



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Chimie-Biologie-Santé

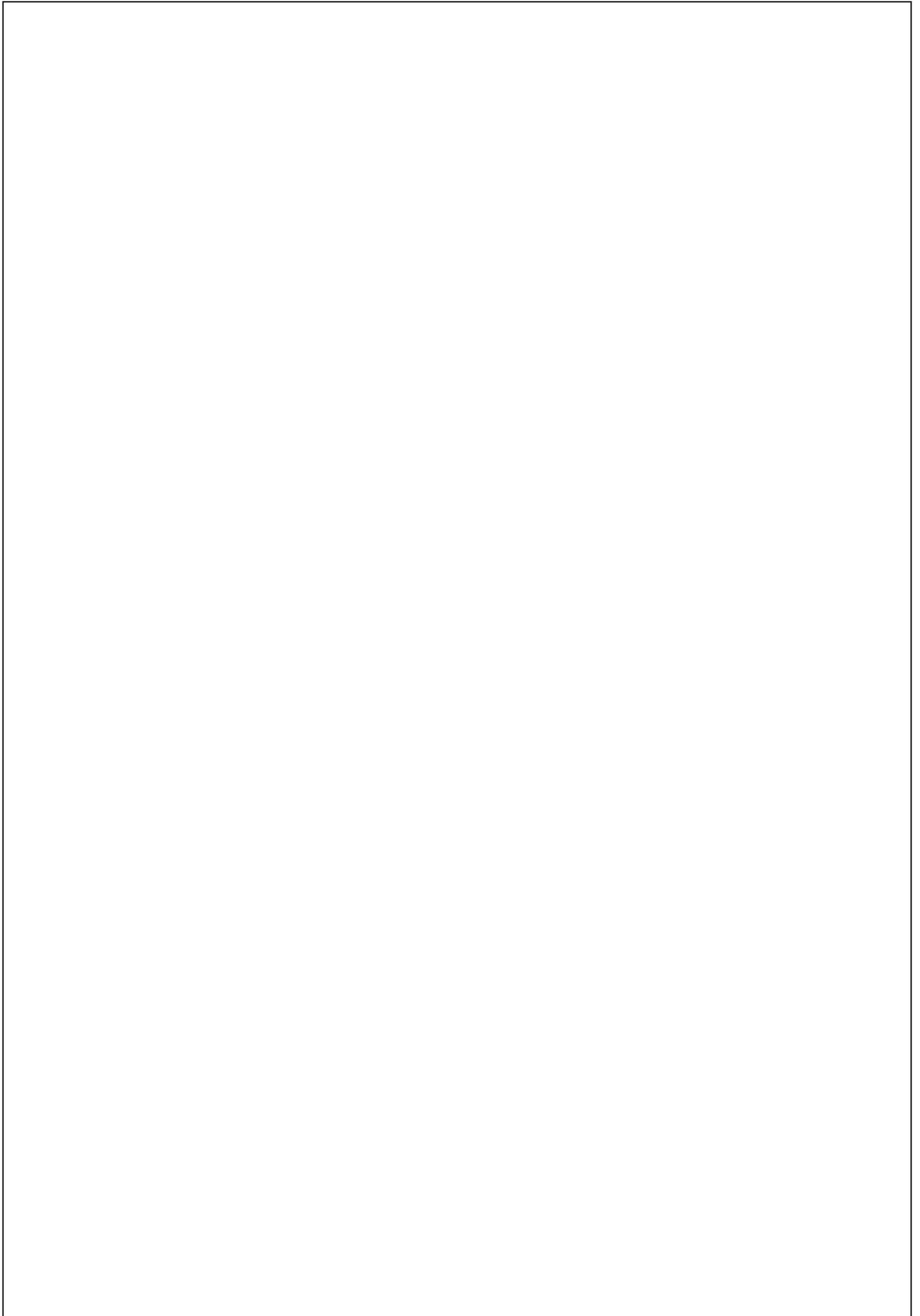
Présentée et soutenue par *Damien Cressier*
Le 13 Octobre 2010

Titre : Synthèse et Evaluation de Nouveaux Dérivés
Organiques et Organométalliques
Contre les Effets des Rayonnements Ionisants

JURY

Mr. R. MARTINO, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Président
Mr. J. BALOSSO, Professeur, Service de Radiothérapie, CHU Grenoble, La Tronche	Rapporteur
Mr. J-C. GUILLEMIN, Directeur de Recherche au CNRS, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Rennes	Rapporteur
Mme C. AMOURETTE, Pharmacien en Chef, Direction Centrale du Service de Santé des Armées, Paris	Examinatrice
Mme A. CHROSTOWSKA, Professeur,, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau	Examinatrice
Mme F. NEPVEU, Professeur, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse	Examinatrice
Mr. N. FORAY, Chargé de Recherche à l'INSERM, European Synchrotron Research Facility, Grenoble	Examineur
Mr. G. RIMA, Chargé de Recherche au CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse	Directeur de Thèse

Ecole doctorale : Sciences de la Matière
Unité de recherche : Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée, UMR 5069



*A mes Parents,
A mon Frère et ma Sœur,
A mes Grands-Parents,
A Daphné.*

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée, UMR-5069, à l'Université Paul Sabatier, dirigé par Mr Antoine Baceiredo.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, Mesdames Chrostowska et Nepveu, Messieurs Balosso, Guillemain et Foray, sans oublier Monsieur Martino président du jury, pour avoir accepté de juger mes travaux de thèses.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'appui de l'ensemble du personnel de la DGA et plus particulièrement les pharmaciens en chef Pierre Martin et Alain Courtière.

D'un grand soutien pour la compréhension de mes études, je voudrais exprimer ma gratitude au pharmacien en chef Christine Amourette et au médecin en chef Michel Diserbo sans oublier les autres membres du CRSSA, William Fauquette et Patrick Martigne, pour leur aide.

Ce travail, réalisé en collaboration avec de nombreux laboratoires français, a été très instructif, ainsi je n'oublierai pas Thierry Le Gall et Brice Nadal du CEA de Saclay ainsi que Stéphane Meunier, Alain Wagner, Antoine Le Roux et Pierre Bischoff, de l'ULP de Strasbourg.

Le soutien et l'intérêt de Claude Lion, directeur de recherche à l'université Paris VII, au projet PROPERGAL a été également très apprécié.

Je voudrais remercier mon directeur de thèse Ghassoub Rima, Chargé de Recherche au CNRS, pour sa sympathie et pour m'avoir permis de réaliser ce travail, et Pierre Hernandez pour son soutien, son aide et son amitié.

Je n'oublie pas non plus Annie Castel pour son aide et son œil expert, Patricia Vicendo et Jean-Pierre Souchard pour leurs explications des tests à l'ABTS et de la RPE ainsi que Françoise Nepveu et Pierre Perio de la faculté de pharmacie pour leur aide lors de la mise en place du test de peroxydation lipidique.

De nombreuses personnes des services communs de l'Université Paul Sabatier ont pris part, dans l'ombre, à ces travaux, Catherine Claparols, Valérie Bourdon, Nathalie Leroy et Eric Leroy du service de spectrométrie de masse, Marc Vedrenne, Pierre Lavedan et Claude Andreu du service de RMN, Nathalie et Sonia du Service de RX, Corinne Routaboul du service d'IR.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du LHFA, Maryse pour son travail, Olivier pour son humour, Marie-Josée et Christian et enfin, les thésards et post-docs du laboratoire, Dimitri et ses magnifiques chants et imitations, Dumitru pour son humour et sa sympathie, Lucian pour ses remarques pertinentes, Nadia, Guillaume, Roland, Raluca, Pascal, Nicolas, Aymeric, Aurélie, et tous les autres pour leur sympathie.

Je voudrais terminer en remerciant l'ensemble de ma famille, ma mère, mon frère et ma sœur, Daphné, et tous les autres pour leur soutien.

Un grand merci à tous.

Introduction Générale

Suite à la découverte des rayons X du radium et du polonium en 1895 par Pierre et Marie Curie et à celle de la radioactivité de l'uranium par Becquerel en 1896, l'utilisation de la radioactivité n'a cessé de devenir de plus en plus fréquente en médecine et dans l'industrie. La reconnaissance des effets des rayonnements ionisants sur l'organisme suivit de peu leur découverte et leur utilisation en médecine. En 1896, les premières pathologies et les premières lésions radio-induites furent décrites. Becquerel recense en 1898 une soixantaine de cas de radiodermites. En 1904, les premiers décès attribués aux rayons X sont rapportés. De nos jours, les effets et les risques liés à l'utilisation des rayonnements ionisants sont bien connus.

Cependant, malgré ces risques, le potentiel de la radioactivité dans les activités médicales de radiodiagnostic et de traitement par radiothérapie, la production d'énergie dans les centrales nucléaires ainsi que la stérilisation alimentaire par irradiation et dans de nombreux autres domaines a abouti à une augmentation importante de l'utilisation des radioéléments et des autres sources d'irradiation (Rayons X...) et ainsi, parallèlement, à un besoin de protection engendrant la création d'organismes nationaux et internationaux de radioprotection.

Ainsi, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) prit en charge la mise en place de systèmes d'évaluation des risques liés à l'utilisation de cette énergie dans tous les domaines d'activités humaines y faisant appel. Des recommandations pour la gestion du risque et la protection des personnels travaillant dans ces domaines, puis pour l'ensemble de la population et l'environnement, apparurent ensuite.

Cependant, actuellement, la radioprotection est essentiellement constituée de moyens physiques (écrans, tabliers plombés, etc.). Des méthodes de dosimétrie permettent aussi de déterminer les doses exactes absorbées par les tissus et ainsi de limiter la durée d'exposition aux radiations. Cette radioprotection est très efficace et peut facilement être mise en place dans le domaine médical ou industriel.

Le réel risque d'exposition aux rayonnements ionisants d'un grand nombre de personnes apparaît lors d'accidents tels que Tchernobyl ou lors de l'utilisation militaire des armes nucléaires (Hiroshima, Nagasaki). Durant ces événements, une partie importante de la population fut surexposée aux rayonnements ionisants sans aucun moyen de protection. De nouveaux projets de recherche menant vers un autre type de radioprotection pouvant protéger les populations ont alors été développés. Les projets de radioprotection chimique permirent le

développement de structures ayant pour objectif de réduire les risques liés à l'irradiation. Ainsi furent découverts dès 1947 la cystéine, et surtout, dans les années 1960, le N-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate (WR-2721), commercialisé sous le nom d'Ethyol ou Amifostine, et présentant des activités radioprotectrices remarquables^[1-3]. Cependant, ce produit entraîne de nombreux effets secondaires limitant son utilisation à des applications thérapeutiques. Ainsi, la recherche de composés radioprotecteurs est toujours d'actualité. Récemment, un nouveau produit, le CBLB-502 a été découvert^[4].

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme d'études amont (PEA) financé par la DGA (Direction Générale pour l'Armement), intitulé PROPERGAL (PROtection du PERSONNEL – Nouvelle formulation GALénique) ayant pour but d'élaborer de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants. Les applications à long terme de tels composés sont la protection des personnes évoluant en milieu contaminé et l'utilisation en médecine pour la préservation des tissus sains lors de radiothérapies.

Ainsi, dans notre groupe, nous recherchons de nouvelles structures radioprotectrices possédant un rapport activité/toxicité élevé. Ce projet consiste à explorer diverses voies de radioprotection chimique telles que la protection par inhibition de phénomènes radicalaires, par protection des macromolécules essentielles à la survie cellulaire (ADN...), par limitation de l'effet oxygène, etc.

Pour cela, nous définirons tout d'abord les effets des radiations sur l'organisme et les moyens de protection contre ces rayonnements. Une fois le choix des nouvelles structures à étudier établi, nous en présenterons la synthèse ainsi que l'évaluation de leur pouvoir antioxydant, antiradicalaire et radioprotecteur.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	7
SOMMAIRE	13
ABREVIATIONS	17
PARTIE I : GENERALITES	19
Chapitre 1 : La Radioactivité	21
I. Historique de La Radioactivité	21
II. L'Emission de Particules	22
III. Mesurer la Radioactivité	27
IV. Les Sources d'Exposition de l'Homme	30
V. Se Protéger des Radiations	39
Chapitre 2 : De l'Irradiation Aux Symptômes	45
I. Mécanismes d'Action des Rayonnements Ionisants	45
II. Les Mécanismes de Réparation et de Défense de l'Organisme	60
III. Effets des Rayonnements Ionisants sur l'Organisme	67
Chapitre 3 : Les Radioprotecteurs, Leurs Modes d'Action	71
I. Généralités	71
II. Les Différents Radioprotecteurs	74
PARTIE II : ETUDE PRELIMINAIRE	87
Chapitre 1 : Les Références	89
I. Les Différentes Références	89
II. Synthèse des Composés de Référence	90
Chapitre 2 : Préparation des Précurseurs Organométalliques	95
I. Caractéristiques et Propriétés	95
II. Obtention des Composés Organométalliques	98
III. Protocoles de Synthèse	102
Chapitre 3 : Techniques d'Evaluation	111
I. Evaluation <i>in vitro</i>	111
II. Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur	124

PARTIE III : MODIFICATION ET ETUDE DE MOLECULES ANTIOXYDANTES	129
Chapitre 1 : Les Acides Pulviniques	131
I. Caractéristiques et Propriétés	131
II. Synthèse	138
III. Protocoles de Synthèse	143
IV. Evaluation <i>in vitro</i>	151
V. Evaluation Cellulaire	177
VI. Evaluation <i>in vivo</i>	178
VII. Conclusion	179
Chapitre 2 : Les Acides Salicyliques	181
I. Caractéristiques et Propriétés	181
II. Synthèse	184
III. Protocoles de Synthèse	188
IV. Evaluation <i>in vitro</i>	197
V. Evaluation <i>in vivo</i>	199
VI. Conclusion	199
PARTIE IV : MODIFICATION ET ETUDE DE MOLECULES RADIOPROTECTRICES	201
Chapitre 1 : Les Dérivés de la NMI	203
I. Caractéristiques et Propriétés	203
II. Synthèse	206
III. Protocoles de Synthèse	209
IV. Evaluation <i>in vitro</i>	216
V. Evaluation <i>in vivo</i>	219
VI. Conclusion	219
Chapitre 2 : Les Benzothiazoles et les Thiadiazoles	221
I. Caractéristiques et Propriétés	221
II. Synthèse	224
III. Protocoles de Synthèse	228
IV. Evaluation <i>in vitro</i>	247
V. Evaluation <i>in vivo</i>	249
VI. Conclusion	250
Chapitre 3 : Les Naphtalimides	253
I. Caractéristiques et Propriétés	253
II. Synthèse	254
III. Protocoles de Synthèse	258
IV. Evaluation <i>in vitro</i>	274
V. Conclusion	277

PARTIE V : PERSPECTIVES	279
Les Dithiols	281
I. Caractéristiques, Propriétés et Synthèse	281
II. Protocoles de Synthèse	282
III. Evaluation <i>in vitro</i>	284
IV. Conclusion	285
CONCLUSION GENERALE	287
PARTIE VI : ANNEXES	293
ANNEXE 1 : EVALUATION <i>IN VITRO</i>	295
I. Evaluation des Dérivés d'Acides Pulviniques	295
II. Evaluation des Dérivés de l'Acide Salicylique	300
III. Evaluation des Dérivés de la NMI	301
IV. Evaluation des Dérivés de Benzothiazoles et de Thiadiazoles	301
V. Evaluation des Naphtalimides	303
ANNEXE 2 : TESTS <i>IN VITRO</i>, CEA DE SACLAY ET ULP DE STRASBOURG	307
I. Test de Protection de la Thymidine	307
II. Test de Protection Cellulaire	314
ANNEXE 3 : DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES	317
I. Composés de Référence	318
II. Dérivés des Acides Pulviniques	319
III. Dérivés des Flavanoïdes	327
IV. Dérivés de l'Acide Salicylique	331
V. Dérivés du Benzothiazole	333
VI. Dérivés des Naphtalimides	335
ANNEXE 4 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	343

Abréviations

ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ADN : acide désoxyribonucléique

Bq : Becquerel

CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique

DL₅₀ : Dose létale pour 50% des animaux

DMF : diméthylformamide

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique

Et₃N : triéthylamine

FRD : Facteur de Réduction de Dose

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

Gy : Gray

IC₅₀ : Concentration inhibant 50% des radicaux

ICRU : International Commission on Radiation Units and Measurements

iPr : isopropyl

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

ppm : partie par million

ND : Non Déterminé

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SOD : superoxyde dismutase

SN : Substitution Nucléophile

Sv : Sievert

THF : tétrahydrofurane

TLE : Transfert Linéique d'Energie

TMS : triméthylsilane

WR-2721 : *N*-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate

WR-1065 : *N*-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylthiol

Partie I :
Généralités

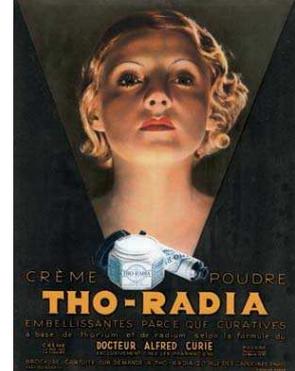
Chapitre 1 :

La Radioactivité

I. Historique de La Radioactivité

La radioactivité fut découverte en 1896 par Henry Becquerel (1852-1908) lors de ses travaux sur les phénomènes de fluorescence des sels d'uranium. Cependant, ce n'est qu'après les travaux de Marie Curie (1867-1934), Pierre Curie (1859-1906) et Ernst Rutherford (1871-1937) que les trois radioactivités α , β et γ furent découvertes. La radioactivité fut ainsi mise en évidence par la fission qui est un phénomène physique naturel aboutissant à la libération d'énergie due à la désintégration d'un atome instable en deux atomes plus stables.

Cependant, les dangers réels de la radioactivité ne furent découverts que plus tard, car, alors qu'en 1930, les médecins préconisaient l'utilisation du radium comme tonifiant, et que le commerce de crèmes de beauté, des poudres et des médicaments à base de radium florissait, Hermann Joseph Muller (1890-1967) mettait en évidence les effets mutagènes des radiations et le risque de cancers radioinduits.



Le potentiel militaire de la radioactivité marqua ensuite l'Histoire. La réalisation du projet Manhattan en 1942 par les Etats-Unis assistés par le Royaume-Uni et le Canada sous la direction du général Leslie Groves et du physicien Robert Oppenheimer aboutit à la mise au point et à l'assemblage de la première bombe atomique. L'utilisation de ces armes nucléaires en 1945 à Hiroshima et à Nagasaki aboutit à une réelle prise de conscience des dangers de la radioactivité.



« Si la splendeur de mille soleils éclatait à la fois dans les cieux, cela serait comparable au rayonnement du grand Etre... Je suis devenu la Mort, le destructeur des mondes. »

J. Robert Oppenheimer citant la Bhagavad Gita.

En parallèle de ces applications militaires, des applications civiles furent développées tant dans le domaine médical (radiodiagnostic) que dans les domaines de l'archéologie (datation au carbone 14), de la production d'énergie (centrales nucléaires) ou dans le domaine agroalimentaire (irradiation d'aliments pour conservation). L'utilisation de la radioactivité croissante dans nos sociétés a abouti à la mise en place de réglementations et de normes strictes permettant de réguler et de limiter les risques liés à l'utilisation de la radioactivité.

II. L'Emission de Particules

Certains noyaux atomiques sont instables, soit naturellement, soit par suite de réactions nucléaires artificielles. Cette instabilité peut être due soit à un trop grand nombre de nucléons soit à un déséquilibre entre protons et neutrons. Cependant, dans les deux cas, les atomes sont radioactifs car ils tendent naturellement vers leur état de stabilité, par désintégration accompagnée de l'émission d'une particule α , β et, en général, d'un rayonnement de photons de haute énergie nommé rayonnement γ . Nous pourrions noter, que quel que soit le rayonnement, celui-ci provoquera par interaction avec la matière des ionisations et des excitations. Cependant, selon le type de rayonnement, qu'il soit particulaire ou électromagnétique, la quantité d'énergie, et par conséquent la probabilité d'arracher un ou plusieurs électrons aux molécules, seront différentes^[5].

II.1. Les Rayonnements Particulaires

II.1.1. Le rayonnement α

Lorsque le noyau présente un trop grand nombre de nucléons, il tend vers son état de stabilité en émettant un noyau d'hélium ou particule α (Figure 1). Ce rayonnement interagit principalement avec les cortèges électroniques des atomes cibles et aboutit à l'excitation et à l'ionisation de la matière qu'il traverse. Il y a naissance de rayonnements secondaires.

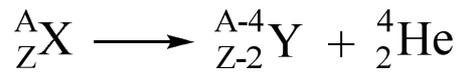
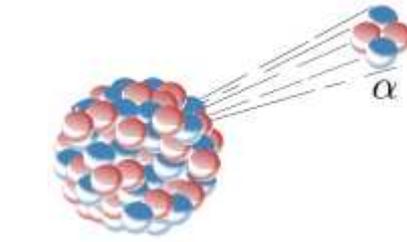


Figure 1 : Rayonnement α

Ce rayonnement est peu pénétrant, et par conséquent, l'énergie fournie par unité de longueur sera très élevée. Les effets biologiques sont ainsi très importants. En effet, la densité d'ionisation étant élevée, le risque de cassures doubles brins de l'ADN sera élevé.

Le parcours dans l'air ne dépasse pas quelques centimètres et le rayonnement est facilement arrêté par une feuille de papier ou par la peau. Ce rayonnement n'engendre que peu de risque pour l'homme sauf en cas de contamination interne ou cutanée. Les émissions de ce type surviennent, entre autres, lors de la désintégration du Radon 222, de l'Uranium 238 ou du Plutonium 239.

II.1.2. Le rayonnement β

Dans le second cas, c'est-à-dire, lors d'un déséquilibre entre les nombres de protons et de neutrons, l'atome tend vers la stabilité par la transmutation, c'est-à-dire la transformation isobarique avec conservation du nombre de masse A. Les rayons β sont produits par exemple lors de la désintégration du carbone 14, du phosphore 32, du potassium 40, des césiums 134 et 137.

II.1.2.a. L'émission β^-

Lors d'un excès de neutrons, un neutron est transformé en proton avec émission d'un électron et d'un antineutrino électronique $\bar{\nu}_e$, c'est l'émission β^- (Figure 2). La particularité de ce rayonnement est qu'il provoque des ionisations et des excitations par diffusion. Celui-ci est plus pénétrant (quelques mètres dans l'air ou quelques millimètres dans le corps humain) et par conséquent moins ionisant que le rayonnement α .

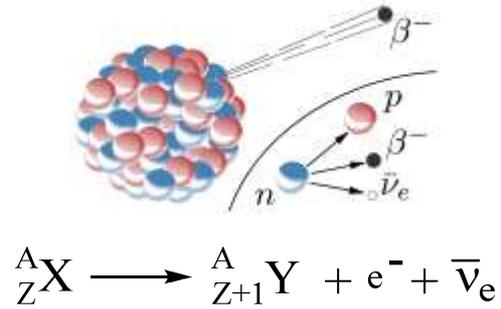


Figure 2 : Rayonnement β^-

On notera en particulier la formation d'un électron lors du rayonnement β^- . Cet électron peut interagir avec les électrons du cortège électronique d'un atome cible sous certaines conditions. En effet, si l'énergie de l'électron incident est forte ($> 30 \text{ eV}$), il y a possibilité d'expulsion d'un électron du cortège électronique de la molécule cible engendrant son ionisation. L'électron secondaire peut ensuite entrer en interaction avec un second atome. Dans le cas où l'énergie de l'électron incident est égale à la différence entre les énergies de liaison de 2 couches électroniques externe de l'atome cible, un électron peut monter sur un niveau d'énergie supérieure. Il y a alors excitation de la molécule. Si l'énergie de l'électron incident est trop faible, le transfert d'énergie n'aboutira qu'à une excitation thermique de la molécule qui se dissipera sous forme de chaleur.

II.1.2.b. L'émission β^+

Dans le cas d'un excès de protons, un proton se transforme en neutron avec émission d'un positon et d'un neutrino ν_e , c'est l'émission β^+ (Figure 3).

Le réel danger lié à ce rayonnement est indirect. En effet, le positon émis lors de ce rayonnement va être inhibé instantanément par un électron du milieu. Cependant, lors de cette inhibition, il y a formation de deux rayons γ très destructeurs de 511 keV chacun formant un angle solide de 180° .

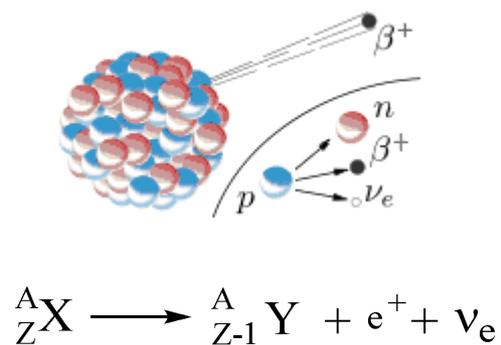


Figure 3 : Rayonnement β^+

II.2. Les Rayonnements Electromagnétiques

Ce type de rayonnements correspond à une onde purement énergétique répondant donc aux lois de la physique ondulatoire. Les rayonnements ionisants de ce type sont compris entre le rayonnement ultraviolet et les rayonnements cosmiques :

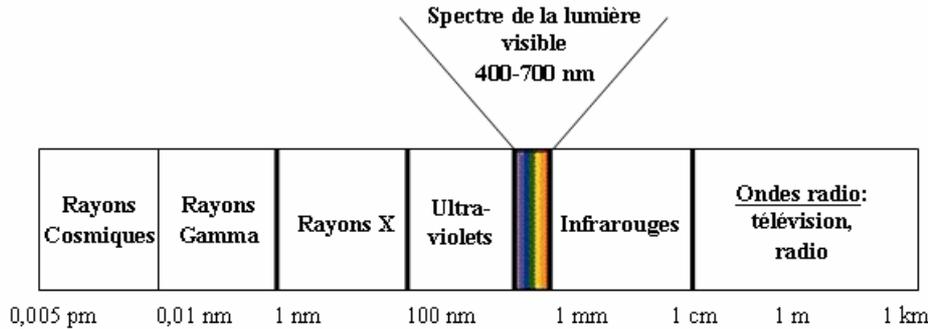


Figure 4 : Spectre électromagnétique

II.2.1. Les rayonnements photon X

Les rayonnements X sont similaires aux rayonnements γ , seule l'origine de ce rayonnement diffère. En effet, ce dernier résulte soit du freinage des particules β dans la matière soit du changement de niveaux d'énergie des électrons dans les atomes.

II.2.2. Les rayonnements photon γ

Le rayonnement γ accompagne la stabilisation des atomes ne présentant pas de déséquilibre baryonique. Nous noterons qu'en général, la désintégration γ suit une désintégration α ou β . Ce type de rayonnement a été mis en évidence par Paul Villard en 1900. Il est dû à une réorganisation des nucléons et de la charge électrique à l'intérieur du noyau. Ce rayonnement, constitué uniquement de photons, est par conséquent purement énergétique. Nous remarquerons que lorsque ce rayonnement interagit avec la matière, l'énergie décroît progressivement au fur et à mesure que les photons incidents, énergétiquement indépendants les uns des autres, interagissent avec, entre autres, les électrons des cortèges électroniques des atomes. L'atténuation de ce faisceau est ainsi due à un transfert d'énergie aboutissant à l'accélération d'électrons qui sont ensuite ralentis par ionisations progressives des structures voisines. Il a aussi été remarqué qu'une partie de l'énergie absorbée peut être restituée sous forme d'un photon secondaire ou diffusée selon une direction

différente de celle du photon incident. L'atténuation de ce faisceau étant longue, il est très pénétrant. En effet, il traverse plusieurs centaines de mètres et pénètre profondément dans les tissus. Ce faisceau provoque trois types d'interactions lorsqu'il traverse la matière, à savoir la création de paires, l'effet photoélectrique et l'effet Compton aboutissant à des excitations et des ionisations.

II.2.2.a. Création de paires

Lorsqu'un photon très énergétique passe à proximité d'un noyau, le champ électrique intense qui entoure le noyau peut engendrer un négaton et un positon à partir du photon. La paire ainsi créée est inhibée dans le milieu, et, comme lors d'un rayonnement, il y aura formation de deux rayons γ formant un angle solide de 180° .

II.2.2.b. Effet photoélectrique

Un photon peut entrer en collision avec les électrons des couches internes d'un atome. Dans ce cas, l'énergie du photon sera totalement absorbée par l'atome, qui va retourner à son état de stabilité en transférant son énergie à son cortège électronique, qui expulsera alors un électron à forte énergie cinétique. L'électron engendrera par la suite un ensemble de phénomènes d'ionisation dans le milieu.

II.2.2.c. Effet Compton

Dans ce cas, le photon incident va transférer une partie de son énergie à un électron présentant une énergie de liaison assez faible. L'électron chargé en énergie va alors être expulsé dans une direction précise donnant naissance à un électron Compton alors que le photon incident sera diffusé dans une direction différente. Dans le cas de photons de faible énergie ($< 0,5 \text{ MeV}$), le photon transportera la majeure partie de l'énergie alors que dans le cas où l'énergie incidente est forte ($> 2 \text{ MeV}$), l'énergie emportée par l'électron Compton sera très importante.

Ainsi, lors d'un rayonnement γ , l'ionisation et les effets délétères sont indirects. Ce n'est qu'après absorption de l'énergie du photon par un électron qu'il va apparaître des ionisations et donc des lésions radio-induites. A l'opposé des rayonnements α et β , peu pénétrants et se déchargeant donc de leur énergie sur de très faibles distances, le rayonnement γ , de par son fort pouvoir pénétrant de la matière, est le plus dangereux et le moins facilement maîtrisable.

III. Mesurer la Radioactivité^[6]

III.1. Les Grandeurs Caractérisant la Source

Une source est caractérisée par l'activité du radioélément qui la constitue, soit le nombre de désintégrations par seconde qu'elle subit. Elle est mesurée en Becquerels (Bq), 1 Bq correspondant à 1 désintégration par seconde. Une substance est dite radioactive si son activité est supérieure ou égale à 1 Bq. Lorsque celle-ci est rapportée à une unité massique (Bq/kg) ou volumique (Bq/l), nous parlons d'activité massique ou volumique. L'ancienne unité de mesure de l'activité est le Curie (Ci). Elle correspond à l'activité d'un gramme de radium (37×10^9 désintégrations par seconde). 1 nCi correspond à 37 Bq.

III.2. Les Grandeurs Utilisées en Radioprotection

Dans de nombreux cas, il n'est pas possible de mesurer directement les grandeurs. Il est alors possible d'estimer, à partir de mesures et coefficients de pondération définis par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR), des grandeurs dites subjectives.

La dose absorbée

Cette grandeur correspond à une quantité d'énergie absorbée, par unité de masse, par une cible. Tout d'abord exprimée en rad, elle est actuellement exprimée en Grays (Gy) correspondant aux joules par kilogramme ($1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ J/kg}$). Le débit de dose est défini comme une énergie absorbée par kilogramme et par unité de temps, c'est-à-dire comme une dose absorbée par unité de temps (Gy/s).

Il faut noter que ces unités ne prennent pas en compte le type de radiations auxquelles est soumise la cible, ainsi que le type de tissus irradiés. En effet, il a été constaté que 1 Gy α produisait plus de dégâts que 1 Gy X. Cette différence peut s'expliquer par la géométrie du dépôt d'énergie à l'échelle microscopique. De plus, la radiosensibilité est différente selon le type de tissus étudiés. On notera qu'un tissu hypoxique ou anoxique sera plus radiorésistant qu'un tissu suroxygéné ; le foie sera ainsi plus radiorésistant que la moelle osseuse, par exemple.

La dose équivalente (H_T)

Cette unité correspond à la dose absorbée par le tissu ou l'organe T, pondérée suivant le type et la qualité du rayonnement R. Elle est exprimée en Sievert (Sv). Pour cela, un facteur de pondération radiologique (w_R) appliqué à la dose moyenne $D_{T,R}$ dans l'organe (moyenne pour l'organe ou le tissu T de la dose absorbée du rayonnement R) est introduit. w_R est établi par la CIPR et par L'International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) (Tableau 1) ; il a ainsi pour but de refléter la nocivité de chaque type de rayonnement^[7]. Cette dose équivalente, utilisée dans le domaine de la radioprotection et donc dans le cadre réglementaire de faibles niveaux d'exposition, est :

$$H_T = \sum_R w_R D_{T,R}$$

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

Tableau 1 : Facteurs de pondération radiologique des différents types de radiation en fonction de leurs énergies^[7]

La dose efficace (E)

C'est la somme des doses équivalentes pondérées délivrées aux différents tissus et organes du corps par l'irradiation. Cette somme peut être considérée comme la dose fictive qui, si elle était administrée de façon uniforme au corps entier, entraînerait le même préjudice pour la santé (même nombre de cas de mortalité par cancer ou effets génétiques notamment) que l'ensemble des doses, plus ou moins différentes les unes des autres, réellement reçues par les divers organes ou tissus. Elle est définie par la formule suivante :

$$E = \sum_T w_T H_T = \sum_T w_T \sum_R w_R D_{T,R}$$

où w_T est le facteur de pondération tissulaire valable pour le tissu ou l'organe T. Ce facteur représente la contribution de cet organe au risque global pris en compte pour tout l'organisme. La somme de tous ces facteurs sur l'ensemble de l'organisme est égale à 1.

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

Tableau 2 : Facteurs de pondération des différents types de tissus^[7]

Le transfert linéaire d'énergie (TLE)

Le TLE correspond à l'énergie transférée au milieu par la particule incidente par unité de longueur de matière traversée. Bien que le TLE d'une particule ne soit qu'une quantité moyenne peu représentative, elle permet une classification radiobiologique des particules en fonction de leur énergie et de leur nature. Elle s'exprime en général en keV/ μm .

IV. Les Sources d'Exposition de l'Homme

Toute personne est soumise aux effets de radiations. En effet, alors qu'une partie de la radioactivité ambiante est due aux activités humaines, la radioactivité naturelle reste la première source d'irradiation. Dans les deux cas, la radioactivité est due à des atomes radioactifs appelés radionucléides.

IV.1. Radioactivité Naturelle

Une partie de la radioactivité naturelle est ainsi issue des radioisotopes engendrés par les supernovas et les rayonnements cosmiques. En Europe, les rayonnements cosmiques se traduisent par une irradiation moyenne d'environ 0,4 mSv par an au niveau de la mer. L'intensité du rayonnement ionisant augmente avec l'altitude. Le rayonnement cosmique entraîne une exposition externe directe et interagit avec des éléments atmosphériques et terrestres pour former des radionucléides secondaires (^3H , ^{14}C ...).

De nombreux radionucléides sont aussi contenus dans le sol. Il faut cependant remarquer que seuls les radionucléides à période longue tels que l'Uranium, le Thorium et le Potassium sont encore à l'état de traces facilement décelables dans l'environnement.

La radioactivité naturelle correspond à environ 77% de l'exposition humaine aux radiations selon une étude de Billon *et al.*, soit 2,5 mSv en moyenne^[8] (Tableau 3). Ainsi, le risque lié à l'activité tellurique issue de l'uranium contenu dans les roches granitiques est réel. Cependant, on voit aussi apparaître clairement le « risque radon ». En effet, selon l'environnement géologique et les matériaux utilisés dans la construction des habitations, la dose absorbée peut varier de 1 à 40 mSv. La radioactivité issue de notre corps, contenant du carbone 14 et du potassium 40, est elle aussi non négligeable (activité de 8000 Bq).

IV.2. Radioactivité Artificielle

La radioactivité artificielle joue aussi un rôle non négligeable au sein des rayonnements ionisants. Elle peut être de différentes natures :

- Les activités de recherches en physique des particules engendrent la synthèse artificielle de composés hautement instables dans les accélérateurs de particules (CERN, GANIL).
- Les activités de radiodiagnostic (radiographies...), de médecine nucléaire, de radiothérapie et autres utilisations médicales (synthèse de radionucléides pour les scintigraphies) sont sources de rayonnements ionisants correspondant à environ 20% de l'exposition humaine à la radioactivité.
- Les centrales nucléaires et les usines de retraits des déchets radioactifs produisent des déchets nucléaires.
- Les activités minières.
- Les retombées atmosphériques de Tchernobyl, des anciens essais nucléaires...

Il faut aussi noter que la dose cumulée provoquant des effets immédiats, c'est-à-dire la dose à laquelle nous commençons à constater les premiers symptômes d'altération sanguine, est de 500 mSv. Un risque cancérigène est cependant observé pour des doses plus faibles.

Nature de la source	Exposition humaine à la radioactivité selon l'OMS : mSv par personne et par an	Radioactivité naturelle en %	Radioactivité artificielle en %
Radon (gaz radioactif naturel souvent présent dans les rez-de-chaussée)	1,3	42%	
Irradiation d'origine médicale (Radiographies, scanners, radiothérapies...)	0,6		20%
Eléments absorbés par alimentation (essentiellement du potassium 40 contenu naturellement dans les aliments)	0,5	16%	
Rayonnement cosmique	0,4	13%	
Rayonnement interne	0,2	6%	
Autres origines artificielles, sauf énergie nucléaire civile (industries minières diverses, retombées atmosphériques des essais militaires, instruments de mesure, certains procédés industriels tels la radiographie de soudures...)	0,1		3%
Energie nucléaire civile	0,01		0,3%
Total	3,1	77%	23%

Tableau 3 : Exposition humaine à la radioactivité naturelle et artificielle^[8]

IV.3. Les Différents Types d'Exposition

L'Homme peut être exposé de deux façons aux rayonnements ionisants. Lorsque la source de l'irradiation est extérieure à l'organisme considéré, nous parlons d'exposition externe, alors que dans le cas où la source est absorbée à l'intérieur de l'organisme, nous parlons d'exposition interne.

L'exposition interne résulte d'une contamination par des particules radioactives qui peut se produire de différentes façons, par inhalation, par ingestion (nourriture contaminée), par radiothérapie métabolique avec injection de substances radioactives, par pénétration transcutanée d'une peau saine, par transfert sanguin à partir d'une plaie contaminée ou, dans certains cas, par contact avec un radioélément. Lors de ce type d'exposition, la contamination est continue jusqu'à l'élimination du radioélément par voie naturelle.

L'exposition externe peut elle aussi se produire de différentes manières. Selon l'éloignement entre la source et l'organisme (plus la source est éloignée, moins l'exposition sera importante), selon le type de protection (écran de plomb, épaisseur de verre etc.), selon le temps d'exposition (plus le temps d'exposition est long, plus la dose absorbée sera importante), selon le type d'irradiation (globale ou localisée), les conséquences seront différentes.

IV.4. Les Utilisations de la Radioactivité

L'uranium 238, avec le potassium 40 et le thorium 232, fait partie des plus fréquents radioéléments présents dans la croûte terrestre. De nombreux autres radionucléides tels que le radon ou le radium 242 sont issus des désintégrations successives des atomes précédents. Les principaux autres éléments radioactifs sont le curium 242 et 244, l'américium 241, le plutonium 239 et 241, le polonium 210, le césium 134, 135 et 137, l'iode 129, 131 et 133, l'antimoine 125, le ruthénium 106, le strontium 90, le krypton 85 et 89, le sélénium 75, le cobalt 60, le chlore 36, le soufre 35, le phosphore 32, et le tritium 3.

IV.4.1. Utilisation dans le domaine industriel

Il existe de nombreuses utilisations de la radioactivité dans le domaine industriel dont les deux majoritaires sont la production d'électricité et l'ionisation agroalimentaire.

