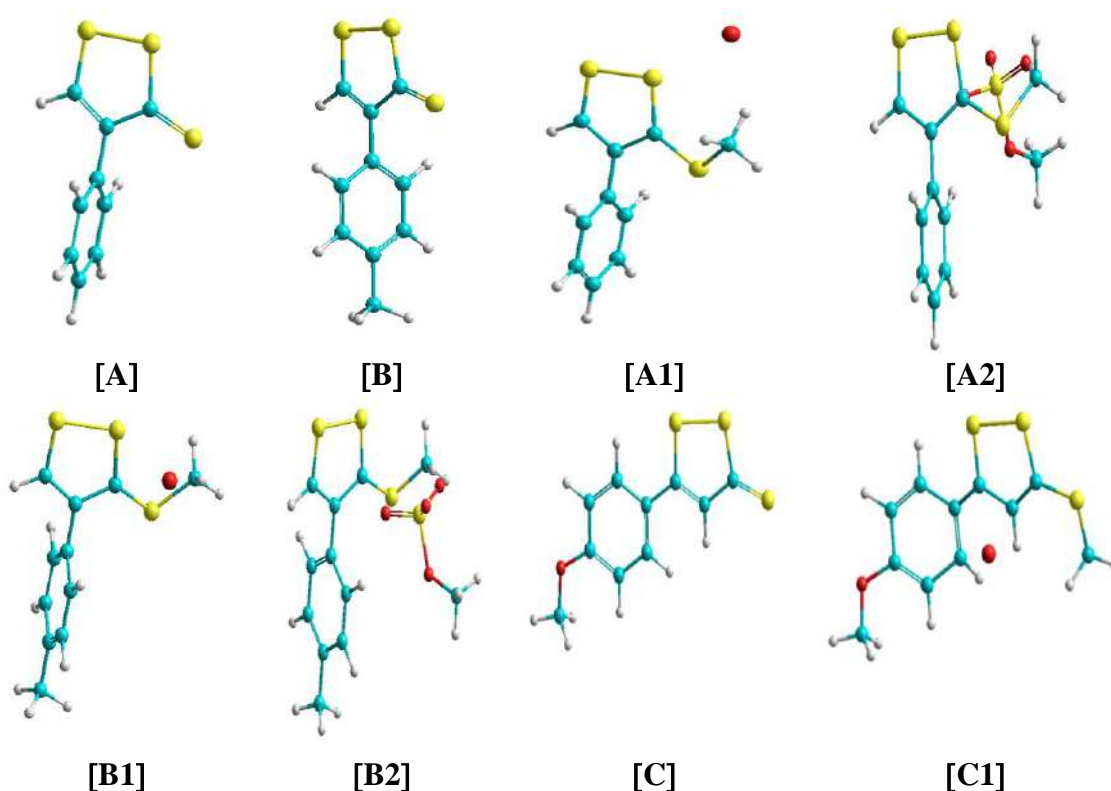
Dithiolethiones	A	B	A1	B1	A2	B2	C	C1
$\Delta H_f$ (Kcal/mol)	95,04	85,80	96,68	87,27	-47,50	-56,83	56,38	61,01

### Etude conformationnelle

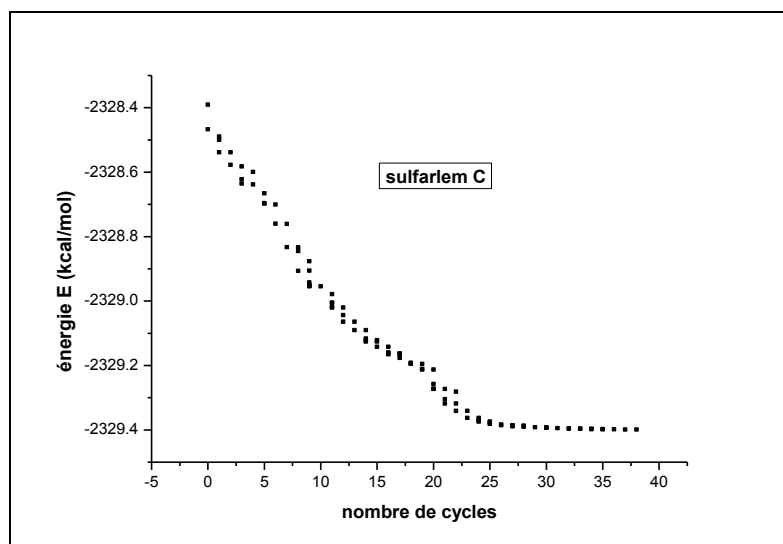
Les structures de dithiolethiones, obtenues après minimisation sont regroupées dans la figure IV.2.

Pour relier la structure des dithiolethiones à leur activité, une analyse conformationnelle de ces molécules a été souvent réalisée. Cette étape permet de déterminer la structure la plus stable.

L'analyse conformationnelle des dithiolethiones a été effectuée par rotation de la liaison entre la partie du substituant en position 4, 5 et le cycle dithiolique (angle dièdre  $\theta$ ). D'après ces travaux, les 5 aryles possèdent une structure plane. Par contre les 4 aryles possède une structure perpendiculaire  $\theta = 90^\circ$  (Voir figure IV. 2).



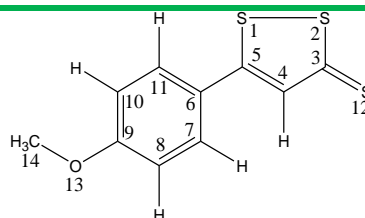
**Figure IV.2 :** Vue "ball and sticks" de conformation la plus stable des dithiolethiones



**Figure IV.3 :** Stage initiale d'optimisation de géométrie

Puisque la géométrie initiale a une grande énergie presque -2328,3909 Kcal/mol, le système évidemment est très loin à aucune point stationnaire voir le figure IV.3, puis l'optimisation de la géométrie semble avec l'augmentation de nombre de cycle qui s'accompagne d'une diminution d'énergie jusqu'à l'énergie sera constant.

**Tableau IV.2 :** Les longueurs des liaisons et les angles dans le composé (C)



$d_{1-2}=2,07\text{\AA} (2,071\text{\AA}^\circ[18])$	$d_{3-12}=1,574\text{\AA} (1,575\text{\AA}^\circ[18])$	$(1-5-4)=116,4^\circ (116,6^\circ[18])$
$d_{2-3}=1,77\text{\AA} (1,77\text{\AA}^\circ[18])$	$d_{9-13}=1,375\text{\AA} (1,375\text{\AA}^\circ[18])$	$(5-1-2)=94,1^\circ (94,1^\circ[18])$
$d_{3-4}=1,444\text{\AA} (1,444\text{\AA}^\circ[18])$	$d_{131-4}=1,407\text{\AA} (1,410\text{\AA}^\circ[18])$	$(5-4-6)=122,89^\circ (122,8^\circ[18])$
$d_{4-5}=1,364\text{\AA} (1,364\text{\AA}^\circ[18])$	$(1-2-3)=97,95^\circ (97,8^\circ[18])$	$(5-6-7)=119,8^\circ (119,8^\circ[18])$
$d_{1-5}=1,758\text{\AA} (1,758\text{\AA}^\circ[18])$	$(2-3-4)=110,7^\circ (110,0^\circ[18])$	$(9-13-14)=117,5^\circ (117,5^\circ[18])$
$d_{5-6}=1,456\text{\AA} (1,456\text{\AA}^\circ[18])$	$(3-4-5)=120,76^\circ (120,5^\circ[18])$	

6-atomes de phényle :  $1,383\text{\AA} \leq d_{C-C} \leq 1,407\text{\AA}$  ;  $119,3 \leq (C-C-C) \leq 120,9^\circ$

On constate que nos résultats de distance entre les atomes et les angles pour le composé 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiolethione (C) sont en accord avec les travaux de BOTREL A. [18].

### IV.2.2. Analyse de la relation quantitative structure-activité chélatrice (QSAR)

Dans cette étude, nous faisons intervenir les résultats expérimentaux obtenus dans l'évaluation des propriétés antioxydantes des composés avec le test au chélation de Fe<sup>2+</sup>. Dans ce modèle, nous avons incorporé dans un premier temps l'ensemble des composés pour lesquels nous avons déterminé une CI<sub>50</sub>. Ces composés sont les dithiolethiones et ses dérivés soit au total 8 composés.

Donc, l'objectif de ce travail était de corrélérer l'activité chélatrice des 8 composés de dithiolethiones, à des variables d'ordre stériques, hydrophobiques et électrostatiques, par une étude MLR.

### Régression linéaire multiple (MLR)

La régression linéaire multiple est la méthode la plus simple de modélisation. Elle consiste à rechercher une équation linéaire par rapport à ses paramètres, reliant la variable à modéliser  $y$  au vecteur d'entrées  $X_1, X_2, \dots, X_n$ . L'équation linéaire recherchée est de la forme :

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_nX_n + C \dots (\text{Eq.IV.11})$$

Où  $a_1, a_2, \dots, a_n$  et  $C$  sont les coefficients de la régression.

La détermination de l'équation (IV.11) se fait alors à partir d'une base de données de  $n$  échantillons pour laquelle a la fois les variables dépendantes et la variable indépendante sont connues. Il s'agit donc de considérer un système de  $m$  équations.

	Descripteur 1	Descripteur 2	...	Descripteur m	activité
Molécule 1	$X_{11}$	$X_{12}$		$X_{1m}$	CI <sub>50</sub>
Molécule 2	$X_{21}$	$X_{22}$		$X_{2m}$	CI <sub>50</sub>
...	...	...	...	...	...
Molécule N	$X_{n1}$	$X_{n2}$	...	$X_{nm}$	CI <sub>50</sub>



L'équation d'analyse de la variance :

$$SST = SSY + PRESS$$

Pour valider les modèles, il existe plusieurs critères de choix. Ces critères dépendent des usages que l'on fait de la régression. Le critère  $R^2$  qui est le coefficient de détermination, est calculé par l'équation suivante :

$$R^2 = 1 - \frac{PRESS}{TSS} = \frac{SSY}{TSS}$$

Le second critère est la valeur du *PRESS* (*Predictive Residual Sum of Squares*) qui doit être la plus faible possible pour le vecteur considéré.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

$y_i$  est la valeur observée,  $\hat{y}_i$  est la valeur estimée, et  $n$  le nombre d'observations.