IV.4.1.a. La production d'énergie

Une des principales applications de la radioactivité est la production d'énergie dans les centrales nucléaires (80% de l'électricité est produite par ce biais en France). La production d'énergie dans ces centrales est réalisée grâce à la fission de l'isotope ^{235}U de l'uranium. Cependant, malgré le fait que l'uranium soit un des éléments radioactifs les plus présents, l'isotope ^{235}U de l'uranium est très minoritaire (<1%) par rapport à l'isotope ^{238}U . Ainsi, avant utilisation, il est nécessaire d'effectuer un enrichissement en ^{235}U .



Des accidents majeurs ont eu lieu et ont montré les risques liés à l'énergie nucléaire et le besoin de sécurité. Aux Etats-Unis, sur l'île de Three Mile Island, en 1979, des défaillances entraînèrent la fusion du cœur du réacteur nucléaire. L'explosion resta heureusement confinée dans l'enceinte limitant les rejets dans l'environnement. A Tchernobyl, le 26 avril 1986, la fusion du cœur d'un réacteur engendra le relargage de radioactivité dans l'environnement et de nombreux décès.

IV.4.1.b. Le contrôle non destructif

Les traceurs radioactifs ou tirs interviennent dans le contrôle de nombreux procédés industriels pour détecter les fuites de liquide ou de gaz de canalisations inaccessibles, pour déceler les défauts internes d'un objet sans en modifier le matériau et sa structure par radiographie industrielle.

IV.4.1.c. L'agroalimentaire

Afin d'inhiber la germination, détruire des micro-organismes et ainsi augmenter la durée de conservation des aliments, l'ionisation est couramment utilisée. De plus, afin de limiter les populations d'insectes parasites, il est possible de relâcher dans la nature une grande quantité de mâles rendus stériles par irradiation et ainsi de lutter à grande échelle

contre le développement d'insectes nuisibles sans utiliser de produits chimiques. De même, l'utilisation de traceurs radioactifs permet d'étudier l'évolution des engrais absorbés par les plantes pour en déterminer leur devenir et les dates les plus favorables pour leur utilisation.

IV.4.2. Utilisations dans le domaine de la Recherche

IV.4.2.a. L'archéologie

Un radionucléide naturel particulièrement connu est le carbone 14 (^{14}C) ou radiocarbone. Ce radionucléide est produit en continu dans la haute atmosphère par interaction des rayons cosmiques avec l'azote et se désintègre à peu près à la même vitesse qu'il est produit. Ainsi, le taux de carbone reste à peu près constant au cours du temps. Dans un organisme, de par les échanges avec l'extérieur (respiration, photosynthèse, alimentation), un équilibre $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ est aussi réalisé. Cependant, après la mort d'un organisme, la teneur en carbone 14 diminue par manque d'échanges avec l'extérieur selon la loi de désintégration radioactive, en faisant ainsi un outil de choix pour la datation en archéologie.

Cette loi de désintégration radioactive selon laquelle la décroissance exponentielle du nombre d'atomes radioactifs est due à l'aspect probabiliste de la radioactivité fut décrite pour la première fois par Rutherford. Un atome radioactif est ainsi caractérisé par sa période correspondant au temps nécessaire pour que la moitié des entités radioactives disparaissent. La désintégration radioactive suivant une loi statistique, la loi de décroissance est du type $N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$ où N_0 est le nombre de nucléides radioactifs initial, $N(t)$ le nombre de nucléides radioactifs à un instant t et λ la constante radioactive de l'élément.

IV.4.2.b. La Biologie

En Biologie, la radioactivité est utilisée à des fins de marquage radioactif de composés permettant ainsi de tracer la molécule. Le radioélément est choisi pour avoir les mêmes propriétés chimiques, biologiques et électroniques que l'élément non radioactif. Cependant, ce radioélément étant facilement détectable, il peut être suivi dans le milieu biologique considéré. Le marquage est ainsi une technique de choix pour la pharmacocinétique ou l'étude de certains phénomènes cellulaires.

IV.4.3. Utilisations dans le domaine médical

La première source d'exposition artificielle à la radioactivité est l'utilisation médicale à des fins de diagnostic ou de thérapie. Une autre utilisation fréquente de l'ionisation γ est la stérilisation du matériel médical.

IV.4.3.a. Radiodiagnostic

Nous pouvons noter que l'utilisation de rayons X peu ionisants pour la radiographie correspond à l'utilisation principale de la radioactivité dans ce domaine. Cependant, bien que peu dangereux, le radiodiagnostic doit être utilisé avec parcimonie. En plus de la radiographie, de nombreux radiodiagnostic sont couramment utilisés :

- Le scanner, permettant par rayons X l'obtention d'une image sous forme d'une série de coupes transverses. Par ce type d'examen, il est possible de voir tous les organes en profondeur sans être gêné par leur superposition. Dans le cas d'un scanner médical, un patient reçoit une dose de 0,05 mSv à 15 mSv selon les organes. Il est donc recommandé de ne pas faire plus de trois examens de ce type par an.
- L'arthrographie est une radiographie d'une articulation. Cette technique est utilisée pour localiser le cartilage, les ligaments, les ménisques... Cette technique nécessite cependant l'injection intra-articulaire d'un agent de contraste.
- La scintigraphie permet de dépister certaines maladies par observation de la morphologie et du fonctionnement d'un organe rendu radioactif par fixation d'un radioélément présentant un tropisme pour l'organe étudié.

IV.4.3.b. Radiothérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement locorégional des cancers, utilisant des radiations pour détruire les cellules cancéreuses tout en épargnant les tissus sains périphériques. La radiothérapie est utilisée chez plus de la moitié des patients ayant un cancer. Elle peut être utilisée seule, ou associée à la chirurgie et à la chimiothérapie. Ses indications sont liées au type de tumeur, à sa localisation, à son stade et à l'état de santé général du patient.

On distingue quatre grandes techniques de radiothérapie :

- La radiothérapie externe est la plus connue et la plus utilisée. La source de rayonnement, extérieure au malade, permet une irradiation localisée des tissus tumoraux par rayonnement γ , X, ou par faisceau d'électrons.
- La curiethérapie consiste à introduire, pour une durée limitée (en général, quelques heures) ou définitivement (source de période courte), une source radioactive dans la tumeur ou dans une cavité de contact.
- La radiothérapie métabolique vectorielle consiste en l'injection d'une source radioactive liquide qui va se fixer sur les cellules cibles.
- La radiochirurgie, proche de la radiothérapie externe, utilise un ou plusieurs faisceaux ultra-focalisés permettant de minimiser la dose délivrée aux tissus adjacents et ainsi d'éviter les zones de surdosage.

Le risque de sur-irradiation médicale apparaît comme bien réel pour ce type de thérapie. En effet, un contrôle et un suivi rigoureux des patients est nécessaire afin d'optimiser le ratio bénéfices/risques et éviter les sur-irradiations médicales (Ranguel de 2006 à 2007 ; Epinal entre 1987 et 2006).

IV.4.4. Utilisations dans le domaine militaire

Les armes nucléaires sont des armes de destruction massive qui utilisent l'énergie dégagée par la fission de noyaux atomiques lourds (uranium, plutonium) pour les bombes A ou par la fusion de noyaux atomiques légers (hydrogène) pour les bombes H.

L'effet destructeur de ce type d'armes est dû au souffle et à l'augmentation de la température ainsi qu'aux rayonnements ionisants. Ce type d'arme a été utilisé deux fois par les Etats-Unis contre le Japon durant la Seconde Guerre Mondiale. Les bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki ont entraîné plusieurs centaines de milliers de morts.

IV.4.4.a. Les différentes armes nucléaires

Les premières bombes développées furent les bombes à fission dites atomiques. Leur principe est basé sur le déclenchement d'une réaction nucléaire en chaîne. Les noyaux de la matière fissile contenue dans la bombe se scindent (fissionnent) par action du détonateur et libèrent des neutrons. Ces derniers percutent d'autres noyaux de matière fissile, qui à leur tour libèrent des neutrons et ainsi de suite. La réaction en chaîne produit alors une énergie colossale.

Un second type d'armement nucléaire apparut sous la forme de « bombes à hydrogène » ou « bombes H ». Ici, le deutérium ou le tritium contenu permet de réaliser par chauffage à très hautes températures une fusion nucléaire. L'amorce, permettant d'obtenir ces conditions, est constituée d'une bombe à fission au plutonium.

En plus de ces deux types de bombes, d'autres armes nucléaires ont été développées :

- La bombe à Neutrons est une bombe à fusion qui, par sa géométrie, renforce l'émission de neutrons au moment de son explosion.
- La bombe sale ou bombe radiologique est constituée d'un explosif traditionnel entouré de matière radioactive. Son but est de polluer et de contaminer sa zone d'explosion sans produire une puissante explosion.
- Les armes nucléaires tactiques ou de batailles sont des armes nucléaires de faible puissance dont le but est l'attaque et la destruction des armées ennemies.

IV.4.4.b. L'utilisation des armes nucléaires

Après sa découverte lors du projet Manhattan, l'engouement pour l'arme nucléaire aboutit à la mise en place de nombreux projets d'armement et ainsi à une prolifération rapide des armes nucléaires. Ainsi, l'URSS développa l'arme atomique en 1949, le Royaume-Uni en 1957, la France en 1960, la Chine en 1967, l'Inde et le Pakistan en 1998... Afin de limiter cette prolifération, furent ratifiés en 1968 le traité de non-prolifération nucléaire (TNP), et en 1972 et en 1979 les Strategic Arms Limitation Talks (SALT). Depuis les années 1990, cette tendance s'est inversée au profit de la réduction des arsenaux nucléaires grâce à la mise en place de nouveaux traités (le Strategic Arms Reduction Treaty, START de 1991 et de 1993 et Le Strategic Offensive Reduction Treaty, SORT de 2002).

En raison de sa puissance, l'arme nucléaire est généralement considérée comme une arme de dissuasion. Cependant, l'impact psychologique potentiel d'une arme nucléaire en fait une cible de choix pour des mouvements ou États terroristes. Ainsi, encore aujourd'hui, les tensions géopolitiques liées à la prolifération des armes nucléaires sont présentes. Le 9 octobre 2005, la Corée du Nord déclare avoir effectué son premier essai nucléaire concluant. Le 4 Octobre 2006, l'Iran rejette explicitement toute suspension de l'enrichissement d'uranium, s'ouvrant ainsi aux sanctions de l'ONU.

De plus, la possible survenue d'un attentat à l'arme nucléaire est considérée comme plausible par la plupart des experts et pourrait potentiellement occasionner d'importantes

conséquences, tant humaines que socio-économiques. Le passé, avec l'accident de Tchernobyl et les bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki, nous permettent d'imaginer les effets d'un attentat nucléaire ou radiologique sur la population environnante.

V. Se Protéger des Radiations

Alors que le nombre d'utilisations de la radioactivité augmentait et que les dangers liés à cette utilisation apparaissaient, il a été nécessaire de développer des moyens de contrôle et de protection contre ce risque. Ainsi fut créé en 1928, après la mise en évidence des premiers érythèmes radio-induits et du lien entre les leucémies et l'utilisation des rayons X, un comité pour la protection contre les rayonnements X et le radium.



Après la seconde guerre mondiale, en 1950, ce comité fut restructuré pour prendre le nom de CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique) et étendre son activité du milieu hospitalier à l'évaluation et à la mise en place de recommandations pour la gestion de l'utilisation de la radioactivité dans les différents domaines d'activité et pour la protection des personnels des industries.

Progressivement, avec l'augmentation de la radioactivité dans le domaine industriel, le champ d'action de la radioprotection s'est étendu à l'ensemble de la population et de l'environnement. Ainsi, le rôle de la radioprotection, selon la CIPR est « d'assurer un niveau de protection adéquat pour l'Homme, sans pénaliser indûment les pratiques bénéfiques qui exposent aux rayonnements ionisants ». En 1952, l'Assemblée Générale des Nations Unies créa un comité scientifique chargé d'étudier les conséquences radiologiques des retombées des tirs nucléaires aériens.

Plus particulièrement, en France, l'IRSN créé en 2001 est « l'expert public en matière de recherche et d'expertise sur les risques nucléaires et radiologiques » et l'ASN aussi créée en 2001, est l'autorité compétente en sûreté nucléaire.

V.1. Des Normes et des Réglementations

Afin de limiter les risques liés à l'utilisation de la radioactivité, une réglementation basée sur trois principes a été mise en place. Le premier principe est que l'utilisation des radiations ionisantes doit être justifiée, c'est-à-dire qu'aucune pratique conduisant à une irradiation ne doit être adoptée à moins qu'elle ne produise un bénéfice suffisant pour les individus exposés ou pour la société, compensant alors le préjudice lié à cette irradiation. De plus, l'irradiation doit être optimisée c'est-à-dire qu'elle doit être le plus faible possible dans la limite où l'effet désiré reste apparent. Le dernier principe est qu'aucun individu ne doit recevoir des doses d'irradiation supérieures aux limites maximum autorisées. En France, la réglementation fixe les limites annuelles maximales de dose à 20 mSv pour les travailleurs du nucléaire et à 1 mSv pour la population.

Les normes internationales sont basées sur les conséquences épidémiologiques des explosions d'Hiroshima et de Nagasaki. Le risque pour la santé est considéré comme proportionnel à la dose reçue et toute dose absorbée est considérée comme un risque cancérigène et génétique par la CIPR (1990).

Dans les installations utilisant la radioactivité, les zones d'activités sont divisées en zones de couleur, en fonction du débit de dose existant dans la zone, permettant de déterminer facilement le risque d'irradiation et de limiter les temps d'exposition :

Zone bleue : de 0,0025 à 0,0075 mSv.h⁻¹

Zone verte : de 0,0075 à 0,02 mSv.h⁻¹

Zone jaune : de 0,02 à 2 mSv.h⁻¹

Zone orange : de 2 à 100 mSv.h⁻¹

Zone rouge : > 100 mSv.h⁻¹

De plus, des normes alimentaires ont été introduites. Ainsi, l'Union Européenne a fixé des activités contenues dans les aliments à ne pas dépasser.

Afin de contrôler les doses absorbées par les travailleurs, deux types de dosimétrie existent :

- La dosimétrie active ou opérationnelle, qui a pour but d'informer la personne de la dose reçue en temps réel, et ainsi de permettre une optimisation des méthodes de travail afin de diminuer l'exposition. Les données recueillies sont transmises périodiquement à l'IRSN.

- La dosimétrie passive ou réglementaire, qui a pour rôle de cumuler les doses absorbées par un travailleur durant une période de 1 ou 3 mois. Au bout de cette période, les données de dosimétrie sont aussi transmises au fichier central de l'IRSN.

V.2. Des Moyens Physiques

Afin de se protéger des effets délétères de la radioactivité, il est possible d'arrêter physiquement les rayonnements (Figure 5). Cependant, alors qu'une simple feuille de papier ou 4 à 5 cm d'air permettent l'arrêt du rayonnement α , et qu'une feuille d'aluminium ou quelques mètres d'air empêchent la propagation du rayonnement β , le rayonnement γ n'est arrêté qu'après de grandes épaisseurs de plomb ou de béton. Cependant, ce moyen de protection ne peut pas s'appliquer en cas de risque d'exposition à grande échelle ou dans de nombreux cas d'accidents.

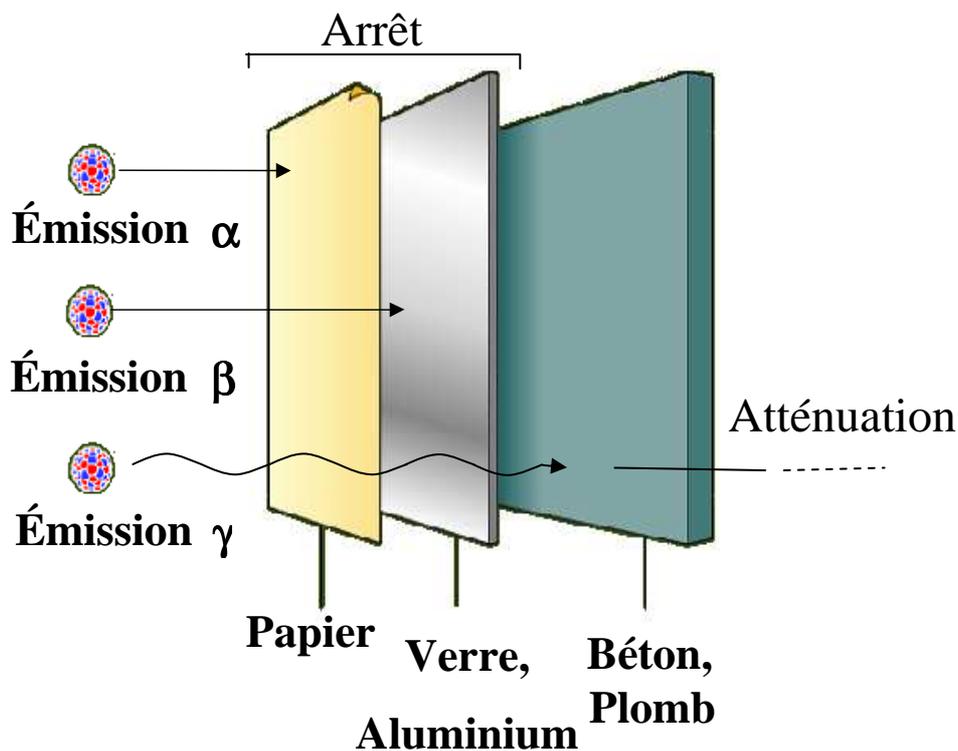


Figure 5 : Protection physique contre les rayonnements ionisants

V.3. Des Moyens Chimiques

Les limitations de la radioprotection physique ont conduit à la nécessité d'une radioprotection chimique. En effet, nous ne pouvons pas oublier que l'exposition aux rayonnements ionisants peut être accidentelle comme lors de l'accident de Tchernobyl ou toucher une grande part de la population (Hiroshima, Nagasaki). De plus, certains corps de métier tels que les travailleurs du nucléaire, pilotes d'avion et astronautes sont soumis au risque de surexposition pouvant avoir des incidences à long terme sur la santé. Ce risque a engendré la naissance de projets visant à développer des molécules chimiques ou biologiques pouvant, s'ils sont absorbés avant irradiation, protéger des effets délétères des irradiations.

Ce type de radioprotection sera plus particulièrement développé dans le chapitre 3.



« La Terre est le berceau de l'humanité, mais qui veut passer sa vie dans un berceau ? » Konstantin Tsiolkovsky

Chapitre 2 : *De l'Irradiation* *Aux Symptômes*

I. Mécanismes d'Action des *Rayonnements Ionisants*

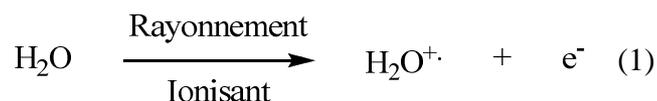
Après une irradiation, un ensemble de phénomènes physiques initiaux aboutissent, après réactions en chaîne, à la dégradation de biomolécules essentielles à la vie des cellules. La transformation chimique résultant de l'irradiation est issue des phénomènes d'excitations et d'ionisations. Nous verrons ainsi l'ensemble des phénomènes reliant les interactions physiques aux phénomènes chimiques, biologiques (dégradation des biomolécules telles que l'ADN, les membrane lipidique...) et d'altération des fonctions cellulaires pour conduire aux résultats sur l'organisme.

I.1. Effets Moléculaires des Rayonnements Ionisants

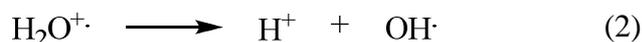
Alors qu'au premier abord, nous pourrions supposer que la majorité des dégâts dus aux rayonnements ionisants résulte de l'absorption directe de la radiation, c'est la radiolyse de l'eau qui engendre plus de 80% des dégâts. Ce constat peut s'expliquer par la quantité très importante d'eau dans les organismes vivants (environ 80%) ainsi que par la possibilité de décomposition de cette eau par les radiations, appelée radiolyse de l'eau.

I.1.1. La radiolyse de l'eau

Le phénomène initial de la radiolyse de l'eau est l'ionisation d'une molécule d'eau, due à l'absorption d'environ 13 eV.



Le radical cation ($\text{H}_2\text{O}^{\cdot+}$) alors formé est instable, d'une durée de vie de 10^{-10} s. Il se stabilise en donnant naissance à un radical hydroxyle OH^{\cdot} très réactif selon le mécanisme suivant :



Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) est le second plus puissant oxydant chimique juste après le Fluor. Ce radical a une durée de vie de moins d'1 ns et réagit donc, *in vivo*, très près de son site de production^[9]. Il est considéré comme le principal agent de radiolésions. De plus, les électrons arrachés par ionisation des molécules d'eau perdent leur énergie par collisions (à l'origine de la formation de radicaux H^{\cdot}) pour être piégés par les molécules d'eau donnant naissance à des électrons aqueux (e^-_{aq}) très réducteurs. Une partie des molécules d'eau étroitement liées aux électrons aqueux va se dissocier pour donner naissance à des radicaux H^{\cdot} et OH^{\cdot} (Figure 6). De plus, il faut remarquer que, dans des systèmes biologiques, les électrons aqueux peuvent aussi réagir avec le dioxygène dissous ou des molécules organiques^[10, 11].

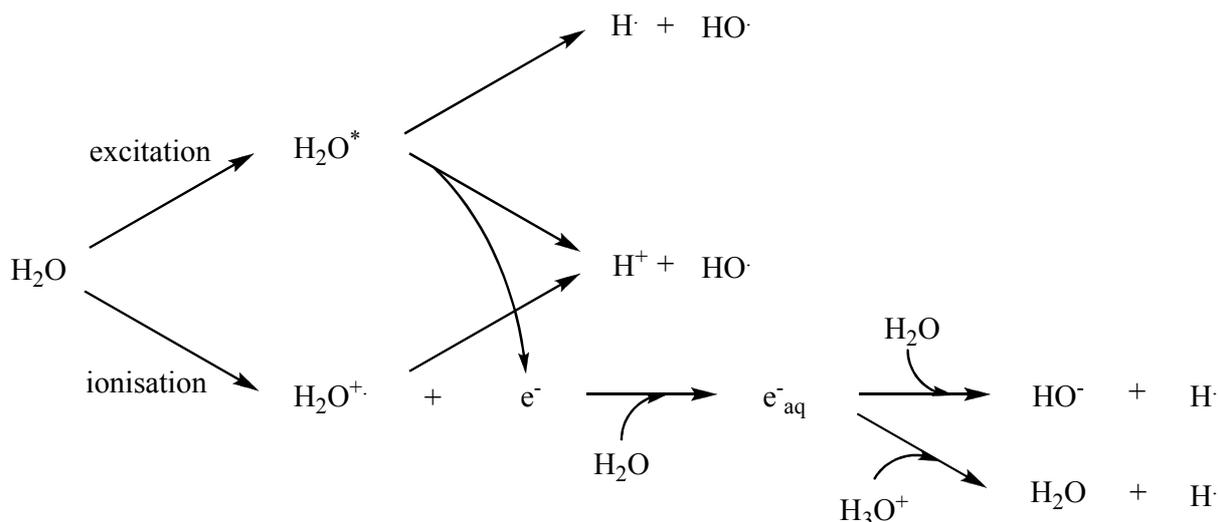
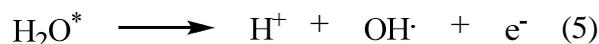


Figure 6 : La Radiolyse de l'eau

Le second effet pouvant aboutir à la radiolyse de l'eau consiste en une simple excitation de cette molécule (Figure 6). La molécule d'eau alors excitée peut se stabiliser selon les mécanismes suivants, aboutissant soit à la formation de H· et de OH· soit à la formation de H⁺, OH· et d'un électron libre e⁻ :



Les différents radicaux formés lors de la radiolyse de l'eau vont ensuite pouvoir diffuser dans le milieu et être à l'origine de lésions au niveau de l'ADN ou au niveau d'autres macromolécules (protéines, lipides...) expliquant ainsi une partie des radiolésions. Ainsi, la diffusion des radicaux est aussi à prendre en compte. En effet, les radicaux peuvent soit réagir avec des molécules organiques soit aboutir à la formation de nouvelles entités stabilisées par réaction de deux radicaux entre eux. Le type de réaction se produisant dépendra essentiellement de la répartition spatiale des radicaux concernés :



Parmi les molécules stables, H₂O₂ peut induire des dommages de par son pouvoir oxydant très fort. H₂O₂ est ainsi impliqué dans les phénomènes d'oxydation dus à la réaction d'Haber-Weiss ou de peroxydation lipidique aboutissant à la destruction des membranes lipidiques.

I.1.2. Effet direct et effet indirect

Comme expliqué précédemment, les effets des rayonnements ionisants sur l'organisme sont de deux types^[12] :

I.1.2.a. L'effet direct

Il consiste en l'absorption directe des rayonnements ionisants par les macromolécules qui s'excitent alors. Les molécules excitées, instables, tendent vers la stabilisation par dissipation de leur énergie excédentaire soit par émission de photons par fluorescence soit par rupture homolytique d'une liaison covalente en deux radicaux.

Cet effet est classiquement considéré comme mineur (15 à 20% des lésions).

I.1.2.b. L'effet indirect

L'effet indirect correspond à l'interaction des produits de la radiolyse de l'eau avec les biomolécules présentes. Il est prépondérant dans les systèmes vivants (80% des lésions). Les radicaux peuvent, comme expliqué précédemment, diffuser en solution aqueuse pour réagir avec des molécules organiques et les modifier.

Les radicaux X \cdot peuvent réagir avec une molécule RH par abstraction de l'hydrogène :



Dans le cas du radical hydroxyle, l'hydroxylation du radical organique est possible :



D'autres réactions, telles que les réarrangements entre deux radicaux organiques ou les réactions intramoléculaires peuvent aussi se produire.



Dans le cas de molécules présentant des insaturations telles que des doubles liaisons, des ouvertures de liaisons ainsi que la formation de composés d'addition sont observées.

I.1.3. L'effet oxygène

L'oxygène a depuis longtemps été établi comme une source de radiosensibilisation. Il explique aussi la très forte résistance aux radiations des cellules hypoxiques telles que les cellules cancéreuses. Cette radiosensibilisation est entre autres due à l'effet oxygène consistant en la réaction de dioxygène avec des radicaux organiques R \cdot pour former des radicaux peroxy en chaîne selon le cycle suivant :

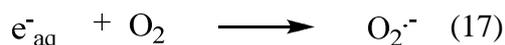


Cet effet est impliqué dans des phénomènes tels que la peroxydation lipidique.

De plus, le dioxygène, présent au moment de l'irradiation, augmente les effets initiaux du radical hydroxyle et contribue à fixer les radiolésions par formation de l'intermédiaire de $\text{HOO}\cdot$ ^[13].



Le second aspect de l'effet oxygène est la formation du radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ à partir de dioxygène et d'électrons aqueux :



Bien qu'au premier abord, ce radical ne paraît pas chimiquement très réactif, celui-ci possède une durée de vie assez longue, induisant ainsi des réactions pendant un certain temps. De plus, ce radical anion peut réagir avec de l'eau pour former le radical $\text{HOO}\cdot$ très réactif :



I.2. Effets Biochimiques des Rayonnements Ionisants

Les deux voies de dégradation expliquant la toxicité des rayonnements ionisants sont la dégradation directe par absorption de l'énergie du rayonnement ionisant ou la dégradation indirecte due aux radicaux hydroxyles très réactifs. Les dégradations touchent la plupart des biomolécules telles que l'ADN, les protéines, les sucres, les alcools ou les lipides^[14, 15].

I.2.1. Effets sur l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN)

Le maintien de l'intégrité génétique d'un individu est essentiel à sa survie. L'ADN apparaît ainsi comme une biomolécule essentielle permettant la transmission de l'information génétique d'une cellule à ses descendantes. Cependant, l'ADN est soumis à de nombreuses attaques inévitables induisant plusieurs milliers de lésions par jour et par cellule. Des changements dans l'intégrité structurale, par altération des bases ou des sucres ainsi que par modification dans la séquence des nucléotides qui composent la double hélice de l'ADN, peuvent induire des erreurs dans le code génétique et ainsi interférer avec la réplication ou la transcription du génome.

L'ADN, de par son rôle dans l'organisme, est une cible privilégiée pour l'irradiation. En effet, les dommages subis par l'ADN ont été établis comme la source majeure des effets biologiques observés. Par exemple, en 1977, Warters *et al.*^[16] montrent que la toxicité de l'¹²⁵I radioactif dépend de son site d'incorporation et engendre 300 fois plus de toxicité s'il est absorbé sur l'ADN que s'il est absorbé sur les membranes. Depuis, cet effet a été confirmé par de nombreuses études, et l'ADN, bien que n'étant pas la cible unique de l'irradiation, reste une molécule pertinente dans l'étude des radioprotecteurs^[17].

I.2.1.a. Structure de l'ADN

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est présent dans toutes les cellules d'un organisme. Il constitue le patrimoine génétique d'un individu. Cette molécule permet la transmission fidèle des caractères héréditaires d'un organisme ainsi que les informations nécessaires au développement de chaque cellule et ce notamment par la production de protéines.

La molécule d'ADN est un biopolymère constitué de deux chaînes de nucléotides formant une double hélice. Ce polymère peut atteindre jusqu'à 1,60 m de long chez l'Homme lorsqu'il est déroulé. Chaque nucléotide composant les chaînes est composé d'un phosphate relié à un sucre, le 2-désoxyribose, lui même relié par une liaison *N*-glycosidique à l'une des quatre bases suivantes : l'adénine et la guanine qui sont des bases puriques, la thymine et la cytosine qui sont des bases pyrimidiques (figure 7).

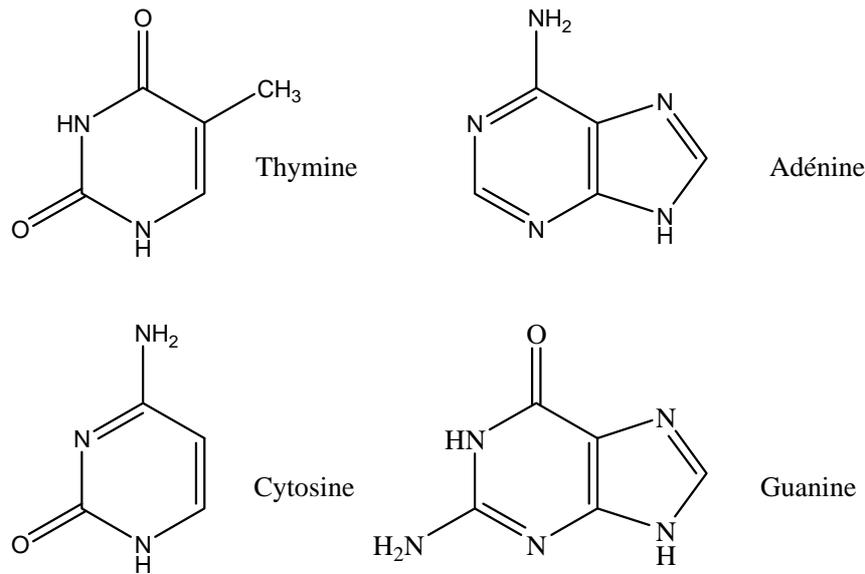


Figure 7 : Les quatre bases de l'ADN

L'ADN soumis à une irradiation peut être modifié, ce qui conduit à en altérer la structure. Cependant, tout individu voit son ADN constamment soumis à de nombreuses attaques par l'environnement (pollution, stress oxydant etc.) et ainsi plusieurs milliers de lésions de l'ADN par jour et par cellule apparaissent. Afin de limiter les dommages et réparer fidèlement les dégradations de cette molécule, un ensemble de processus, au niveau de l'ADN et de la cellule, permet le maintien de l'intégrité génétique d'un individu^[18]. Aussi, lors d'une irradiation, un ensemble de protéines permettra la réparation d'une partie de l'ADN endommagé. Cependant, plus l'irradiation ou plus précisément, plus la densité des ionisations reflétée par le TLE (Transfert Linéique d'Énergie) sera importante, plus les dégâts seront nombreux et difficilement réparables^[19, 20]. Les conséquences de l'irradiation sont donc très variables. Lors d'une faible irradiation, le nombre et la gravité des dommages de l'ADN seront considérés comme mineurs et les enzymes réparatrices de la cellule permettront une réparation des lésions. Si la réparation n'est pas fidèle, une mutation génique apparaît pouvant avoir, ou non, des conséquences à long terme. Pour des niveaux élevés d'irradiation, elle conduit à la mort cellulaire immédiate ou différée.

Il existe deux types de dommages radio-induits de la molécule d'ADN : les cassures de l'ADN, les lésions ou modifications de bases... (Figure 8)

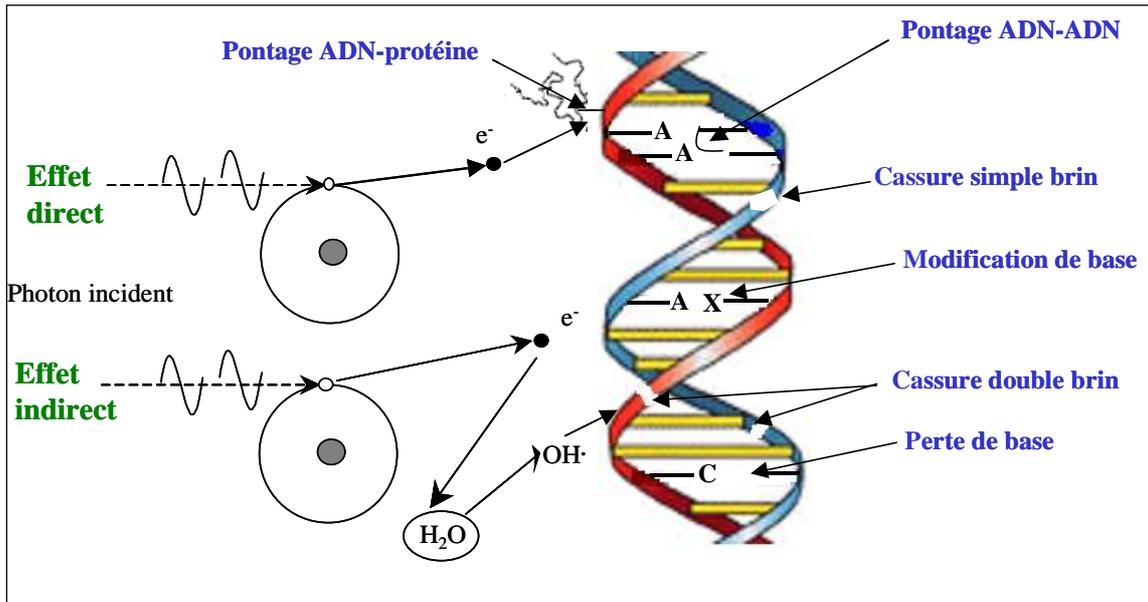


Figure 8 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants^[21]

I.2.1.b. Les cassures simple et double brin de l'ADN

Les cassures simple et double brin de l'ADN sont dues à une rupture de la chaîne sucre-phosphate liant les bases de l'ADN entre elles. Les cassures simple brin représentent une part importante des dégâts engendrés par l'irradiation (environ 1000 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma). Les cassures double brin sont plus rares (40 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma). Elles correspondent à deux cassures sur les brins opposés de l'ADN situées à moins de dix paires de base l'une de l'autre. Elles sont beaucoup plus dangereuses pour l'organisme et sont reconnues comme première cause de létalité cellulaire lors d'une irradiation^[18]. Ces cassures peuvent être issues soit d'une particule dégradant les deux brins, soit de deux dégradations de type cassure simple brin. Elle est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases et hétérologue dans le cas contraire. Les ruptures hétérologues sont les plus fréquentes.

Une cassure simple ou double brin peut conduire à une perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone lésée. Ainsi, la dégradation de l'ADN par cassure simple ou double brin peut être considérée comme un des effets les plus graves de l'irradiation. Nous noterons aussi que ces cassures sont dues aux deux effets : à l'effet direct, s'apparentant à une ionisation directe de l'ADN, ainsi qu'à un effet indirect dû à la production de ROS (Radical Oxygen Species) dont les radicaux hydroxyles, généralement modélisés *in vitro* par réaction de Fenton, ou les électrons libres aqueux.

La première explication de la cassure du squelette de l'ADN est l'abstraction du proton H_4' par les radicaux hydroxyles aboutissant à la formation de phosphoglycolate et de propenal^[22] (Figure 9) :

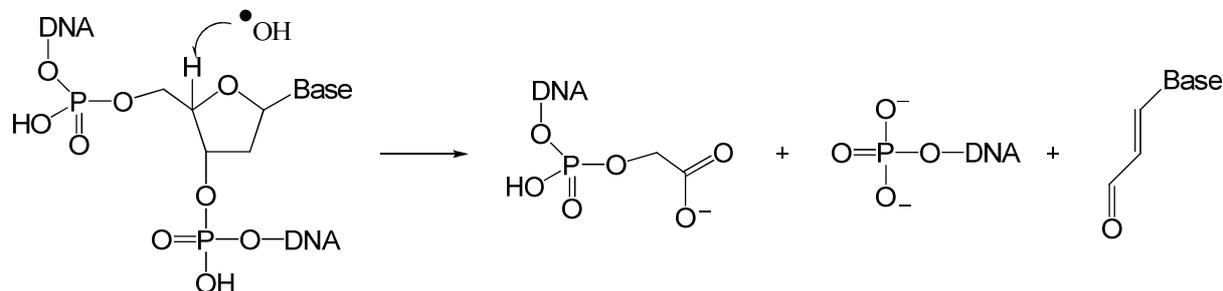


Figure 9 : Dégradation de l'ADN par abstraction en H_4'

Le second type d'oxydation possible dû aux radicaux hydroxyles est la formation de 5'-aldéhyde par abstraction du proton en H_5' (Figure 10) :

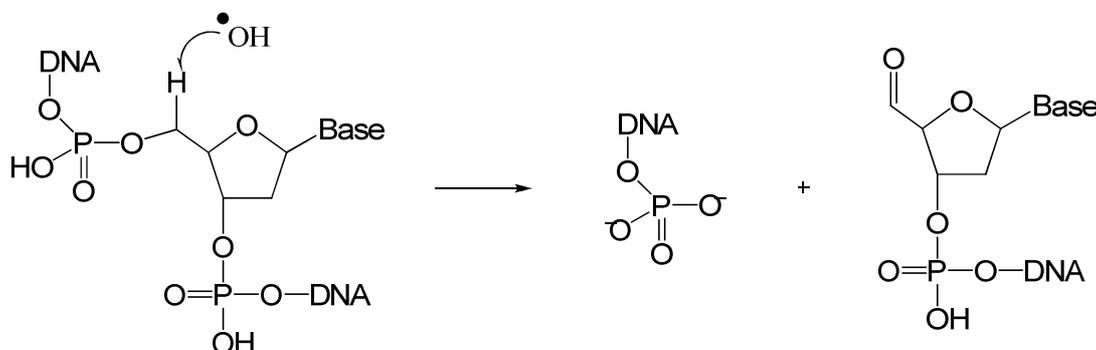


Figure 10 : Dégradation de l'ADN par abstraction en H_5'

Des pontages intra ou inter chaînes ou des pontages ADN/protéines environnantes peuvent aussi se former lors d'irradiations dans le cas où deux radicaux sont produits à la fois dans l'ADN et dans une protéine. En général, le pontage est observé entre les acides aminés « tyrosine » des protéines et les bases pyrimidiques de l'ADN.

1.2.1.c. Les dommages du cytosquelette de l'ADN

Les dommages du cytosquelette de l'ADN peuvent être dus à la modification ou à la destruction des bases, à des phénomènes de pontage et de formation de dimères ou à l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces dégâts sont prépondérants (environ 1500 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma) et sont facilement réparables.

Les bases dégradées sont dans certains cas stables, mais de nombreuses modifications induisent leur instabilité et leur dégradation. De plus, la toxicité et l'effet mutagène de certaines bases modifiées sont réels^[23, 24]. Nous pourrions noter que les bases pyrimidiques sont plus radiosensibles que les bases puriques. Les modifications des bases peuvent être dues soit à l'effet direct soit à l'effet indirect.

- Dans le cas de l'effet indirect, le premier effet des radicaux hydroxyles sur les nucléosides est l'oxydation des doubles liaisons des bases, généralement en position C₅ et C₆ des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et C₄ et C₈ des bases puriques (adénine, guanine).

En prenant par exemple la 2'-deoxyguanosine, le radical hydroxyle peut oxyder la molécule en 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine par abstraction d'hydrogène suivie d'une cyclisation intramoléculaire^[22] (Figure 11) :

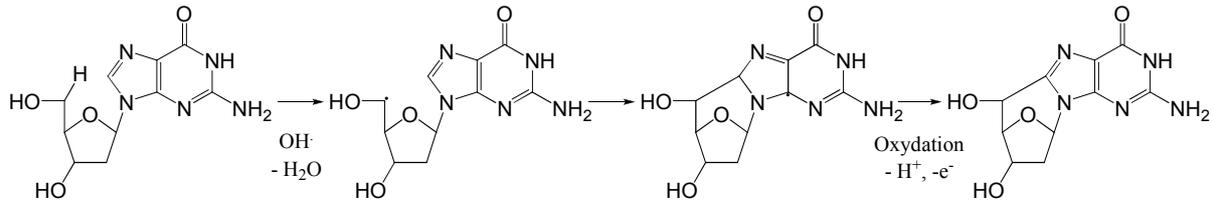


Figure 11 : Oxydation de la 2'-deoxyguanosine en 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine

La seconde réaction possible est la formation de la 8-oxo-2'-deoxyguanosine (Figure 12) :

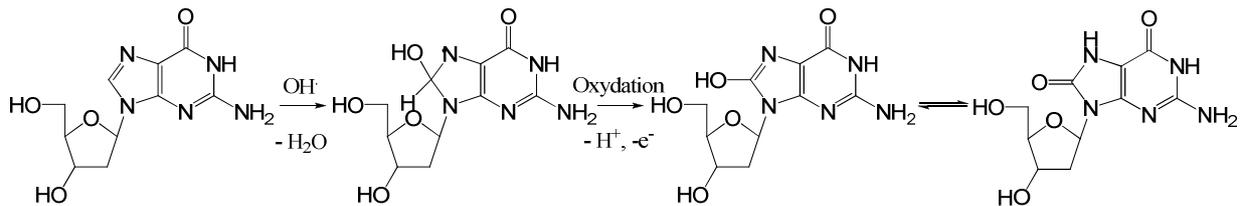


Figure 12 : Oxydation de la 2'-deoxyguanosine en 8-oxo-2'-deoxyguanosine

Il a été remarqué que ce type de réaction est possible avec la plupart des « building blocks » de l'ADN même si les dérivés de la guanine sont les structures les plus facilement oxydables. *In vitro*, il est possible de simuler l'effet indirect de la radiation sur les nucléosides en utilisant la réaction de Fenton.

- Lors d'une absorption directe de la radiation, on observe une ionisation de la base. Le radical cation ainsi obtenu s'hydrate, aboutissant à l'oxydation de la base (Figure 13) :

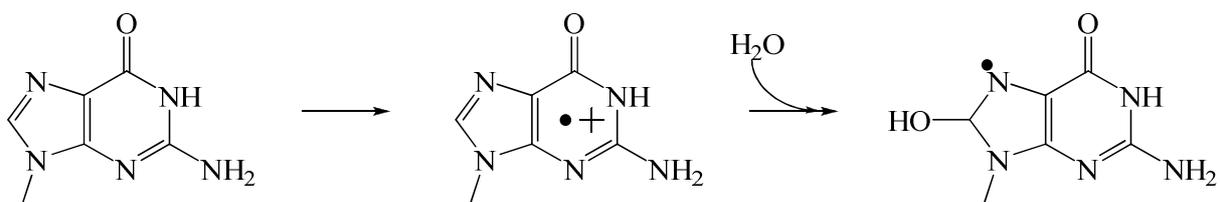


Figure 13 : Oxydation de la guanine par effet direct de la radiation

I.2.2. Effet sur les protéines

Similairement à la dégradation de l'ADN par les radiations, les protéines peuvent être désorganisées par oxydation des aminoacides ou dégradées par clivage. En particulier, nous noterons que les protéines contenant des groupements thiols tels que les enzymes cellulaires et les protéines de transport sont facilement oxydables avec formation de ponts disulfures, et que les peptides « riches en fonctions acides » sont facilement endommagés par les irradiations^[25, 26].

Dans tous les cas, une fois oxydée, la protéine n'est plus utilisable par l'organisme. Par exemple, lorsque deux résidus de type « cystéine » sont proches, ces derniers peuvent former par oxydation des ponts disulfures aboutissant à l'inactivation des protéines porteuses de ces résidus. Les ponts disulfures peuvent être réduits par des enzymes présentes dans la cellule.

D'autres lésions irréversibles telles que des réticulations (formation de ponts bi-tyrosine détectables par fluorescence), des coupures, des modifications de certains acides aminés peuvent aussi avoir lieu et modifier la structure secondaire et tertiaire des protéines. Après modification, les protéines deviennent très hydrophobes et vont pouvoir former des agrégats dans et autour des cellules^[27].

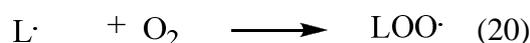
I.2.3. Effet sur les lipides

Les membranes cellulaires sont essentiellement composées d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Ceux-ci sont des cibles de choix pour les ROS (Reactive Oxygen Species) tels que le radical hydroxyle capable d'arracher un proton sur un carbone en α de deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué ensuite oxydé en radical peroxy^[27, 28].

Ainsi, lors d'irradiations, les radicaux hydroxyles peuvent initier la peroxydation lipidique par abstraction d'un proton de la chaîne aliphatique de l'acide gras (LH) aboutissant à un radical alkyl (L) :



Le radical résultant peut, s'il n'y a pas réarrangement entre deux radicaux lipidiques, réagir avec de l'oxygène pour donner le radical peroxyde $\text{LO}_2\cdot$:



La peroxydation lipidique entre alors dans une réaction en chaîne où le radical peroxyde va réagir avec un acide gras adjacent pour donner un hydroperoxyde lipidique et un autre radical alkyl L' :



Les hydroperoxydes peuvent être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde...) et en alcanes (hydroxynonéal...) toxiques (Figure 14).

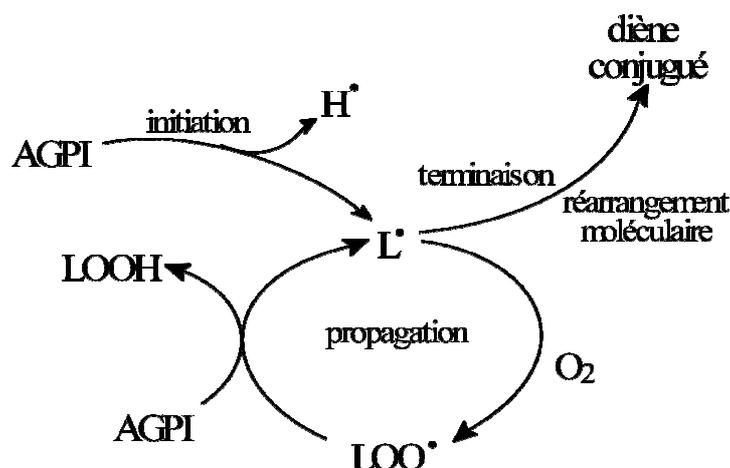


Figure 14 : Cycle de dégradation des AGPI par peroxydation lipidique

I.3. Effets Cellulaires des Rayonnements

Au niveau de la cellule, trois grands types de lésions peuvent apparaître. Alors que certaines lésions sont létales car elles touchent les fonctions vitales de la cellule, d'autres lésions sont dites sublétales, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas individuellement létales mais réparables. Cependant, l'accumulation de ces dernières peut entraîner la mort cellulaire. Le dernier type de lésions correspond à des lésions potentiellement létales c'est-à-dire des lésions qui sont réparables mais qui doivent être réparées avant la division cellulaire pour permettre une survie. Ainsi, en radiobiologie, la notion de mort cellulaire apparaît pour définir les cellules qui perdent leur capacité à se différencier quasi-indéfiniment. Dans le cas d'une irradiation très forte, l'arrêt de toute fonction cellulaire est observé, il y a alors apparition d'une mort immédiate. Dans le cas d'une irradiation à faible dose, certaines cellules pourront synthétiser des protéines et de l'ADN mais ne pourront plus proliférer. Nous parlons alors de mort différée.

I.3.1. Notions de radiosensibilité/radiorésistance

Comme expliqué précédemment, certaines cellules sont radiosensibles ou radiorésistantes, c'est-à-dire que selon le type de cellules, et en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation, le rayonnement n'aura pas la même influence sur la survie de la cellule. En 1906, Bergonié et Tribondeau ont ainsi montré que la radiosensibilité d'une cellule varie proportionnellement à sa capacité de division et de façon inversement proportionnelle à son degré de différenciation. Ainsi, deux types de cellules se dessinent. Les cellules présentant une faible capacité de réparation et peu différenciées, telles que, par exemple, les cellules souches pluripotentes de la moelle hématopoïétique, sont très radiosensibles. Inversement, les cellules à forte capacité de réparation seront radiorésistantes.

De plus, il faut noter que pour les cellules hypoxiques, le nombre de cassures simples brins de l'ADN est 3 à 4 fois plus faible que pour les cellules de mammifères oxygénées^[18]. Ces cellules hypoxiques sont aussi 2 à 3 fois plus résistantes vis-à-vis de l'irradiation que les mêmes cellules oxygénées. L'étalement dans le temps d'une dose influe aussi sur la survie cellulaire en raison de la réparation partielle des lésions qui peut survenir. Ainsi, Elkind et Sutton^[29] ont montré qu'une irradiation en deux fractions, séparées par un intervalle de temps, induit un taux de létalité inférieur à celui obtenu avec une irradiation à la même dose totale délivrée en une seule fois. Certaines molécules peuvent aussi conférer des propriétés radiosensibilisatrices, radioprotectrices ou restauratrices aux cellules. Ce type de molécule sera évoqué dans le chapitre 2 de la partie 5.

I.3.2. Les aberrations chromosomiques

Après une irradiation, une déstabilisation du génome est observée dès les premières mitoses. Il peut s'ensuivre une très forte mortalité cellulaire. L'instabilité chromosomique radio-induite a été observée pour des cellules hématopoïétiques, des fibroblastes primaires et des lymphocytes. Ces cellules, si elles survivent à l'irradiation, peuvent apporter à leurs descendantes cette instabilité chromosomique et donc une forte capacité à former des aberrations chromosomiques^[13]. Ces aberrations peuvent être soit des anomalies de nombre ou de structure visibles au microscope (effets clastogènes), soit des anomalies invisibles à un examen au microscope mais pouvant avoir des conséquences graves (mutations géniques) (Figure 15).

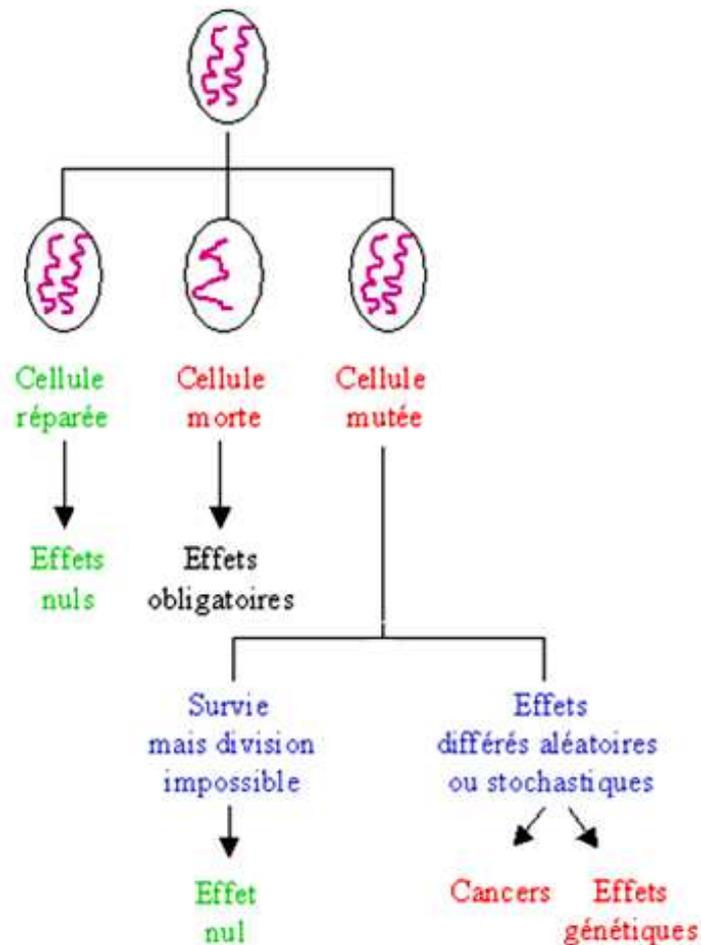


Figure 15 : Conséquences cellulaires de l'irradiation^[21]

Certains types d'aberrations chromosomiques des lymphocytes circulants sont utilisés à des fins de dosimétrie biologique. Cette technique de dosage est utilisée, plus particulièrement, en cas d'incidents ou d'accidents, en absence de dosimètres physiques réglementaires.

I.4. Conclusion

Ainsi, à partir du phénomène initial correspondant à l'interaction physique des rayonnements ionisants avec la matière, un ensemble de processus chimiques et biologiques va engendrer des dégâts et des modifications des biomolécules essentielles aboutissant aux effets sur l'organisme en cinq étapes majeures :

- La première étape est physique. Elle correspond aux tout premiers instants après l'irradiation ($< 10^{-15}$ s) aboutissant à la création d'espèces excitées dans la cellule et l'ADN. Les premières altérations des biomolécules apparaissent selon l'effet direct.
- Ensuite, une étape physico-chimique (10^{-15} s $< t < 10^{-12}$ s) aboutit à la thermalisation du milieu puis à la formation d'espèces radicalaires OH \cdot , H \cdot et des électrons aqueux e $^-$.
- L'étape chimique (10^{-12} s $< t < 10^{-6}$ s), correspond à la diffusion des radicaux.
- L'étape « biochimique » débute alors avec les réactions entre espèces radicalaires et biomolécules engendrant leur dégradation.
- L'étape « biologique » permet la prise en charge des dégradations et la réparation des biomolécules. Les systèmes de réparation, plus ou moins fidèles, peuvent durer plusieurs heures. Les lésions moléculaires pouvant être graves apparaissent alors, conduisant à des atteintes cellulaires, à des atteintes d'organes et à une pathologie^[13, 30].

II. Les Mécanismes de Réparation et de Défense de l'Organisme

Face aux dommages induits par une irradiation, les organismes ont développé un ensemble de moyens de protection et de réparation pour répondre à tous les types de dommages^[18].

II.1. Les Mécanismes de Réparation de l'ADN

Au niveau de l'ADN, deux types de réparations peuvent avoir lieu, à savoir les réparations par excision et resynthèse, et les réparations par recombinaison homologe et non homologe^[31-34].

II.1.1. Réparation par excision et resynthèse

La réparation par excision et resynthèse permet une réparation d'une large variété de lésions. Ce type de réparation est en général observé pour les cassures simple brin. La première étape consiste en la reconnaissance par les ADN-glycosylases spécifiques permettant une excision par coupure de la liaison N-glycosidique de la base altérée produisant un site apurique. Une endonucléase AP clive ensuite l'ADN au niveau de ce nouveau site pour permettre à une exonucléase de créer une brèche. Il s'ensuit alors l'élimination du phosphate par une phosphodiesterase afin de permettre la reconstitution de la chaîne lésée par l'ADN polymérase en prenant pour modèle le brin complémentaire de l'ADN. Une ligase permet alors une reconstitution de l'intégrité du brin d'ADN lésé. Dans un second type de mécanisme, une endonucléase peut cliver une partie du brin contenant la base lésée. Une fois éliminée, l'oligonucléotide lésé est remplacé par un brin sain par resynthèse et par complémentarité de base^[35].

II.1.2. Réparation des coupures doubles brins

Dans le cas de cassures double brin, la recombinaison homologue ou la réparation par suture non homologue sont les mécanismes principaux car ces lésions sont plus difficiles à être réparées. La recombinaison homologue correspond à un échange de l'un des deux brins de l'hélice non lésée avec celui de la chaîne lésée. Il s'ensuit alors une reconstitution fidèle de la double hélice. La recombinaison non-homologue consiste en un échange de brins non homologues de l'ADN. Ce mécanisme de réparation biochimique ne permet pas la restauration de la séquence d'origine mais uniquement la continuité de l'ADN endommagé par une cassure double brin. Cette réparation conduira ainsi au changement de l'information génétique et par conséquent à la naissance d'une mutation pour le gène concerné.

II.2. Les Défenses Biochimiques et Chimiques

De nombreux mécanismes permettent de protéger l'organisme contre les effets des rayonnements ionisants. Ces mécanismes de défense sont très variés. Les principaux sont les systèmes de défense anti-oxydante endogène, l'inhibition des phénomènes radicalaires, la protection par hypoxie ou anoxie, la réparation par transfert d'hydrogène.

II.2.1. Défenses anti-oxydantes endogènes

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux dégâts subis lors d'une irradiation sont dus à l'effet indirect et donc à des radicaux libres et des oxydants forts. Les systèmes de défense anti-oxydant endogène ont pour but d'inhiber ces molécules soit par des enzymes spécifiques se présentant comme des piègeuses de radicaux, soit par des composés naturels endogènes ou présents dans l'alimentation (vitamines)^[27].

Ainsi, en temps normal un équilibre antioxydant/pro-oxydant est établi dans l'organisme. Lors d'une irradiation, cet équilibre est rompu, d'où l'intérêt de développer des molécules antioxydantes^[36]. Ainsi, le premier axe de recherche de mes travaux a consisté à développer des molécules antioxydantes à visée radioprotectrices (partie 3).

II.2.1.a. Les systèmes enzymatiques

Les enzymes antioxydantes les plus connues sont les SOD (superoxyde dismutases), la catalase et les glutathion peroxydases. Les SOD permettent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Cependant, ce dernier est connu pour pouvoir produire des radicaux hydroxyles selon la réaction de Fenton. Ainsi, ce peroxyde doit être pris en charge par les glutathion peroxydases ou la catalase. Les glutathion peroxydases font partie

d'un système dont le but est de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau. Pour cela, elles oxydent du glutathion réduit (GSH) en disulfure (GSSG). La restitution du GSH se fait par l'intermédiaire de la glutathion réductase et du système NADPH/NADP⁺. La catalase permet une dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Figure 16).

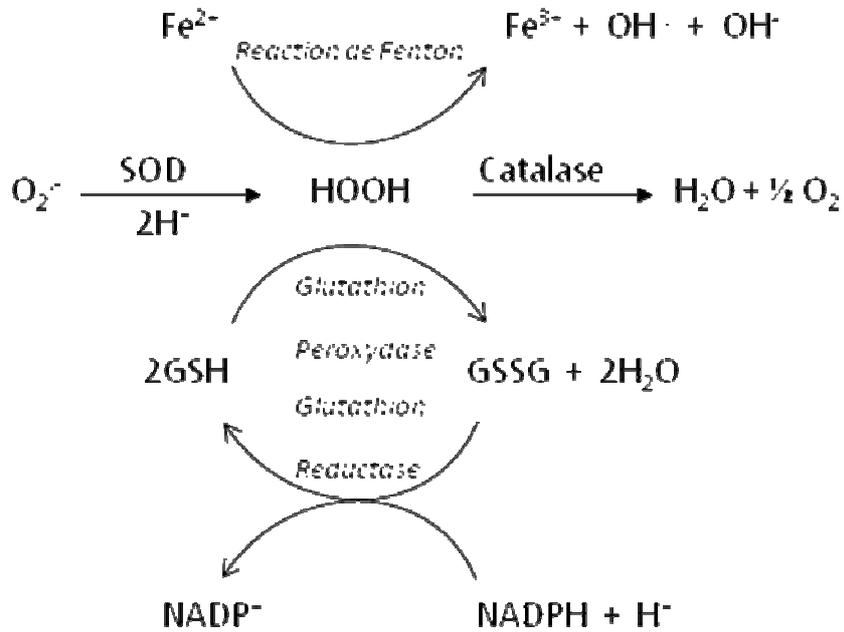
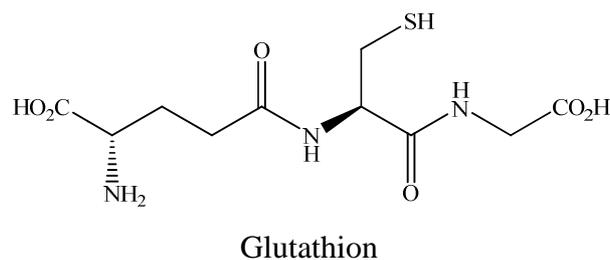


Figure 16 : Les principaux systèmes de défense endogènes enzymatiques

D'autres enzymes telles que les peroxyrédoxines ou thioredoxine réductases, récemment découvertes, sembleraient aussi jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes^[37].

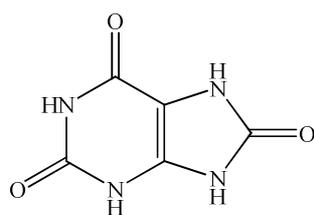
II.2.1.b. Les systèmes non-enzymatiques

D'autres composés, non enzymatiques, interviennent dans les défenses antioxydantes. C'est, entre autres, le cas du glutathion, de certaines vitamines ou de certains métaux de transition. Le glutathion (GSH) est un tripeptide présentant un groupement thiol lui conférant des propriétés réductrices et nucléophiles :

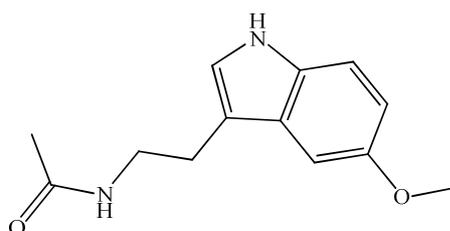


Ce composé est présent en forte concentration dans la plupart des cellules et participe à l'activité antioxydante par piégeage direct des radicaux libres qui l'oxydent alors en disulfure (GSSG), ou en réduisant les hydroperoxydes en agissant comme substrat des glutathions peroxydases selon le cycle présenté précédemment.

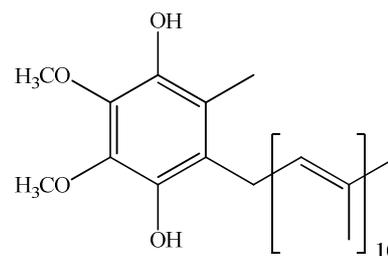
D'autres composés antioxydants permettent une protection vis-à-vis des ROS. Ainsi, l'acide urique, produit de dégradation et d'excrétion des purines chez l'Homme, semble être un antioxydant plasmatique efficace ; la mélatonine, ou hormone du sommeil, bien qu'essentiellement connue comme hormone de régulation des rythmes chronobiologiques et des sécrétions hormonales, serait aussi un antioxydant puissant ayant la capacité de traverser les parois cellulaires et la barrière hémato-encéphalique. La coenzyme Q₁₀, ou ubiquinone, est une molécule utilisée lors de la production d'énergie par les mitochondries. Sa forme réduite, l'ubiquinol, est un composé très antioxydant et lipophile pouvant inhiber la peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires.



Acide Urique



Mélatonine



Ubiquinol

D'autres composés, tels que certains métaux de transition, sont essentiels pour les enzymes antioxydantes. Ainsi, le cuivre, le zinc et le manganèse entrent dans la composition du site actif de différentes superoxydes dismutases. Le sélénium est présent sous forme de sélénocystéine dans les sélénoprotéines telles que la glutathion peroxydase^[38].

II.2.2. Défenses anti-oxydantes exogènes ^[39]

II.2.2.a. La vitamine C

La vitamine C est un antioxydant puissant présent dans tous les organes. A pH physiologique, l'acide ascorbique est sous sa forme de monoanion ascorbate. Cet anion est un cofacteur enzymatique impliqué dans la synthèse du collagène et dans la conversion de la dopamine en noradrénaline. De plus, il piège facilement les radicaux pour donner le semidéhydroascorbate. Ce dernier peut à son tour s'oxyder en déhydroascorbate (Figure 17).

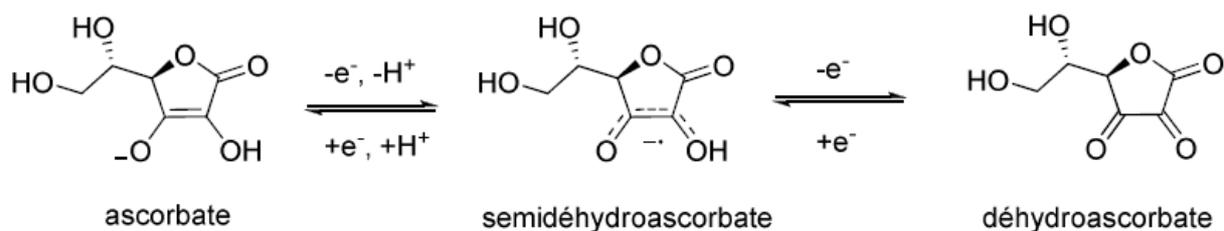
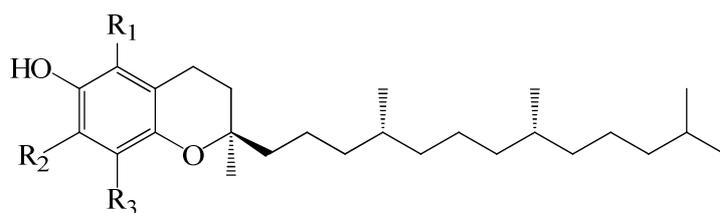


Figure 17 : Inhibition de radicaux par l'acide ascorbique

L'anion ascorbate peut aussi agir comme réducteur de cations ferriques et cuivriques induisant ainsi, en présence de peroxyde d'hydrogène, la formation de radicaux hydroxyles par réaction de Fenton ou Fenton-like faisant apparaître la dualité pro/anti-oxydant de l'acide ascorbique^[40, 41].

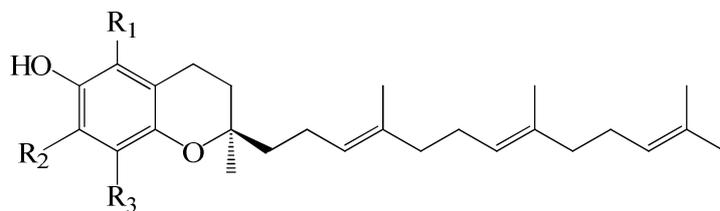
II.2.2.b. La vitamine E

La vitamine E est constituée d'un ensemble de phénols de structures proches, répartis en deux sous-groupes que sont les tocophérols et les tocotriénols. La vitamine E est un composé très antioxydant de par sa fonction phénol et peu polaire car il présente une longue chaîne lipophile. Ainsi, il est présent essentiellement dans les milieux lipidiques tels que les membranes cellulaires, en faisant la première ligne de défense contre les radicaux peroxydes formés lors de la peroxydation lipidique^[42]. La vitamine E, après avoir réagi, devient radicalaire. Le radical formé est cependant peu réactif et peut être inhibé par d'autres antioxydants tels que la vitamine C ou le glutathion^[43, 44]. Par exemple, la vitamine E, sous sa forme oxydée, à forte concentration, peut aussi présenter une activité pro-oxydante^[45].



Tocophérol

R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocophérol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocophérol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocophérol
H	H	CH ₃	δ-tocophérol

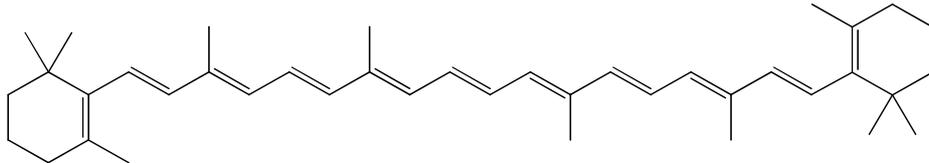


Tocotriénol

R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocotriénol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocotriénol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocotriénol
H	H	CH ₃	δ-tocotriénol

II.2.2.c. Les caroténoïdes

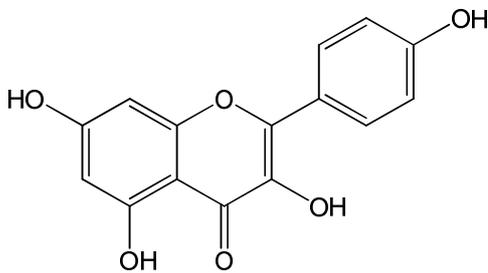
Les caroténoïdes sont des terpénoïdes issus des carotènes et des xanthophylles. Ils sont présents dans les légumes tels que la carotte (β -carotène) ou la tomate (lycopène) ainsi que chez certains animaux et bactéries. Ces composés sont très antioxydants et lipophiles et sont donc localisés dans les lipoprotéines, dans les membranes ou dans les autres milieux lipophiles.



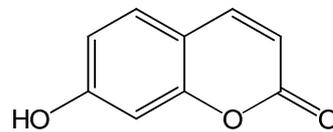
β -carotène

II.2.2.d. Les polyphénols

Les polyphénols sont des substances naturelles présentes dans les plantes. Cette famille de produits, composée par plus de 8000 structures différentes dont les acides pulviniques, les flavonoïdes et les coumarines, présente des propriétés antioxydantes, antimutagènes et pourrait permettre de réduire les risques cardiovasculaires^[46, 47].



Flavonoïde



Coumarine

II.2.3. Les autres systèmes de défense

Nous avons vu que l'effet oxygène était un des facteurs non négligeables de radiorésistance ou de radiosensibilité. Aussi, la mise en hypoxie ou en anoxie des cellules peut permettre une inhibition des phénomènes radicalaires destructeurs. Ce mode d'action a été démontré pour certains radioprotecteurs tels que les catécholamines et l'histamine^[48]. Agir avec les propriétés vasoconstrictrices de certaines molécules peut être une voie de recherche.

L'hypothèse des disulfures mixtes est aussi intéressante ici. Emise pour la première fois par Eldjarn et Phil^[49] en 1956 elle correspond à l'hypothèse où des thiols pourraient former des ponts disulfures avec des protéines intra- et extra- cellulaires. Cette liaison,

démontrée pour la cystéamine et la cystéine, peut être réduite par les glutathion-transférases permettant ainsi de protéger contre l'effet direct des rayonnements ionisants la fonction SH de la protéine facilement oxydable par la formation d'un pont disulfure. Par attaque d'un radical libre, le pont disulfure est clivé en fonction thiol d'une part et en acide thiosulfonique d'autre part. Cette hypothèse reste controversée car tous les thiols ne sont pas des radioprotecteurs, alors qu'ils forment tous des disulfures.

D'autres molécules peuvent permettre de faciliter la réparation des dommages subis. Ainsi, après attaque par effet direct ou par les radicaux libres, il apparaît des biomolécules sous leur forme radicalaire. La réparation par transfert d'hydrogène permet d'inhiber ce type de radicaux avant qu'ils ne réagissent avec d'autres radicaux ou avec du dioxygène. Cette réparation simple et très rapide permet la restauration d'une molécule avant que les dommages ne deviennent irréversibles.

L'injection de certaines molécules engendre un choc biochimique se caractérisant par une hypotension, une hypothermie ou une hypoxie. Ce choc biochimique peut permettre, entre autre par hypothermie, de réduire les réactions métaboliques et de réparer les dommages^[50].

II.3. Conclusion

Ainsi, un ensemble de systèmes de défenses enzymatique ou non enzymatique peuvent permettre de limiter l'effet des rayonnements ionisants. Cependant, bien qu'efficaces, on voit apparaître une limitation de ces défenses après une irradiation durant laquelle de grandes quantités d'espèces oxydantes et radicalaires sont produites. L'intérêt d'essayer de développer des molécules antioxydantes et antiradicalaires afin d'inhiber les radicaux formés lors d'irradiation apparaît comme un axe de recherche intéressant pour la radioprotection chimique.

Les rayonnements ionisants affectant les tissus hématopoïétiques et réduisant le nombre de neutrophile et de plaquettes dans le sang, le risque de septicémie, d'hémorragie ou d'anémie augmente considérablement. Activer la restauration hématopoïétique apparaît alors comme un autre axe de recherche.

De plus, il a aussi été démontré qu'une même molécule peut agir selon de nombreux mécanismes alliant ainsi des propriétés antioxydantes à d'autres propriétés comme des propriétés antimutagéniques etc.

III. Effets des Rayonnements

Ionisants sur l'Organisme

Les effets sur l'organisme des rayonnements ionisants sont de deux types. Ils résultent soit d'un risque aléatoire ou stochastiques soit d'un risque direct ou déterministe^[51, 52].

III.1. Risque Stochastique

Le risque aléatoire résulte de la modification du matériel génétique. Il induit des cancers si les altérations ont touché les cellules somatiques, ou des modifications phénotypiques de la descendance si les altérations touchent les cellules germinales. Ce risque est réel après toute irradiation quelle que soit la dose, même si la probabilité d'apparition d'effets néfastes est linéairement dépendante de l'intensité de l'irradiation. Cette relation est facilement démontrée pour les fortes doses mais reste non prouvée non pour les faibles doses. Cependant, il faut noter qu'une fois apparu, la gravité de cet effet est indépendante de l'irradiation initiale. Ces observations ont été établies à partir des données épidémiologiques recueillies avec le suivi des survivants des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki et l'apparition des cancers radio-induits^[53].

III.2. Risque Déterministe

Le risque direct ou déterministe est dû à l'effet physique de l'irradiation. Ce type d'effet apparaît toujours à partir d'une dose donnée appelée dose seuil. Cependant, la gravité de cet effet augmente avec la dose, et la vitesse d'apparition des effets est d'autant plus grande que la dose est élevée. De plus, selon l'individu, la valeur seuil de cet effet est plus ou moins grande car certaines maladies peuvent affaiblir les mécanismes de défense et de réparation de l'ADN et des cellules, engendrant ainsi une certaine radiosensibilité.

Un exemple de l'effet déterministe est le syndrome d'irradiation aiguë dans le cas d'irradiation globale. Celui-ci se découpe en trois phases. La première phase dite prodrome (vomissements, céphalées) est suivie d'une phase de latence puis de la réapparition de signes cliniques dépendant de la dose reçue^[54-56] (Figure 18).

En fonction de la dose, lors du syndrome d'irradiation globale aigüe, divers grands syndromes sont observés :

III.2.1. Le syndrome hématopoïétique

Ce syndrome est la conséquence de la destruction partielle ou totale des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et des lymphocytes périphériques. Observé dès 0,5 Gy, il correspond à une baisse des lymphocytes et du taux de granulocytes après quelques heures puis d'une baisse des thrombocytes et du nombre de plaquettes après quelques semaines.

III.2.2. Le syndrome cutané

La peau est le premier système de défense contre les radiations. Exposée dans tous les cas, un syndrome cutané apparaît à des doses supérieures à 3-8 Gy. Après quelques heures, un érythème passager apparaît. Après une période de latence de deux à quatre semaines, les symptômes réapparaissent accompagnés d'alopecie (chute des poils) et de desquamation (perte des couches superficielles de l'épiderme). Pour des doses très fortes (>20 Gy), des nécroses de la peau apparaissent.

III.2.3. Le syndrome gastro-intestinal

Ce syndrome apparaît pour des doses d'environ 8 Gy. Il s'explique par la destruction des cellules souches des cryptes intestinales et par la rupture de la barrière intestinale permettant le passage de bactéries qui induisent des infections. En absence de traitement, la mort par septicémie ou déshydratation intervient dans les deux semaines.

III.2.4. Le syndrome neuro-vasculaire

Ce syndrome se manifeste à des doses élevées (> 50 Gy en général). L'atteinte neuro-vasculaire se manifeste par une apathie, une désorientation, des troubles de l'équilibre... Après une période de latence de quelques heures, durant lesquelles la personne récupère partiellement ses capacités, les syndromes nerveux réapparaissent accompagnés de convulsions qui conduisent au coma et à la mort.

III.2.5. Effet sur le système de reproduction

Les cellules germinales font partie des cellules les plus radiosensibles, car peu différenciées et avec un potentiel de division très élevé. A partir de 0,15 Gy, une stérilité transitoire chez l'homme peut être observée. Pour des doses comprises entre 3 et 6 Gy, la stérilité définitive est observée pour les hommes et les femmes.

0,15 Gy : Stérilité transitoire chez l'homme possible.

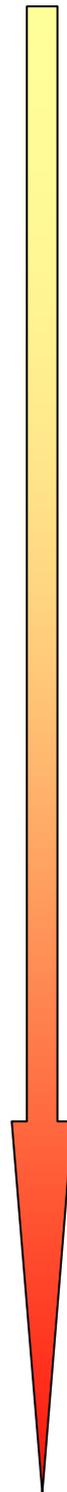
3 à 5 Gy : Epidermite sèche dans un délai de trois semaines.

3 à 6 Gy : Stérilité définitive de la femme avec modifications des caractères sexuels (ménopause précoce).

5 Gy : Apparition d'un érythème précoce sous quelques heures.

4 à 6 Gy : Stérilité définitive de l'homme sans modification des capacités sexuelles.

> 30 Gy : Apparition d'une nécrose cutanée dont le seul traitement est la greffe.



0,5 Gy : Une légère baisse du nombre de lymphocytes peut être observée.

1 à 2 Gy : Apparition de la première phase prodrome.

2 à 4 Gy : Le système hématopoïétique oblige la mise en place d'une surveillance étroite et d'une antibiothérapie.

4,5 Gy : Dose létale 50% chez l'homme adulte en l'absence de traitement.

4 à 6 Gy : Modification sévère de la numération mettant en évidence une atteinte importante du système hématopoïétique.

6 Gy : Dose létale 100% chez l'homme dans tous les cas en absence de traitement.

8 à 10 Gy : Apparition des signes cliniques par atteinte pulmonaire. Le pronostic vital dépend de l'âge, de l'état de santé et du traitement de la personne irradiée.

10 à 20 Gy : Décès inéluctable dans la semaine suivant l'irradiation. Atteinte respiratoire, digestive...

> 50 Gy : Atteinte neurologique sévère. Décès sous 48h.

Figure 18 : Symptômes en fonction de la dose

Chapitre 3 :

Les Radioprotecteurs,

Leurs Modes d'Action

I. Généralités

Un radioprotecteur est une substance naturelle ou synthétique qui permet, si elle est administrée avant irradiation, de réduire les effets causés par une exposition à un rayonnement ionisant. L'effet radioprotecteur de certains composés contre les effets délétères des rayonnements ionisants a été publié pour la première fois par W.M. Dale en 1949^[57].

L'usage de tels composés peut avoir lieu dans le domaine médical lors de radiothérapies ou lors d'une exposition prévisible ou accidentelle. Dans le cas d'une exposition accidentelle, l'utilisation de tels composés devient complexe car de nombreuses données sont inconnues telles que la dose, la distribution de la dose, le stress etc.