Le troisième critère est la somme des carrés totaux (*Total Sum of Squares*) (*TSS*):

$$TSS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$\bar{y}$  est la moyenne des valeurs observées

Le quatrième critère est la somme des carrés des écarts expliquée (*Sum of the squares of the response value*) *SSY* :

$$SSY = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

Le cinquième critère est l'erreur quadratique moyenne *MSE* (*Mean Square Error*) définie par la relation [25]:

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - m}$$

$n$  = nombre d'échantillon,  $m$  = nombre des variables indépendantes.

Le sixième critère est l'écart type ( $s$ ) est un autre paramètre habituellement rapporté ; il indique dans quelle mesure la fonction de régression prédite les données observées. Nous rappelons que dans les plusieurs références [25] l'écart type est connu sous le nom de Erreur Standard (*SE*), ce paramètre est donnée par [26]:

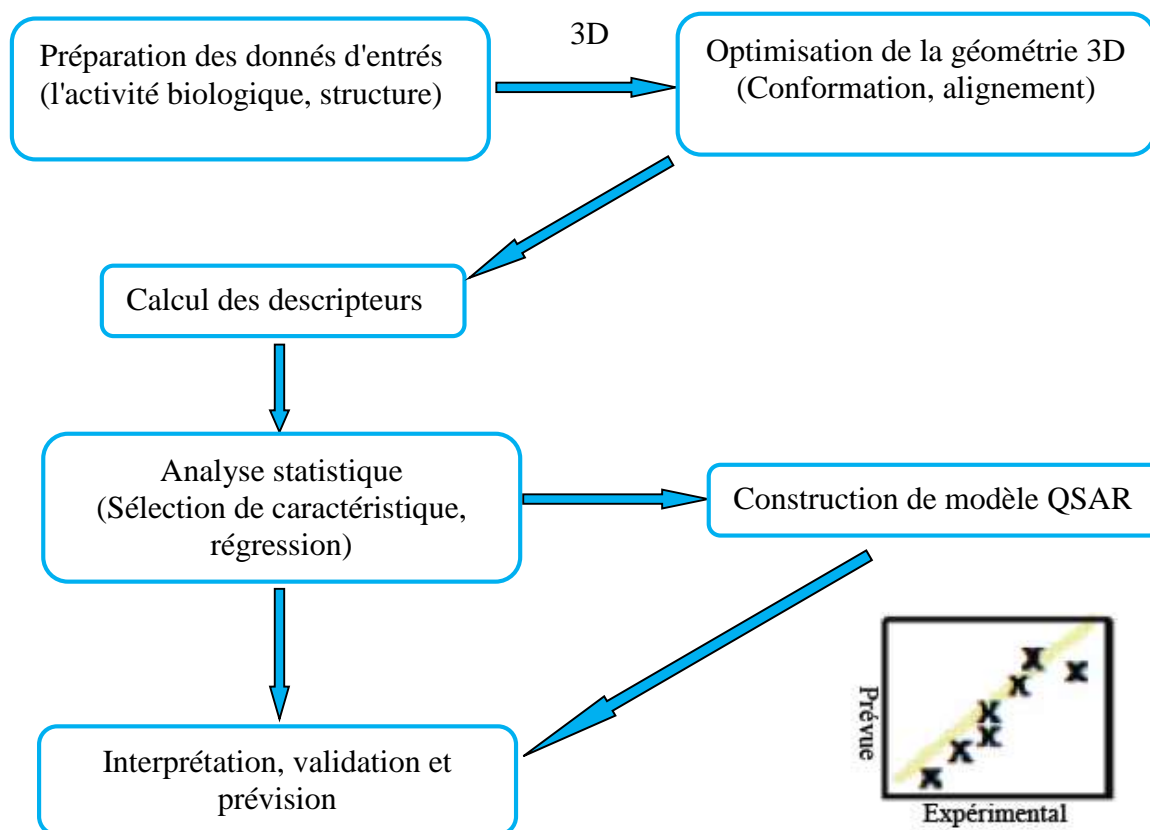
$$s = SE = \sqrt{MSE} = \sqrt{\frac{1}{n - m} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

Le septième critère est la validation standard des erreurs de prédiction ( $S_{PRESS}$ )

$$S_{PRESS} = \frac{\sqrt{PRESS}}{n - m - 1}$$

En fin, l'erreur de prédiction ( $PE$ ). Ce paramètre statistique est calculé à partir de la relation suivante [24] :

$$PE = \frac{2(1 - R^2)}{3\sqrt{n}}$$



**Figure IV.4** : Principes d'une génération de modèle QSAR en 3D

Nous donnons dans le tableau IV-3 les paramètres moléculaires comme ( $\mu$ ,  $E_{HOMO}$ ,  $E_{LUMO}$ ,  $\chi$ ,  $MR$ ) de tous dérivés des dithiolethiones étudiées que nous avons obtenue dans notre laboratoire par la méthode semi-empirique MNDO-PM3[20], pour les valeurs de coefficient de partage  $\log P_{n-octanol/eau}$  sont déterminés expérimentalement (voir chapitre III).

**Tableau IV.3 :** Paramètres moléculaires et  $CI_{50}$  (L'activité chélatrice) entrés dans la relation quantitative structure-activité étudiée

Dithiolethiones	$\mu$	$E_{HOMO}$	$E_{LUMO}$	$\chi$	MR	$log P_{n-octanol/eau}$	L'activité chélatrice $CI_{50}$ (mM)
<b>A</b>	3,387	-8,938	-2,665	5,801	66,63	3,230	0,510
<b>B</b>	3,581	-8,910	-2,640	5,775	70,91	3,490	0,507
<b>A1</b>	1,401	-8,626	-2,378	5,502	84,14	1,947	1,240
<b>B1</b>	1,706	-8,605	-2,356	5,480	88,43	2,353	2,072
<b>A2</b>	14,40	-9,105	-3,972	6,538	81,81	0,450	0,470
<b>B2</b>	15,46	-9,030	-4,022	6,526	86,10	1,240	0,749
<b>C</b>	5,736	-8,856	-2,601	5,728	74,20	3,820	1,158
<b>C1</b>	3,141	-8,242	-2,390	5,316	92,90	2,250	0,758

La régression linéaire multiple est générée par l'utilisation de logiciel Origin Pro, version 8 et nous avons obtenu une équation de QSAR.

$$CI_{50} = -42,90068 - 0,07959 \mu - 319,9437 E_{HOMO} - 315,41091 E_{LUMO} - 632,06026 \chi + 0,13423 MR + 0,30795 \log P \dots (Eq.IV.12)$$

(n= 8 R<sup>2</sup> = 0,99 s= 0,16 F = 58 , 21581)

Cette relation contient des propriétés électroniques comme :  $E_{HOMO}$ ,  $E_{LUMO}$ ,  $\mu$  et des propriétés stériques comme MR et enfin le facteur de lipophilie  $log P_{n-octanol/eau}$ .

La comparaison entre les données de la modélisation moléculaire et celles des activités étudiées afin d'obtenir des tendances. Cette méthode permet d'estimer pour chaque variable moléculaire si elle a une influence.

Il apparaît clairement que l'énergie de l'orbitale HOMO, l'énergie de l'orbitale LUMO et l'électronégativité  $\chi$  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 le coefficient de partage  $log P$ , le moment dipolaire  $\mu$  et la réfractivité molaire MR.

A partir de la relation QSAR chaque propriété influe des effets négatifs ou positifs sur l'activité chélatrice des ions ferreux :

- Les énergies de **HOMO**, **LUMO** sont des propriétés importantes des plusieurs processus chimiques et pharmacologiques.
- L'énergie HOMO mesure le caractère donneur d'électron par le composé étudié par contre l'énergie LUMO mesure leur caractère d'attracteur.

On peut définir l'affinité électronique et le potentiel d'ionisation par les relations suivantes :

$$A = -E_{LUMO} \text{ et } PI = -E_{HOMO}$$

Dans cette corrélation de QSAR, il est évident que l'activité chélatrice soit associée à une grande contribution du paramètre HOMO. Par exemple, prenant la valeur de ( $E_{HOMO} = -8.605\text{eV}$ ) pour le composé (**B1**) (tableau IV.3), les contributions relatives dans Eq. IV.12 est (+ **2753,1155**). L'aspect de ces limites dans l'expression de QSAR est inattendu pendant qu'elles impliquent que le potentiel d'ionisation est un facteur important dans l'activité antioxydante.

Le composé chélateur ne donne pas des électrons à l'orbitale inoccupée d'ion  $\text{Fe}^{2+}$  mais aussi accepte des électrons de ce orbitale pour former une liaison coordinative.

L'activité chélatrice de dithiolethiones est réalisée par l'intermédiaire de différents groupes chimiques liant le fer, comme le groupe ( $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ ) des sels de dithiolethiones et les sites de localisation de la contribution de la HOMO.

Une bonne corrélation linéaire est trouvée entre les énergies HOMO/LUMO de dithiolethiones et l'activité chélatrice.

Aussi, l'électronégativité corrèle avec l'activité antioxydante étudiée par un grand coefficient négatif (-**632,06026**).

Nous nous intéressons maintenant à la distribution de la HOMO. Sa représentation spatiale peut nous apporter des informations sur les sites concernés par le transfert d'électron.