Actuellement, quelques dérivés organométalliques et phosphorés étudiés par notre groupe de recherche ont montré une activité radioprotectrice intéressante. Un nouveau composé, le CBLB-502, a récemment été publié^[4]. Il présenterait une activité radioprotectrice comparable, ou légèrement supérieure au composé de référence, le WR-2721.

I.1. Classification des Radioprotecteurs

Depuis la découverte des propriétés radioprotectrices de la cystéine, de la cystéamine et du WR-2721, de nombreuses études ont eu pour but de trouver le meilleur radioprotecteur. Ainsi, il a été nécessaire de déterminer un moyen de classification de ces composés. L'efficacité d'un radioprotecteur *in vivo* a ainsi été définie par son Facteur de Réduction de Dose (FRD) correspondant au rapport des doses d'irradiation qui provoquent 50% de mortalité à 30 jours, respectivement chez les animaux protégés et chez les animaux non protégés (Figure 19). Chacune de ces doses d'irradiation est déterminée préalablement.

$$\text{FRD} = \frac{\text{DL}_{50/30\text{jours}} \text{ chez les animaux protégés}}{\text{DL}_{50/30\text{jours}} \text{ chez les animaux non protégés}}$$

Figure 19 : Calcul du Facteur de Réduction de Dose

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

I.2. Vers un Radioprotecteur Idéal

Ainsi, un radioprotecteur idéal doit présenter certaines caractéristiques :

- Avoir une activité radioprotectrice suffisante pour protéger l'organisme contre les dommages radio-induits et le cas échéant les réparer ;
- Etre facilement administrable (par voie orale de préférence), de façon répétée ;
- Présenter le moins d'effets secondaires possibles et une toxicité faible ;
- Etre compatible avec d'autres médicaments ;
- Etre efficace pour tout type et toute dose d'irradiation ;
- Avoir un effet prolongé ;
- Etre stable ;
- Pour couvrir toutes les circonstances, un radioprotecteur devrait être facilement administrable de façon chronique, avant ou après l'irradiation.

A l'heure actuelle, aucun composé ne respecte l'ensemble de ces critères. Cependant, certains d'entre eux présentent une efficacité intéressante et spécifique mais avec des effets secondaires non négligeables. Des études cliniques ont été réalisées afin de déterminer le traitement le plus efficace et le moins toxique possible.

I.3. Les Différentes Voies de Radioprotection

L'étude du mode d'action des différents composés synthétisés pour la radioprotection chimique a permis depuis les années 1980 de comprendre les mécanismes de base de la radioprotection chimique. Initialement dominée par les thiols, la radioprotection chimique s'est ouverte aux composés « non-thiols » tels que les dérivés de vitamines, les métallo-éléments ainsi que le matériel biologique tel que les inhibiteurs de protéases ou les antagonistes aux canaux calcium. Ainsi, depuis quelques années, de nouvelles voies de radioprotection autres que chimiques ont été explorées^[58, 59].

De plus, alors qu'en général les composés radioprotecteurs sont plus actifs lorsqu'ils sont injectés avant irradiation, certains composés peuvent permettre de moduler à posteriori les dommages dus aux radiations. Il est supposé que ces derniers composés agissent sur la régénération et la repopulation des éléments dégradés dans les tissus essentiels au maintien des fonctions vitales. Le très fort potentiel thérapeutique et les avantages de la combinaison d'un composé chimique injecté en pré-irradiation limitant les dégâts à l'organisme et d'un composé biologique accélérant la régénération tissulaire démontré par Weiss *et al.* semble une voie de recherche intéressante pour la radioprotection^[60].

Les modes d'action possibles des radioprotecteurs peuvent être de plusieurs types tels que :

- L'inhibition des radicaux libres ;
- L'induction de radioprotecteurs cellulaires tels que la superoxyde dismutase ou le glutathion... ;
- L'activation de la restauration hématopoïétique et des fonctions immunitaires par la stimulation et la maintenance de la prolifération de cellules souches au niveau de la moelle osseuse ;
- L'activation des enzymes de réparation de l'ADN ;
- La réparation par donation d'hydrogène ;
- L'induction d'une hypoxie ;
- La formation des disulfures mixtes.

II. Les Différents Radioprotecteurs

II.1. Les Radioprotecteurs Naturels

La famille des radioprotecteurs naturels est constituée des différents composés extraits des plantes, algues et champignons ainsi que des vitamines, des caroténoïdes, des polyphénols, des polysaccharides, des acides aminés, des lipides, des amines et polyamines, des hormones, protéines et peptides^[61]... L'étude des acides pulviniques et des Flavonoïdes (polyphénols) sera réalisée dans la partie 3.

D'après des études menées par Venkatachalam *et al.*^[61] les composés naturels auraient pour la majeure partie une action spécifique sur un organe donné. Ainsi, par exemple, alors que le système hématopoïétique est très bien protégé par la vitamine E, la vincristine ou l'acide lipoïque, le système nerveux est protégé par la vitamine C et le mannitol. De même, la réparation de l'ADN est favorisée par la mélatonine, l'huile d'olive ou la nicotamide. L'utilisation de produits naturels tels que les vitamines, les acides aminés, les lipides, les amines et polyamines, les hormones, ou les protéines et peptides est intéressante car ces composés présentent en général une toxicité très faible et sont bien tolérés par l'organisme. Cependant, les composés naturels sont en général moins efficaces (FRD < 1,3) que les composés de synthèse tels que l'amifostine. (FRD = 2,12)^[62].

L'intérêt réel de l'utilisation de ces composés est qu'ils peuvent être associés à d'autres substances. L'utilisation conjointe du 5-hydroxytryptophane et du WR-2721 a permis d'en améliorer considérablement les propriétés radioprotectrices^[63].

II.2. Les Défenses de l'Organisme

II.2.1. Les superoxydes dismutases et les complexes métalliques

Comme présenté au chapitre 2 de cette partie, les superoxydes dismutases sont des enzymes naturelles catalysant la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Cette superoxyde dismutase est utilisée sous le nom d'Orgotéine® pour diminuer les effets secondaires lors de radiothérapies^[64-66]. De plus, en association avec des liposomes, de bons résultats de radioprotection et de radio-restauration ont été obtenus^[64-68].

Des composés mimant la superoxyde dismutase ont aussi été synthétisés. Ces composés possèdent un ion métallique (Cu, Fe, Mn, Zn) au niveau de leur site actif. Par exemple, le complexe de l'acide kojique avec un manganèse (Figure 20) présente une activité légèrement plus faible que le WR-2721, mais reste actif même lorsqu'il est injecté 24h avant irradiation^[69].

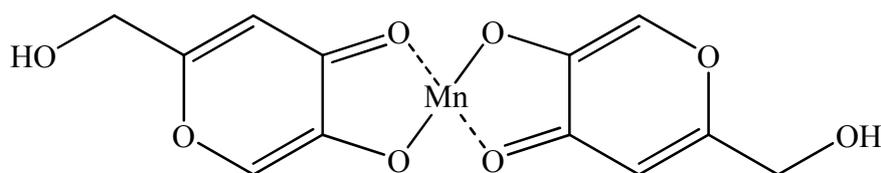


Figure 20.: Complexe de manganèse de l'acide kojique

II.2.2. Les cytokines et les immunomodulateurs

Les cytokines sont des polypeptides, glycosylés ou non, régulant le fonctionnement du système immunitaire. Elles interviennent dans l'inflammation et l'hématopoïèse. Ces cytokines peuvent stimuler les cellules souches hématopoïétiques et le système immunitaire qui est la principale cible des radiations. Ainsi, elles permettent de limiter les risques de septicémie ou d'anémie consécutives à l'irradiation.

Singh *et al.*, a résumé les différentes études menées^[70]. Toutes les cytokines présentent une activité radioprotectrice avec un mécanisme souvent spécifique. Par exemple, l'interleukine 1 (IL-1) stimule la moelle afin de surmonter la myélodépression^[71]. De plus, un mélange des cytokines IL-1 et IL-2 a montré une activité radioprotectrice très marquée (100% de survie lorsque l'injection a eu lieu 24h avant l'irradiation à 11 Gy). Cependant, certaines cytokines présentent des effets secondaires non négligeables (pro-inflammatoires, etc.).

L'exemple le plus connu des immunostimulants présentant des propriétés radioprotectrices intéressantes est le Ribomunyl[®] utilisé en médecine. Le mécanisme d'action de ce médicament semble passer par l'intervention de l'interleukine 1 et de l'interféron^[72].

Plus récemment, une équipe américaine a développé un composé permettant de limiter le phénomène d'apoptose, phénomène majeur de la perte cellulaire après une irradiation. Pour cela, ils ont utilisé un dérivé moins toxique et moins immunogène d'une protéine bactérienne, la flagelline, qui se lie au récepteur toll-like 5 (TLR5) présent sur les cellules et active la voie NF-κB. Le CBLB-502 ainsi développé permet une protection de 87% des souris à une dose de 13 Gy lorsqu'il est injecté 30 minutes avant irradiation. Son activité serait ainsi meilleure que celle du WR-2721.

II.3. Les Radioprotecteurs Non Soufrés

II.3.1. Les nitroxydes

Cette famille de composés permet une protection contre les radiations avec une certaine sélectivité pour les tissus sains par rapport aux tissus tumoraux^[73]. Ainsi, il a été développé le tempol (Figure 21) qui est un composé très actif en radioprotection mais qui, malheureusement, présente de nombreux effets secondaires (hypotension...) et a une durée d'efficacité limitée.

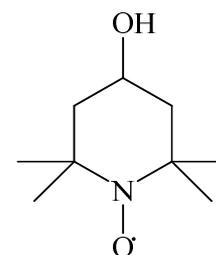


Figure 21 : Structure du tempol

II.3.2. Les hétérocycles

De nombreux composés hétérocycliques sont connus pour leurs propriétés radioprotectrices. Parmi ces composés, l'imidazole, le benzimidazole et la naphthylméthylimidazoline sont les plus représentatifs^[74-76]. Un autre composé, le Hoechst 33342 qui est un bis(benzimidazole), possède la particularité de se complexer sélectivement avec les doubles brins de l'ADN et ainsi de le protéger^[77]. Ce type de composé sera étudié dans la partie 4.

II.3.3. Les dérivés hydroxylés

Certains composés (polyphénols, alcools, etc.) présentent une activité radioprotectrice intéressante. Cependant, ils sont en général moins actifs que leurs analogues soufrés.

II.4. Les Radioprotecteurs Soufrés

II.4.1. La protection par les thiols

II.4.1.a. L'inhibition des phénomènes radicalaires

Le premier mode de protection des thiols est l'inhibition des radicaux formés lors de l'irradiation avant qu'ils n'attaquent et dégradent l'ADN. Bien que l'inhibition des radicaux hydroxyles soit essentielle à la protection, l'inhibition des radicaux secondaires (R^\cdot , LO^\cdot , LOO^\cdot) ne doit pas être négligée. Par exemple, les composés de type thiols (RSH), thiolates (RS^-) et disulfides (RSSR) réagissent très rapidement avec les radicaux libres.

L'inhibition se déroule en deux étapes. La première consiste en l'inhibition du radical hydroxyle en eau par le thiol. Le thiol est alors transformé en radical RS^\cdot qui n'est pas assez réactif pour participer à la dégradation des macromolécules biologiques :



Le radical RS^\cdot est ensuite capable de se dupliquer pour donner un disulfure facilement éliminé par l'organisme :



Il est à noter que d'autres composés tels que les antioxydants (vitamine C, vitamine E, acides pulviniques, acides salicyliques), bien que d'effet radioprotecteur très variable, peuvent permettre l'inhibition des radicaux. Ce type de composé sera étudié dans la partie 3 de l'étude.

II.4.1.b. La réparation par transfert d'hydrogène

Les thiols peuvent aussi agir en tant que réparateur par transfert d'hydrogène. En absence d'oxygène ou de composé réparateur, l'ADN radicalaire (ADN^\cdot), n'est pas réparable et induit donc une certaine létalité :



Sous condition aérobie, l'ADN radicalaire réagit avec l'oxygène pour donner un radical oxygéné qui, bien qu'inhibé, aboutit à la dégradation de l'ADN.



Certaines molécules telles que les thiols ou les thiolates peuvent aussi limiter les dégradations de l'ADN, qu'elles soient dues à l'effet direct ou indirect. L'ADN dégradé sous forme radicalaire peut être réparé par transfert d'hydrogène ou d'électron selon la réaction :



La compétition entre ces trois réactions a été démontrée par Hodgkiss *et al.*^[78].

De nombreux autres paramètres sont aussi à prendre en compte :

- La réparation de l'ADN lésé par d'autres molécules que les thiols ;
- La fixation compétitive d'autres espèces à la place de l'oxygène ;
- L'augmentation des capacités de la cellule à réparer l'ADN ;
- La diminution de la teneur en oxygène permettant de limiter l'effet oxygène.

II.4.1.c. Les limitations liées à l'utilisation des thiols

L'utilisation de thiols comme composés radioprotecteurs est cependant soumise à d'importantes limitations^[79] :

- Le composé doit être injecté avant ou juste après irradiation (Hodgkiss *et al.* ont montré que le 2-mercaptoéthanol protège *in vitro* les cellules irradiées lorsqu'il était injecté juste après irradiation.)^[80, 81]
- La forme sous laquelle se trouve le thiol doit elle aussi être prise en compte. En effet, il sera préféré des composés thiols chargés positivement à pH physiologique que des composés neutres. On notera que les propriétés d'inhibition radicalaire par les composés ne dépendent que très peu de leur forme ionique^[82]. Nous avons vu précédemment que les radicaux hydroxyles très instables ne peuvent réagir que près de leur site de production. Or, l'effet potentiel de réparation des thiols n'est possible qu'en cas d'interaction entre le thiol et l'ADN. Aussi, un composé radioprotecteur doit être apte à se rapprocher le plus possible de l'ADN qu'il doit protéger. Certains composés de type intercalant de l'ADN peuvent permettre une telle proximité. Une autre manière de permettre à un composé de se rapprocher de l'ADN est de jouer sur l'interaction ADN/molécule. Ainsi, alors qu'un composé neutre ne présentera pas de répulsion ou d'interaction préférentielle avec l'ADN et donc ne s'accumulera pas en concentration suffisante pour agir, un composé anionique sera exclu des environs de l'ADN et un composé cationique pourra s'accumuler de façon suffisamment proche de l'ADN pour être actif.

- Les thiols protègent plus efficacement les cellules présentant un taux d'oxygène moyen que les cellules anoxiques ou suroxygénées^[83, 84].
- Le taux d'oxygène peut aussi expliquer la différence d'activité du WR-1065 ou du WR-2721 selon le type de cellule. Le WR-1065 protège des effets délétères de l'irradiation les fibroblastes humains sains mais ne protège pas les fibrosarcomes tumoraux *in vitro*^[85]. La différence d'activité peut aussi s'expliquer par les différences dans l'organisation de la chromatine selon le type de cellule^[86].
- Les thiols permettent aussi de limiter les effets secondaires d'oxydation des membranes lipidiques des cellules par la peroxydation lipidique. De plus, les thiols ont aussi été décrits comme modulateurs de l'apoptose. L'effet thérapeutique de ce type de composés, qui peuvent diminuer l'apoptose de cellules saines en maintenant l'apoptose des cellules endommagées, a été clairement défini^[87].

De nombreuses molécules contenant du soufre ont été étudiées pour la radioprotection chimique. Il apparaît que, par exemple, les composés de type 1,2-dithiol-3-thione et dithioesters pouvaient permettre une certaine protection *in vivo*, avec *in vitro*, une cytotoxicité sélective pour les cellules hypoxiques^[88, 89].

II.4.2. Les radioprotecteurs soufrés

II.4.2.a. Les aminothiols

Patt *et al.*^[1] a démontré l'activité radioprotectrice de la cystéine par ingestion ou par voie intraveineuse chez le rat (75 à 89% de survie à 8 Gy pour des doses allant de 175 à 575 mg/kg) (Figure 22). Après la découverte de l'activité radioprotectrice de ces composés, un ensemble de dérivés basé sur le principe d'une fonction basique forte de type amine à l'extrémité d'une chaîne dont l'autre extrémité est occupée par un thiol a été développé. L'essor des aminothiols durant les années 1950 a permis de faire de grandes découvertes dans le domaine de la radioprotection. Ainsi, Bacq *et al.*, a montré en 1951 que la cystéamine était 5 fois plus efficace que la cystéine^[90]. Cependant, ces aminothiols présentent de nombreux inconvénients (solubilité faible, toxicité, choc cardiovasculaire, hypotension...) limitant leur utilisation chez l'Homme^[91].

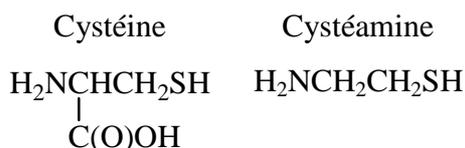


Figure 22 : Structures de la cystéine et de la cystéamine

En 1959, le Walter Reed Army Institute of Research, aux Etats-Unis, a lancé son programme de développement de médicaments contre les effets des rayonnements ionisants (Antiradiation Drug Development Program), lequel a permis la synthèse et l'évaluation de nouveaux types de dérivés contre les effets des rayonnements ionisants (Tableau 4). Parmi les différents composés obtenus, le WR-1065 fait partie des aminothiols les plus actifs.

Thiols	
Composé	Structure
Cystéamine (WR-347)	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$
Dithiothreitol (DTT)	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$
WR-1065	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$
WR-255591	$\text{CH}_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$
WR-151326	$\text{CH}_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{SH}$

WR : Walter Reed Army Institute of Research

Tableau 4 : Les principaux aminothiols radioprotecteurs et leurs structures

Le WR-1065 est le principe actif du WR-2721. Ce composé agit en tant que radioprotecteur par piégeage des radicaux OH[•], ainsi que par réparation par donation d'hydrogène. Son activité est en grande partie due à la possibilité de former avec l'ADN une liaison permettant une proximité. D'autres études ont aussi montré qu'il intervenait dans différents processus intracellulaires tels que la synthèse de l'ADN ou le cycle cellulaire et qu'il possédait des propriétés anti-clastogènes permettant une diminution des aberrations chromosomiques radio-induites^[92].

II.4.2.b. Les phosphorothioates

Des composés de type phosphorothioates ont aussi été développés. L'utilisation de ce type de pro-drogue permet une meilleure métabolisation des principes actifs qui sont alors pris en charge par les phosphatases alcalines restituant le composé sous sa forme active de thiol. Le Walter Reed Army Institute of Research, aux Etats-Unis a ainsi développé des

composés de type phosphorothioates de formule générale $H_2N(CH_2)_xNH(CH_2)_ySPO_3H_2$ où l'activité radioprotectrice est optimale pour $x = 3$ et $y = 2$ ou 3^[93, 94].

Le composé le plus actif de cette série correspond au WR-2721 qui est considéré comme le composé le plus actif en radioprotection chimique connu à ce jour (Figure 23). Il s'agit en fait de la pro-drogue du WR-1065. Son FRD est de 2,12 lorsqu'il est injecté à 200 mg/kg en intra-péritonéal 30 min avant irradiation. Il passe à 2,42 lorsque le composé est injecté 20 minutes avant l'irradiation^[95].

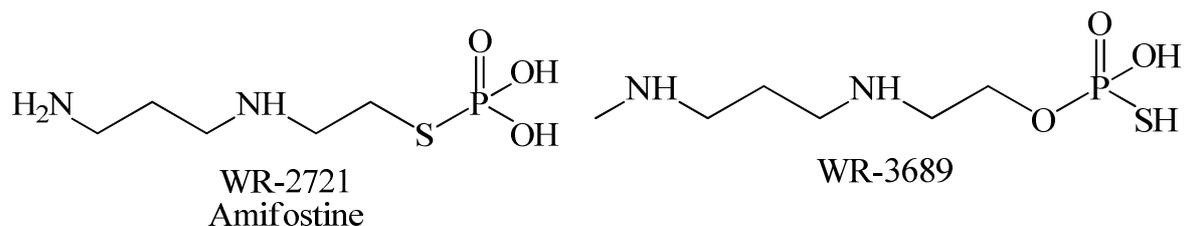


Figure 23 : Structure du WR-2721 et du WR-3689

De plus, il faut noter que, bien que le WR-2721 ait été développé dans un premier temps pour des applications militaires, de nombreux effets secondaires (hypotension, protection limitée du système nerveux central et durée d'efficacité limitée, etc.)^[96] limitent son utilisation à la radiothérapie où il permet de protéger plus efficacement les cellules saines que les cellules tumorales^[97-100].

A ce jour, le WR-2721 est le meilleur radioprotecteur connu. Il a été approuvé par la FDA pour un usage clinique. Récemment, un nouveau composé, le WR-3689, dérivé de l'amifostine, a montré une activité proche du WR-2721 avec une très légère baisse de la toxicité et une meilleure biodisponibilité (Figure 23).

Phosphorothioates	
Composé	Structure
WR-638	$H_2N(CH_2)_2SPO_3H_2$
WR-2721	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_2SPO_3H_2$
WR-3689	$CH_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_2SPO_3H_2$
WR-151327	$CH_3NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3SPO_3H_2$

WR : Walter Reed Army Institute of Research

Tableau 5 : Les principaux phosphorothioates radioprotecteurs et leurs structures

Dans notre groupe, il a été développé des phosphorothioates de la naphthylméthylimidazoline (NMI) et de la naphthyléthylimidazoline (NEI) de structure générale^[101] :

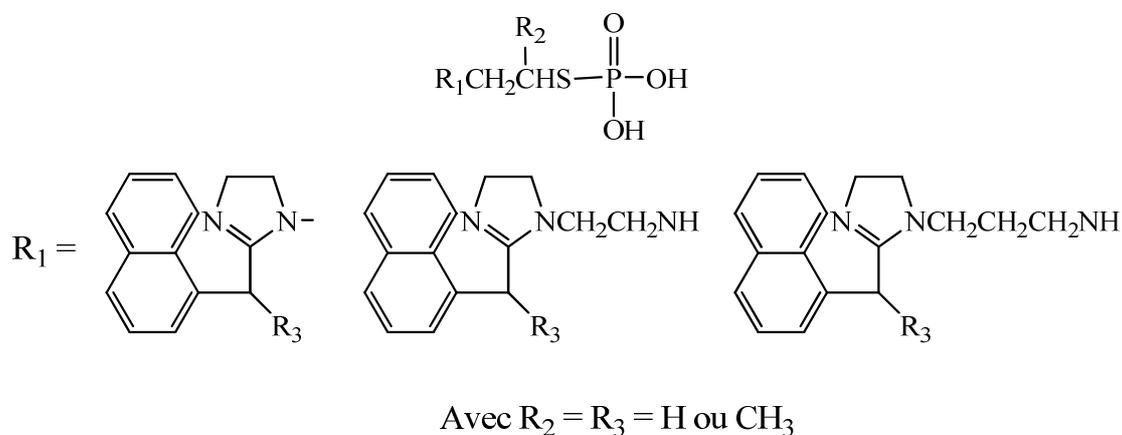


Figure 24 : Structure générale des dérivés de la NMI

Ces composés présentent des propriétés radioprotectrices remarquables qui seront développées dans le chapitre 1 de la partie 4 de l'étude.

II.4.2.c. Les autres dérivés soufrés

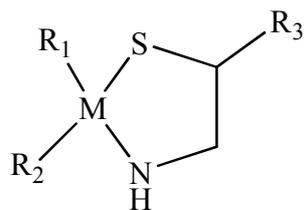
D'autres dérivés soufrés présentent aussi des propriétés radioprotectrices.

Les thiosulfates sont plus actifs que les aminothiols correspondants et moins toxiques que les disulfures. Ces dérivés présentent pour particularité d'être assez solubles, de résister à l'oxydation et d'être très réactifs vis-à-vis des molécules soufrées avec lesquelles ils donnent des disulfures^[102-105].

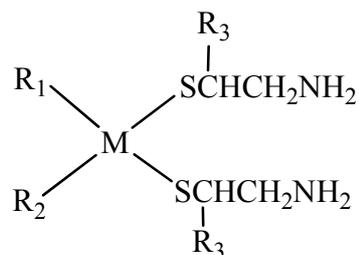
Les thiazolidines sont des analogues cycliques de la cystéamine qui peut être N-substituée. Ils possèdent en général une meilleure activité radioprotectrice que les aminothiols linéaires. Nous observons aussi un effet prolongé de ce type de molécule du fait de l'hydrolyse lente du cycle. Elles peuvent être considérées comme des pro-drogues des aminothiols^[106].

II.4.3. Utilisation de précurseurs organométalliques

L'utilisation de précurseurs organométalliques permet de modifier profondément les propriétés biologiques des composés (Figure 25). Il a été montré que l'introduction de précurseurs organométalliques pouvait augmenter les propriétés radioprotectrices, tout en diminuant la toxicité des composés^[107]. L'utilisation des précurseurs organométalliques sera développée dans le chapitre 1 de la partie 2.



Métallathiazolidines



Métalladithioacétals

Figure 25 : Structure générale des métalladithiazolidines et des métalladithioacétals

II.5. Conclusion

Ainsi, un ensemble de molécules naturelles ou non peut limiter les effets délétères d'une irradiation^[108]. Les modes d'action des composés sont très variés. Il est donc envisageable de créer des molécules agissant sur chacune des voies de radioprotection séparément. La combinaison de molécules radioprotectrices présentant des modes d'action différents pourrait donner un effet radioprotecteur très important. C'est le cas de la combinaison de 5 composés (cystéine, β-mercaptoéthylamine, aminoéthylisothiuronium, glutathion et sérotonine) qui présente un FRD de 2,8, supérieur aux FRD respectifs de chaque composé^[109].

Comme nous l'avons vu précédemment, les voies de dégradation des biomolécules et les cibles de l'irradiation sont nombreuses. Aussi, il a été nécessaire de réduire les voies d'investigation dans la mise au point de nouvelles molécules. L'effet direct ne chiffrant que pour 20% des dégradations et étant très difficilement limitable, nous nous baserons préférentiellement sur l'inhibition des phénomènes radicalaires dus à l'effet indirect. Ainsi nous étudierons et modifierons dans ces travaux des molécules qui présentent des propriétés antioxydantes (dérivés d'acides pulviniques, d'acides salicyliques etc.). L'autre axe de recherche sera la modification et l'étude de molécules présentant des propriétés radioprotectrices marquées (dérivés de la naphthylméthylimidazoline, de benzothiazole et de thiadiazole, d'anhydride naphthaliques etc.).

Ces molécules seront modifiées afin d'étudier l'influence des différents groupements sur les propriétés antioxydantes et radioprotectrices des composés. De plus, l'influence de l'introduction de précurseurs organométalliques sur les propriétés des molécules sera aussi étudiée.

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

Tableau 6 : Les principaux radioprotecteurs connus [21]

Partie II :
Etude Préliminaire

Chapitre 1 : Les Références

I. Les Différentes Références

Un ensemble de molécules de référence a été utilisé pour notre étude (Figure 26). Certains de ces produits de référence pour l'évaluation des propriétés antioxydantes sont disponibles commercialement (vitamine C, vitamine E, trolox, curcumine...). D'autres composés ont dû être synthétisés tels que le WR-2721 et son métabolite le WR-1065 qui sont, dans notre étude, les composés de référence en radioprotection.

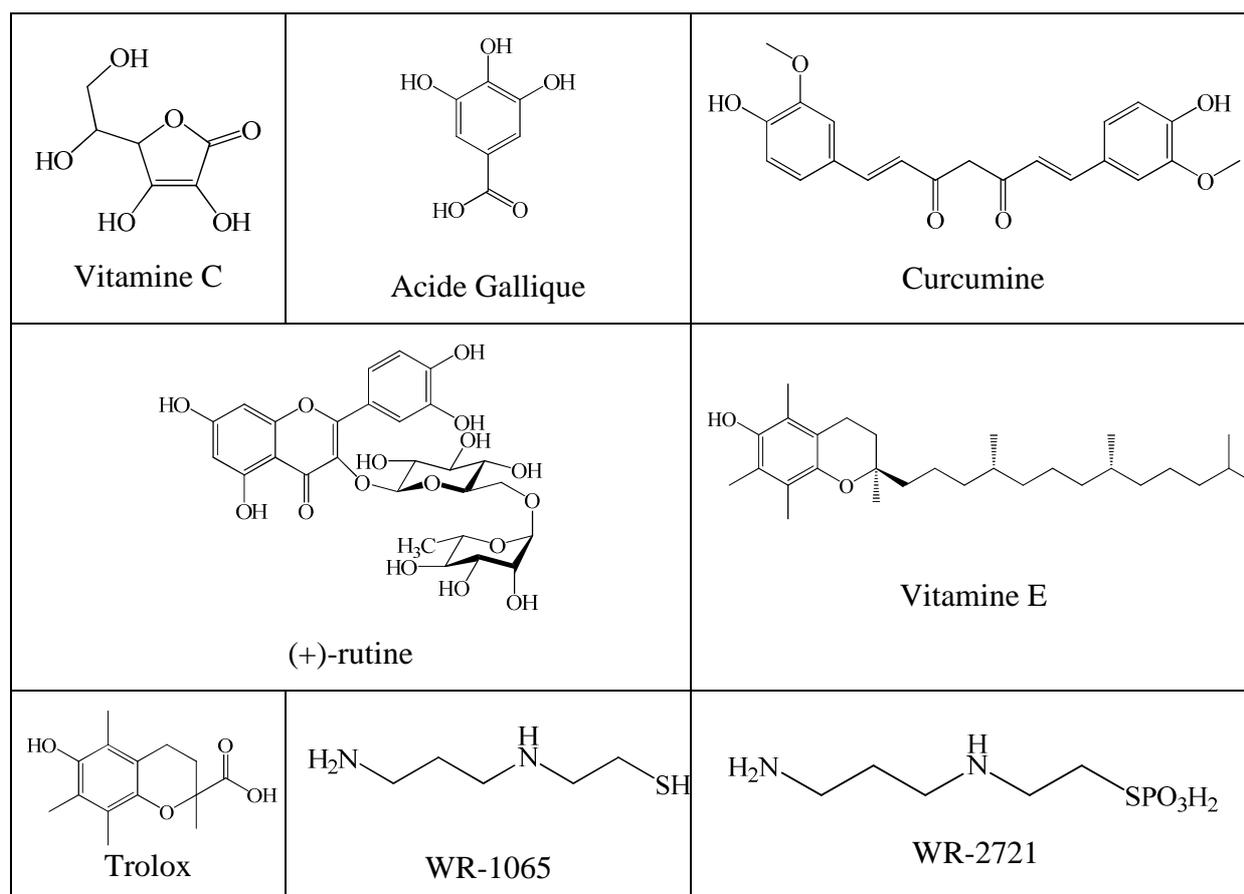


Figure 26 : Les différentes références

II. Synthèse des Composés de Référence

II.1. Techniques Expérimentales d'Analyses

Les composés ont été identifiés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), spectrométrie de masse et infrarouge. Leur pureté est contrôlée par analyse élémentaire.

L'ensemble des spectres de résonance magnétique nucléaire du proton est réalisé sur des spectromètres Avance 300 BRUKER, de fréquence de 300,13 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence. La multiplicité des signaux est désignée par : s (singulet) ; d (doublet) ; dd (doublet dédoublé) ; t (triplet) ; q (quadruplet) ; quint (quintuplet) ; m (multiplet) ; b (singulet large).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone ont été réalisés sur un spectromètre Avance 300 BRUKER, à la fréquence de 75,46 MHz, en J-Mod. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant le TMS comme référence.

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

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du silicium ont été réalisés sur un spectromètre Avance 300 BRUKER, à la fréquence de 59,63 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, en prenant le TMS comme référence.

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

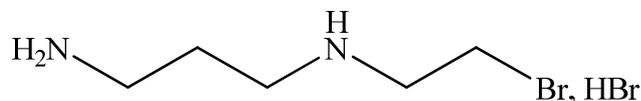
Les spectres de masse ont été effectués à l'aide d'un spectromètre Nermag R10-10H pour l'impact électronique, d'un spectromètre type Qtrap et API 365 pour l'électrospray et la FAB (Fast Atom Bombardment ; Applied Biosystems).

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le laboratoire de microanalyse du Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse.

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

II.2. Le WR-1065 et le WR-2721

II.2.1. Synthèse du sel de N-(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine



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

Le résidu marron est repris avec 40 ml de méthanol. Puis 100 ml d'acétone sont ajoutés, sous agitation, à la solution. Le précipité blanc obtenu est filtré, puis séché sous vide sur P₂O₅. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par 50 ml d'acétone. Le précipité obtenu est filtré puis séché sous vide en présence de P₄O₁₀.

On obtient 67,40 g du sel bromé (198,8 mmol ; Rdt : 94%).

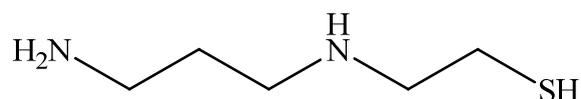
Caractérisation

RMN ¹H (300,13 MHz, D₂O, δ, ppm) : 2,10 - 2,14 (m, 2H, CH₂), 3,09 - 3,21 (m, 4H, CH₂), 3,44 - 3,70 (m, 4H, CH₂)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 26,6 (CH₂CH₂CH₂), 36,1 (H₂NCH₂), 37,9 (CH₂Br), 45,3 (NHCH₂CH₂CH₂), 47,5 (NHCH₂CH₂Br)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 181 [M+1]⁺

Point de fusion : 205 - 207 °C

II.2.2. Synthèse du 2-(3-aminopropylamino)-éthanethiol (WR-1065)

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

On obtient 620 mg de WR-1065 (4,63 mmol ; Rdt : 28%).

Caractérisation

RMN ¹H (300,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,76 - 1,81 (m, 4H, CH₂), 2,65 - 2,96 (m, 6H, CH₂)

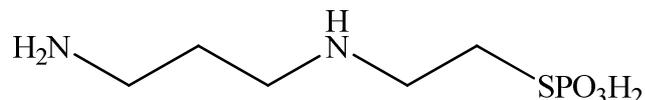
RMN ¹³C (75,46 MHz, D₂O, δ, ppm) : 23,6 (CH₂S), 26,1 (CH₂CH₂CH₂), 36,7 (H₂NCH₂), 44,6 (NHCH₂CH₂CH₂), 49,3 (NHCH₂CH₂S)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 135 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₅H₁₄N₂S) :

Calc. % : C, 44,73 ; H, 10,51
Exp. % : C, 44,03 ; H, 11,21

II.2.3. Synthèse du N-(3-aminopropyl)-2-aminoéthylphosphorothioate (WR-2721)



A une solution de Na_3SPO_3 anhydre (3,46 g, 19,25 mmol) dans 19 ml d'eau à 30°C est ajouté, sous agitation, le N-(2-bromoéthyl)propane-1,3-diamine (6,60 g, 19,25 mmol). Après dissolution totale, 1,5 ml de DMF sont ajoutés. Le mélange est agité une nuit à 30°C puis 150 ml de méthanol sont ajoutés. Le précipité blanc obtenu est recristallisé trois fois dans un mélange méthanol/eau (4/1).

On obtient 2,3 g du dérivé phosphoré (10,70 mmol ; Rdt : 56%).

Caractérisation

RMN ^1H (300,13 MHz, D_2O , δ , ppm) : 2,02 - 2,12 (m, 2H, CH_2), 2,89 - 2,98 (m, 2H, CH_2), 3,06 - 3,15 (m, 4H, CH_2), 3,32 - 3,35 (m, 2H, CH_2)

RMN ^{13}C (75,46 MHz, D_2O , δ , ppm) : 23,8 (CH_2S), 25,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 36,5 (H_2NCH_2), 44,4 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 50,4 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$)

RMN ^{31}P (D_2O , δ , ppm) : 15,7

Spectre de masse (FAB, DMSO) : $m/z = 215$ $[\text{M}+1]^+$

Analyse élémentaire ($\text{C}_5\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$) : Calc. % : C, 28,03 ; H, 7,06

Exp. % : C, 27,63 ; H, 7,46

Point de fusion : 151-153 °C

Chapitre 2 :

Préparation des

Précurseurs

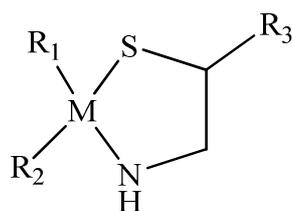
Organométalliques

I. Caractéristiques et Propriétés

L'introduction de groupements organométalliques modifie les propriétés biologiques des composés. Ainsi, depuis quelques années, notre équipe, en collaboration avec le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, a montré que l'utilisation de précurseurs germaniés, séléniés ou siliciés engendrait une baisse de la toxicité ainsi qu'une augmentation des propriétés radioprotectrices en comparaison avec les dérivés carbonés^[107].

I.1. Modification de la Toxicité

Dans le tableau 7, nous remarquons l'influence de l'introduction de précurseurs organométalliques sur la toxicité des dérivés organiques. En effet, les composés organométalliques montrent dans la majorité des cas une nette diminution de leur toxicité en comparaison avec la cystéamine. On peut remarquer qu'ici, les dérivés organosiliciés sont moins toxiques que les dérivés organogermaniés^[110]. Cette diminution de toxicité pourrait s'expliquer par une possible inhibition de la toxicité des fonctions thiols ou amines, réactives, contenues dans les composés organiques. Une autre explication pourrait être une meilleure métabolisation du composé sous sa forme organométallique.



Métallathiazolidines

M	R ₁	R ₂	DL ₅₀ (mg/Kg)
Si	C ₆ H ₅	CH ₃	800
	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	1000
	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	1500
	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	1500
Ge	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	1000
	<i>n</i> -C ₄ H ₉	<i>n</i> -C ₄ H ₉	700
	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	400
	CH ₃	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	600
Cystéamine	-	-	600

Tableau 7 : Variations de la toxicité selon M, R₁ et R₂
dans la famille des métallathiazolidines

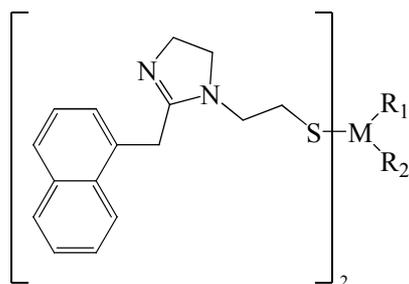
I.2. Modification du Pouvoir Radioprotecteur

Dans le tableau 8, nous observons l'augmentation des propriétés radioprotectrices d'un dérivé de la Naphthylméthylimidazoline (NMI) par l'introduction d'un groupement organogermanié ou organosilicié^[110]. Alors que le dérivé organique présente un très léger effet radioprotecteur, (FRD = 1,1), les dérivés organométalliques présentent un FRD nettement plus élevé (1,4 < FRD < 1,7) avec, comme précédemment évoqué, une baisse non négligeable de la toxicité.

Cette augmentation de l'effet radioprotecteur pourrait s'expliquer par :

- Une meilleure vectorisation de la molécule ;
- Une modification des propriétés antioxydantes et antiradicalaires de la molécule ;
- Une augmentation de la posologie par diminution de la toxicité de la molécule ;

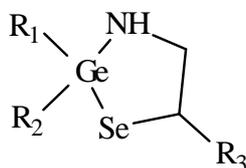
Partie II, Chapitre 2 : Préparation des Précurseurs Organométalliques



M	R ₁	R ₂	DL ₅₀ (mg/Kg)	FRD
Ge	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	80	1,7
Ge	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	150	1,4
Si	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	100	1,4
Si	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	100	1,5
HSCH ₂ CH ₂ NMI	-	-	35	1,1

Tableau 8 : Variations de la toxicité et du pouvoir radioprotecteur selon M, R₁ et R₂ dans la famille de la naphthylméthylimidazoline

L'effet prolongé ou effet retard est aussi un effet intéressant induit par l'utilisation d'organométalliques (Tableau 9). Comme présenté dans ce tableau, les molécules deviennent plus actives lorsqu'elles sont injectées 90 minutes avant irradiation que lorsque le délai n'est que de 15 minutes^[110]. Cet effet peut s'expliquer par l'hydrolyse lente du composé organométallique et donc par la libération lente et continue du principe actif.



R ₁	R ₂	R ₃	DL ₅₀ (mg/Kg)	Temps (min)	Taux de Survie %
<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	H	255	15	40
				90	60
<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -C ₅ H ₁₁	CH ₃	236	15	30
				90	50
<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	H	224	15	30
				90	50
<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	CH ₃	200	15	30
				90	40
H ₂ NCH ₂ CH ₂ SeH, HCl	-	-	17	15	0
				90	0
H ₂ NCH(CH ₃)CH ₂ SeH, HCl	-	-	10	15	0
				90	0

Tableau 9 : Variations de la toxicité et du pouvoir radioprotecteur selon R₁, R₂ et R₃ pour un temps entre l'injection et l'irradiation de 15 ou 90 minutes

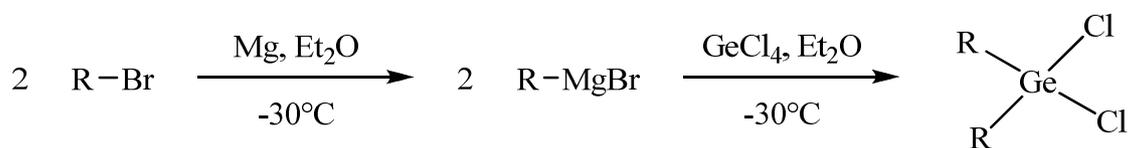
II. Obtention des Composés Organométalliques

II.1. Synthèse des Précurseurs Organométalliques

Selon le groupement présent sur le germanium ou le silicium, les propriétés biologiques des composés varient. Ainsi, nous avons décidé d'étudier l'influence des groupements greffés sur le précurseur.

II.1.1. Synthèse des précurseurs dialkyldichlorogermanes

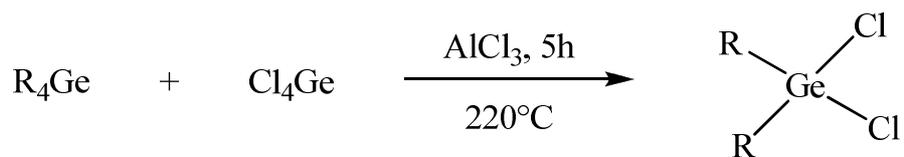
Les procédés classiques de synthèse des composés organométalliques dihalogénés ont été utilisés ici^[111]. Ce procédé consiste dans un premier temps à la formation d'un organomagnésien approprié, dans l'éther à basse température. Cet organomagnésien est ensuite mis en réaction avec le tétrachlorure de germanium pour donner le précurseur dichloré souhaité (Figure 27).



R = *n*-C₆H₁₃, *i*-C₅H₁₁

Figure 27 : Synthèse des dialkyldichlorogermanes par la voie organomagnésienne

La seconde méthode consiste en une synthèse par redistribution à 220°C en tube scellé, entre le tétrachlorure de germanium et le tétraalkylgermane en présence d'une quantité catalytique d'acide de Lewis tel que le chlorure d'aluminium :



R = *n*-C₆H₁₃, *i*-C₅H₁₁

Figure 28 : Synthèse des dialkyldichlorogermanes par redistribution

II.1.2. Synthèse des précurseurs dialkyldichlorosilanes

La synthèse des précurseurs dichlorés siliciés est basée sur le même principe que celle des dérivés germaniés. La première étape est une réaction entre un organomagnésien et du tétraéthoxysilane (Figure 29).

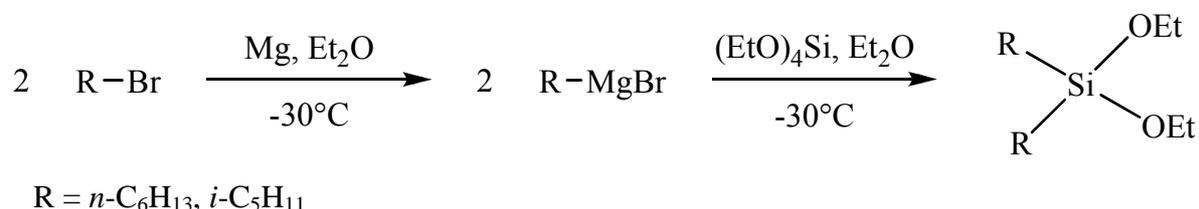


Figure 29 : Synthèse des dialkyldiéthoxysilane

Ensuite, il est réalisé la chloration des dialkyldiéthoxysilanes en présence d'un chlorure d'acide et d'une quantité catalytique de chlorure d'aluminium :

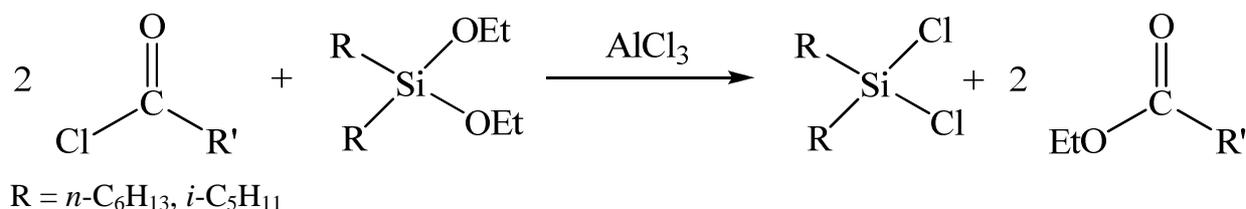


Figure 30 : Synthèse des dialkyldichlorosilane

II.1.3. Synthèse des bis(diéthylamino)dialkylgermanes et silanes

A partir des dérivés dichlorés, il est possible de synthétiser les bis(diéthylamino)dialkylgermanes ou silanes par réaction entre le dérivé lithié de la diéthylamine et le composé dichloré :

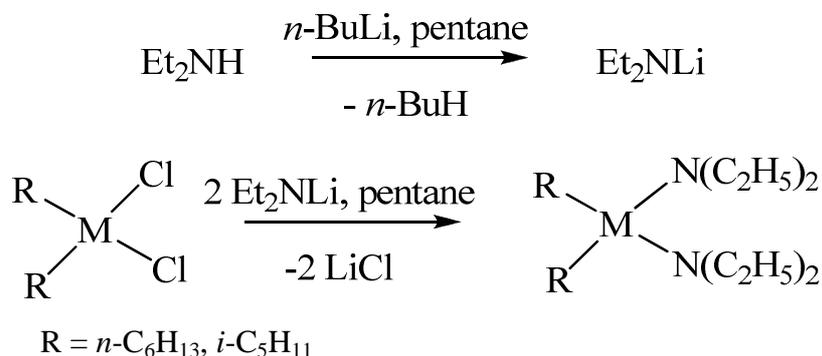
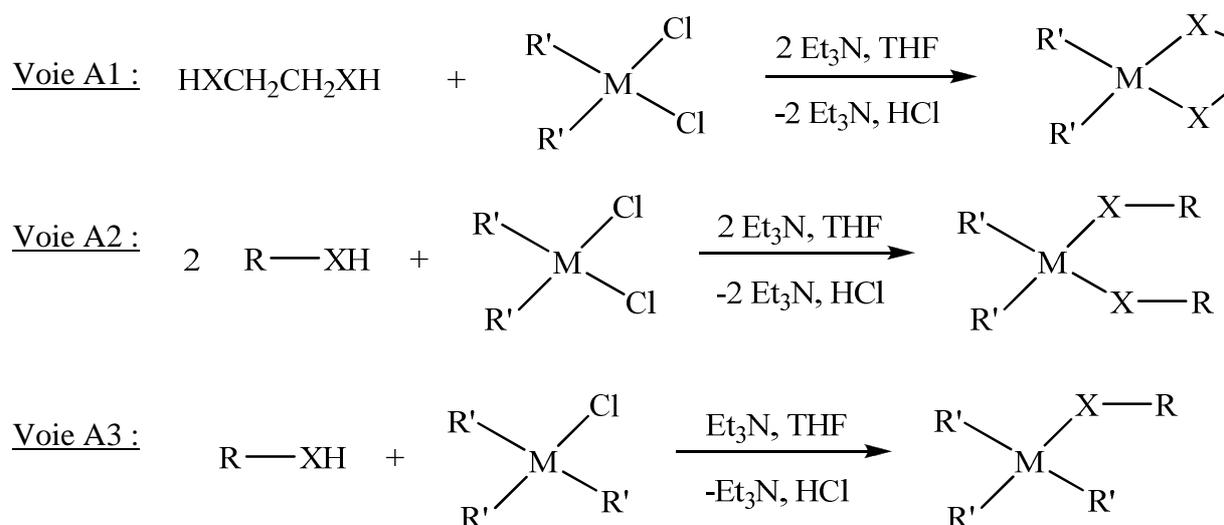


Figure 31 : Synthèse des bis(diéthylaminodialkyl)-germanes et -silanes

II.2. Synthèse des Dérivés Organométalliques

Deux voies de synthèse sont généralement utilisées pour l'obtention des dérivés organométalliques^[107, 110, 112].

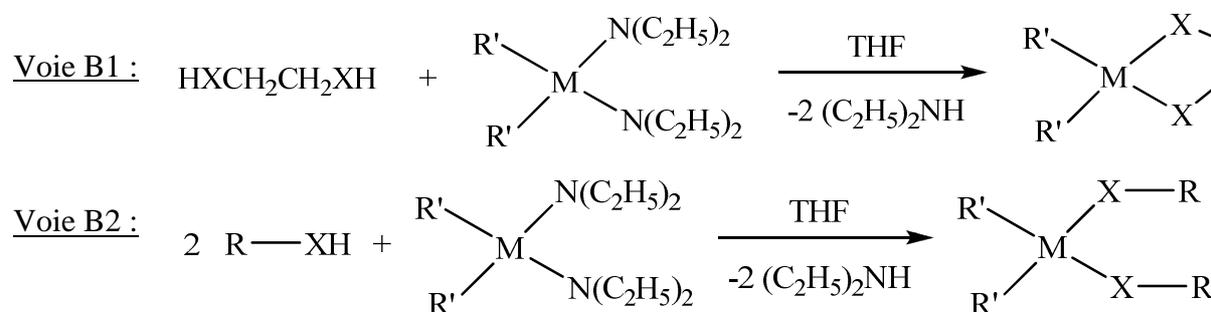
La première méthode (Voie A) est une réaction de déshydrochloration entre les précurseurs chlorés et les composés organiques en présence d'une base comme la triéthylamine (Figure 32). Suivant la nature des composés organiques, des dérivés mono- ou di-substitués linéaires ou cycliques ont été obtenus avec de bons rendements (60-85%).



Avec X = O, S, NH

Figure 32 : Synthèse des dérivés organométalliques selon la voie A

La seconde méthode (Voie B), plus performante, consiste en la réaction entre le bis(diéthylamino)germanes ou le bis(diéthylamino)silanes et le dérivé organique (Figure 33). Cette méthode permet l'obtention des dérivés souhaités avec des rendements élevés (95-98%).



Avec X = O, S, NH

Figure 33 : Synthèse des dérivés organométalliques selon la voie B

II.3. Conclusion

L'intérêt principal de ces structures organométalliques est d'agir comme pro-drogue permettant une libération *in vivo* d'une ou plusieurs substances radioprotectrices ainsi qu'une libération retardée ou prolongée des substances actives.

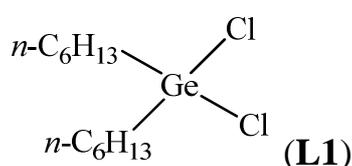
Ainsi, la synthèse de certains précurseurs organométalliques d'intérêts non commerciaux a été réalisée dans notre laboratoire. La synthèse des dérivés organométalliques se fera, dans la majorité des cas, par la voie A. Les composés les plus intéressants ont aussi été synthétisés par la méthode B afin d'optimiser les rendements.

III. Protocoles de Synthèse

III.1. Les Précurseurs Organométalliques

III.1.1. Synthèse des précurseurs organogermaniés

III.1.1.a. Synthèse du dichloro-di-*n*-hexylgermane (L1)



Synthèse par la voie organomagnésienne

A une solution de magnésium (30,0 g, 1,23 mol) dans 500 ml d'éther anhydre est ajoutée sous argon, goutte à goutte, une solution de bromure de *n*-hexyle (169,8 g, 1,03 mol) dans 700 ml d'éther anhydre. Le mélange est porté à reflux sous agitation pendant 2h. Le mélange réactionnel devient noir. Sous Argon, à -40°C, la solution d'organomagnésien préalablement synthétisée est ajoutée goutte à goutte à une solution de GeCl₄ (110,3 g, 0,51 mol) dans 600 ml d'éther anhydre. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est agité pendant une nuit.

Le mélange est filtré puis le solide obtenu est lavé avec 3×200 ml de pentane anhydre. Les solvants sont concentrés sous vide puis le résidu est repris avec 100 ml de pentane anhydre avant d'être de nouveau filtré puis concentré sous vide. Le mélange est distillé sous pression réduite pour conduire à 83,8 g d'huile incolore (57,25 mmol, Rdt : 51,9%). Le produit obtenu est conservé sous argon.

Synthèse par redistribution

A un mélange de tétra-*n*-hexylgermane (21,7 g, 52,43 mmol) et de tétrachlorure de germanium (11,2 g, 52,43 mmol) est ajouté du chlorure d'aluminium (1,9 g, 14,16 mmol). Le mélange est porté à 220°C pendant 5h dans un autoclave. Le résidu est repris par 500 ml de pentane anhydre puis filtré. Le filtrat est alors concentré puis distillé sous vide. On obtient 10,8 g d'huile incolore (Rdt : 65,5%). Le produit obtenu est conservé sous argon.

Caractérisation

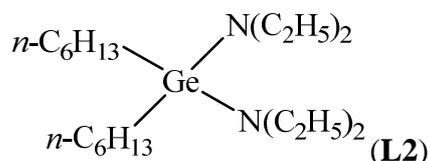
Eb : 85°C / 0,03 mm Hg

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 0,88 (t, J = 5,6Hz, 6H, CH₃), 1,19 - 1,50 (m, 12H, CH₂), 1,52 - 2,24 (m, 8H, CH₂)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 14,1 (CH₃), 22,5 (CH₂), 23,3 (CH₂), 26,2 (CH₂), 31,3 (CH₂), 31,2 (CH₂)

Spectre de masse (EI, THF) : m/z = 314 [M]⁺

III.1.1.b. Synthèse du bis(diéthylamino)-di-*n*-hexylgermane (L2)



A une solution de diéthylamine (12,3 g, 167,95 mmol) dans 100 ml de pentane anhydre est ajoutée sous argon, goutte à goutte, une solution de *n*-butyllithium (105,0 ml, 1,6 M, 167,95 mmol) dans l'hexane. Le mélange est porté à reflux sous agitation pendant 1h. Sous Argon, à -40°C, une solution de dichloro-di-*n*-hexylgermane (20,0 g, 70,00 mmol) dans 140 ml de pentane anhydre est ajoutée goutte à goutte à la solution de lithien.

On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante puis le mélange est porté à reflux pendant 8h. On laisse une nuit sous agitation, à température ambiante. Le précipité de chlorure de lithium est laissé décanter puis le surnageant est récupéré par canulation. On évapore les solvants sous vide.

Après distillation, on récupère 19,5 g d'huile incolore (50,46 mmol, Rdt : 72,1%). Le produit obtenu est conservé sous argon.

Caractérisation

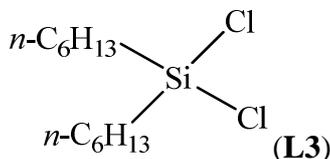
Eb : 123°C / 0,01 mm Hg

RMN ¹H (200,13 MHz, C₆D₆, δ, ppm) : 0,90 (t, J = 4,5Hz, 6H, CH₃), 1,05 (t, J = 6,9Hz, 12H, CH₃CH₂N), 1,12 - 1,54 (m, 20H, (CH₂)₅), 2,92 (q, J = 6,9Hz, 8H, CH₂N)

Spectre de masse (EI, THF) : m/z = 388 [M]⁺

III.1.2. Synthèse des précurseurs organosiliciés

III.1.2.a. Synthèse du dichloro-di-*n*-hexylsilane (L3)



Synthèse par la voie organomagnésienne

*Synthèse du diéthoxy-di-*n*-hexylsilane*

A une solution de magnésium (25,7 g, 1,06 mol) et de tétraéthoxysilane (50,0 g, 0,24 mol) dans 120 ml d'éther anhydre est ajoutée sous argon, goutte à goutte, une solution de bromure de *n*-hexyle (158,5 g, 0,96 mol) dans 500 ml d'éther anhydre. Le mélange est laissé une nuit sous agitation et sous argon.

L'excès de magnésium est hydrolysé doucement par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique à 10%. La phase étherée est récupérée par décantation, séchée sur chlorure de calcium puis filtrée. On évapore la phase organique sous vide puis le résidu obtenu est distillé sous vide.

On obtient 43,1 g d'huile incolore correspondant au diéthoxy-di-*n*-hexylsilane (164,34 mmol, Rdt : 68,5%). Le produit obtenu est conservé sous argon.

Caractérisation

Eb : 137°C / 10 mm Hg

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 0,58 (t, J = 7,2Hz, 4H, CH₂Si), 0,86 (t, J = 5,1Hz, 6H, CH₃), 1,18 (t, J = 6,9Hz, 6H, CH₃CH₂O), 1,21 - 1,26 (m, 16H, (CH₂)₄), 3,73 (q, J = 6,9Hz, 4H, CH₂O)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 12,6 (CH₂Si), 14,1 (CH₃), 18,5 (CH₃CH₂O), 22,6 (CH₃CH₂), 22,8 (CH₃CH₂CH₂), 31,6 (CH₂CH₂Si), 33,2 (CH₂), 58,1 (CH₂O)

I.R. (cm⁻¹) : ν_{Si-O} = 1106

Spectre de masse (EI, THF) : m/z = 288 [M]⁺

Synthèse du dichloro-di-n-hexylsilane

Une quantité catalytique de chlorure d'aluminium est ajoutée à une solution de diéthoxy-di-n-hexylsilane (40,0 g, 138,62 mmol) et de chlorure d'acétylène (398,0 ml, 360,5 g, 459,29 mmol). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 7h.

La solution est concentrée sous vide puis le résidu est distillé sous pression réduite. 30,1 g d'huile incolore est obtenue (112,41 mmol, Rdt : 81,1%). Le produit obtenu est conservé sous argon.

Caractérisation

Eb : 135°C / 10 mm Hg

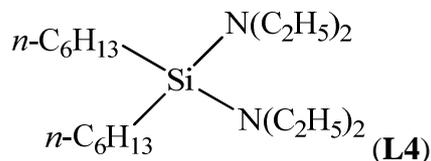
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 0,89 (t, J = 5,8Hz, 6H, CH₃), 1,16 (t, J = 6,5Hz, 4H, CH₂Si), 1,28 - 1,54 (m, 16H, (CH₂)₄)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 14,1 (CH₃), 20,4 (CH₂Si), 22,4 (CH₃CH₂), 22,5 (CH₃CH₂CH₂), 31,4 (CH₂CH₂Si), 32,2 (CH₂)

I.R. (cm⁻¹) : ν_{Si-Cl} = 689

Spectre de masse (EI, THF) : m/z = 268 [M]⁺

III.1.2.b. Synthèse du bis(diéthylamino)-di-n-hexylsilane (L4)



Le protocole décrit pour la synthèse de **L2** est utilisé pour la synthèse de **L4** avec 12,6 g de diéthylamine (179,65 mmol) en solution dans 100 ml de pentane anhydre, 115 ml de butyllithium dans l'hexane (1,6M, 184,0 mmol) et 20,0 g de dichloro-di-n-hexylsilane (74,24 mmol). Après distillation, sont obtenus 12,5 g d'huile incolore. Le produit obtenu est conservé sous argon.

Caractérisation

Eb : 110°C / 0,05 mm Hg

RMN ¹H (200,13 MHz, C₆D₆, δ, ppm) : 0,61 - 0,79 (m, 4H, CH₂Si), 0,88 (t, J = 5,7Hz, 6H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,0Hz, 12H, CH₃CH₂N), 1,14-1,50 (m, 16H, (CH₂)₄), 2,80 (q, J = 7,0Hz, 8H, CH₂N)

Spectre de masse (EI, THF) : m/z = 342 [M]⁺

III.2. Les Dérivés Dialkyl Organométalliques

III.2.1. Synthèse des dialkylorganométalliques cycliques

Ce type de réaction sera utilisé essentiellement pour la synthèse des dérivés organométalliques cycliques issus des dérivés d'acides pulviniques (partie 3, chapitre 1), de l'acide salicylique (partie 3, chapitre 2), ou du 4,5-dimercapto-1,3-dithiole-2-thione (partie 5, chapitre 1).



Avec X = O, S, NH

Protocole général Voie A1

A une solution de composé parent (1 équivalent) et de triéthylamine (2 équivalents) dans du THF anhydre est ajoutée au goutte à goutte, sous argon, une solution de dichlorodialkylgermane (respectivement dichlorodialkylsilane) (1 équivalent) dans du THF anhydre. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit.

Après retour à température ambiante, du pentane anhydre (0,5 en volume par rapport au THF) est ajouté. Le chlorhydrate de triéthylamine est éliminé par filtration puis le filtrat est séché sous vide pour conduire au produit attendu.

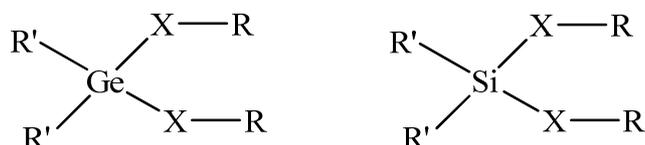
Protocole général Voie B1

A une solution de composé parent (1 équivalent) dans du THF anhydre est ajoutée au goutte à goutte, sous argon, une solution de bis(diéthylamino)dialkylgermane (respectivement bis(diéthylamino)dialkylsilane) (1 équivalent) dans du THF anhydre. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit.

Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous vide pour donner le produit attendu.

III.2.2. Synthèse des dialkylorganométalliques linéaires

Ce type de réaction sera réalisé pour la synthèse des dérivés organométalliques linéaires des dérivés du benzothiazole (partie 4, chapitre 2) et des naphthalimides (partie 4, chapitre 3).



Avec X = O, S, NH

Protocole général Voie A2

A une solution de composé parent (2 équivalents) et de triéthylamine (2 équivalents) dans du THF anhydre est ajoutée au goutte à goutte, sous argon, une solution de dichlorodialkylgermanes (respectivement dichlorodialkylsilane) (1 équivalent) dans du THF anhydre. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit.

Après retour à température ambiante, du pentane anhydre (0,5 en volume par rapport au THF) est ajouté. Le chlorhydrate de triéthylamine est éliminé par filtration puis le filtrat est séché sous vide pour conduire au produit attendu.

Protocole général Voie B2

A une solution de composé parent (2 équivalents) dans du THF anhydre est ajoutée sous argon, au goutte à goutte, une solution de bis(diéthylamino)dialkylgermane (respectivement bis(diéthylamino)dialkylsilane) (1 équivalent) dans du THF anhydre. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit.

Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est concentré sous vide pour donner le produit attendu.

III.3. Les Dérivés Trialkyl Organométalliques

Ce type de réaction sera réalisé pour la synthèse des dérivés organométalliques des dérivés de l'acide salicylique (partie 3, chapitre 2), des dérivés du benzothiazole (partie 4, chapitre 2) et des naphthalimides (partie 4, chapitre 3).



Avec X = O, S, NH

Protocole général Voie A3

A une solution de composé parent (1 équivalent) et de triéthylamine (1 équivalent) dans du THF anhydre est ajoutée au goutte à goutte, sous argon, une solution de trichloroalkylgermane (respectivement trichloroalkylsilane) (1 équivalent) dans du THF anhydre. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit.

Après retour à température ambiante, du pentane anhydre (0,5 en volume par rapport au THF) est ajouté. Le chlorhydrate de triéthylamine est éliminé par filtration puis le filtrat est séché sous vide pour conduire au produit attendu.

Chapitre 3 :

Techniques d'Evaluation

I. Evaluation *in vitro*

Comme nous l'avons vu précédemment, les voies de dégradation et les cibles de l'irradiation sont nombreuses, aussi, il a été nécessaire de réduire les voies d'investigation dans la mise au point de nouvelles molécules. L'effet direct ne chiffrant que pour 20% des dégradations et étant très difficilement limitable, nous nous baserons préférentiellement sur l'inhibition des phénomènes radicalaires dus à l'effet indirect. Nous avons ainsi développé différents tests permettant d'étudier nos molécules vis-à-vis de ces phénomènes.

Le pouvoir antioxydant de nos composés a été déterminé par deux tests simples :

- Le test au radical cation ABTS⁺.
- Le test au radical DPPH[•] dont une partie des tests a été effectuée par l'équipe de Thierry Le Gall du CEA de Saclay.
- Un test de peroxydation lipidique en milieu micellaire a été mis au point en collaboration avec P. Perio de l'équipe de F. Nepveu de l'IRD. La méthode a alors été modifiée pour être adaptée à l'utilisation d'un lecteur de microplaques dans notre laboratoire.

Dans notre étude, les molécules obtenues ont ensuite été testées *in vitro* par l'équipe de Thierry Le Gall du CEA de Saclay selon trois modèles, ayant pour but de simuler les clivages de l'ADN :

- L'ionisation directe de la thymidine modélisant l'irradiation directe de l'ADN par rayonnement γ .
- La dégradation de la thymidine par réaction de Fenton (H_2O_2 , Fe^{2+}) modélisant les dégradations dues à la réaction de Fenton ou aux métaux.
- La dégradation de la thymidine par réaction de Photo-Fenton (H_2O_2 , UV) modélisant les dégradations dues à la réaction de Fenton et à une irradiation UV.

I.1. Evaluation des Propriétés Antioxydantes

Ces dernières années, un vif intérêt a été porté par les industries pharmaceutiques et cosmétiques pour l'étude des phénomènes radicalaires dangereux pour l'organisme. Ainsi, nombre de médicaments et de produits antioxydants ou antiradicalaires ont été étudiés. Le but de ces produits est de limiter les effets délétères des radicaux formés naturellement ou à cause de l'activité humaine de façon endogène, ou issus de processus physiques tels que la radiolyse de l'eau.

Nous avons synthétisé des molécules dans le but de prévenir les dommages produits par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau. Ce phénomène est particulièrement connu pour les composés de type thiol ou polyphénol comme présenté précédemment.

I.1.1. Test au radical DPPH

Parallèlement à cet engouement, un ensemble de techniques a été mis au point afin d'évaluer les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des composés. La méthode d'évaluation de ces propriétés par le test au DPPH est courante.

I.1.1.a. Partie théorique

Cette méthode consiste en l'étude de l'inhibition du radical particulièrement stable 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazil, noté DPPH \cdot . La stabilité de ce composé est due à l'importante délocalisation du radical sur l'ensemble de la structure du DPPH. La délocalisation de ce radical empêche son inhibition par formation de dimères ou réaction avec les solvants tels que l'éthanol (Figure 34). De plus, la délocalisation du radical induit la coloration violette du DPPH \cdot en solution alcoolique. Ce radical est caractérisé par son pic d'absorbance à 516 nm^[113-115].

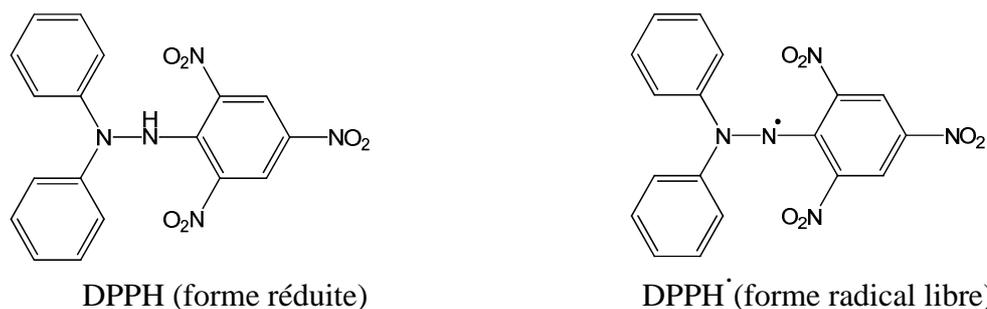


Figure 34 : Structure de la forme réduite (DPPH) et radicalaire (DPPH•) du 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazil

Le principe de ce test est de mesurer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en présence d'un composé potentiellement antioxydant et apte à céder un proton à différentes concentrations. Par addition d'une solution éthanoïque de composé à tester au radical DPPH•, il résulte une diminution de la coloration violette caractéristique du radical avec l'apparition de la forme réduite du DPPH. Le radical du composé test résultant de cette réaction peut alors réagir et former entre autres des dimères. Nous remarquons qu'au terme de la réaction, il persiste une légère coloration jaune caractéristique des groupements picryl résiduels.

Un exemple de la réaction entre le radical DPPH• et le trolox est donné sur le schéma suivant :

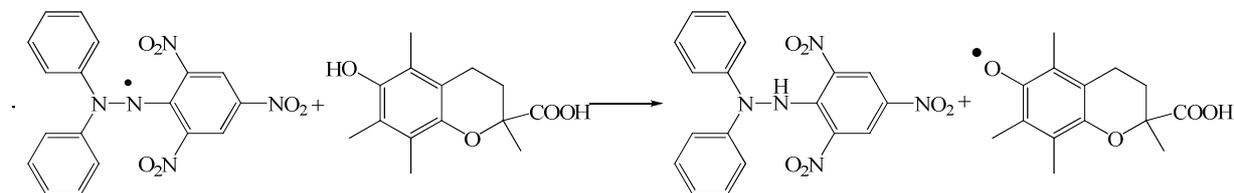


Figure 35 : Inhibition du DPPH par le trolox

On notera que certains produits, tels que la vitamine C ou les acides pulviques, peuvent donner plusieurs protons. Pour la vitamine C pouvant céder 2 protons, 2 molécules de DPPH• peuvent être inhibées. La norbadione A est un composé hautement antiradicalaire car 7 molécules de DPPH• peuvent être inhibées par une molécule de norbadione A.

De plus, afin de pouvoir réaliser ce test, il est nécessaire de vérifier que le produit testé n'absorbe pas à 516 nm.

Ce test a été réalisé selon les molécules, soit par notre groupe soit par l'équipe de Thierry Le Gall au CEA de Saclay, avec le même protocole.

I.1.1.b. Conditions expérimentales

Les mesures ont été réalisées dans de l'éthanol absolu sur des microplaques 96 puits à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan FC incubator (Thermo Fisher).

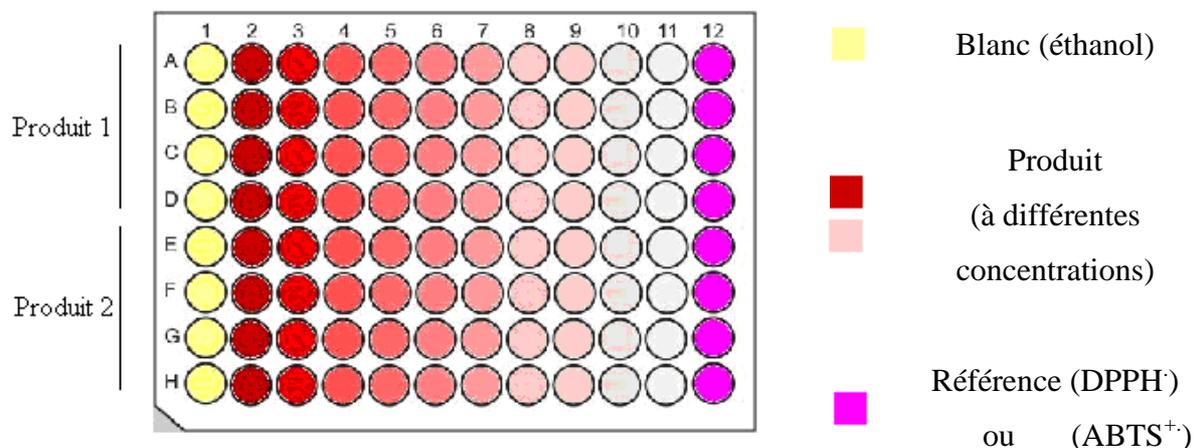


Figure 36 : Schéma de microplaque pour la préparation des tests (DPPH et ABTS)

Pour chaque composé, une gamme de concentration est préparée allant de 10^{-3} M à $1,95 \cdot 10^{-6}$ M directement sur la plaque pour un volume final de 100 μ L dans les colonnes 2 à 11. Pour chaque concentration, quatre mesures seront effectuées (Figure 36).

Des témoins d'éthanol absolu (200 μ L) et de radical DPPH \cdot (100 μ M) sont disposés respectivement dans les colonnes 1 et 12.

Ensuite, une solution à 200 μ M de radical DPPH \cdot est préparée dans l'éthanol absolu. 100 μ L de cette solution à 200 μ M sont ajoutés aux colonnes 2 à 11.

L'absorbance est alors mesurée à 515 nm, toutes les 5 minutes, pendant une heure.

Les IC₅₀ des composés sont déterminées lorsque la courbe de mesures atteint un plateau.

I.1.2. Test au radical cation ABTS⁺.

Afin de compléter le premier test des propriétés antioxydantes, un second test basé sur le même principe est utilisé. Ce test est réalisé avec l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) noté ABTS. Le radical ABTS⁺ est aussi un radical stable. Il est utilisé pour évaluer les propriétés antioxydantes des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien de produits purs. La particularité de ce radical est de pouvoir réagir non seulement avec les antioxydants classiques de type polyphénol ou thiol mais aussi avec tout autre composé donneur d'hydrogène ou d'électron.

I.1.2.a. Partie théorique

Le radical $ABTS^+$ est formé dans notre étude par oxydation de l'ABTS par du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$). D'autres oxydants tels que le dioxyde de manganèse (MnO_2) peuvent aussi être utilisés. Le radical $ABTS^+$ ainsi formé présente une coloration vert-bleu caractéristique de sa bande d'absorption à 734 nm. Cette bande d'absorption, de coefficient d'extinction molaire élevé, est utilisée pour notre étude. Les autres coefficients d'extinction molaire élevés de ce radical stable se trouvent à 416 et 650 nm.

La concentration en radical $ABTS^+$ peut être aisément calculée par mesure de l'absorption de la bande à 734 nm en spectroscopie UV-visible. La décroissance de cette bande sous l'action de différents antioxydants à différentes concentrations permet la mesure de l'activité antioxydante. On notera qu'un autre paramètre entrant en compte dans la mesure est le temps de réaction^[116-119].

Similairement au radical DPPH $^{\cdot}$, le radical présent sur l' $ABTS^+$ est délocalisé sur l'ensemble de la structure, ce qui explique sa grande stabilité (Figure 37).

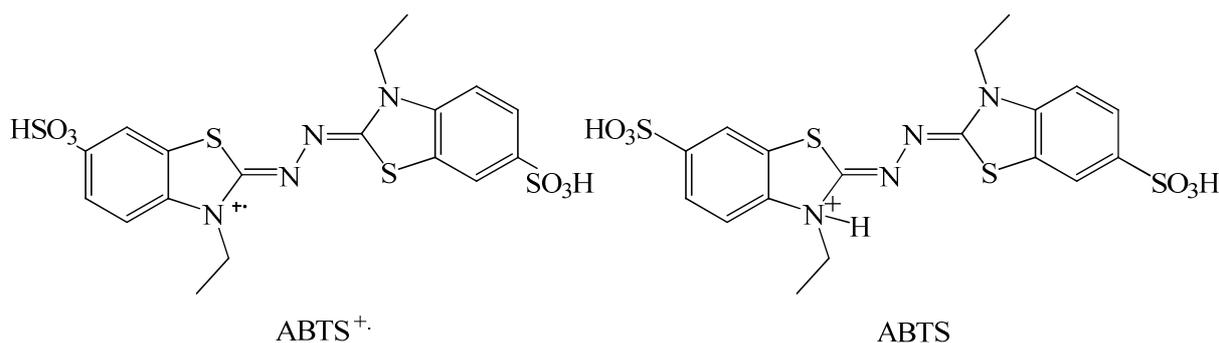


Figure 37 : Structure de la forme réduite (ABTS) et radicalaire ($ABTS^+$) de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Comme pour le test au DPPH, nous mesurons ici la décoloration de la solution à 734 nm afin de déterminer le pourcentage d'inhibition du radical en fonction du temps et de la concentration d'antioxydant.

I.1.2.b. Conditions expérimentales

Activation de l'ABTS

A une solution d'ABTS (Sigma Aldrich) à 7 mM dans l'eau, est ajoutée une solution de persulfate de potassium (Sigma Aldrich) à 140 mM pour obtenir une concentration finale de 3,5 mM. Le mélange est agité une nuit à l'abri de la lumière et à température ambiante pour former le radical $ABTS^+$. Le mélange est ensuite dilué avec de l'éthanol absolu pour

obtenir une absorbance voisine de 0,7 à 734 nm et à 30°C pour un volume final de 300 µL. Le rendement de la réaction d'oxydation peut être calculé à partir du coefficient d'extinction molaire connu de $1,5 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ car la réaction est toujours incomplète : elle commence immédiatement, mais ne se stabilise qu'après plus de 6 heures.

Protocole de test

Les mesures ont été réalisées dans de l'éthanol absolu sur des microplaques 96 puits à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan FC incubator (Thermo Fisher).

Pour chaque composé, une gamme de concentration est préparée allant de 10^{-3} M à $1,95 \cdot 10^{-6}$ M directement sur la plaque pour un volume final de 200 µL dans les colonnes 2 à 11. Pour chaque concentration, quatre mesures sont effectuées.

Des témoins d'éthanol absolu (300 µL) et de radical ABTS⁺ ($A = 0,7$; 100 µL de solution d'ABTS⁺ préalablement étalonnée et 200 µL d'éthanol absolu) sont disposés respectivement dans les colonnes 1 et 12 (Figure 36).

Ensuite, 100 µL de la solution d'ABTS préalablement étalonnée sont ajoutés aux colonnes 2 à 11.

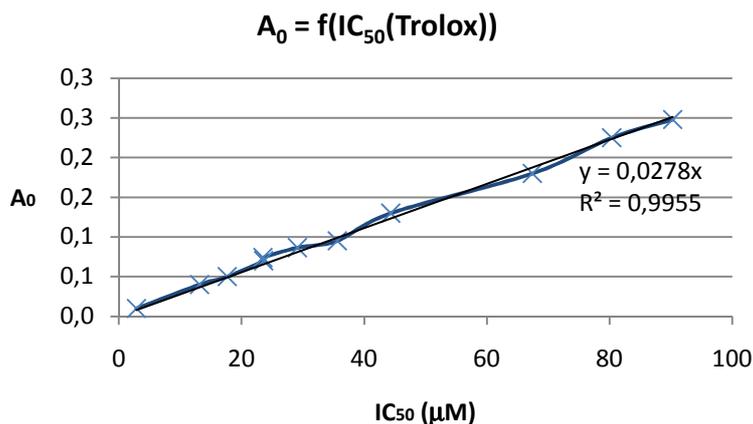
L'absorbance est alors mesurée à 740 nm, toutes les 30 secondes, pendant une heure à 30°C.