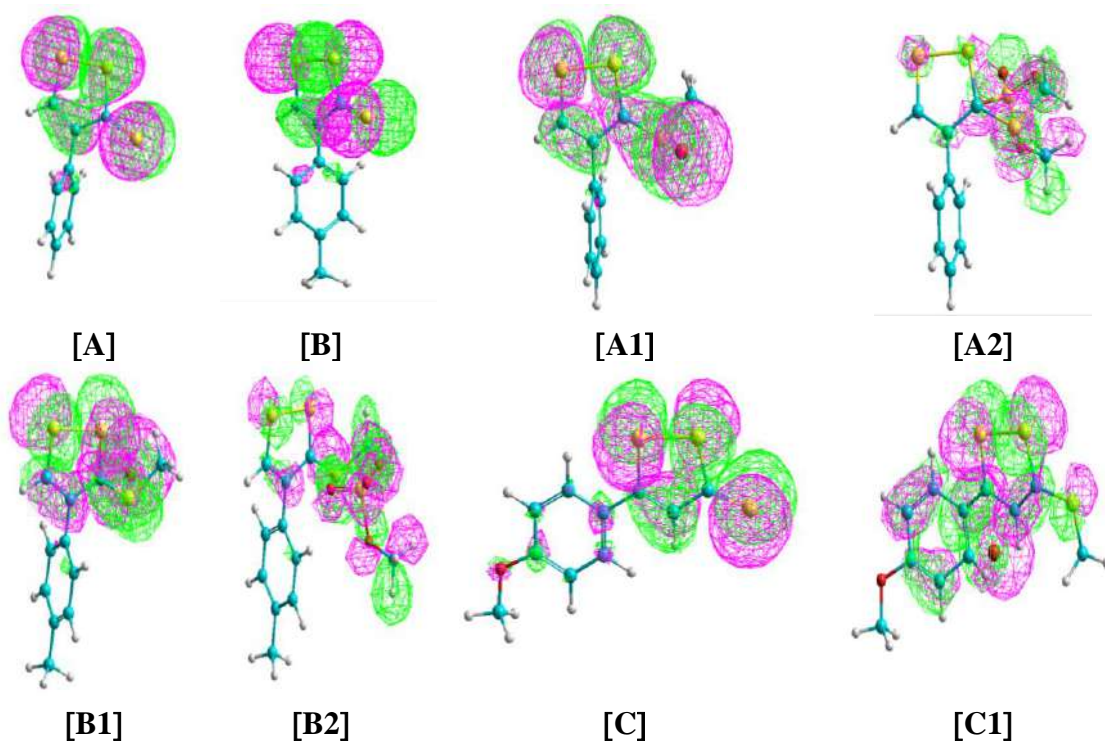
Pour visualiser la contribution des différents atomes pour la HOMO, cette dernière a été représentée sous forme de surfaces pour les 4-aryl-1,2-dithiolethione et la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiolethione.

Pour la 4-phényl-1,2-dithiolethione (**A**), la 4-p-tolyl-1,2-dithiolethiones (**B**), la contribution de la HOMO est localisée sur les atomes soufrés de cycle dithiole, la double liaison C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, la fonction thiocarbonyle C<sub>3</sub>=S et partiellement sur la double liaison de cycle phényle. Pour la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiolethione (**C**), cette orbitale est localisée majoritairement au niveau du cycle dithiolique, la double liaison C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, la fonction thiocarbonyle C<sub>3</sub>=S, le cycle phényle et l'atome d'oxygène de groupe méthoxy.

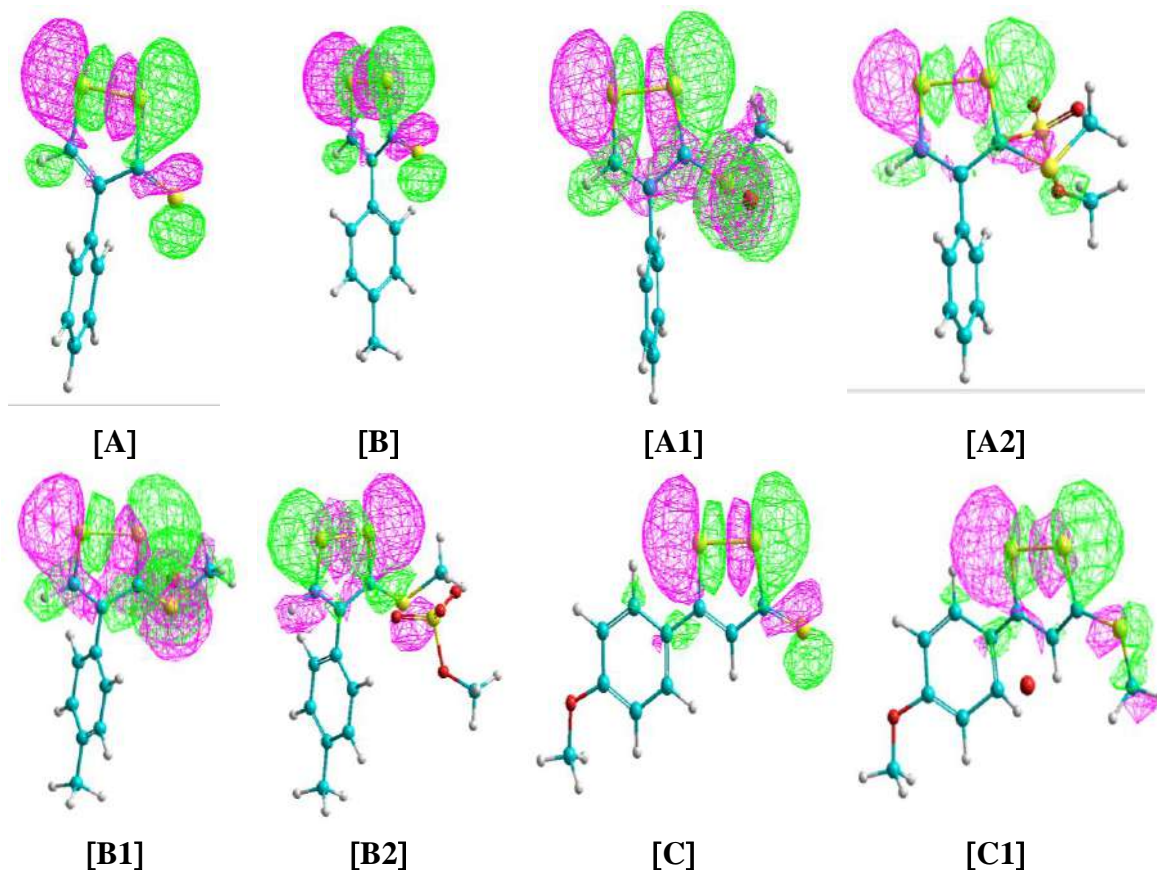
Nous observons que la HOMO est localisée aux mêmes endroits sur les **A1** et **B1**. La faible délocalisation sur le cycle phényle dans ces deux composés, explique la faible activité mais non nulle. Pour **A2** elle est majoritairement localisée sur le contre ion (méthyle sulfate), et pour **B2** elle se situe sur le cycle dithiolique et sur le contre ion correspondant. **C1** a une distribution plus étendue sur les deux cycles (phényle et dithiolique). Tandis que l'orbitale moléculaire LUMO se répartie sur tous les atomes constitutif du cycle dithiolique avec une certaine délocalisation le long de C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Cette distribution des orbitales frontières ont montrent l'existence de la délocalisation des électrons  $\pi$  dans le système conjugué de la molécule. En plus pour les sels iodés **A1** et **B1** la LUMO se situé sur le contre ion (I<sup>-</sup>) par contre les sels **A2** et **B2** la LUMO ne se répartie pas sur le contre ion (CH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup>), en fin la répartition de LUMO dans les composés **C** et **C1** est presque la même.

Nous avons montré que les dithiolethiones sont des bonnes chélateurs des ions ferreux. Nous proposons que cette réactivité soit liée au transfert d'électron de la HOMO vers la molécule.

De plus, la distribution de la HOMO et LUMO sur l'antioxydant permet de connaître les sites où peuvent se produire ce transfert d'électrons. Les paramètres de la HOMO et LUMO sont calculés à partir de la conformation la plus stable avec la méthode MNDO-PM3. Les orbitales frontières HOMO et LUMO de l'état fondamental des dithiolethiones sont représentées dans la figure IV.5 et la figure IV.6.



**Figure IV.5 :** Représentation de la HOMO de la structure optimisée des dithiolethiones (méthode semi-empirique MNDO-PM3)



**Figure IV.6 :** Représentation de la LUMO de la structure optimisée des dithiolethiones (méthode semi-empirique MNDO-PM3)

**Le moment dipolaire ( $\mu$ ) :** d'après le tableau IV.3, les dithiolethiones semblent polaires, alors ce genre de composé favorise la formation des chélateurs avec  $\text{Fe}^{2+}$ .

Le coefficient négative de  $\mu$  dans l'éq (IV.12) indique que la corrélation entre l'activité chélatrice et le moment dipolaire est positive. Des résultats similaires à ceux que nous avons obtenus pour le moment dipolaire  $\mu$  ont été reportés par ARDAKANI R. B. *et Coll.* [26]. Ces auteurs ont constaté que le *Log CMC* (Critical Micelle Concentration) augmente avec la diminution de  $\mu$ .

Le moment dipolaire élever aux cas des sels dithioliques avec contre ion ( $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ ) **A2** et **B2**, ce qui reflète une augmentation de l'activité chélatrice.

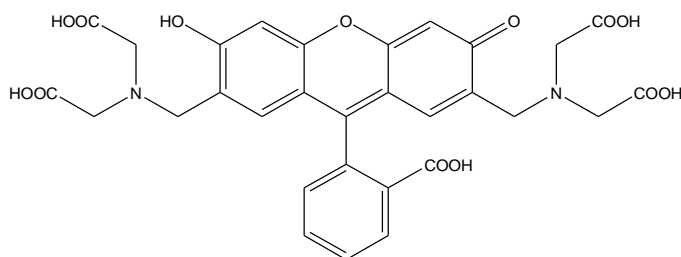
La présence d'un groupe donneur en position  $\text{C}_5$  (sulfarlem **C**) provoque l'augmentation du moment dipolaire il provient de la présence d'un effet de résonance résultant d'effet mésomère donneur de groupe 5-p-méthoxyphényl vers le noyau dithiolethione.

**Le coefficient de partage  $\log P_{n\text{-octanol/eau}}$  :** ce coefficient est très largement utilisé dans des études de relations structure-activité quantitatives (QSAR<sub>s</sub>) dans les sciences pharmaceutiques, biochimiques, toxicologiques et dans les sciences de l'environnement. La lipophile intéresse donc tout autant la communauté, elle étudie les problèmes de santé humaine que celle impliquée dans les problèmes de l'environnement.

Le rapport hydrophilie / hydrophobie, ou la lipophilie d'un chélateur du fer serait un facteur important dans la détermination de l'utilisation de celui-ci comme agent antipaludique potentiel.

La calcéine fluorescente (un analogue de l'EDTA), qui lie très fortement le fer ferrique, pénètre très difficilement dans les cellules et n'inhibe la croissance plasmodiale qu'à de fortes concentrations.

Un dérivé hydrophobe de l'acétométhoxyl- calcéine (chélateur de fer), est 200 fois plus actif que la calcéine (Voir la figure IV.7) [19,27].



**Figure IV.7 :** Structure de calcéine

Dans notre travail la lipophilie des dithiolethiones sont corrélés directement avec l'activité chélatrice, c'est à dire l'activité chélatrice augmente avec la diminution du  $\log P$ .

**La réfractivité molaire (MR)** est la mesure de volume qui est occupé par un atome ou groupes des atomes. La MR s'obtient grâce à l'équation suivante :

$$MR = \frac{MW}{d} \times \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \dots (Eq. IV. 13)$$

Où:

- **n**: est l'indice de réfraction
- **MW**: est la masse moléculaire
- **d**: représente la densité

Ceci est particulièrement important si le substituant possède des électrons  $\pi$  ou des paires électroniques libres.

Aussi si la masse moléculaire est grande (cas les sels dithioliques iodés) possèdent une réfractivité moléculaire plus important.

Une bonne corrélation linéaire est trouvée entre le coefficient de partage  $\log P$  de dithiolethiones et la réfractivité molaire MR avec  $R^2 = 0,84$  (tableau IV.6).

Enfin, l'équation (IV.12) montre que l'activité chélatrice peut être diminuée avec l'augmentation de (MR), mais cette influence est minimale à cause de faible coefficient (+0,13423) dans cette équation. Le signe positif du MR dans QSAR équation explique que le substituant se lie à la surface polaire [23].

Afin de tester la validité de pouvoir prédictif des modèle QSAR sélectionné, la technique de validation croisée par omission *LOO* (*leave-one-out*) a été utilisée. Le modèle développé a été validé par le calcul des paramètres statistiques suivants : la somme des carrés résiduels (PRESS), la somme des carrés totaux (TSS), coefficient de détermination  $R^2$  et l'erreur standard (SE).

La somme résiduelle prédictive des carrés (PRESS, *Predictive Residual Sum of Squares*) est une mesure des capacités prédictives d'un modèle. La petite valeur de PRESS signifie la meilleure prévisibilité du modèle [20].

En outre, pour un modèle raisonnable de QSAR, le rapport PRESS/SSY doit être inférieur à 0,4 [23]. Les résultats présentés dans le tableau IV.4 indiquent que ce rapport est de 0,0057.



**Tableau IV.4** : Paramètres de validation croisée (activité chélatrice)

Model	PRESS	SSY	PRESS/SSY	s(SE)	S <sub>PRESS</sub>	R <sup>2</sup>	6PE
Eq.IV.12	0,0515	8,99386	0,0057	0,16	0.227	0,994	0,014

Les modèles QSAR développés présentent des faibles valeurs minimal de S<sub>press</sub> ce qui indique que les deux modèles présentent des petites valeurs résiduelles entre les activités biologique observées et prédites.

On peut également utiliser le paramètre s qui rend compte des variations d'erreur des prédictions. Le modèle QSAR développé présente une faible valeur d'écart type (s=0,16) ce qui indique que le modèle présente de petite valeur résiduelle entre les activités chélatrice expérimentales et prédites.

Pour ce modèle de QSAR la condition R > 6PE est satisfaite, ce qui indique que le modèle possède un bon pouvoir prédictif [24]. La valeur de 6PE est présenté dans le tableau IV.4 indique que la corrélation proposée est bonne.

Cette analyse de QSAR donne aussi les résultats suivants :

- La valeur de R<sup>2</sup> est de 0,99.

- Le **test de Fisher**, ou **test F** est un test d'hypothèse statistique qui permet de tester l'égalité de deux variances en faisant le rapport des deux variances et en trouvant que ce rapport ne dépasse pas une certaine valeur théorique que l'on cherche dans le tableau de Fisher .

Si F est plus grand que la valeur théorique, on rejette l'hypothèse d'égalité des deux variances. Notre résultats montrent que (**F = 58,21581**), cette valeur est plus grande qu'une valeur critique lue dans une table de Fisher (**19,33**). Le modèle dont la valeur de F est supérieure à F<sub>crit</sub> est statistiquement significatif.

Le tableau de Fischer pour un risque de 5 % est joint en Annexe I p.191.

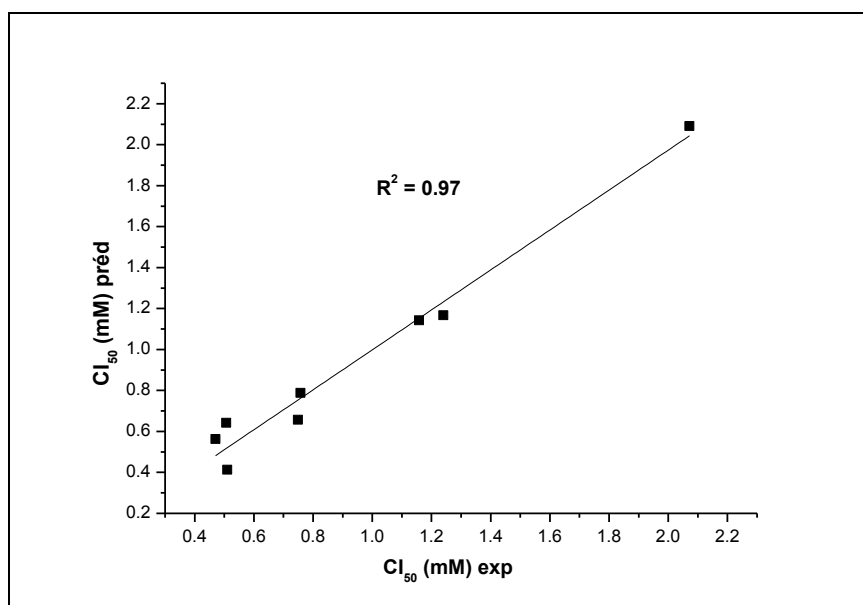
A fin d'analyser les erreurs de nos résultats pour l'activité chélatrice, l'erreur absolue AE est calculé par la relation suivante :

$$AE = |CI_{50}(\text{prédite}) - CI_{50}(\text{expérimental})|$$

**Tableau IV.5 :** Valeurs des activités prévues et expérimental de l'ensemble de dérivés de 1,2-dithiole-3-thione

Composé	CI <sub>50</sub> (expérimental)	CI <sub>50</sub> (prédite)	AE
A	0,510	0,41331	0,096
B	0,507	0,64231	0,135
A1	1,240	1,16727	0,072
B1	2,072	2,09133	0,019
A2	0,470	0,56249	0,092
B2	0,749	0,65673	0,092
C	1,158	1,14287	0,015
C1	0,758	0,78769	0,029

La figure IV.8 présente la corrélation entre les valeurs prédites et expérimentales pour l'activité de chélation des dérivés de 1,2dithiole-3-thione. Du point de vue des performances statistiques, ce modèle présente de coefficient de détermination R<sup>2</sup> est égale à 0,97. Il indique que ce modèle peut être appliqué avec succès pour prédire l'activité chélatrice pour les dithiolethiones étudiés.



**Figure IV.8 :** Corrélation entre les CI<sub>50</sub> (chélation) calculés et observés

A partir des résultats précédents nous avons trouvé le facteur de corrélation R entre les propriétés moléculaires (voir tableau IV.5), nous avons remarqué que les valeurs de R entre l'énergie de l'orbitale HOMO, LUMO et  $\chi$  est 0,9999 à cause de relation de calcul de  $\chi$  :

$$\chi = -\left(\frac{HOMO + LUMO}{2}\right) \dots (Eq. IV. 14)$$

**Tableau IV.6 :** Le facteur de corrélation entre les différentes propriétés moléculaires impliquées dans le modèle relation structure activité de chélation (valeurs de R)

	$\mu$	HOMO	LUMO	$\chi$	MR	$\log P$
$\mu$	1					
HOMO	0,54365	1				
LUMO	0,55147	0,99995	1			
$\chi$	0,54562	1	0,99997	1		
MR	-0,68104	-0,59568	-0,60071	-0,59725	1	
$\log P$	-0,82226	-0,53163	-0,53864	-0,53361	0,84432	1

Ainsi, l'analyse de 3D/QSAR des composés étudiés permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les structures choisies pourraient posséder une activité chélatrice importante qui dépendrait non seulement du l'accroissement les énergies HOMO/LUMO mais également de la présence de lipophilie moyenne.
- Les valeurs prédictives de  $CI_{50}$  des dithiolethiones sont les moins modifiées.
- Toutes les molécules possédant un contre ion  $CH_3SO_4^-$  sont 4 à 5 fois plus puissantes que celles possédant un iodure ( $I^-$ ) sur cette position.

### IV.2.3. Analyse de la relation quantitative structure-activité anti-hémolyse (QSAR)

L'objectif de ce travail était de corrélérer l'activité anti-hémolyse des 8 composés de dithiolethiones, à des variables d'ordre stériques, hydrophobiques et électrostatiques, par une étude MLR.

**Tableau IV.7 :** Paramètres moléculaires et (le pourcentage anti-hémolyse) entrés dans la relation quantitative structure-activité étudiée

Dithiolethiones	$\mu$	$E_{\text{HOMO}}$	$E_{\text{LUMO}}$	$\chi$	MR	$\log P$ <i>n-octanol/eau</i>	pourcentage anti- hémolyse %
A	3,387	-8,938	-2,665	5,801	66,63	3,23	59,73
B	3,581	-8,910	-2,640	5,775	70,91	3,49	61,29
A1	1,401	-8,626	-2,378	5,502	84,14	1,947	35,71
B1	1,706	-8,605	-2,356	5,480	88,43	2,353	44,04
A2	14,40	-9,105	-3,972	6,538	81,81	0,45	39,66
B2	15,46	-9,030	-4,022	6,526	86,10	1,24	43,33
C	5,736	-8,856	-2,601	5,728	74,20	3,82	57,86
C1	3,141	-8,242	-2,390	5,316	92,90	2,25	50,95

La régression linéaire multiple est générée par l'utilisation de logiciel Origin Pro, version 8 et nous avons obtenu une équation de QSAR.

$$\text{Pourcentage anti-hémolyse} = 355 - 3,77748 \mu - 3926,69862 E_{\text{HOMO}} - 4034,08089 E_{\text{LUMO}} - 7954,15587 \chi - 0,50011 \text{MR} + 14,61757 \log P \dots \text{(Eq. IV.15)}$$

$$(\text{n} = 8, \text{R}^2 = 0,999, \text{s} = 19,01745 \text{ et } \text{F} = 350,58313)$$

Il apparaît clairement que l'énergie de l'orbitale HOMO, l'énergie de l'orbitale LUMO, l'électronégativité  $\chi$  et le coefficient de partage  $\log P$  sont des paramètres très importants vue leur fort poids. Secondairement, nous constatons également que d'autres paramètres possèdent une importance minimum mais non négligeable ; ces paramètres sont le moment dipolaire  $\mu$  et la réfractivité molaire MR.