Les IC₅₀ des composés sont déterminées lorsque la courbe de mesures atteint un plateau.

I.1.2.c. Calculs de TEAC

Communément, les valeurs sont données en Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) correspondant à la normalisation de l'IC₅₀ du composé testé par la valeur d'IC₅₀ du trolox à une même absorbance de départ A_0 . Afin de calculer les TEAC en prenant en compte les légères variations de A_0 possibles entre les différents tests, il a été tracé la courbe de l'IC₅₀ du trolox en fonction de A_0 (Graphique 1). Chaque point de cette courbe correspond à la moyenne de 5 mesures effectuées.

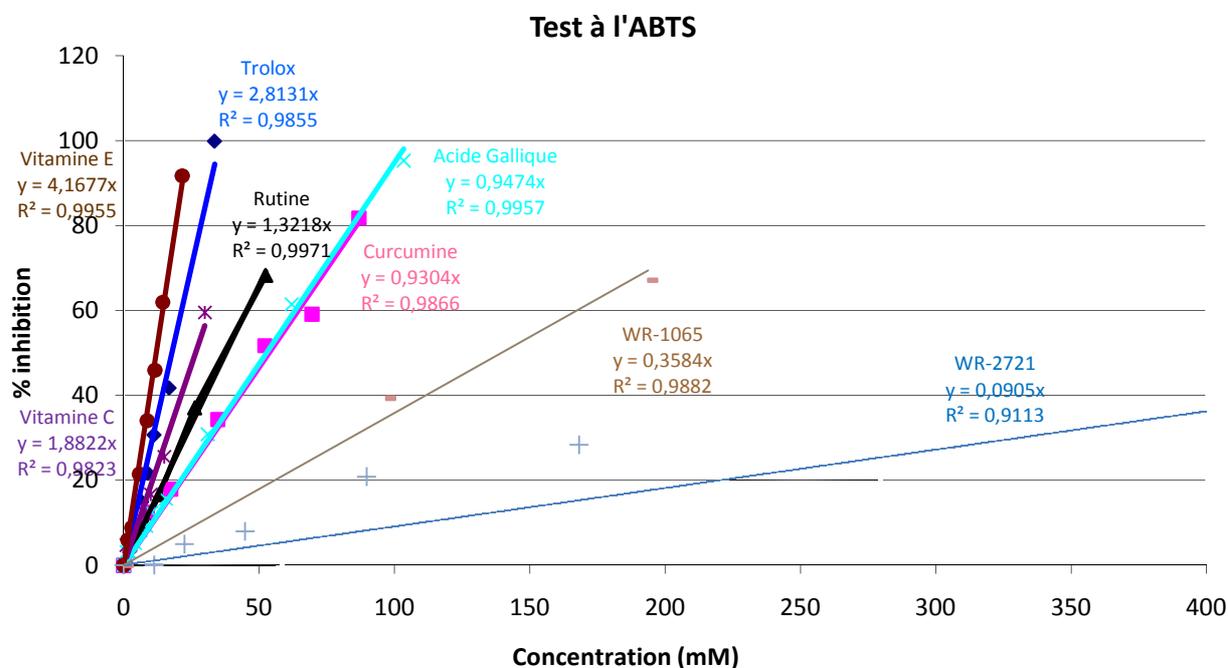
A partir de cette courbe, il est possible de déterminer l'IC₅₀ du trolox pour un A_0 donné. Le TEAC est alors calculé par division de la valeur d'IC₅₀ d'un produit à A_0 par l'IC₅₀ du trolox à partir du même A_0 .



Graphique 1 : Courbe de calculs des TEAC : $IC_{50} = f(A_0)$

I.1.2.d. Résultats : composés de référence

Un ensemble de molécules connues pour leurs propriétés antioxydantes a été testé comme références. Il s'agit de l'Acide Ascorbique (Vitamine C), de l' α -tocophérol (Vitamine E), de l'Acide Gallique, du Trolox, de la (+)-Rutine, de la Curcumine, du WR-2721 et du WR-1065. Les résultats (% inhibition du radical cation $ABTS^{+}$ en fonction de la concentration en antioxydant) sont représentés ci-après (Graphique 2). On notera que les coefficients de corrélation sont en général très bons ($>0,98$).



Graphique 2 : Courbe de résultats du test à l'ABTS pour les composés de référence:

$$\% \text{ inhibition} = f(\text{Concentration})$$

A partir des droites de régression, il est possible de déterminer la concentration inhibant 50% du radical ABTS⁺ (IC₅₀) (Tableau 10, Graphique 3).

Produit	IC ₅₀ (µM)	Déviatiion standard
Vitamine E	12,0	0,1
Vitamine C	26,6	0,4
Trolox	17,8	0,3
(+)-Rutine	37,8	0,2
Acide Gallique	52,8	0,2
Curcumine	53,7	1,0
WR-1065	139,5	9,7
WR-2721	552,50	54,9

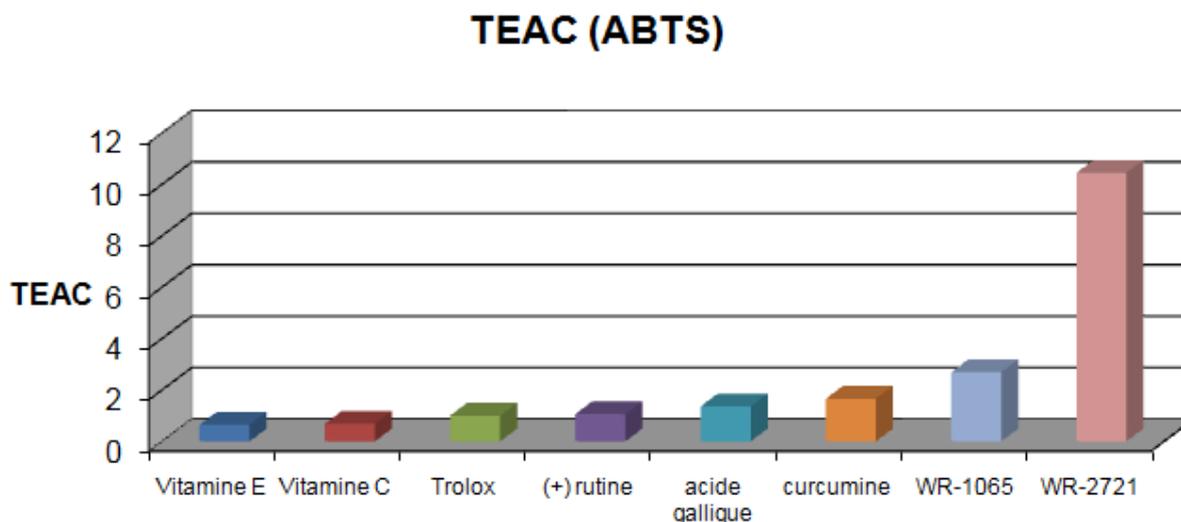
Tableau 10 : IC₅₀(ABTS) des composés de référence

On obtient ainsi les TEAC, prenant en compte les variations d'absorbance initiale A₀ (Tableau 11).

Produit	TEAC	Déviatiion
Vitamine E	0,64	0,01
Vitamine C	0,68	0,03
Trolox	1,00	-
(+)-Rutine	1,06	0,02
Acide Gallique	1,36	0,02
Curcumine	1,66	0,07
WR-1065	2,69	0,19
WR-2721	10,45	1,04

Tableau 11 : TEAC (ABTS) des composés de référence

On notera que le WR-2721 est peu actif dans ce test par rapport aux autres composés. Cependant, ce résultat semble logique. En effet, ce composé est la prodrogue du WR-1065. Il nécessite, comme pour tous les phosphorothioates, l'action d'une phosphatase alcaline permettant la libération du principe actif et donc des propriétés de ce composé. Dans ce test, cette phosphatase étant absente du milieu, il n'y a pas libération du principe actif et donc peu d'activité.



*Graphique 3 : Représentation graphique des TEAC (ABTS)
pour les composés de référence*

I.1.3. Test de peroxydation lipidique en milieu micellaire

Le phénomène de peroxydation lipidique est très destructeur lors d'une irradiation. Afin d'évaluer la capacité de nos composés à inhiber ce phénomène, nous avons mis en place un test de peroxydation lipidique en milieu micellaire. Ce type de test est généralement utilisé dans l'industrie pharmaceutique ou cosmétique pour tester la capacité de produits à inhiber les radicaux lipidiques dans des milieux biologiques. Une autre utilisation est, dans l'industrie agroalimentaire, de déterminer la capacité de conservation des aliments par de nouveaux conservateurs.

I.1.3.a. Principe du test

Cette technique est basée, comme pour l'ABTS et le DPPH, sur des techniques spectrophotométriques. Ici, le β -carotène, composé extrait de la carotte, est utilisé comme indicateur coloré. Il présente un pic d'absorbance caractéristique à 470 nm (orange). Des micelles de lipides contenant le β -carotène sont formées par émulsion, dans l'eau, d'acide linoléique et de Tween 40. On provoque alors l'oxydation de l'acide linoléique par ajout d'eau saturée en oxygène. L'acide linoléique ainsi libéré va réagir avec le β -carotène qu'il va détériorer en rétinol. Il en résulte une décoloration du β -carotène et par conséquent une baisse de l'absorbance à 470 nm du mélange. L'ajout de certains composés tels que la vitamine E permet une protection du β -carotène et donc un maintien de l'absorbance spécifique à 470 nm (figure 38) ^[120-122].

Certains composés, bien que très fortement antioxydants, sont inefficaces dans ce test. En effet, le β -carotène est, dans ce modèle, inclus dans la membrane lipidique de la micelle. Ainsi, les produits ne seront actifs que s'ils présentent des propriétés antioxydantes et une certaine lipophilie. La vitamine C par exemple, est un très bon antioxydant. Cependant, son activité est nulle ici car il est trop hydrophile.

Dans ce test, nous déterminons le pourcentage de protection du β -carotène par nos produits à deux concentrations, 116 μM et 24 μM , correspondant à 90% et 50% de protection du β -carotène par la vitamine E dans notre modèle. Ce modèle permettra de quantifier la capacité d'une molécule à protéger les membranes lipidiques telles que les membranes cellulaires.

I.1.3.b. Conditions expérimentales

Préparation des micelles

Une solution de β -carotène à 2 mg/ml dans le dichlorométhane est préparée. Dans un ballon, sont introduits 80 mg d'acide linoléique, 240 mg de Tween 40 puis 2 ml de la solution de β -carotène à 2 mg/ml. Le dichlorométhane est évaporé sous courant d'argon. Une solution d'eau ultrapure saturée en oxygène est préparée en faisant buller de l'oxygène dans l'eau pendant 1 heure. La solution de micelles est préparée par addition de 50 ml d'eau saturée en oxygène à la solution d'acide linoléique, de Tween 40 et de β -carotène. La solution est ensuite agitée au vortex pendant 30 secondes. Cette solution sera préparée juste avant son ajout aux puits de la microplaque. En effet, à partir du moment où l'eau saturée en oxygène est ajoutée à la seconde solution, la peroxydation lipidique commence.

Préparation des plaques

Les mesures ont été réalisées dans de l'éthanol absolu sur des microplaques 96 puits à l'aide d'un lecteur de plaques Multiskan FC incubator (Thermo Fisher).

Pour chaque composé, deux concentrations sont préparées (116 μM et 24 μM) dans des tubes eppendorf. 50 μL de chaque solution sont introduits dans les puits des colonnes 1 à 11, comme indiqué sur la Figure 39. Dans la colonne 12, 50 μL de solution de vitamine E à 116 μM (A-C) ou à 24 μM (E-G) sont introduits. Pour chaque concentration et chaque produit, trois mesures seront effectuées. Un témoin d'éthanol absolu (300 μL) est introduit dans la colonne 1. 50 μL d'une solution d'éthanol absolu sont introduits dans les puits des lignes D et H. Ensuite, 250 μL de la solution micellaire de β -carotène préparée juste avant introduction sont ajoutés aux colonnes 2 à 12.

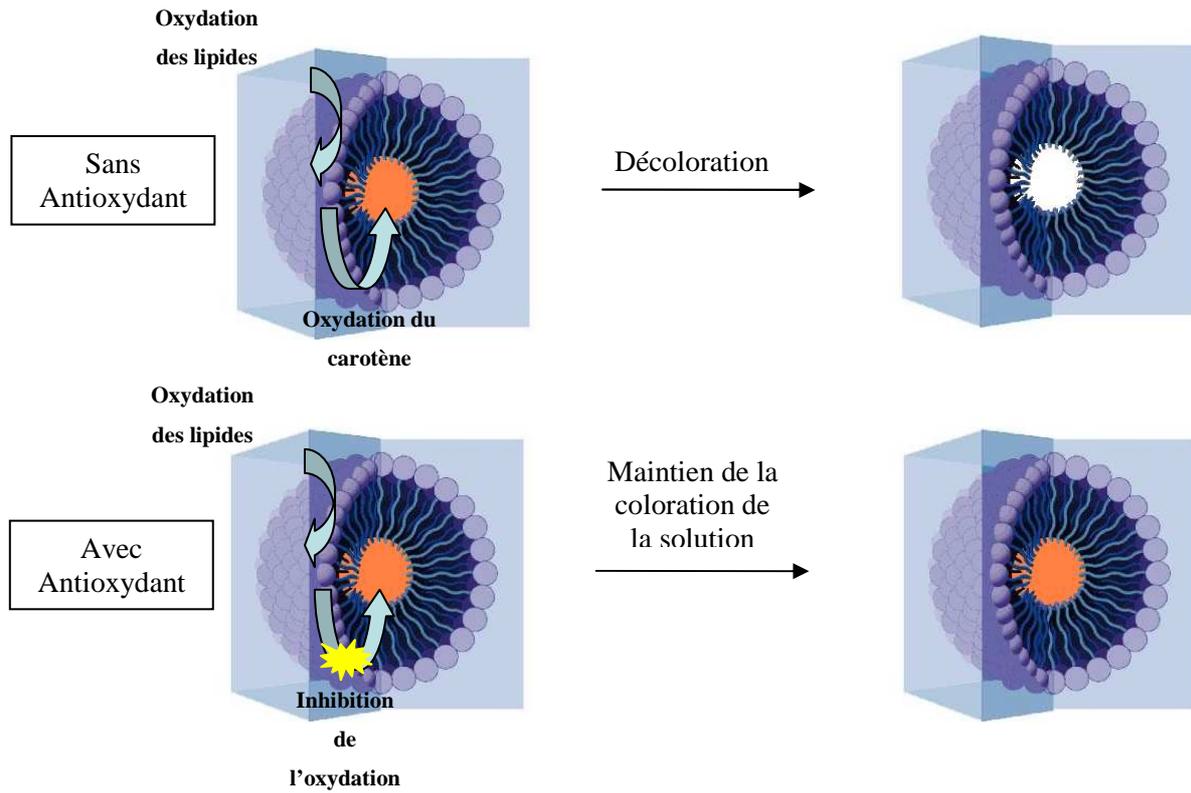


Figure 38 : Test de peroxydation lipidique

Protocole de test

L'absorbance est alors mesurée à 450 nm, toutes les minutes, pendant quatre heures.

Les pourcentages de protection du β -carotène par les composés sont déterminés lorsque la courbe de mesures atteint un plateau

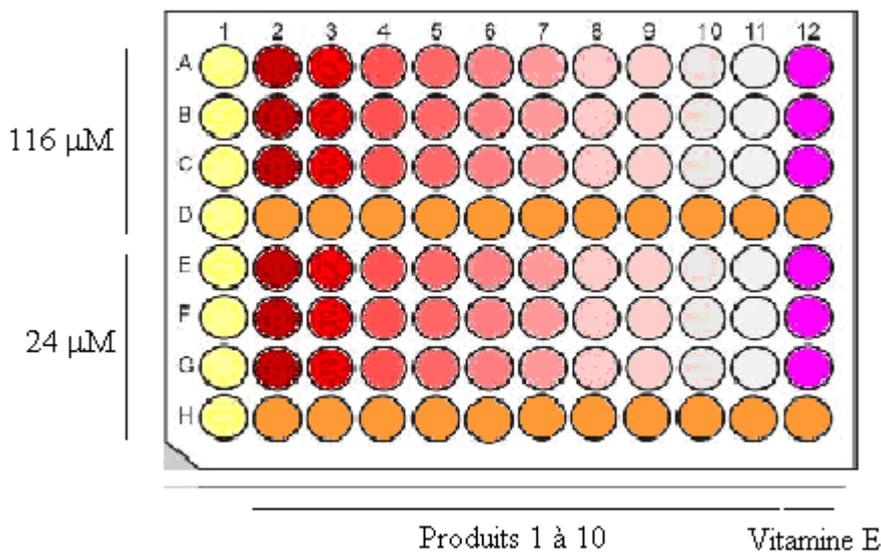


Figure 39 : Schéma de microplaque pour la préparation du test de peroxydation lipidique

I.1.3.c. Détermination de la lipophilie/hydrophilie des composés

Nous savons que, selon les composés, la répartition statistique des molécules dans un mélange de deux solvants est différente. La notion de non homogénéité des milieux prend toute son importance dans ce type de test où la molécule testée est introduite en milieu aqueux mais doit migrer dans un milieu lipophile pour permettre une protection. Ainsi, la capacité des molécules à passer la membrane lipidique a été calculée à partir des logP théoriques correspondant au coefficient de partition théorique entre le *n*-octanol et l'eau. Les calculs ont été réalisés avec ChemBioDraw Ultra 11. Plus le logP est élevé, plus la molécule aura tendance à migrer dans la micelle et plus elle pourra protéger le β -carotène de la peroxydation lipidique.

I.1.3.d. Résultats : composés de référence

Un ensemble de composés de référence a subi ce test (Tableau 12). Ces composés présentent tous des propriétés antioxydantes marquées ($0,5 < \text{TEAC} < 1,5$, au test à l'ABTS).

N°	LogP	% de protection à 116 μM	Déviati on standard	% de protection à 24 μM	Déviati on standard
Vitamine E	9,98	89,6	0,2	55,0	6,2
Vitamine C	-3,36	-14,6	1,4	-5,3	2,8
Trolox	3,19	60,9	7,1	52,0	4,8
(+) rutine	-1,45	9,8	5,5	5,0	2,8
Acide Gallique	0,47	-7,8	3,6	-0,2	1,2
Curcumine	2,56	90,8	6,8	-14,4	2,4
WR-1065	-0,61	-1,0	0,8	0,3	1,3
WR-2721	-0,29	2,1	0,3	1,8	0,9

Tableau 12 : Pourcentage de protection des références vis-à-vis de la peroxydation lipidique

Nous remarquons, avec ces exemples, l'influence de la lipophilie dans la capacité à protéger de la peroxydation lipidique dans notre modèle. En effet, alors que la vitamine E et la vitamine C présentent des TEAC proches (TEAC (Vitamine E) = 0,64 ; TEAC (Vitamine C) = 0,68), les résultats sont ici totalement différents. La vitamine C est ainsi inefficace (et même pro-oxydante) car elle est hydrophile et ne passe pas la membrane alors que la vitamine E, lipophile, à 116 μM , protège à 90% le β -carotène. Le même constat est observé en regardant le Trolox (TEAC = 1,00) et la (+)-rutine (TEAC = 1,06). La Vitamine E sera considérée comme la molécule de référence pour les études de peroxydation lipidique.

I.1.4. Test de Protection de la Thymidine

Le test de protection de la thymidine a été mis au point par F. Taran (CEA/SCBM, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage) en collaboration avec les équipes de C. Créminon et D. Boquet (CEA/SPI, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse) et de S. Pin et J.-P. Renault (CEA/SIS2M, Service Interdisciplinaire sur les Systèmes Moléculaires et les Matériaux). Il consiste en l'étude de la dégradation de la thymidine (nucléoside de l'ADN) soumise à un stress oxydant pouvant être une irradiation γ , une irradiation UV à 254 nm en présence de peroxyde d'hydrogène ou un stress oxydant de type Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). La thymidine intacte est ensuite quantifiée par dosage immuno-enzymatique faisant appel à un anticorps spécifique de la thymidine. Ce test de criblage se réalise sur des plaques 96 puits et a permis de tester simultanément un grand nombre de composés comportant des fonctions phénols ou thiols. Le principe détaillé et les protocoles de ce test, réalisé par l'équipe de Thierry Le Gall au CEA de Saclay, seront donnés en annexe.

I.1.5. Test de Protection de Plasmide

Ce second test consiste à étudier la dégradation d'un plasmide (ADN double brin superenroulé, non chromosomique, extrait d'une bactérie) soumis à un stress oxydant en présence d'un composé potentiellement antioxydant. Par action d'un stress oxydant, il va y avoir dégradation de l'ADN par cassure simple brin générant de l'ADN circulaire ou double brins donnant alors de l'ADN linéaire. Les différentes formes de l'ADN sont alors séparées par électrophorèse sur gel d'agarose puis quantifiées (Figure 40)^[21].

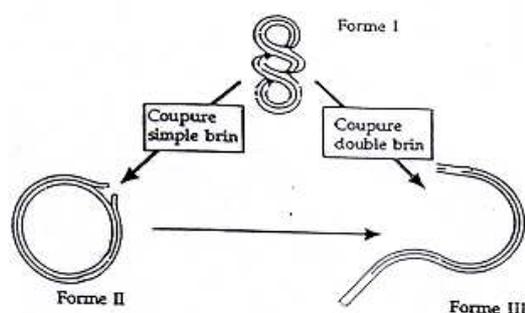


Figure 40 : Les 3 formes de l'ADN :
Forme I, superenroulée ; Forme II,
circulaire ; Forme III, linéaire

II. Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur

Une fois la mesure des propriétés antioxydantes réalisée, il est nécessaire de s'intéresser aux propriétés des composés dans des systèmes plus complexes reflétant mieux la réalité, car dans un organisme, un radioprotecteur doit être apte à protéger de plusieurs types de radicaux (OH[·], LOO[·] etc.) et de différents types d'attaque (directes et indirectes), plusieurs types de cibles (ADN, lipides, protéines, sucres...). Ainsi, il est réalisé un test sur un modèle cellulaire (TK6) puis un test *in vivo* chez la souris.

II.1. Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur sur Modèle Cellulaire

Les tests *in vitro* sur modèle cellulaires ont été réalisés au Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss, à Strasbourg, par Pierre Bischoff et Antoine Le Roux.

Ces études ont été menées sur des cellules TK6 correspondant à une lignée de cellules lymphoblastoïdes humaines très radiosensibles ayant un caryotype stable (47 chromosomes) et dotées d'une protéine p53 fonctionnelle. Cette protéine agit en tant que facteur de transcription et est indispensable au maintien de l'intégrité de la cellule et de ses composants. Lorsque la cellule est soumise à un stress, la protéine p53 est activée et va provoquer la transcription de nombreux gènes. Cette activation conduit soit à l'arrêt du cycle cellulaire, de manière à permettre par exemple la réparation de l'ADN endommagé, soit directement à l'apoptose. Le protocole de ce test sera donné en annexe.

II.1.1. Evaluation toxicologique

La première évaluation cellulaire correspond à une évaluation *in vitro* de la toxicité des produits. Pour cela, les différentes molécules sont mises en contact avec les cellules TK6, sans irradiation. Un suivi de la prolifération cellulaire est alors réalisé à l'aide d'un test à l'Alamarblue[®] puis comparé au témoin sans molécule. Le test à l'Alamarblue[®] est un

indicateur de l'activité métabolique, basé sur le pouvoir réducteur des cellules vivantes. Les cellules vont en effet réduire la résazurine, un colorant bleu non fluorescent, en résosfurine, un colorant rouge fluorescent. L'intensité de la fluorescence est alors directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes^[123].

II.1.2. Evaluation du pouvoir radioprotecteur

Ensuite, il est réalisé un test permettant de définir les propriétés radioprotectrices des composés. Pour cela, après avoir mis en contact les différentes molécules avec les cellules, on réalise une irradiation à 8 Gy. On suit alors la prolifération cellulaire par le test à l'Alamarblue® et on compare avec le témoin correspondant à une culture cellulaire irradiée sans ajout de la molécule test.

II.2. *Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur in vivo Chez la Souris*

Afin d'évaluer les propriétés radioprotectrices de certains de nos produits, nous avons réalisé un ensemble de tests *in vivo* chez la souris. Deux souches de souris ont été utilisées, à savoir des souris CD₁ et B₆D₂F₁. Cette partie se divise en deux études :

- La détermination de la toxicité aiguë des composés, DL_{50tox/48h}
- La détermination des propriétés radioprotectrices des dérivés

Pour notre étude, les molécules sont dissoutes dans le sérum physiologique ou le miglyol (si la molécule n'est pas soluble en milieu aqueux). Le miglyol est un mélange d'ester d'acides gras qui a la particularité d'être inerte et non toxique. On notera que l'utilisation du DMSO est à proscrire dans cette étude car il possède des propriétés radioprotectrices, qui biaiseraient les résultats de nos tests.

II.2.1. Evaluation toxicologique

Dans un premier temps, la solubilité de nos produits dans le miglyol est déterminée. On notera X la solubilité maximale des produits.

Avant l'étude du pouvoir radioprotecteur des composés, la toxicité aiguë de nos composés est déterminée.

Des souris d'un poids moyen de 25-30 g ont été utilisées. Une fois dissous, les produits sont injectés à 5 doses (X, X/2, X/4, X/8, X/16, exprimées en mg de produit par kg) par voie intrapéritonéale.

La toxicité du produit exprimée par la $DL_{50tox/48h}$ (Dose Létale pour 50% des animaux traités 48h après l'injection) est alors déterminée selon la méthode des « probits »^[124-126].

II.2.2. Evaluation du pouvoir radioprotecteur

L'évaluation du pouvoir radioprotecteur des composés consiste en l'injection par voie intrapéritonéale des produits, 15 ou 90 minutes avant irradiation. La dose injectée correspond à la $DL_{50tox48h}/2$ ou à la moitié de la solubilité maximale X/2 si la $DL_{50tox48h}$ ne peut être déterminée (solubilité insuffisante). Les doses d'irradiation correspondent à la dose qui conduit à la mort de tous les animaux non traités au cours des trente jours suivant l'exposition ($DL_{100irr/30jours}$) et à une dose de 2 Gy supérieure. La dose est délivrée par une source de Cobalt 60, émettrice de rayonnements γ .

La $DL_{100irr/30jours}$ est déterminée en soumettant plusieurs lots d'animaux à des doses d'irradiation croissantes puis en traçant la courbe de létalité correspondante. Dans nos conditions, la $DL_{100irr/30jours}$ correspond à 8,2 Gy pour les souris Swiss CD1 (et 8,8 Gy pour les souris B6D2F1). Les deux doses d'irradiation seront donc 8,2 et 10,2 Gy pour les souris Swiss CD1 (8,8 et 10,8 Gy pour les souris B6D2F1).

Pendant les irradiations, les animaux sont placés dans une boîte de Plexiglass comportant 30 cellules, placée dans un champ homogène de $28,5 \times 28,5 \text{ cm}^2$.

Les courbes de survie des animaux sont ensuite tracées sur 30 jours. La comparaison des courbes de survie obtenues pour les souris traitées par un composé et les souris témoins non traitées permet de se rendre compte de l'activité radioprotectrice du composé (pourcentage de survie à 30 jours, temps moyen de survie).

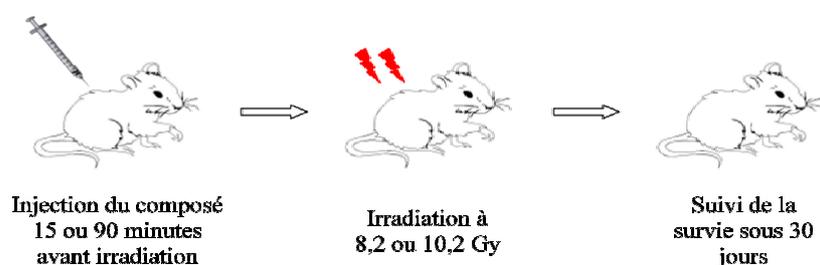


Figure 41 : Protocole d'irradiation pour le test de radioprotection in vivo

Partie III :
Modification et
Etude de Molécules
Antioxydantes

Le premier axe de recherche de nouvelles molécules radioprotectrices correspond à l'étude et à la modification de structures organiques présentant des propriétés antioxydantes. Le but est ainsi d'inhiber les radicaux produits lors d'une irradiation avant qu'ils ne dégradent les biomolécules essentielles de l'organisme.

Chapitre 1 :

Les Acides Pulviniques

I. Caractéristiques et Propriétés

Les acides pulviniques sont des 5-arylidène-buténolides dont le dérivé le plus simple est l'acide pulvinique (Figure 42). Ces composés naturels sont des pigments isolés à partir de différents champignons tels que ceux de la famille du bolet^[127]. Ils peuvent aussi être présents dans certains lichens^[128]. Ces composés expliquent ainsi la couleur jaune/orangée des bolets et de certains lichens. Les acides variégatique et xérocomique présentent des groupements catéchol pouvant s'oxyder et induire un bleuissement du bolet lorsqu'il est coupé^[129, 130].

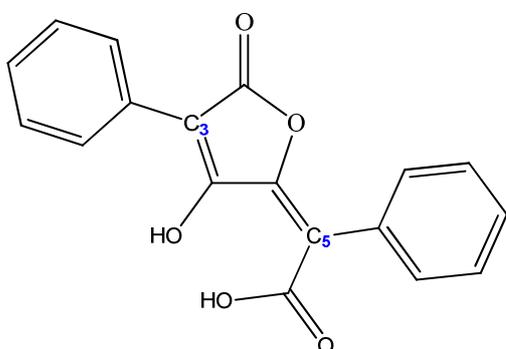


Figure 42 : Structure de l'Acide Pulvinique



Pulveroboletus ravenelii

Isolés pour la première fois en 1831^[131], leur structure ne fut déterminée que cinquante ans plus tard par Spiegel^[132]. Classiquement, cette famille de molécules est composée d'un cycle insaturé de type « lactone » à 5 chaînons appelé acide tétronique (Figure 43) sur lequel sont greffés en position 3 un groupement aromatique et en position 5, une double liaison exocyclique liée à une fonction carboxylée et à un second groupement aromatique. Cette double liaison se trouve sous une configuration E pour tous les acides pulviniques naturels.

De plus, lorsque la fonction carboxylée est un acide carboxylique, on parle d'acide pulvinique ; si cette fonction est un ester méthylique, on parle de pulvinate de méthyle (Figure 44). Une seconde variation possible est la substitution par différents groupements (hydroxy, méthoxy, chlore) de l'aromatique. Il apparaît alors un troisième degré de classification qui correspond à la « symétrie » de la molécule. Si les 2 groupements aromatiques sont identiques, on parle d'acide pulvinique symétrique et si ces groupements sont différents, on parle d'acide pulvinique dissymétrique.

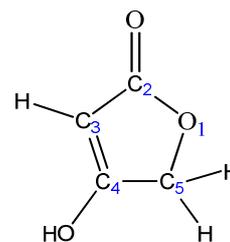
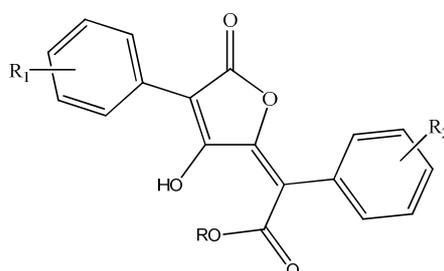


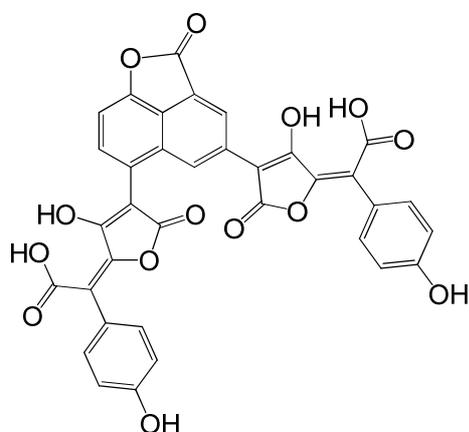
Figure 43 : Structure de l'Acide tétronique



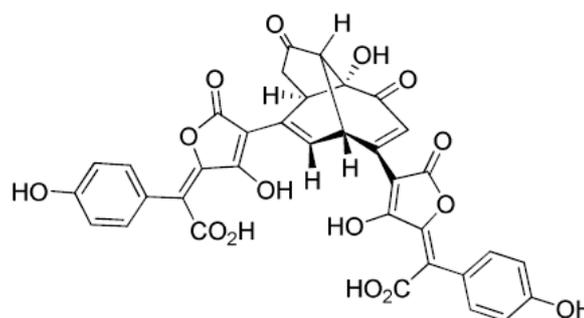
R = H : Acide Pulvinique
R = CH₃ : Pulvinate de Méthyle

Figure 44 : Structure générale des acides pulviniques et des pulvinate de méthyle

Des composés structurellement apparentés aux acides pulviniques peuvent aussi être isolés à partir de certains champignons. Ainsi, en 1984, Steglich isola la Norbadione A à partir du bolet bai (*Xerocomus badius*), puis récemment, la chalcitrine fut isolée à partir du scléroderme vulgaire (Figure 45). Ces deux dérivés correspondent à la dimérisation de l'acide xérocomique selon différentes voies de biosynthèse^[127, 133, 134].



Norbadione A



Chalcitrine

Figure 45 : Structure de la Norbadione A et de la Chalcitrine

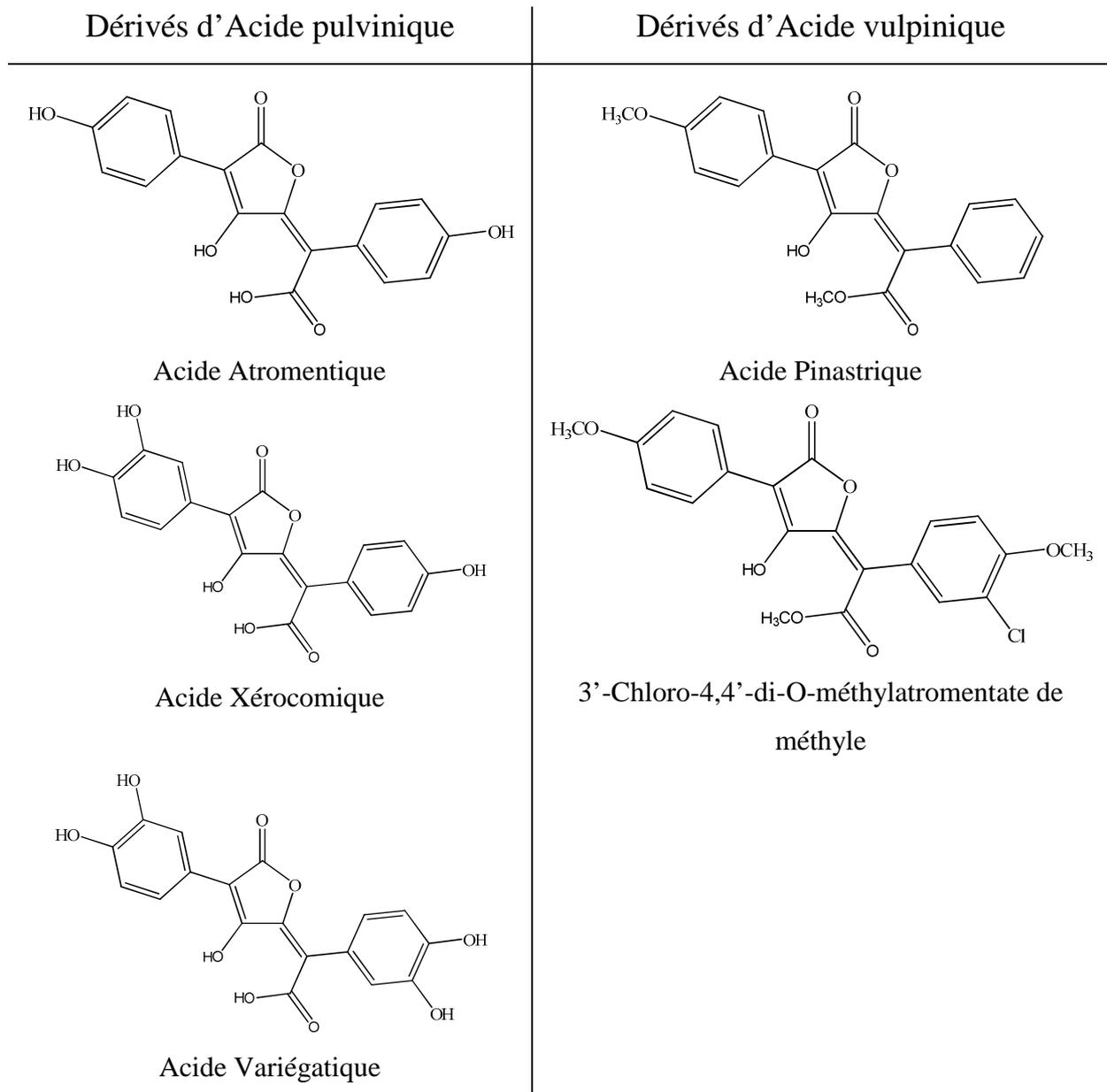
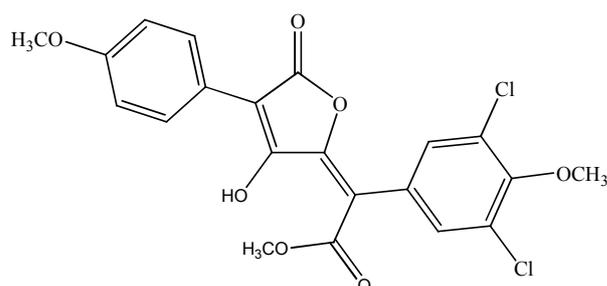
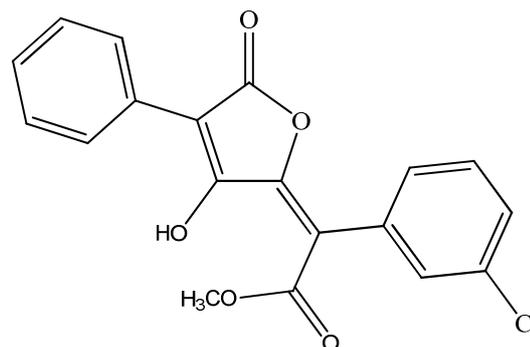


Figure 46 : Structure des principaux dérivés d'acides pulviniques et vulpiniques

I.1. Propriétés Biologiques

Les acides pulviniques sont connus pour leurs propriétés biologiques depuis plus d'un siècle. La toxicité de certains lichens, et plus particulièrement de l'acide vulpinique provoquant l'hyperventilation et des convulsions chez certains animaux de laboratoire, était utilisée comme poison contre les loups par les esquimaux. La toxicité de cet acide fut démontrée en 1952 par Södeberg^[135].

Les propriétés anti-inflammatoires des dérivés d'acide pulvinique symétriques et dissymétriques furent explorées par O'Mant *et al.*^[136] en 1975. On notera que le dérivé chloré ci-contre présente une activité anti-inflammatoire notable sans effet secondaire majeur^[137].