A partir de la relation QSAR chaque propriété influe des effets négatifs ou positifs sur l'activité anti-hémolyse des globules rouges : Les énergies de **HOMO**, **LUMO** sont des propriétés importantes de l'activité anti-hémolyse.

Dans cette corrélation de QSAR, il est évident que l'activité anti-hémolyse soit associée à une grande contribution du paramètre HOMO. Par exemple, prenant la valeur de ( $E_{\text{HOMO}} = -8,938\text{eV}$ ) pour le composé (**A**) (tableau IV.7), les contributions relatives dans Eq. IV.15 est (+ 35096,832).

Aussi, l'électronégativité corrèle avec l'activité antioxydante étudiée par un grand coefficient négatif (-7954,15587).

Les molécules volumineuses avec relativement une haute réfractivité moléculaire (le volume d'une molécule) (le **C1** ;  $92.90\text{ cm}^3/\text{mol}$ ) peuvent inhiber l'hémolyse des globules rouges.

La réfractivité molaire représente le volume réel des molécules contenues dans une mole de la substance [22]. Pour une structure moléculaire donnée, la réfractivité peut être facilement calculée par la somme des increments des différentes liaisons entre atomes ou groupes.

Une des propriétés les plus importantes physico-chimiques utilisée dans les études QSAR est la réfractivité molaire (MR). Il a été démontré que le caractère lipophile est lié au volume molaire, et l'encombrement stérique [22]. Donc, la réfractivité moléculaire dépend de la lipophilie et de la polarisabilité de la molécule. Elle donne des informations relatives au volume et à la cohésion de la molécule.

Une bonne corrélation linéaire est trouvée dans cette étude entre le coefficient de partage  $\log P$  de dithiolethiones et la réfractivité molaire MR avec ( $R^2 = 0,84$ ).

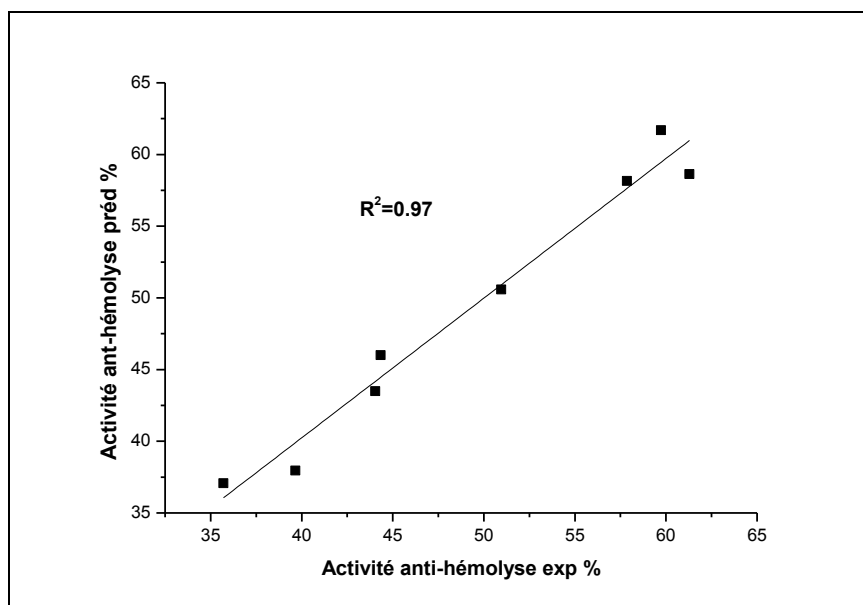
**Tableau IV.8** : Paramètres de validation croisée (activité anti-hémolyse)

Model	PRESS	SSY	PRESS/SSY	s	R <sup>2</sup>	6PE
Eq. IV.15	19,01745	20001,59185	0,00095	3,08362	0,999	0,0014

Le modèle QSAR développé présente une faible valeur de rapport PRESS/TSS (0,00095), cette valeur reste toujours inférieure de 0,4 [21].

Pour ce modèle de QSAR la condition  $R > 6PE$  est satisfaite, ce qui indique que le modèle possède un bon pouvoir prédictif.

La figure IV.9 montre la corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites pour le modèle utilisant les pourcentages anti-hémolyse. On peut remarquer que le nuage de points s'affine pour les valeurs élevées d'activité. Nous essayerons d'expliquer ce phénomène par la suite.



**Figure IV.9 :** Corrélation entre les pourcentages (anti-hémolyse) calculés et observés

Notre résultats montrent que ( $F = 350,58313$ ), cette valeur est plus grande qu'une valeur critique lue dans une table de Fisher ( $19,33$ ). Le modèle dont la valeur de  $F$  est supérieure à  $F_{crit}$  est statistiquement significatif.

Les résultats statistiques montrent très clairement que la méthode utilisée donne des meilleures conditions de linéarité et de prédiction. Nous devons donc expliquer ce phénomène et le justifier.

Un examen approfondi de figure IV.9, montrant la corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites, révèle que les corrélations sont meilleures pour les dithiolethiones à faible activité que pour les dithiolethiones à forte activité.

De plus, on peut préciser que parmi les composés inactifs ayant un pourcentage d'anti-hémolyse  $< 50\%$ , 4 composés (**A1**, **A2**, **B1**, **B2**).

Ce phénomène semble être normal pour une telle analyse QSAR, et pour l'expliquer, nous appuierons notre réflexion sur le fait qu'il peut y avoir plusieurs raisons (stériques, électrostatiques et lipophiliques) expliquant un mauvais «pourcentage d'anti-hémolyse » ; ces raisons peuvent être des mauvaises distributions électrostatiques, ou des problèmes liés à la lipophilie ou à la forme de la molécule. Il est donc clair, à partir de ceci, que les composés actifs ont très peu de différence entre eux alors que les composés à faible activité peuvent se différencier par plusieurs de ces phénomènes.

A partir des connaissances actuelles sur la composition des globules rouges, nous pouvons expliquer facilement le choix des descripteurs électrostatiques. En effet, le modèle de globules rouges répond à trois points précis des composés. Ces points correspondent à site électrostatique, site stérique et un site lipophile présent chez tous les composés et qui est le cycle aromatique. Les principales différences de ces composés homogènes sont donc dues à la différence de distribution électronique induite par la variété de substituants. Les différences stériques sont surtout dues aux parties flexibles des structures et leur rôle est minimisé.

A fin d'analyser les erreurs de nos résultats pour le pourcentage d'anti-hémolyse, l'erreur absolue AE est calculé par la relation suivante :

$$AE = |\text{pourcentage anti - hémolyse}_{\text{prédi}} - \text{pourcentage anti - hémolyse}_{\text{exp}}|$$

**Tableau IV.9 :** Valeurs de l'activité anti-hémolyse expérimentales et prédites des dithiolethiones étudiés

Dithiolethiones	L'activité anti-hémolyse expérimentale	L'activité anti-hémolyse prédite	AE
A	59,73	61.69795	1,9679
B	61,29	58.6337	2,6563
A1	35,71	37.07022	1,3602
B1	44,04	43.48834	0,5516
A2	39,66	37.9576	1,7024
B2	44,33	46.00741	1,6774
C	57,86	58.14612	0,2861
C1	50,95	50.57527	0,3747

En ce qui concerne la prédiction de composé **C** (sulfarlem), le tableau IV.10 récapitulatif des prédictions montre que ce composé est prédit avec une erreur toujours inférieure à 0,2861 unité de pourcentage d'anti-hémolyse. Le sulfarlem possède une lipophilie forte ( $\log P = 3,82$ ) pouvant participer à une interaction de type lipophilique avec la membrane biologique de globule rouge.

### Conclusion

En conclusion, nous pouvons dire que cette étude sur la famille des dithiolethiones, a montré un réel modèle avec un écart moyen de 0,068 unité de  $CI_{50}$  pour l'ensemble des prédictions de l'activité chélatrice. D'un point de vue qualitatif, il est intéressant aussi de rappeler que nos modèles ont montré une corrélation de l'activité antioxydante avec les descripteurs de type électrostatique et une corrélation de la sélectivité avec les descripteurs de type lipophiliques et stérique. Pour parfaire nos résultats, il faudrait continuer cette étude des prédictions avec d'autres composés pour avoir un « test set » plus conséquent qui apporterait plus d'information sur l'aspect prédictif de nos modèles.

### Références

- [1] CRUM BROWN A. et FRASER T. R.; *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, pp 221-241 (1868).
- [2] ZEIN S., Études théoriques des composés à transition de spin mono- et bi-nucléaires, Thèse de doctorat, université de CLAUDE BERNARD – LYON 1 (2005).
- [3] RUIZ-LOPEZ M. F. et RIVAIL J. L.; Ed. P. v. R. Schleyer, Wiley & Sons1, **437**, (1998).
- [4] RIVAIL J. L.; *Éléments de Chimie Quantique a l'Usage des Chimistes*; Inter Editions, Paris (1994).
- [5] CHAQUIN P.; *Manuel de Chimie Théorique*, Ellipses, (2000).
- [6] CANNEAUX S.; Etude théorique de processus atmosphériques : réaction du radical OH avec l'acétone et capture d'un composé organique volatil par une goutte d'eau, Thèse de doctorat, université de Reims Champagne-Ardenne (2004).
- [7] MORA V. et CASTRO E. A.; *chem. pap.*, **56(4)**, pp 250-255 (2002).
- [8] SZABO A. et OSTLUND N. S.; *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, Mc Graw-Hill, New York (1989).
- [9] JENSEN F.; *Introduction to Computational Chemistry*, Wiley, New York, (1998).
- [10] IBRAHIM A. A. et ABDALRAZAQ E. A.; *American Journal of Applied Sciences*, **6(7)**, pp 1385-1389 (2009).
- [11] DAUDEY J.-P.; *medecine sciences*, **14(11)**, pp 1299-1300 (1998).



- [12] DEWAR M. J. S., ZOEBISCH E. G., HEALY E. F. et STEWART J. J. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, pp 3902-3909 (1985).
- [13] STEWART J. J. P.; *J. Comput. Chem*, **10**, pp 221-264 (1989).
- [14] STEWART J. J. P.; *J. Comput. Chem*, **10**, pp 209-220 (1989).
- [15] POPLE J. A. et SEGAL G. A.; *J. Chem. Phys*, **44**, pp 3289-3296 (1966).
- [16] HANSCH C.; VCH Publishers, New York, pp 341-379 (1987).
- [17] BONA M.; Détermination du *log P* eau/n-octanol de 1,2-dithiole-3-thiones et de 1,2-dithiole-3-ones règles de calcul, thèse de doctorat, université de Renne I (1995).
- [18] BOTREL A., ILLIEN B., RAJCZY P., LEDOUX I. et ZYSS J. ; *Theor Chim Acta*, **87**, pp 175-194 (1993).
- [19] PRADINES B., MILLET J. et HENRY M.; *Med Trop*, **63**, pp 119-130 (2003).
- [20] PODUNAVAC-KUZMANOVIĆ S. O., CVETKOVIĆ D. D. et BARNA D. J., *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, p 1674 (2009).
- [21] SRIVASTAVA A. K. et SHUKLA N., *Journal of Saudi Chemical Society*, **17**, p 323 (2013).
- [22] CARRASCO R., PADRÓN J. A. et GÁLVEZ J.; *J Pharm Pharmaceut Sci*, **7(1)**, pp 19-26 (2004).
- [23] KUBINYI H.; QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Federal Republic of Germany) and VCH Publishers, New York, NY (USA), (1993).
- [24] SINGH J., SINGH S., THAKUR S., LAKHWANI M., KHADIKAR P. V., AGRAWAL V. K. et SUPURAN C. T.; *ARKIVOC*, **xiv**, p 114 (2006).
- [25] KONOVALOV. D. A., COOMANS D., DECONINCK. E. et HEYDEN Y. V.; *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, p 1649 (2007).
- [26] ARDAKANI R. B., MIRHOSSEINI S. M., GHADERIYEH F. et ABADI M.; *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.*, **71**, p 310 (2014).
- [27] BORDIER F.; Nouvelles activités nitrilase : application à la synthèse de produits d'intérêt, Thèse de doctorat, université de Evry Val d'Essonne, (2012).
- [28] MINKINE V., SIMKINE B. et MINIAEV R.; Théorie de la structure moléculaire, édition MIR. MOSCOU, (1982).

# **Conclusion générale et perspectives**

Au cours de ces travaux, nous avons préparé deux dérivés de dithiolethiones : la 5-p-méthoxyphényl-1,2-dithiole-3-thione **C** et son dérivé **C1**, comme nous avons étudié les propriétés biologiques et physicochimiques de quelques polyphénols et dithiolethiones.

Plusieurs de ces composés se sont avérés capables de piéger différents radicaux libres et d'inhiber l'hémolyse des érythrocytes.

Dans un deuxième temps, étant donné la nature multiple de l'activité antioxydante, nous avons cherché à rationaliser les résultats antioxydantes à travers des tests d'activité piègeur des radicaux : DPPH $\cdot$ ,  $\cdot$ OH,  $O_2^{\bullet-}$ .

Aussi, l'effet antioxydant observé n'étant pas dû uniquement à un effet antiradicalaire, cela a amené dans un troisième temps à commencer des études de complexation. Le fer est impliqué dans la réaction de FENTON. Ainsi, une bonne chélation de ce métal permettrait également d'expliquer l'activité antioxydante déterminée en biologie.

Des études préliminaires ont été menées avec le Fe(II) et quelques dithiolethiones et polyphénols et ont permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'activité antioxydante pouvait être expliquée par une capacité à chélater le fer. A titre d'exemple, l'acide tannique, qui est un bon chélatante.

Aussi, le test de la capacité réductrice des ions ferriques Fe(III) a révélé que le BHT manifeste un pouvoir réducteur relativement supérieur à celui de la quercétine. Une corrélation forte et significative existe entre l'activité réductrice des quelques composés étudiés et leurs potentiels d'oxydation.

Un autre objectif de ce travail est la détermination de coefficient de partage n-octanol/eau de quelques dithiolethiones. La différence de solubilité observée à l'équilibre est corrélée à l'hydrophobicité des molécules ( $\log P$ ). Cette dernière a été déterminé pour la première fois dans ce travail (cas des sels : **A1**, **A2**, **B1**, **B2** et **C1**). Nos résultats montrent que les sels sont moins lipophiles que les dithiolethiones **A**, **B**, **C**.

Les dithiolethiones présentent, à faible concentration, une activité antioxydante et empêchent l'hémolyse des hématies, induites par l'eau oxygénée  $H_2O_2$ . Ces composés sont relativement forts par rapport à la vitamine C. L'activité anti-hémolyse des dithiolethiones semble intimement liée à sa structure moléculaire. Sa forte lipophilie laisse supposer qu'elles se localiseraient dans le milieu intracellulaire.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons utilisé des outils de chimie théorique et de bioinformatique afin de mieux comprendre ce mécanisme antioxydant et établir des relations structure-activité. Les calculs de PM3 nous ont permis de modéliser une réaction de chélation de Fe(II) par nos composés (dithiolethiones) et de trouver les paramètres physicochimiques qui influent sur l'activité anti-hémolyse. 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. La modélisation moléculaire nous a permis de déterminer, parmi les molécules synthétisées, celles donnant le meilleur effet inhibiteur.

L'étude des propriétés antioxydantes et biologiques 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.

En conclusion, les recherches réalisées, au cours de ce travail de thèse, ont permis la proposition d'un modèle d'inhibition d'hémolyse cohérent vis à vis des relations structure-activité relevées au sein de cette catégorie de dithiolethiones. Plusieurs des structures étudiées sont caractérisées par une excellente activité anti-hémolyse et devraient présenter de bonnes propriétés pharmacologiques.

L'ensemble de nos résultats montre que les meilleurs composés se caractérisent par la présence d'une fonction thione directement reliée au noyau dithiole.

La présence d'un contre ion comme l'atome d'iode ou le groupe méthyle sulfate de type sels dithiolylium diminue au contraire les propriétés anti-hémolyse.

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

### *Du point de vue activité biologique*

De tels tests auront pour but de proposer de nouveaux dithiolethiones utilisées comme des fongicides, à la chimie de synthèse qui pourra poursuivre ce travail dans une voie plus appliquée et industrielle.

Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des dithiolethiones et polyphénols, des études similaires *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuse visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques et érythrocytaires. De même, des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

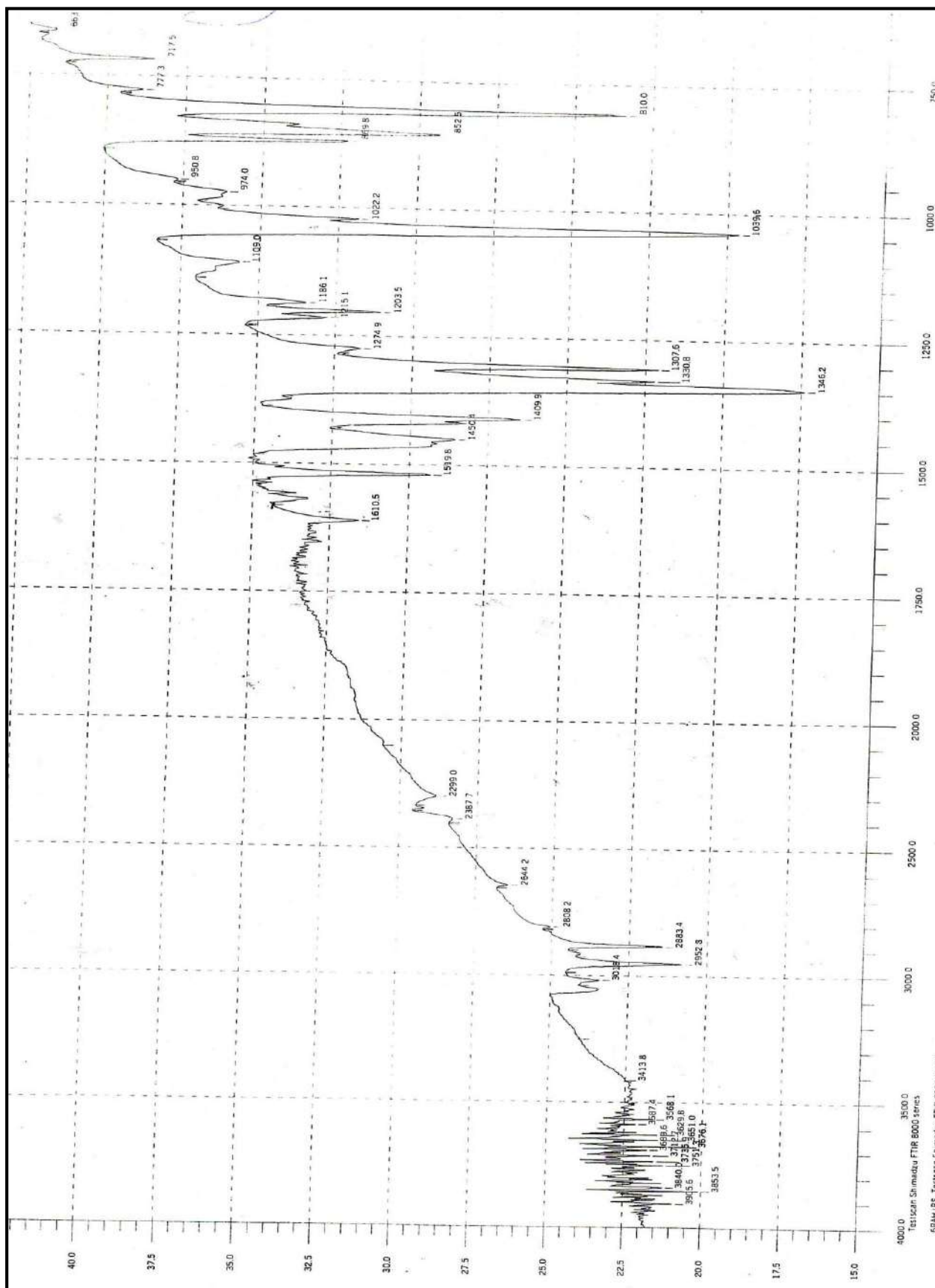
Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des composés phénoliques et des dithiolethiones en utilisant différentes techniques de déterminer d'autres types d'activités (que l'activité antioxydante) telles que : l'activité anti-inflammatoire, antibactérienne etc, ce qui nécessiterait de faire des tests cellulaires et/ou biologiques;