Les propriétés antimicrobiennes et antivirales des dérivés d'acides pulviniques ont été décrites par de nombreuses équipes telles que Brady *et al.* et Ross *et al.*^[138, 139]. Ainsi, l'acide vulpinique, l'acide pinastrique et le dérivé ci-contre présentent une activité antimicrobienne intéressante^[140, 141].

L'activité antivirale de l'acide pinastrique a aussi été démontrée pour le virus de l'herpès de type 1 ou le virus de la polio de type 1 sans cytotoxicité apparente. L'acide vulpinique présente lui une activité intéressante pour lutter contre les virus de l'influenza de type A ou B^[141, 142]. La dernière propriété décrite est la plus intéressante pour notre étude. En effet, les acides pulviniques présentent des propriétés antioxydantes marquées pouvant permettre d'inhiber les radicaux libres formés lors d'une irradiation^[143-145]. Cependant, à faible concentration, ces acides pulviniques pourraient être pro-oxydants.

I.2. Voies de Synthèse

I.2.1. Biosynthèse

La méthode de synthèse naturelle des acides pulviniques est issue de la voie du shikimate permettant la biosynthèse de nombreux acides aminés aromatiques et alcaloïdes (Figure 47). Cette voie est similaire pour les lichens et les champignons^[146-150]. Dans cette synthèse, le chorismate issu de l'acide shikimique subit un réarrangement sigmatropique [3,3] de type Claisen pour former le préphénate. Ce dernier va subir une décarboxylation pour donner l'acide 4-hydrophénylpyruvique **1** qui se condense alors deux fois pour conduire à l'atromentique (ou terphénylquinone) **2**. Une réaction enzymatique permet alors l'ouverture par oxydation puis la cyclisation sous forme de lactone en acide atromentique. L'intermédiaire **3** de cette réaction n'a jamais été isolé.

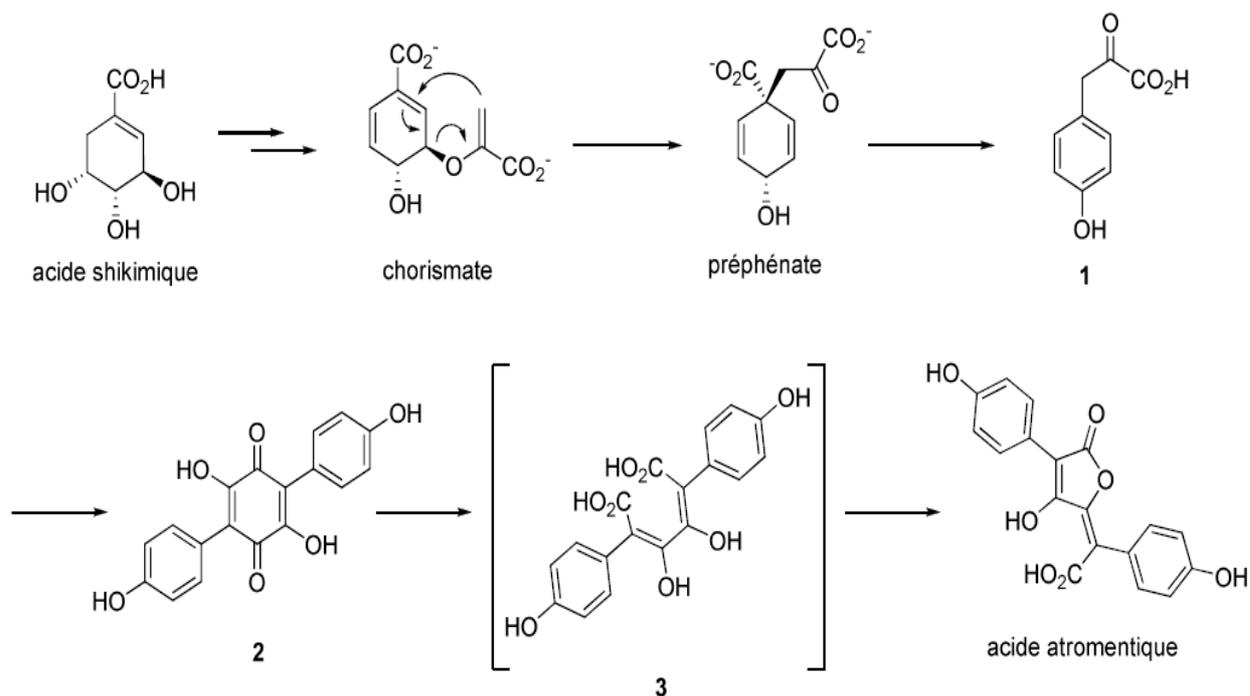


Figure 47 : Biosynthèse des acides pulviniques

Cette biosynthèse a inspiré différentes voies de synthèse des acides pulviniques telles que la méthode par oxydation de quinones.

1.2.2. Synthèse des acides pulviniques symétriques

La première voie de synthèse fut décrite par Volhard en 1894. Elle permet l'obtention des bis-lactones symétriques ou dissymétriques qui sont les intermédiaires clés pour l'obtention des dérivés souhaités^[151].

Cette méthode débute par la condensation de deux molécules de phénylacétonitrile sur l'oxalate d'éthyle, en présence d'éthanolate de sodium. La dicétone alors obtenue présente un équilibre avec sa forme cyclique. On obtient alors la bis-lactone désirée par traitement acide puis lactonisation en présence d'anhydride acétique (Figure 48).

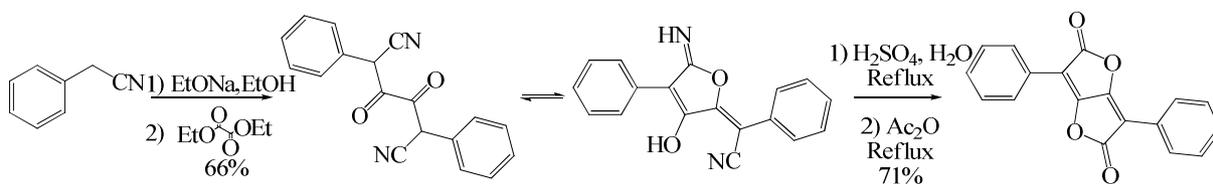


Figure 48 : Synthèse des bislactones

La dernière étape consiste en l'hydrolyse ou la méthanolyse de la bis-lactone en acide pulvinique ou en acide vulpinique (Figure 49) :

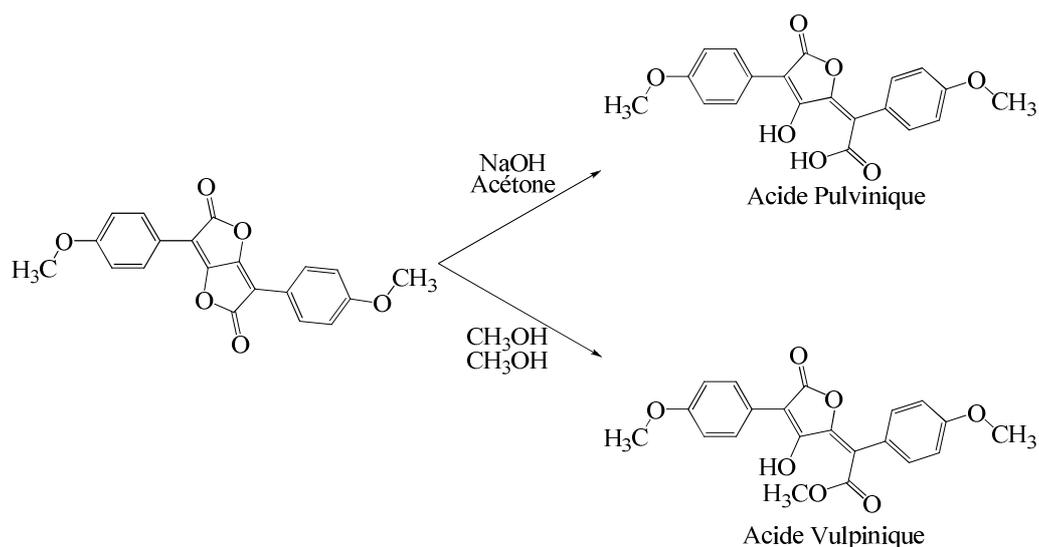


Figure 49 : Synthèse des acides pulviniques selon Volhard

Pour les dérivés symétriques, une autre méthode développée par Kögl en 1928, basée sur l'oxydation de quinone, permet facilement l'obtention de la bis-lactone désirée (Figure 50). L'oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide chlorhydrique permet la transformation de l'atromentine en bislactone. D'autres systèmes d'oxydation (tétraacétate de plomb ou un mélange anhydride acétique/DMSO) sont aussi possibles^[152-159].

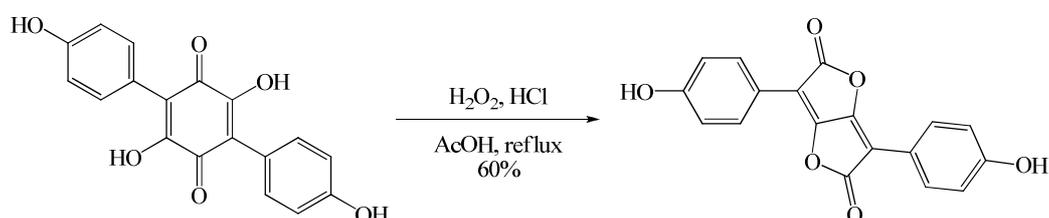


Figure 50 : Synthèse des bislactones par oxydation de quinone

I.2.3. Synthèse des acides pulviniques dissymétriques

La synthèse de Volhard n'a été réellement employée qu'après 1933 où les travaux d'Asano ont permis l'obtention d'une bislactone dissymétrique^[160]. Actuellement, elle est devenue une des méthodes les plus largement employées pour la préparation d'acides pulviniques naturels ou non naturels^[129, 130, 136, 161]. En 1961, Åkermark optimisa alors l'étape de condensation des arylacétonitriles en ajoutant de l'hydrure de sodium, évitant ainsi les réactions de rétro-aldolisations observées avec l'éthanolate de sodium^[162]. Cependant, dans tous les cas, les 2 dérivés pulviniques suivant sont obtenus (Figure 51). Une étude préliminaire a démontré que les propriétés antioxydantes étaient nettement plus marquées pour l'isomère 1 que pour l'isomère 2. Ainsi, nous chercherons à obtenir préférentiellement l'isomère 1.

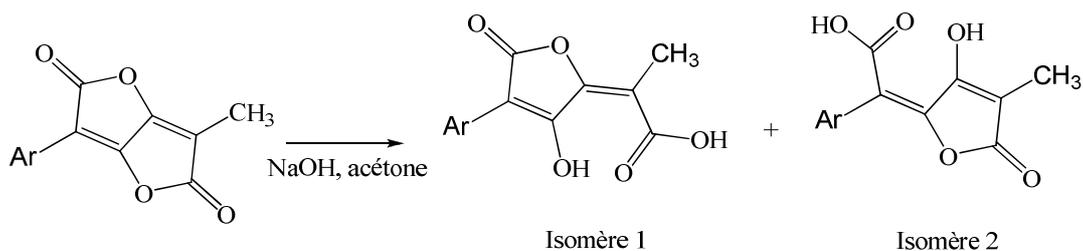


Figure 51 : Synthèse des bislactones asymétriques par la méthode de Volhard

L'équipe de Charles Mioskowski et Alain Wagner de l'ULP de Strasbourg a montré que l'ouverture de la bislactone dissymétrique par un alcool ou une amine peut être régiosélective lorsqu'elle est réalisée en présence de TBAF^[163, 164]. La régiosélectivité varie alors de 85 à 99% en faveur des composés 1 (Figure 52) :

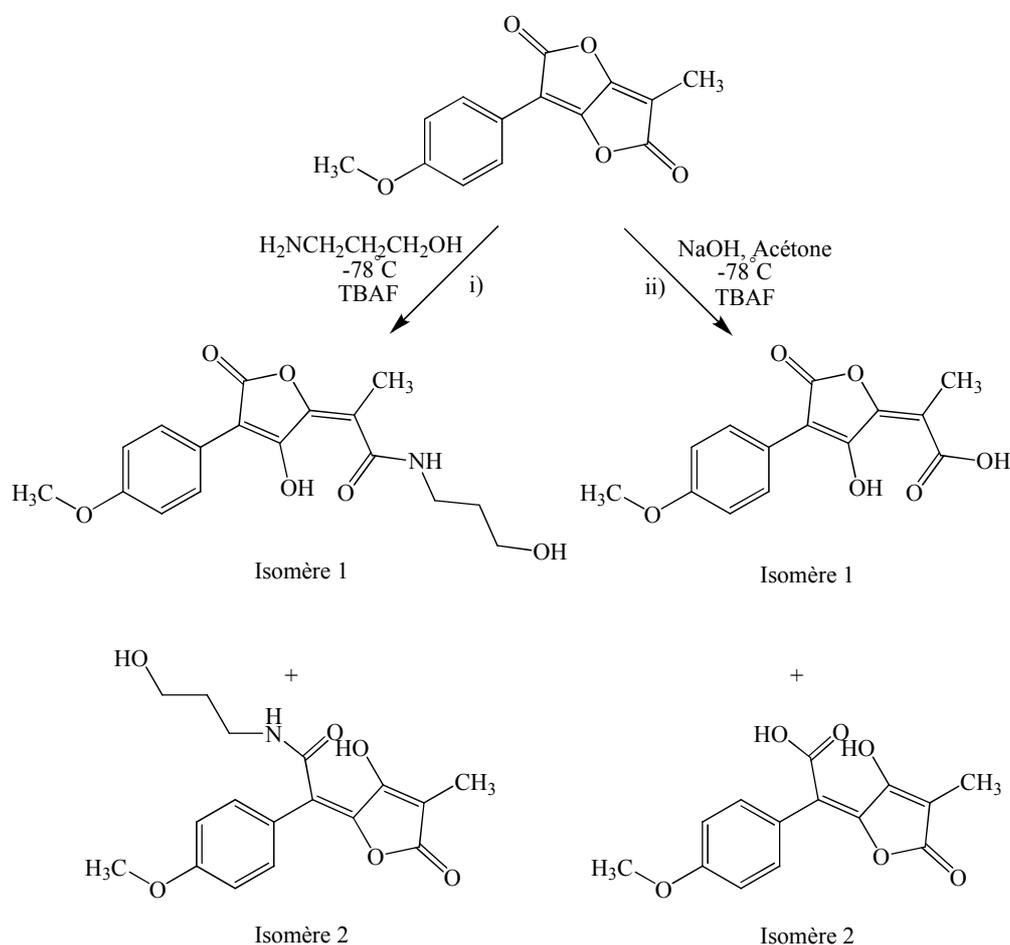


Figure 52 : Synthèse régiosélective des acides pulviniques asymétriques

De nombreuses autres méthodes existent pour la synthèse des dérivés d'acides pulviniques^[165-168] telles que l'oxydation de quinones^[169] et l'alkylidénation, la réaction de Réformatsky^[170, 171], l'oléfination de Horner-Wadsworth-Emmons^[172], les cyclisations de Dieckmann^[173] ou de Langer^[174, 175] ou d'autres méthodes utilisant un acide tétronique, des tétronates de benzyle, des acides 3-aryltétronique ou des dioxolanones^[176-178].

I.3. Conclusion

Dans notre travail, nous utiliserons quelques dérivés d'acides pulviniques symétriques ou dissymétriques préparés selon les méthodes décrites ci-dessus. Les bis-lactones ont été fournies par Brice Nadal du CEA de Saclay (bis-lactone symétrique) et par Antoine Le Roux de l'ULP de Strasbourg (bis-lactone dissymétrique). Les équipes du docteur Thierry Le Gall du CEA de Saclay et du docteur Alain Wagner de l'ULP de Strasbourg ont aussi réalisé, respectivement, la synthèse d'acides pulviniques symétriques et dissymétriques. Les différents dérivés obtenus par ces équipes ont ensuite été intégrés dans notre étude sur les propriétés antioxydantes et radioprotectrices. La Norbadione A, issue d'extraction à partir du bolet, nous a aussi été fournie par le CEA de Saclay.

Les dérivés organométalliques d'acides pulviniques, que nous avons synthétisé, seront obtenus selon la méthode décrite Partie II Chapitre 2.

II. Synthèse

Dans ce chapitre sont répertoriées,

- les molécules dont j'ai réalisé la synthèse qui seront notées **PX**
- les molécules fournies par l'ULP de Strasbourg qui seront notées **BXXX**
- les molécules fournies par le CEA de Saclay qui seront notées **CXXX**

Certaines molécules synthétisées par nos collaborateurs ont été recristallisées et intégrée à notre étude par RX (**B008**, **B056**, **B085**).

II.1. Les Acides Pulviniques Symétriques

II.1.1. Synthèse

Nous avons synthétisé 3 acides pulviniques symétriques par ouverture de la bis-lactone correspondante (Figure 53) :

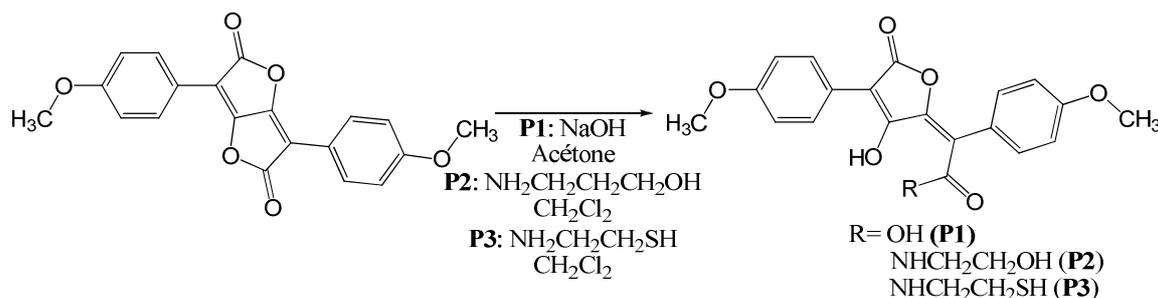


Figure 53 : Synthèse de P1, P2 et de P3

II.1.2. Données RX

La cristallisation a permis l'obtention de la structure RX des composés **P1** et **P2**. Au regard de la longueur des liaisons Carbone/Carbone et Carbone/Oxygène, nous observons bien un système conjugué sur toute la structure (Figure 54 et 55). En effet, les deux cycles benzéniques présentent bien les caractéristiques d'un cycle benzénique conjugué de longueur moyenne de liaison C/C de 1,38 Å et d'angle moyen de 120°. De plus, on observe un système conjugué de type $\sigma/\pi/\sigma/\pi/\sigma$ présentant donc des liaisons doubles et des liaisons simples partielles, intermédiaires entre des liaisons π_{pure} ($\approx 1,34$ Å) et σ_{pure} ($\approx 1,54$ Å). Les liaisons partielles C₅-C₈ (σ : 1,498 Å) / C₈-C₁₀ (π : 1,346 Å) / C₁₀-C₁₂ (σ : 1,482 Å) / C₁₂-C₁₃ (π : 1,370 Å) / C₁₃-C₁₄ (σ : 1,471 Å) de **P1** permettent de relier les deux groupements benzéniques par mésomérie et ainsi d'expliquer les propriétés de capture des radicaux par ce type de structure. De plus, la longueur de C₁₂-O₆ ($\pi_{\text{pure}} \approx 1,23$ Å < 1,308 Å < $\sigma_{\text{pure}} \approx 1,43$ Å) de **P1** est caractéristique d'un équilibre de liaison de type énoil.

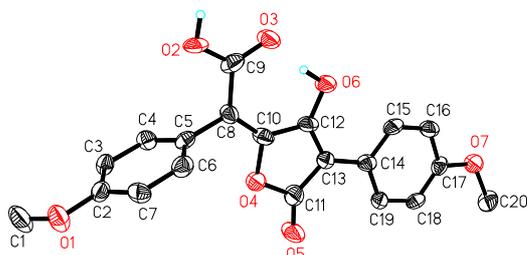


Figure 54 : Structure de P1

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 3)

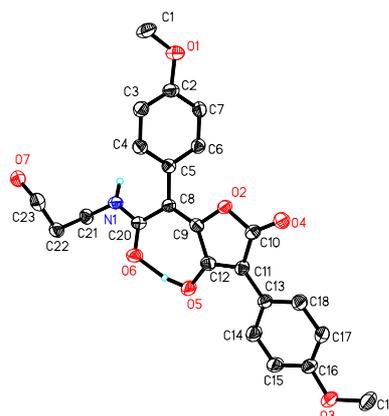
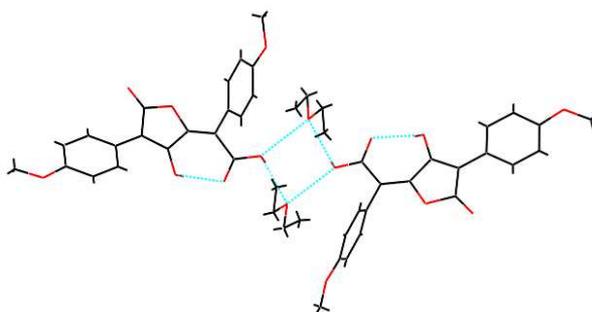


Figure 55 : Structure de P2

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 3)

La cristallisation de **P1** dans l'éther montre la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire et d'une liaison hydrogène intermoléculaire (avec l'éther) permettant la stabilisation de la structure. La présence de la liaison hydrogène intramoléculaire doit être prise en compte pour permettre le greffage des dérivés organométalliques. En effet, on observe, quelle que soit la méthode de synthèse du composé organométallique réalisée (voie A1 ou B1) à température ambiante, que la molécule est obtenue avec un très faible rendement (10 à 20%). Ce résultat peut s'expliquer par la présence de la liaison hydrogène intramoléculaire qui empêche le greffage du précurseur organométallique à température ambiante (Figure 56).

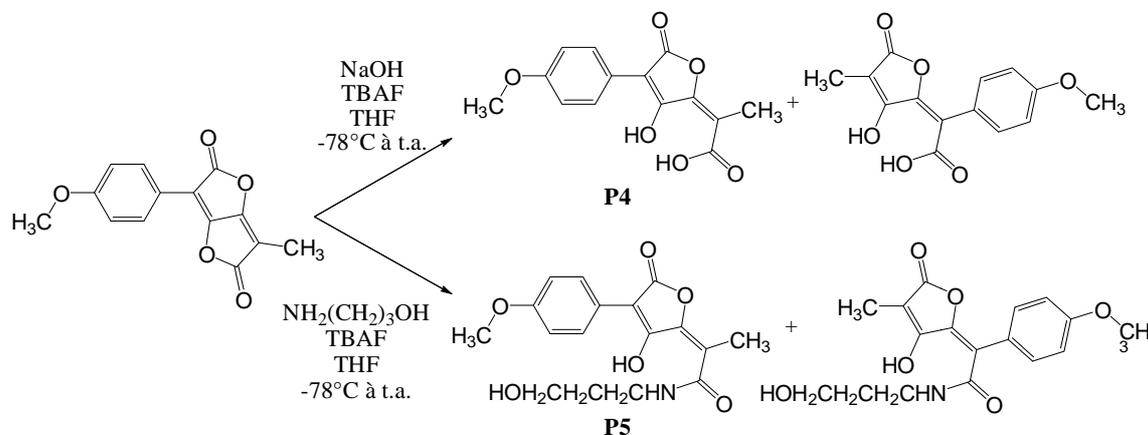
Figure 56 : Structure de **P1** dans l'éther

Cependant, lorsque la réaction est réalisée à reflux dans du THF, les rendements sont nettement plus importants (80-90%). En effet, en chauffant, on provoque une instabilité de cette liaison hydrogène intramoléculaire permettant ainsi la réaction entre le précurseur organométallique et l'acide pulvinique.

II.2. Les Acides Pulviniques Dissymétriques

II.2.1. Synthèse

Nous avons réalisé la synthèse de deux acides pulviniques dissymétriques par ouverture sélective de la bis-lactone dissymétrique correspondante (Figure 57) :

Figure 57 : Synthèse de **P4** et de **P5**

II.2.2. Données RX

Les deux régioisomères ont été séparés par chromatographie sur colonne. Le composé majoritairement formé correspond bien au produit attendu de conformation 1. En effet, par cristallisation dans le dichlorométhane de la fraction majoritaire obtenue pour **P5**, nous avons obtenu la structure ci-dessous (Figure 58). De plus, par cristallisation dans un mélange eau/éthanol du produit **B008** envoyé par l'ULP de Strasbourg, la structure suivante, correspondant bien à l'isomère attendu, a été obtenue (Figure 59).

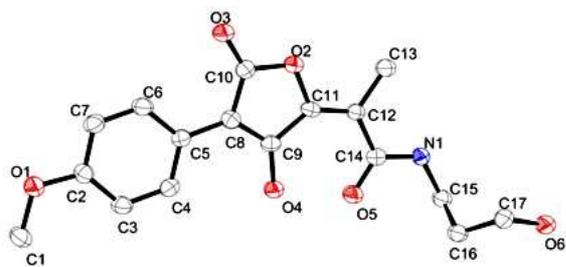


Figure 58 : Structure de P5

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 3)

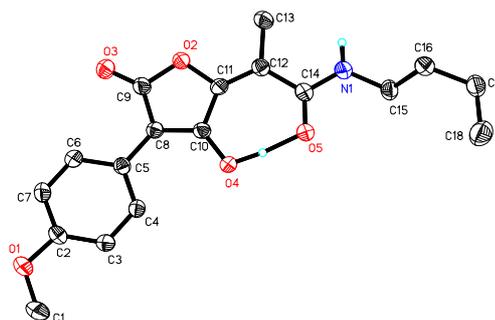


Figure 59 : Structure de B008

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 3)

Comme précédemment, le cycle benzénique est observé (longueur moyenne de liaison C/C de 1,38 Å et d'angle moyen de 120°) et le système conjugué $\sigma/\pi/\sigma/\pi$ est présent : les liaisons C₅-C₈ (σ : 1,476 Å) / C₈-C₉ (π : 1,365 Å) / C₉-C₁₁ (σ : 1,481 Å) / C₁₁-C₁₂ (π : 1,370 Å) / C₁₂-C₁₄ (σ : 1,471 Å) de **P5** et **B008** sont en effet des liaisons intermédiaires entre simple et double liaison. Cependant, la liaison C₁₂-C₁₃ est une liaison simple de longueur de 1,507 Å légèrement plus courte qu'une liaison simple pure (1,54 Å).

Ainsi, par comparaison des structures de **P2** et de **P5** (ou **B008**), nous avons remarqué que chacune des deux molécules présente bien un système conjugué. Cependant, **P5** (ou **B008**) ne présente qu'un cycle benzénique alors que **P2** en présente deux. Nous supposons que **P2** permettra une meilleure stabilisation des radicaux que **P5** (ou **B008**). De plus, **P5** et **B008** ne diffèrent que par une fonction alcool primaire sur la chaîne de la fonction amide. Ainsi, nous supposons que **B008**, présentant une seule fonction alcool permettant la capture des radicaux, sera moins actif que le composé **P5**.

II.3. Les Flavonoïdes

Deux flavonoïdes (**B056** et **B085**) fournis par l'ULP de Strasbourg ont été cristallisés dans un mélange eau/éthanol (Figure 60 et 61). Ces deux molécules présentent une fonction alcool, permettant la capture des radicaux, associée à un groupement aromatique permettant une stabilisation des radicaux. Nous supposons que la présence d'un fluor sur la partie aromatique de cette structure peut permettre une meilleure stabilisation des radicaux.

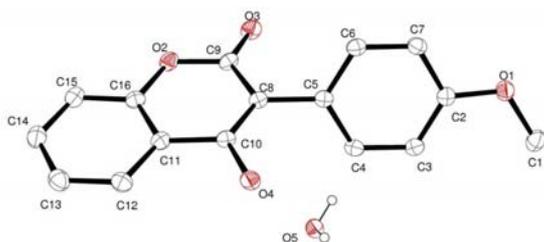


Figure 60 : Structure de **B056**

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 3)

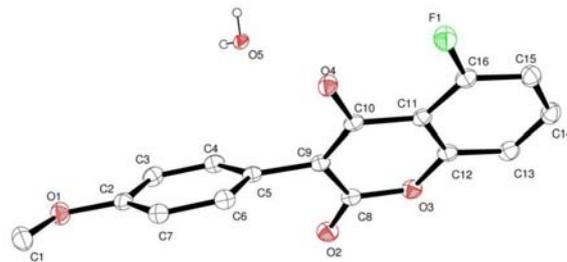


Figure 61 : Structure de **B085**

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 3)

II.4. Synthèse des Dérivés Organométalliques d'Acides Pulviniques

L'acide pulvinique **P1** a été modifié en introduisant un groupement organosilicié ou organogermanié selon les voies A1 et B1 présentées dans le chapitre 2 de la partie 2 (Figure 62).

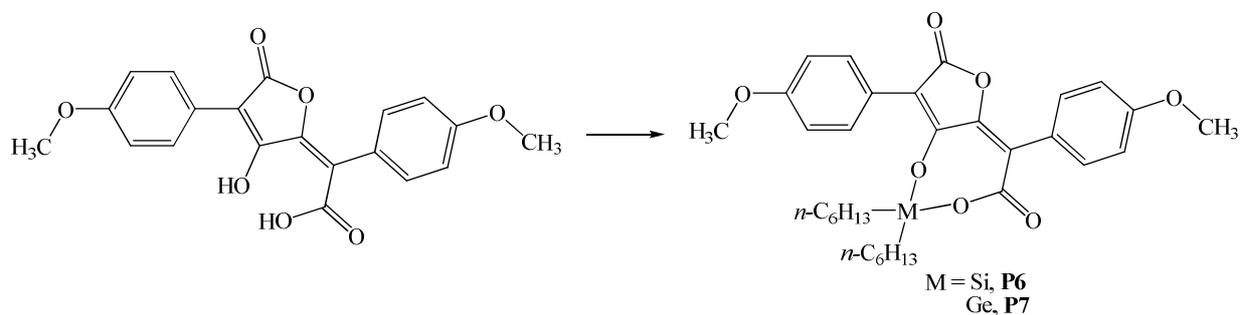


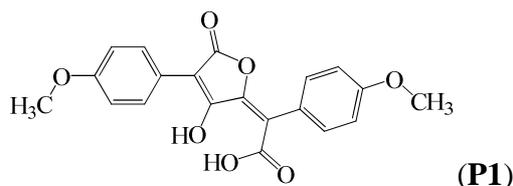
Figure 62 : Synthèse de **P6** et de **P7**

III. Protocoles de Synthèse

III.1. Les Dérivés Organiques

III.1.1. Les acides pulviniques symétriques

III.1.1.a. Synthèse de l'acide 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl)acétique (P1)



A une solution de bislactone (2,00 g, 5,71 mmol) dans 50 ml d'acétone est ajoutée de la soude (0,24 g, 6,00 mmol, 1,05 équivalents) dans 10 ml d'eau. Le mélange réactionnel est porté à reflux sous agitation pendant un jour puis est concentré sous vide.

Le précipité obtenu est traité par un mélange d'eau saturée en bicarbonate de potassium et d'acétate d'éthyle (1/1). On filtre puis on récupère la phase organique. On extrait de nouveau la phase aqueuse par 3×100 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont récupérées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous vide. Le résidu est purifié par colonne chromatographique (CH₂Cl₂/MeOH : gradient d'éluion 98/2 à 95/5). On récupère 1,92 g de produit (5,22 mmol, Rdt : 91,4%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

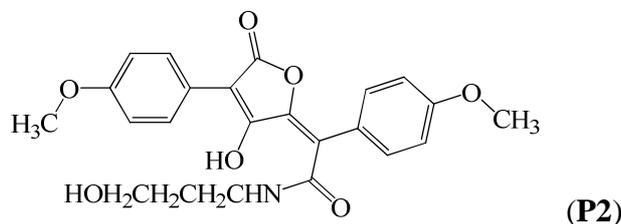
RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 3,80 (s, 6H, OCH₃), 6,92 (d, J = 8,5Hz, 2H_{Ar}), 6,98 (d, J = 9,1Hz, 2H_{Ar}), 7,26 (d, J = 8,5Hz, 2H_{Ar}), 8,02 (d, J = 9,1Hz, 2H_{Ar}), 12,90 (b, 1H, COOH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 55,6 (CH₃O), 99,4 (C_{Ar}-CO(lactone)), 113,5 (C_{Ar}), 114,2 (CH_{Ar}), 117,5 (CH_{Ar}), 123,6 (CH_{Ar}), 127,1 (CH_{Ar}), 128,2 (C_{Ar}), 131,9 (C_{Ar}), 151,9 (O-C_{Ar}=C), 158,4 (C_{Ar}-O (éther)), 159,2 (C_{Ar}-O (éther)), 165,1 (C_{Ar}=O (lactone)), 168,1 (C_{Ar}-O (énol)), 170,2 (COOH)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 368 [M]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3477, 2970 et 2358, ν_{CO} = 1707 et 1680

III.1.1.b. Synthèse du 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)-N-(3-hydroxypropyl)-2-(4-méthoxyphényl)acétamide (P2)



A une solution de bislactone (2,00 g, 5,71 mmol) dans 50 ml de chloroforme est ajouté le 3-aminopropanol (0,86 g, 11,42 mmol, 1,2 équivalents). Le mélange réactionnel est porté à reflux sous agitation pendant un jour puis est concentré sous vide.

Le précipité obtenu est traité dans un mélange d'eau saturée en bicarbonate de potassium et d'acétate d'éthyle (1/1). On filtre puis on récupère la phase organique. On extrait de nouveau la phase aqueuse par 3×100 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont récupérées, séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous vide. Le résidu est purifié par colonne chromatographique (CH₂Cl₂/MeOH : gradient d'éluion 98/2 à 90/10). On récupère 1,45 g de produit (3,41 mmol, Rdt : 59,7%).

Caractérisation

Aspect : Cristaux (aiguilles) Orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,62 (quint., J = 6,3Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,31 (t, J = 6,1Hz, 2H, CH₂NH), 3,40 (t, J = 6,0Hz, 2H, CH₂OH), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 7,03 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 7,18 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 7,30 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 7,97 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 8,16 (b, 1H, NH)

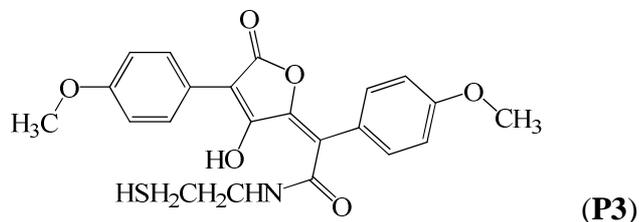
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 31,3 (CH₂CH₂CH₂), 31,7 (CH₂NH), 55,5 (CH₃O), 59,1 (CH₂OH), 96,6 (C_{Ar}-CO(lactone)), 113,8 (C_{Ar}), 114,6 (CH_{Ar}), 118,4 (CH_{Ar}), 122,7 (CH_{Ar}), 124,0 (CH_{Ar}), 128,5 (C_{Ar}), 132,0 (C_{Ar}), 151,8 (O-C_{Ar}=C), 159,0 (C_{Ar}-O (éther)), 161,9 (C_{Ar}-O (éther)), 165,6 (C_{Ar}=O (lactone)), 168,7 (C_{Ar}=O (énol)), 177,3 (C=O (amide))

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 426 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3530, 3396, ν_{NH} = 2957, ν_{CO} = 1737 et 1591

Analyse élémentaire (C₆H₁₁N₃S₃) :
 Calc.% : C, 64,93 ; H, 5,45 ; N, 3,29
 Exp.% : C, 64,45 ; H, 5,50 ; N, 3,28

III.1.1.c. Synthèse du 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)-N-(2-mercaptoéthyl)-2-(4-méthoxy-phényl)acétamide
(P3)



A une solution de bislactone (2,00 g, 5,71 mmol) dans 50 ml de chloroforme est ajoutée la cystéamine (0,46 g, 6,00 mmol, 1,05 équivalents). Le mélange réactionnel est porté à reflux sous agitation pendant un jour. Le milieu réactionnel est concentré sous vide.

Le précipité obtenu est traité dans un mélange d'eau saturée en bicarbonate de potassium et d'acétate d'éthyle (1/1). On filtre puis le précipité obtenu est lavé avec 5 ml d'une solution d'eau saturée en bicarbonate de potassium puis avec 5 ml d'une solution d'acétate d'éthyle. On récupère 0,84 g de produit (1,97 mmol, Rdt : 34,4%).

Caractérisation

Aspect : Poudre Orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,50 (s, 1H, SH), 2,98 (t, J = 6,9Hz, 2H, CH₂S), 3,46 (t, J = 6,9Hz, 2H, CH₂N), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 6,79 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 6,89 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 7,39 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 8,20 (d, J = 9,2Hz, 2H_{Ar}), 9,91 (b, 1H, NH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 19,0 (CH₂SH), 38,0 (CH₂N), 55,5 (CH₃O), 89,7 (C_{Ar}-CO(lactone)), 113,4 (C_{Ar}), 113,6 (CH_{Ar}), 125,4 (CH_{Ar}), 129,0 (CH_{Ar}), 129,2 (C_{Ar}), 131,0 (C_{Ar}), 155,6 (O-C_{Ar}=C), 158,5 (C_{Ar}-O (éther)), 167,7 (C_{Ar}-O (lactone)), 171,6 (C_{Ar}=O (énol)), 176,4 (C=O (amide))

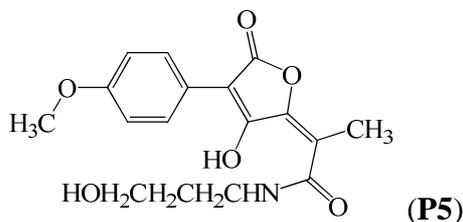
Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 429 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3611, 3403, ν_{NH} = 2960, ν_{SH} = 2607, ν_{CO} = 1703 et 1650

Analyse élémentaire (C₂₂H₂₁NOS₆S) : Calc.% : C, 61,81 ; H, 4,95 ; N, 3,28

Exp.% : C, 61,94 ; H, 4,51 ; N, 3,66

III.1.2.b. Synthèse de l'acide 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)propanoïque (P5)



A une solution de bislactone (2 g, 7,75 mmol) dans du THF anhydre (20 ml) à -35°C, est ajoutée, sous argon, une solution de fluorure de tétrabutylammonium (2,13 g, 8,14 mmol, 1,05 équivalents, 8,14 ml, 1M dans le THF anhydre). La solution est ensuite refroidie à -78°C. On ajoute au goutte à goutte et sous argon une solution d'aminopropanol (0,61 g, 8,14 mmol, 1,05 équivalents) dans 5 ml de THF anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 heure puis est laissé revenir à température ambiante. On agite pendant 2 heures à température ambiante.

Les solvants sont évaporés sous vide puis le résidu est dissous dans 30ml d'acétate d'éthyl. La phase organique est lavée avec une solution d'acide chlorhydrique 1M puis par une solution de brine. La phase organique est récupérée, séchée sur sulfate de magnésium puis filtrée. Le filtrat est concentré sous vide. Le produit est purifié par colonne chromatographique (CH₂Cl₂/MeOH : gradient d'éluion 98/2 à 95/5). On récupère 1,32 g de produit (3,96 mmol, Rdt : 51,1%).