### *Du point de vue modélisation moléculaire*

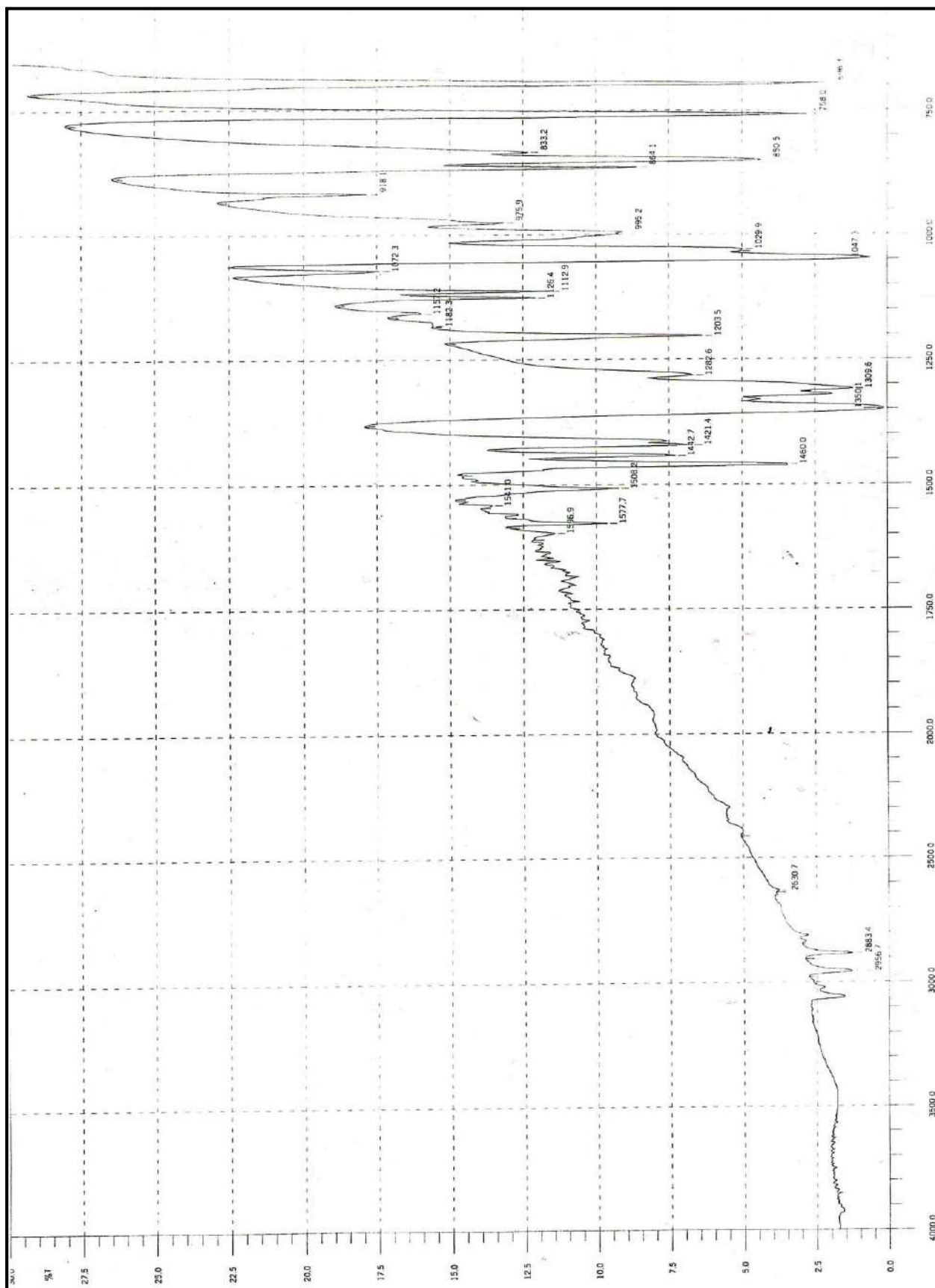
Les calculs réalisés, dans ce travail, par la méthode PM3 doivent être complétés par la méthode DFT/B3LYP (6-31G\*). Il faudrait aussi, avec des moyens de calcul plus importants, étudier d'une manière plus exhaustive la recherche conformationnelle des différentes molécules.

A partir de ces résultats un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées. Il conviendrait dans le prolongement de ces résultats, de tester l'activité biologique des structures nouvellement proposées, en faisant appel à d'autres programmes de docking et d'autres fonctions de score; notre étude ici n'étant qu'initiale.

# **Annexe**

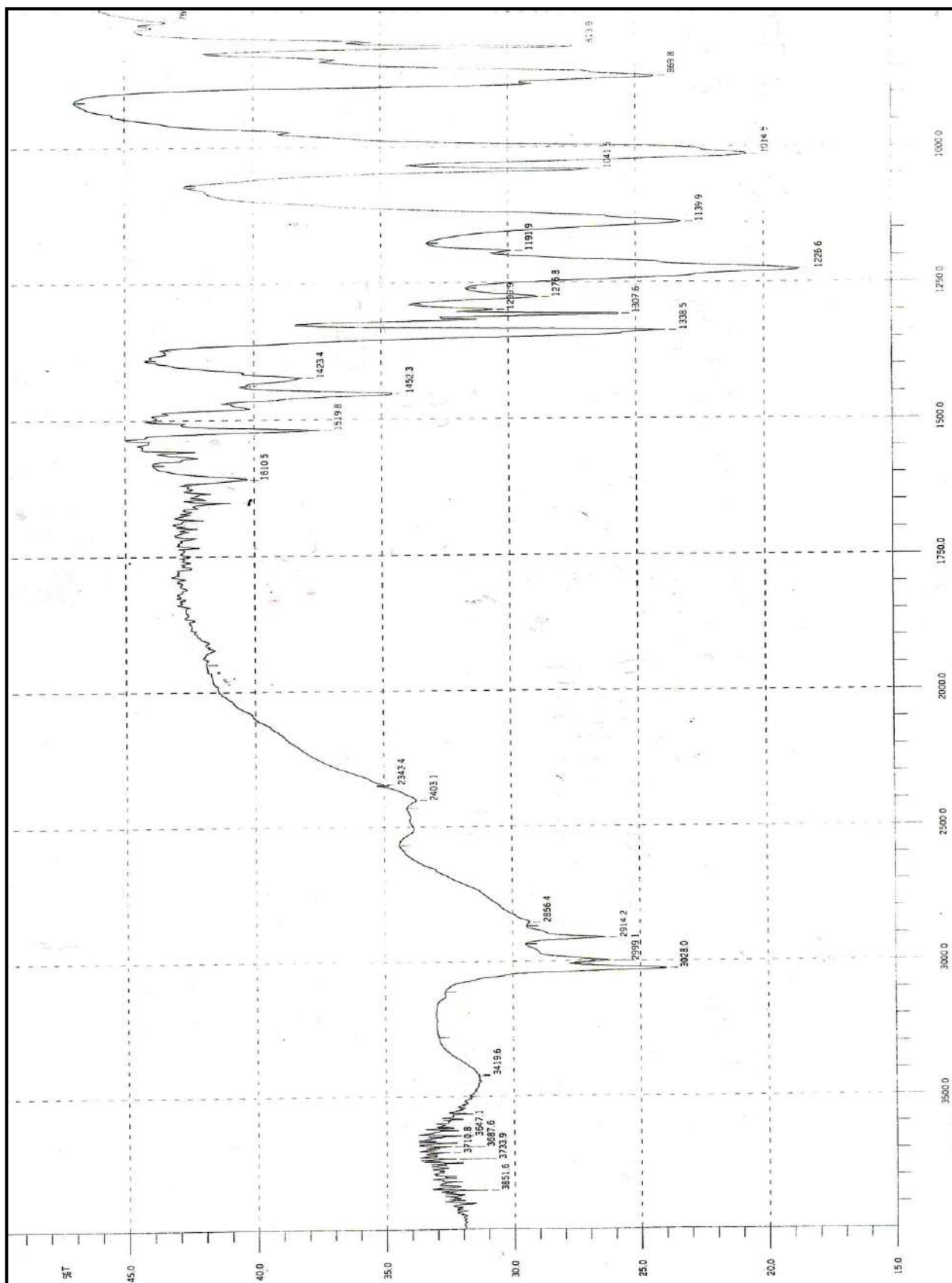


**Figure I.55** : Spectre IR de 3-méthylthio-4p-tolyl-1,2- dithiolylium contre ion (I) B1



**Figure I. 56 :** Spectre IR de 3-méthylthio-4-phényl-1,2- dithiolium contre ion (I) A1





**Figure I.57:** Spectre IR de 3-méthylthio-4-p-tolyl-1,2-dithiolylium contre ion ( $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ )

**B2**

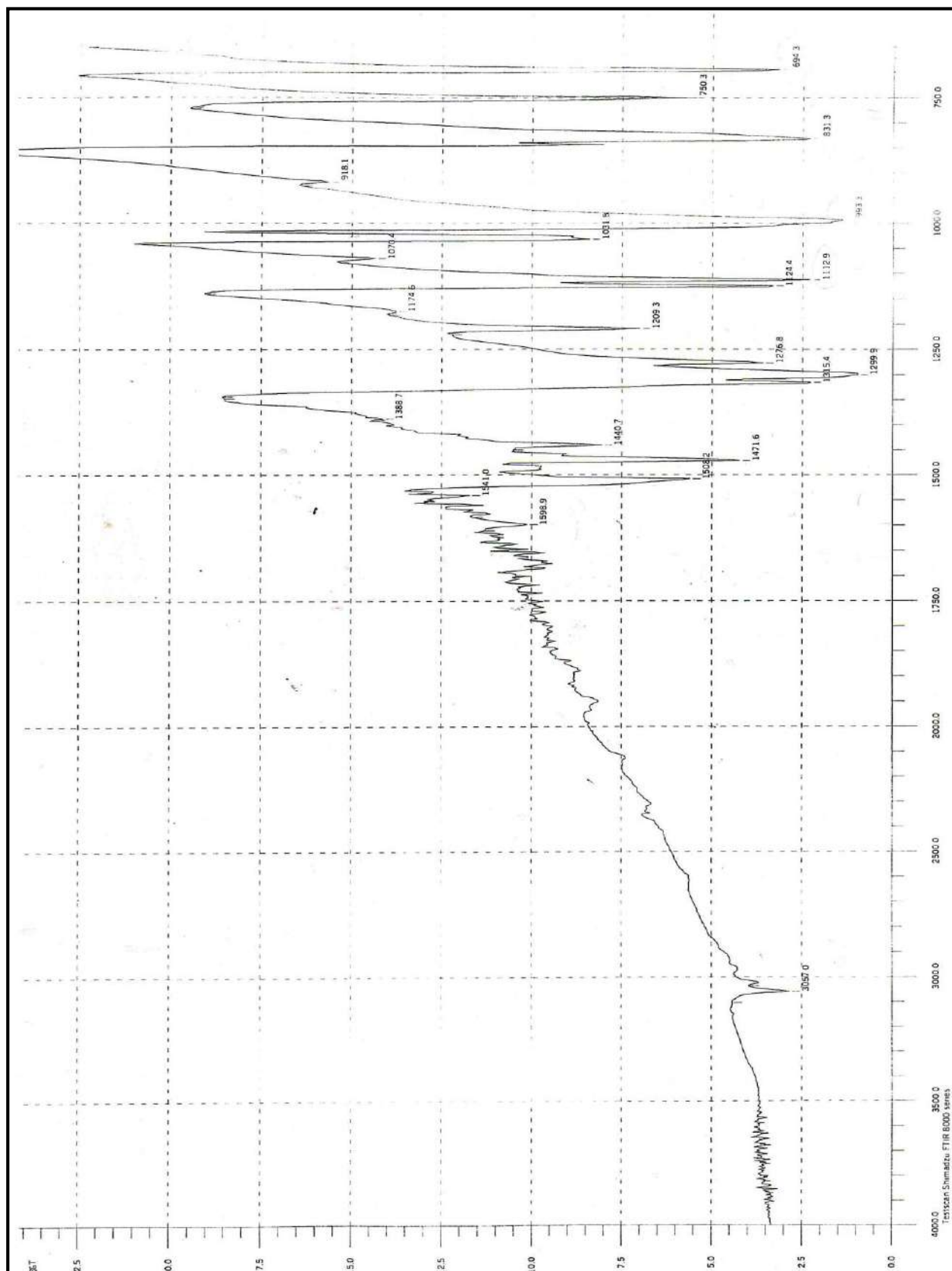
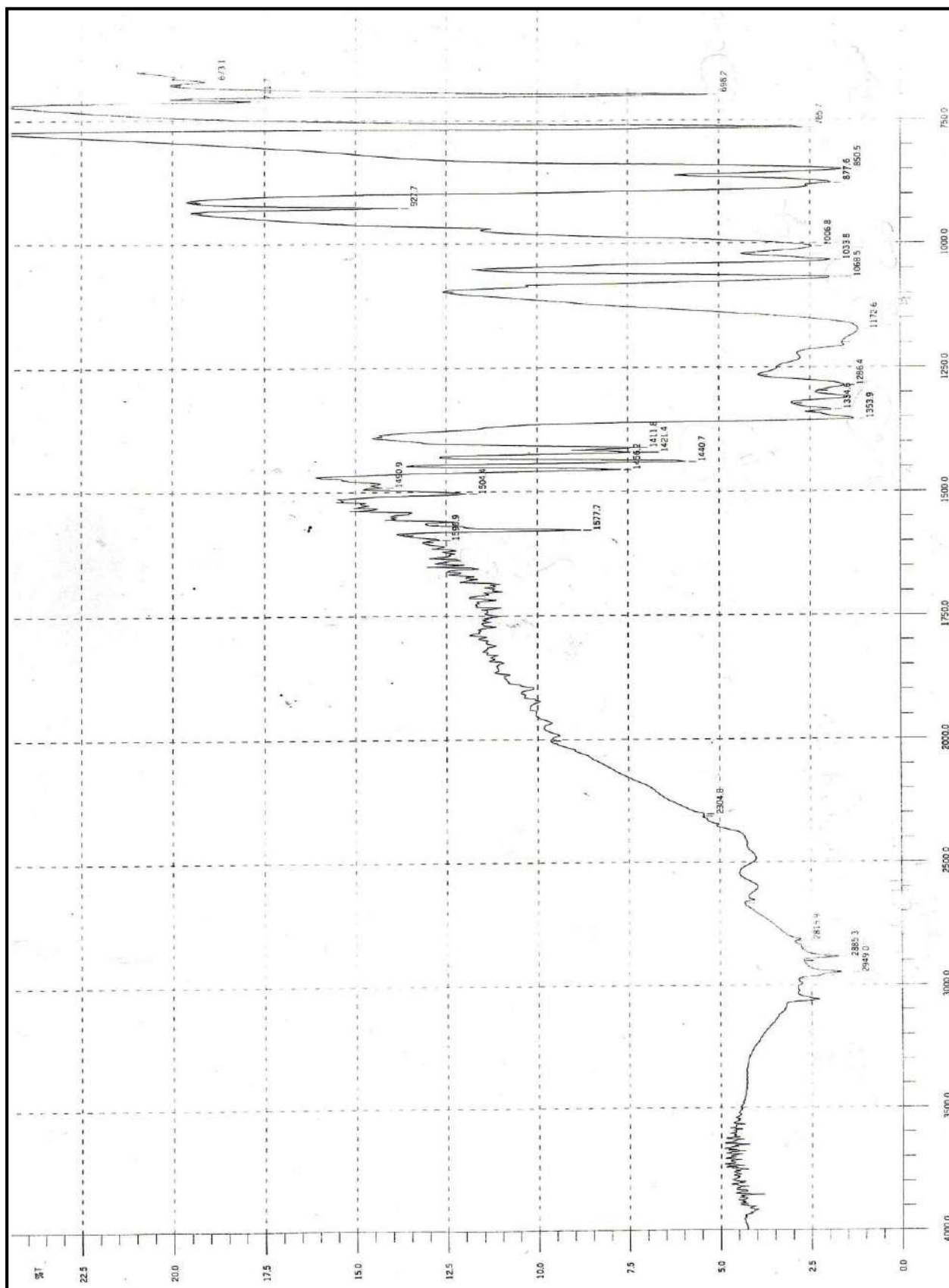


Figure I.58 : Spectre IR de 4-phényl-1,2-dithiole-3-thione A



**Figure I.59:** Spectre IR de 3-Méthylthio-4-phényl-1,2-dithiolium contre ion ( $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ ) A2

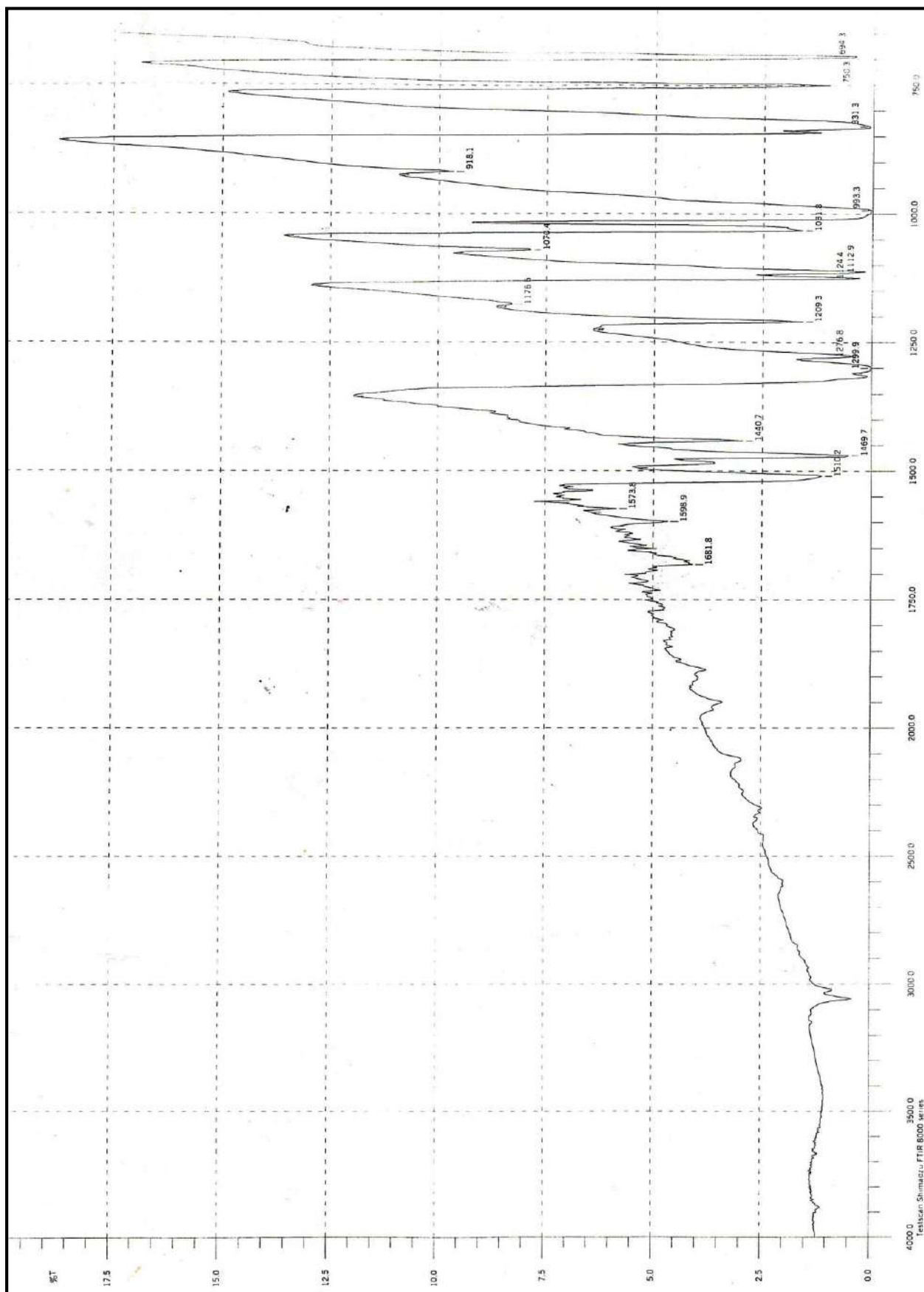


Figure I.60 : Spectre IR de 4-p-tolyl-1,2-dithiole-3-thione B

Table de Fisher-Snedecor,  $\alpha = 5 \%$

$\frac{v_1}{v_2}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20
1	161	199	215	224	230	233,9	236	238,8	240,5	241,8	248,0
2	18,5	19,0	19	19,2	19,3	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,45
3	10,1	9,55	9,2	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,66
4	7,71	6,94	6,5	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,80
5	6,61	5,79	5,4	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,56
6	5,99	5,14	4,7	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,87
7	5,59	4,74	4,3	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,44
8	5,32	4,46	4,0	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,15
9	5,12	4,26	3,8	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	2,94
10	4,96	4,10	3,7	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,77
20	4,35	3,49	3,1	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,12