Caractérisation

Aspect : Cristaux (aiguilles) jaune orangé

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,65-1,83 (m, 2H, CH₂), 2,12 (s, 3H, CH₃), 3,30-3,36 (m, 2H, CH₂N), 3,41-3,52 (m, 2H, CH₂O), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 6,92 (d, J=9,2 Hz, 2H_{Ar}), 7,97 (d, J=9,0 Hz, 2H_{Ar}), 9,08 (b, 1H, NH)

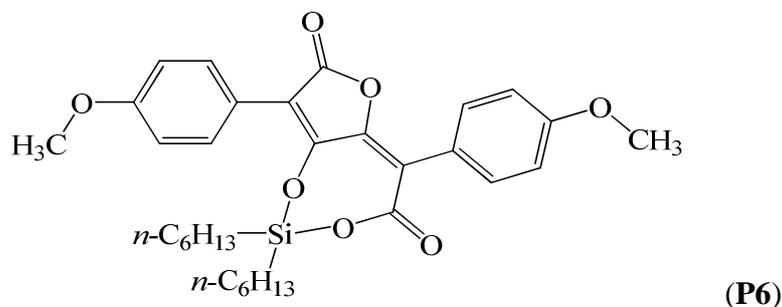
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 13,5 (CH₃), 31,4 (CH₂CH₂CH₂), 38,2 (CH₂N), 55,1 (CH₃O), 58,5 (CH₂OH), 100,4 (C_{Ar}-CO(lactone)), 113,6 (CH_{Ar}), 113,8 (C_{Ar}-CO(amide)), 122,3 (C_{Ar}), 128,0 (CH_{Ar}), 150,8 (O-C_{Ar}=C), 158,6 (C_{Ar}-O (éther)), 161,2 (C_{Ar}-O (énol)), 166,7 (C_{Ar}=O (lactone)), 168,3 (C=O (amide))

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 334 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₇H₁₉NO₆) : Calc.% : C, 61,25 ; H, 5,75 ; N, 4,20
Exp.% : C, 61,18 ; H, 6,23 ; N, 3,92

III.2. Les Dérivés Organométalliques

III.2.1.a. Synthèse du 2,2-di-*n*-hexyl-5,8-bis(4-méthoxyphényl)furodioxasilépine-4,7-dione (**P6**)



Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **P1** (2,72 mmol) dans 30 ml de THF anhydre
- 0,56 g de triéthylamine (5,58 mmol, 2,05 équivalents)
- 0,77 g de dichlorodi-*n*-hexylsilane (2,86 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 15 ml de THF anhydre.

On récupère 1,06 g de produit (1,87 mmol, Rdt : 68,8%).

Voie B1

Le protocole décrit pour la voie B1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **P1** (2,72 mmol) dans 30 ml de THF anhydre
- 0,98 g de bis(diéthylamino)di-*n*-hexylsilane (2,86 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 15 ml de THF anhydre.

On récupère 1,48 g de produit (2,62 mmol, Rdt : 96,3%).

Caractérisation

Aspect : Poudre rouge

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,30-1,17 (m, 26H, C₆H₁₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 6,95 (t, J = 8,2Hz, 4H_{Ar}), 7,22 (d, J = 8,1Hz, 2H_{Ar}), 7,99 (d, J = 8,6Hz, 2H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 13,7 (CH₃), 15,9 (CH₂), 22,3 (CH₂), 22,7 (CH₂), 31,4 (CH₂), 32,9 (CH₂), 55,6 (CH₃O), 98,7 (C_{Ar}-CO(lactone)), 113,4 (CH_{Ar}), 114,1 (CH_{Ar}), 117,6 (C_{Ar}-COOH), 123,9 (C_{Ar}-C=C), 127,3 (C_{Ar}-C=C), 128,0 (CH_{Ar}), 131,9 (CH_{Ar}), 152,0 (O-C_{Ar}=C), 158,2 (C_{Ar}-O (éther)), 159,1 (C_{Ar}-O (éther)), 165,9 (C_{Ar}-O (ether)), 168,2 (C_{Ar}=O (lactone)), 169,8 (ester)

RMN ²⁹Si (59,63 MHz, DMSO, δ, ppm) : -22,82 ppm

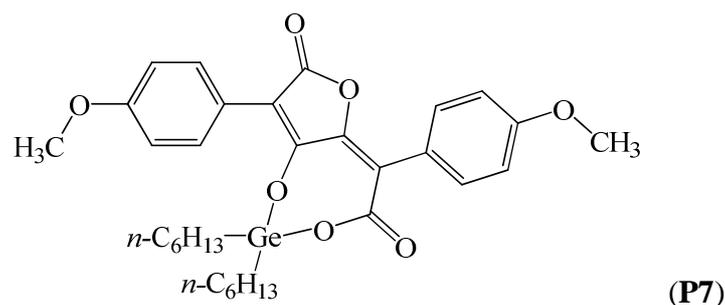
Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 565 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1751 et 1681

Analyse élémentaire (C₃₂H₄₀O₇Si) : Calc.% : C, 68,06 ; H, 7,14

Exp.% : C, 68,64 ; H, 6,82

III.2.1.b. Synthèse du 2,2-di-*n*-hexyl-5,8-bis(4-méthoxyphényl)furodioxagermepine-4,7-dione (P7)



Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,00 g de **P1** (2,72 mmol) dans 30 ml de THF anhydre

0,56 g de triéthylamine (5,58 mmol, 2,05 équivalents)

0,90 g de dichlorodi-*n*-hexylgermane (2,86 mmol, 1,05 équivalents)

dans 15 ml de THF anhydre.

On récupère 1,23 g de produit (2,02 mmol, Rdt : 74,2%).

Voie B1

Le protocole décrit pour la voie B1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,00 g de **P1** (2,72 mmol) dans 30 ml de THF anhydre

1,11 g de bis(diéthylamino)di-*n*-germane (2,86 mmol, 1,05 équivalents)

dans 15 ml de THF anhydre.

On récupère 1,63 g de produit (2,67 mmol, Rdt : 98,1%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 0,80-1,33 (m, 26H, C_6H_{13}), 3,86 (s, 6H, OCH_3), 6,94-6,99 (m, 4H_{Ar}), 7,28-7,32 (m, 2H_{Ar}), 8,18 (d, $J = 8,6\text{Hz}$, 2H_{Ar})

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 11,5 (CH_2), 14,2 (CH_3), 22,6 (CH_2), 23,4 (CH_2), 31,5 (CH_2), 32,9 (CH_2), 55,5 (CH_3O), 113,4 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CO}$ (lactone)), 113,7 (CH_{Ar}), 118,7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CO}$ (amide)), 123,4 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-C}=\text{C}$), 128,4 (CH_{Ar}), 131,4 (CH_{Ar}), 158,5 ($\text{O-C}_{\text{Ar}}=\text{C}$), 159,1 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$ (éther)), 163,5 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$ (éther)), 173,3 ($\text{C}_{\text{Ar}}=\text{O}$ (lactone) et $\text{C}=\text{O}$ (ester))

Spectre de masse (FAB, DMSO) : $m/z = 608$ [$\text{M}-2$] $^+$, 442 [$\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_{24}$] $^+$

I.R. (cm^{-1}) : $\nu_{\text{CO}} = 1764$ et 1723

Analyse élémentaire ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2$) : Calc.% : C, 62,87 ; H, 6,93

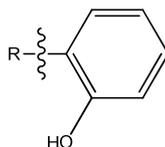
Exp.% : C, 62,59 ; H, 7,21

IV. Evaluation in vitro

Par la suite, on utilisera les notations suivantes :

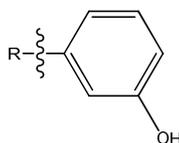
- (o) signifie que le substituant se trouve en ortho.

Par exemple, C₆H₄-OH (o) correspond à :



- (m) signifie que le substituant se trouve en méta.

Par exemple, C₆H₄-OH (m) correspond à :



- (p) signifie que le substituant se trouve en para.

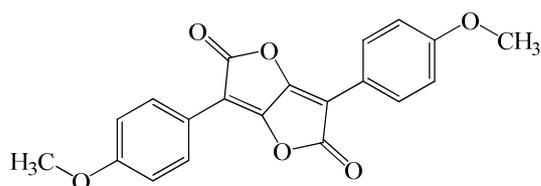
Par exemple, C₆H₄-OH (p) correspond à :



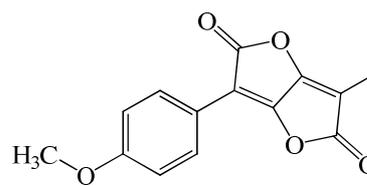
Seuls les résultats les plus intéressants de chaque série seront donnés ici. Les autres seront donnés en annexe.

IV.1. Etude Préliminaire

IV.1.1. Etude des bis-lactones



C068



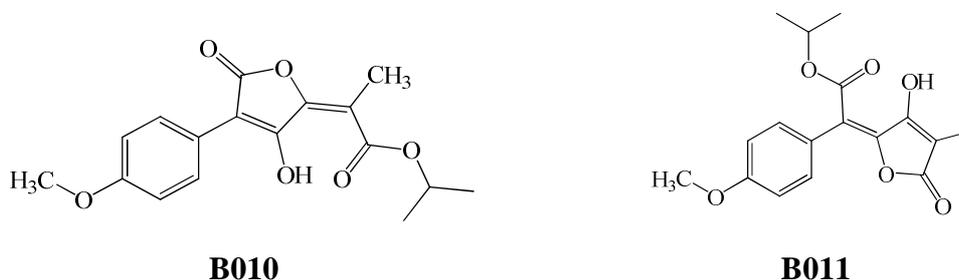
B005

N°	ABTS		LogP	Peroxydation lipidique			
	TEAC	Déviation Standard		% de protection		% de protection	
				116 μM	Déviati Standard	24 μM	Déviati Standard
C068	ND	ND	1,38	3,0	2,7	1,2	3,5
B005	20.37	3.65	0,31				

Tableau 13 : Propriétés antiradicalaires et antioxydantes des bislactones (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

Les deux bis-lactones fournies par le CEA et l'ULP, précurseurs des acides pulviniques, sont inefficaces vis-à-vis du test au radical cation ABTS⁺ (le TEAC de **C068** n'a pas pu être déterminé par manque de solubilité). Aucun effet de protection contre la peroxydation lipidique n'a été montré pour ces structures (Tableau 13).

IV.1.2. Comparaison des régioisomères obtenus lors de la synthèse des acides pulviniques dissymétriques



N°	ABTS		LogP	Peroxydation lipidique			
	TEAC	Déviation Standard		% de protection		% de protection	
				116 μM	Déviati Standard	24 μM	Déviati Standard
B010	3,50	1,03	0,7	ND	ND	ND	ND
B011	6,68	0,25	0,7	-24,2	4,1	-9,7	2,1

Tableau 14 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes de deux régioisomères d'acide pulvinique (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

Comme exposé en introduction lors de la synthèse des acides pulviniques dissymétriques, deux isomères de position sont obtenus puis séparés par chromatographie. Les composés **B010** et **B011** (fournis par l'ULP) correspondent aux régioisomères 1 et 2 respectivement. Le régioisomère 1 est bien le composé le plus actif au test à l'ABTS. Nous nous intéresserons donc par la suite, uniquement au régioisomère 1 (Tableau 14). Aucun effet de protection contre la peroxydation lipidique n'a été montré pour ces structures.

IV.2. Evaluation des Dérivés d'Acides Pulviniques

Les dérivés d'acides pulviniques et vulpiniques ont été modifiés selon les groupements R_1 , R_2 et R_3 (Figure 63) :

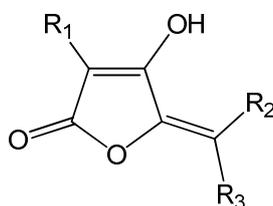
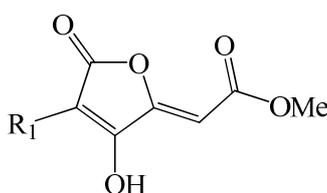


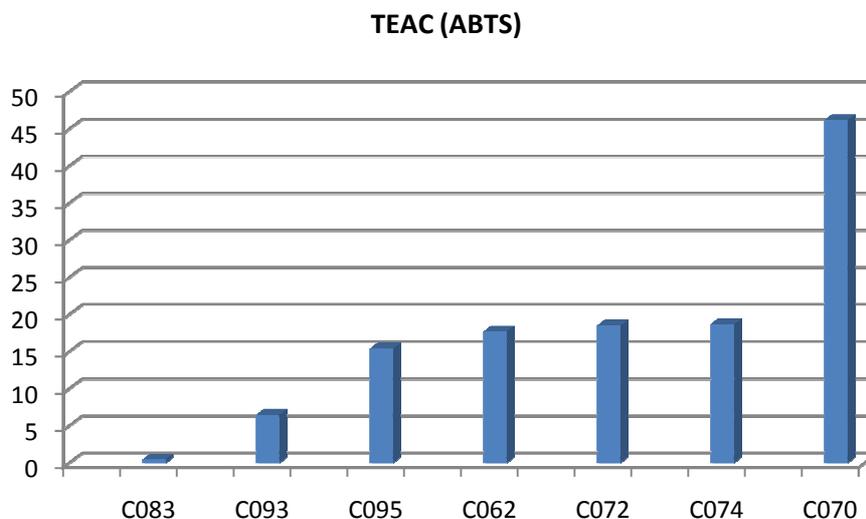
Figure 63 : Schéma général des acides pulviniques et vulpiniques

IV.2.1. Modification des acides pulviniques selon R_1 , $R_2=H$, $R_3=CO_2Me$



N°	R_1	N°	R_1	N°	R_1
C062	CO ₂ Bn	C072	C ₆ H ₄ -Br (p)	C093	C ₆ H ₄ -CH ₃ (p)
C070	Ph	C074	C ₆ H ₄ -NO ₂ (p)	C095	C ₆ H ₄ -F (p)
		C083	C ₆ H ₄ -OH (p)		

Figure 64 : Variations des acides pulviniques (fournis par le CEA), modifiés selon R_1

IV.2.1.a. Test à l'ABTS

Graphique 4 : Variations des propriétés antiradicalaires des acides pulviniques modifiés selon R₁ (test à l'ABTS)

Nous nous sommes intéressés à la variation des propriétés antioxydantes des acides pulviniques selon le groupement R₁. Le groupement R₁ semble grandement influencer sur les propriétés antioxydantes des acides pulviniques (Graphique 4).

Dans la série **C070**, **C072**, **C074**, **C093** et **C095**, nous avons fait varier les effets inductifs et mésomères en para du groupement phényle. On remarquera que dans cette série la variation des TEAC est très importante. **C093** présente un groupement méthyle en para alors que **C070** présente un hydrogène sur cette même position. Ainsi, la présence d'un alkyl sur le groupement phényle induirait une nette augmentation des propriétés antioxydantes. De même, en comparant **C070** à **C072**, **C074** et **C095**, on mesure l'importance de la substitution du groupement en para par des groupements (halogènes, nitro). On notera ensuite la variation très faible entre les trois composés **C072**, **C074** et **C095**. Ces produits ne varient que par le type de groupements en para du cycle benzénique (Br, NO₂, F), ce qui suggérerait une influence très faible du type de groupements substituant le cycle sur les propriétés antioxydantes.

En comparant **C062** et **C093**, on observe une diminution des propriétés antioxydantes lorsque le groupement aromatique n'est pas directement relié à l'acide carboxylique et qu'il ne permet pas une délocalisation sur toute la structure des radicaux. Cependant, au regard de

C062 et **C070**, la nature du groupement semble aussi influencer les propriétés antioxydantes, qu'il permette ou non la délocalisation des radicaux.

La substitution de R_1 par un phénol induit une très forte augmentation du caractère antioxydant de l'acide pulvinique. En effet, un groupement phénol serait apte à capter directement les radicaux (Figure 65). Ainsi, **C083**, présentant un site de capture des radicaux en plus, il présente des propriétés antiradicalaires nettement supérieures aux autres produits de cette série.

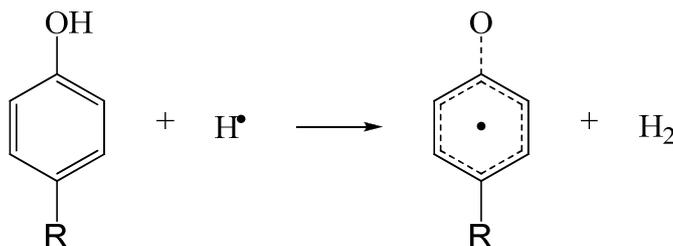


Figure 65 : Inhibition des radicaux par un cycle phénol

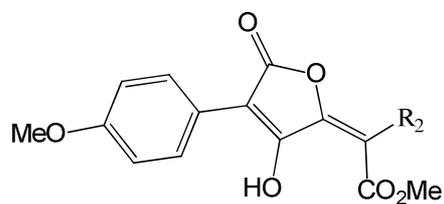
IV.2.1.b. Test de peroxydation lipidique

Nous remarquons tout d'abord que les modifications présentées ici n'engendrent pas de grandes variations de propriétés de lipophilie (Annexe 1, Tableau A1).

Seul **C072** présenterait dans notre modèle un faible pouvoir protecteur à 116 μM (33,9% de protection) mais serait inefficace à 24 μM .

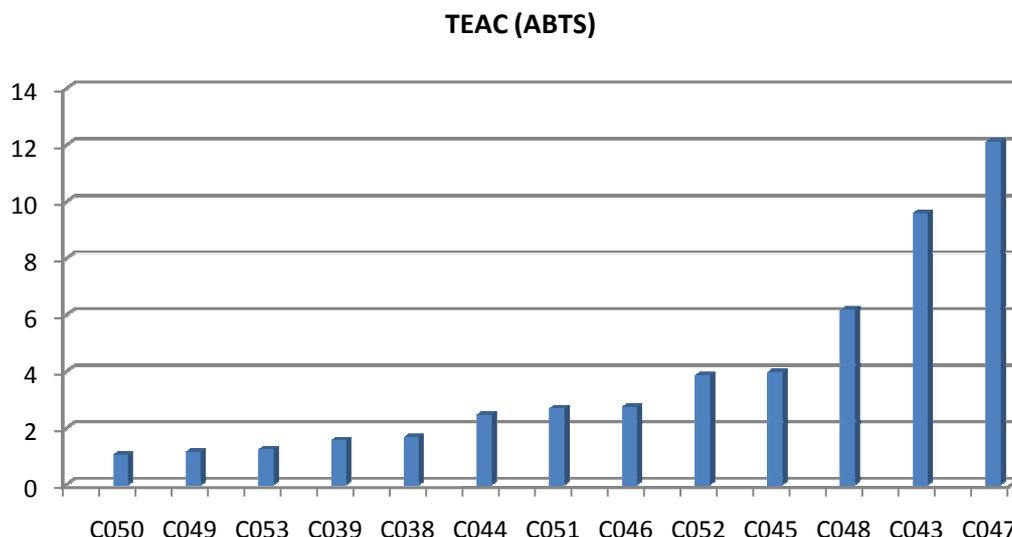
De plus, vis-à-vis de ce modèle, la plupart des composés présentés ici seraient pro-oxydants. L'effet pro-oxydant des acides pulviniques est connu. En effet, selon la concentration, ces composés peuvent se comporter comme la vitamine C ou E et être soit pro-oxydants, soit anti-oxydants^[45, 143]. L'inefficacité de ces composés peut aussi s'expliquer par la capacité de capture des radicaux très faible de ce type de composés. En effet, l'ensemble des composés de cette famille présente des propriétés antiradicalaires faibles au test à l'ABTS (TEAC > 6) sauf **C083** (TEAC = 0,48) qui se révèle être un des deux composés actifs de cette famille.

IV.2.2. Modification des acides pulviniques selon R_2 , $R_1 = C_6H_4-$
 OMe , $R_3 = CO_2Me$



N°	R_2	N°	R_2	N°	R_2
C038	Ph	C039	C_6H_4-OH (m)	C043	H
C044	I	C045	C_6H_4-Cl (p)	C046	$C_6H_4-CF_3$ (m)
C047	$C_6H_4-CF_3$ (o)	C053	C_6H_4-OH (p)		
C048		C052			
C049		C050		C051	

*Figure 66 : Numérotation des acides pulviniques (fournis par le CEA),
modifiés selon R_2*

IV.2.2.a. Test à l'ABTS

Graphique 5 : Variations des propriétés antiradicalaires des acides pulviniques modifiés selon R_2 (test à l'ABTS)

R_2 influe aussi sur les propriétés antioxydantes des acides pulviniques (Graphique 5). Au sein de cette série, plusieurs groupements de molécules présentant des structures proches se détachent : **C049**, **C050** et **C051**, présentant un cycle à cinq pour R_2 ; **C043** et **C044**, ne présentant aucun cycle aromatique pour R_2 ; **C039** et **C053**, présentant des groupements phénols pour R_2 ; **C038**, **C048**, **C045**, **C046**, **C047** et **C052**, présentant un cycle à six pour R_2 .

On remarque l'influence des propriétés du groupement R_2 . Alors que **C043** est peu antioxydant, lorsque l'hydrogène est substitué par un groupement halogéné tel qu'un iode (**C044**), les propriétés antioxydantes augmentent fortement.

Lorsque le groupement R_2 est de type phénol, les propriétés antioxydantes sont très bonnes. Cette remarque confirme les observations réalisées précédemment sur l'influence des phénols en R_1 et R_2 permettant un nouveau site de capture des radicaux (Figure 65). On remarquera aussi que la position du phénol, para ou méta, influe légèrement sur les TEAC dans notre exemple.

Les composés présentant des cycles furanes ou thiophènes présentent des TEAC assez faibles ce qui confirme le choix de ce type de groupement pour donner des acides pulviniques très antioxydants. De plus, on remarque que le thiophène est moins antioxydant que les furanes. Par contre, la position du cycle furane, qu'il soit en position 1 ou 2, influe peu sur les propriétés des composés car **C049** et **C050** se comportent de façons identiques vis-à-vis de ce test.

L'influence du cycle à six est aussi remarquable. En effet, on remarque une grande disparité dans les TEAC de la série **C038**, **C045**, **C046**, **C047** et **C052**. **C047** et **C048** sont peu antioxydants. **C038** est le meilleur de cette série. **C045** et **C052** ont des propriétés proches. Au regard de ces résultats, on notera que la substitution par des groupements R (\neq OH) du phényle diminue les propriétés antioxydantes des composés. De plus, **C046** et **C047** ne varient que par la position du groupement CF₃. **C046** présente le groupement CF₃ en méta et présente un meilleur TEAC que **C047** présentant le CF₃ en ortho. Ainsi, placer un groupement fortement de ce type sur le phényle fait chuter les propriétés antioxydantes des composés et, la diminution dépend de la position du substituant. On notera aussi que la présence de groupements de type chlore en méta ou para influe peu sur les propriétés antioxydantes.

IV.2.2.b. Test de peroxydation lipidique

N°	LogP	% de protection		% de protection	
		116 μ M	Déviatiion Standard	24 μ M	Déviatiion Standard
C039	0,84	32,1	1,8	6,7	0,5
C043	-0,31	44,2	0,1	13,9	0,9
C047	-0,31	49,5	3,1	18,0	6,0
C048	2,15	76,3	1,4	37,8	3,1

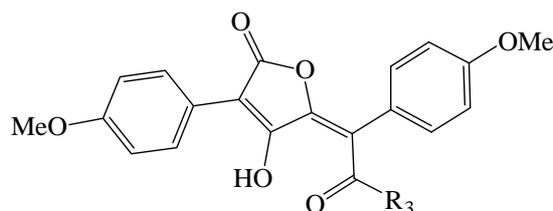
Tableau 15 : Variations des propriétés antioxydantes des acides pulviniques modifiés selon R₂ (test de peroxydation lipidique)

Comme précédemment, certains composés de cette famille sont pro-oxydants. Cependant, avec R₁ = Ph-OMe, les acides vulpiniques sont plus antioxydants dans ce modèle que dans le cas précédent. Un ensemble de composés (**C045**, **C052**, **C053**, **C051**, **C050**) est inactif. **C039** et **C043** présentent des propriétés de protection à 116 μ M. **C047** (49,5% et 18,0% de protection à 116 μ M et 24 μ M respectivement) et surtout **C048** (76,3% et 37,8% de protection à 116 μ M et 24 μ M respectivement) sont des composés dont les propriétés sont à retenir (Tableau 15).

De même que lors de l'étude des composés de référence, il semblerait que dans le cas des acides vulpiniques, le caractère lipophile joue sur les propriétés de protection, **C048** étant un composé relativement lipophile (logP > 2). Cependant, certaines de ces structures présentent des logP supérieurs à 2 mais ne présentent aucune propriété de protection vis-à-vis

de la peroxydation lipidique dans notre modèle. Ainsi, la nature même du groupement R_2 et les propriétés électroniques associées à ce groupement (effet -I, -M) joueraient sur les propriétés de protection.

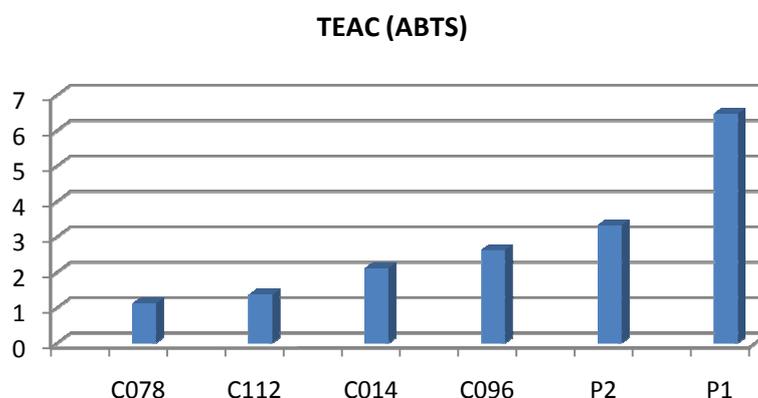
IV.2.3. Modification des acides pulviniques selon R_3 ,



N°	R_3	N°	R_3
P1	H	P2	-NHC ₃ H ₆ OH
C014	-OCH ₃	C112	-NHC ₈ H ₁₇
C078	$CF_3CO_2^-$ 	C096	

Figure 67 : Variations des acides pulviniques (fournis par le CEA),
modifiés selon R_3

IV.2.3.a. Test à l'ABTS



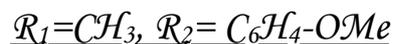
Graphique 6 : Variations des propriétés antiradicalaires des acides pulviniques
modifiés selon R_3 (test à l'ABTS)

Ces premiers résultats sur les acides pulviniques montrent l'influence du groupement R_3 sur les propriétés antioxydantes des composés. En effet, des variations de TEAC sont observées pour ces six composés. La molécule **P1**, présentant un groupement $R_1=CO_2H$, donne un TEAC assez faible par rapport aux autres structures. En modifiant ce groupement par CO_2CH_3 (**C014**), on diminue le TEAC d'un facteur 3. Le meilleur composé de cette série est le sel d'acide pulvinique **C078** qui présente un TEAC relativement faible (1,12) (Graphique 6).

IV.2.3.b. Test de peroxydation lipidique

Seul le composé **P1** permet une protection efficace (67,0% de protection à 116 μM et 24,5% de protection à 24 μM). Les résultats pour les autres composés sont donnés en annexe (Annexe 1, Tableau A3).

IV.2.4. Modification des acides pulviniques dissymétriques selon R_3 ,

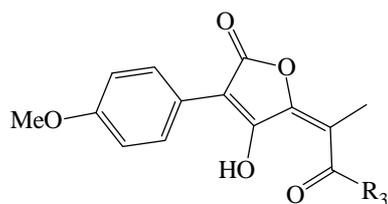


IV.2.4.a. Test à l'ABTS

Ces résultats montrent que, comme précédemment pour les acides pulviniques symétriques, l'influence de R_3 sur les propriétés antiradicalaires des acides pulviniques dissymétriques est très importante (Graphique 7). L'introduction de groupements de composés proches de la vitamine C (**B098**) ou de flavanoïdes (**B074**) permet de rendre la molécule particulièrement active. L'introduction d'un groupement amine secondaire (**B042**) permet aussi une bonne capture des radicaux. D'autres composés (**B038**, **B019**, **B041**, **B012**), présentant cette fois-ci des groupements amines primaires ou tertiaires, donnent des TEAC intéressants (de 1,76 à 2,31). Au regard des TEAC très proches obtenus pour **B008**, **B040** et **P5**, il semblerait que la fonction alcool présente en bout de chaîne latérale n'intervienne pas dans la capture ou dans l'inhibition des phénomènes radicalaires. On notera aussi que les produits présentant des fonctions alcools en bout de chaîne latérale sont moins actifs que ceux présentant des fonctions amides.

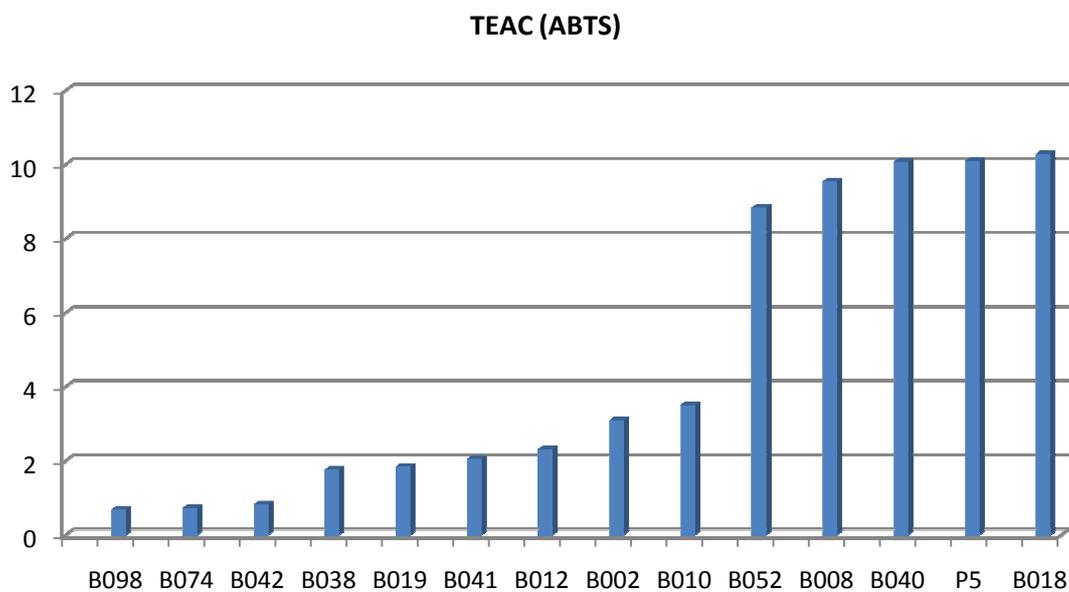
IV.2.4.a. Test de peroxydation lipidique

Les acides pulviniques dissymétriques présentés ici ne sont pas actifs vis-à-vis de la peroxydation lipidique dans notre modèle. Un seul composé, le **B074**, semble protéger le carotène (68,6% de protection à 116 μM et 57,5% de protection à 24 μM), confirmant ainsi l'intérêt de la stratégie bimodale couplant l'acide pulvinique à un flavanoïde (ici le trolox).



N°	R ₃	N°	R ₃	N°	R ₃
B098		B074		B019	
B042		B008	-NHC ₄ H ₉	B052	
B018	-NHC ₂ H ₄ NH ₂	B012	-NHC ₃ H ₆ NH ₂	B038	-NHC ₅ H ₁₀ NH ₂
B041	-NHC ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂	P5	-NHC ₃ H ₆ OH	B040	-NHC ₃ H ₆ OCH ₃
B002	-OCH ₃	B010	-OiPr		

Figure 68 : Numérotation des acides pulviniques dissymétriques, modifiés selon R₃



Graphique 7 : Variations des propriétés antiradicalaires des acides pulviniques dissymétriques modifiés selon R₂ (test à l'ABTS)

IV.2.5. Autres acides pulviniques testés

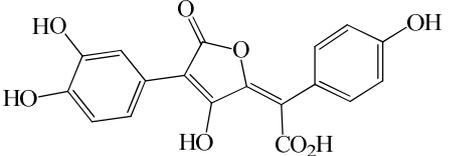
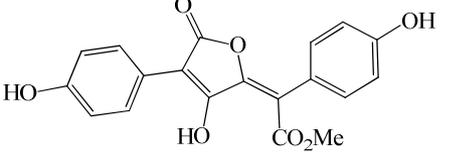
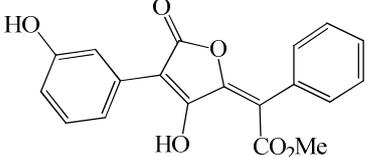
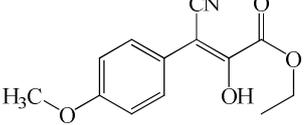
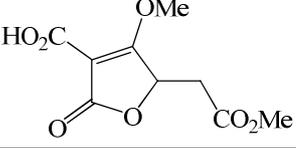
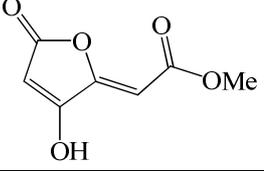
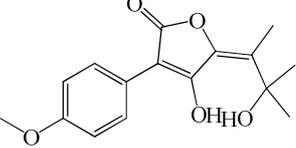
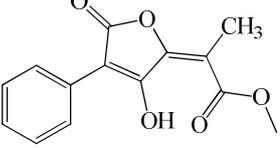
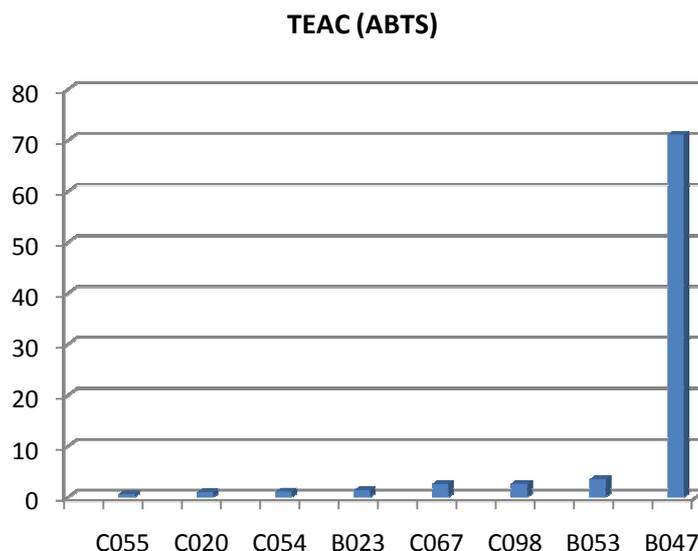
C055		Acide Xérocomique
C020		Acide Vulpinique
C054		Dérivés de l'acide pinastrique
B023		
C067		
C098		
B053		
B047		

Figure 69 : Numérotation des autres acides pulviniques testés



Graphique 8 : Variations des propriétés antiradicalaires des acides pulviniques (test à l'ABTS)

Parmi ces dérivés, 4 acides pulviniques (**C020**, **C054**, **C055**, **B023**) présentent des TEAC proches ou inférieurs à 1 (de 0,61 à 1,35) (Graphique 8). Ainsi ces molécules font partie des meilleurs composés antiradicalaires obtenus lors de cette étude. De plus, le composé **C020** présente une activité remarquable vis-à-vis de la peroxydation lipidique à 116 μM (65% de protection) et à 24 μM (40% de protection) (Tableau 16).

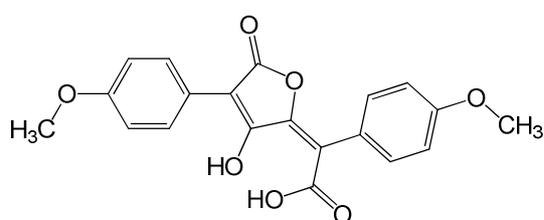
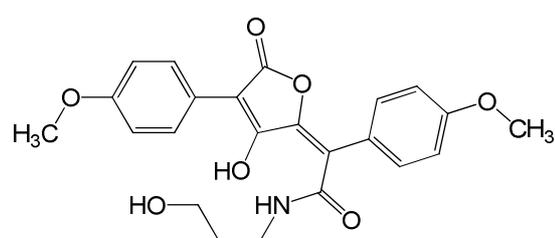
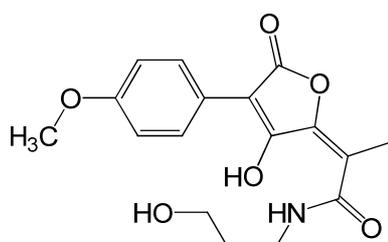
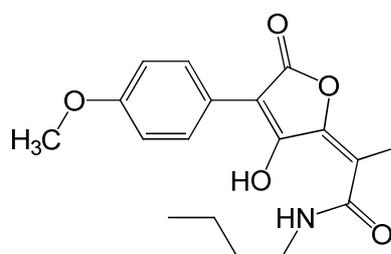
N°	LogP	% de protection		% de protection	
		116 μM	Déviati on Standard	24 μM	Déviati on Standard
C055	-0,08	10,3	3,7	2,3	5,1
C020	0,58	64,6	0,8	39,9	4,0
B023	0,97	21,4	3,8	4,5	2,2

Tableau 16 : Variations des propriétés antioxydantes des acides pulviniques (test de peroxydation lipidique)

IV.2.6. Conclusion

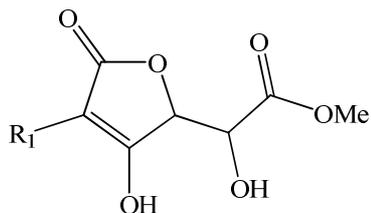
L'étude des dérivés d'acides pulviniques symétriques et dissymétriques a montré que les groupements R_1 , R_2 et R_3 influençaient beaucoup les propriétés antiradicalaires dans le test à l'ABTS. Quatre composés (**P1**, **B074**, **C046**, **C047**) présentent aussi une activité remarquable vis-à-vis de la peroxydation lipidique.

De plus, à partir des structures RX de **P1**, **P2**, **P5** et **B008**, nous avons supposé que, étant donné que les dérivés dissymétriques présentaient un système aromatique moins étendu que les dérivés symétriques, l'activité de **P5** serait plus faible que celle de **P2**. En effet, au regard des résultats expérimentaux obtenus par le test à l'ABTS, **P5** (TEAC = 10,09) est moins actif que **P2** (TEAC = 3,33). En comparant les structures de **P5** et **B008**, nous avons remarqué que ces molécules ne variaient que par la présence d'un alcool primaire sur l'amide. Ces deux composés de TEAC très proches (10,09 et 9,54) suggèrent une faible influence de la chaîne amide sur les propriétés de capture des radicaux. Aussi, le site de capture ne semble pas être une fonction présente sur la chaîne amide. Ainsi, deux sites de capture restent possibles pour ce type de structure : l'énol ou la fonction acide carboxylique, éther ou amine secondaire selon les structures. En comparant **P1** et **P2**, nous remarquons que **P2** est deux fois plus actif que **P1**. A partir des données RX, nous avons remarqué que ces structures ne différaient que par la présence d'un acide carboxylique et d'un amide. Ainsi, il semblerait que ce site soit un site actif pour la capture de radicaux.

**P1****P2****P5****B008**

IV.3. Evaluation des Dérivés du méthyl 2-(4-alkyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacétate, Modification selon R_1 , $R_2=OH$, $R_3=CO_2Me$

Les dérivés du 4-hydroxy-5-méthylfuran-2(5H)-one ont été modifiés selon R_1 :



N°	R_1	N°	R_1	N°	R_1
C082	C ₆ H ₄ -OH (p)	C097	C ₆ H ₄ -OBn (p)	C073	C ₆ H ₄ -NO ₂ (p)
C092	C ₆ H ₄ -CH ₃ (p)	C094	C ₆ H ₄ -F (p)	C076	H
C042	C ₆ H ₄ -OCH ₃ (p)	C071	C ₆ H ₄ -Br (p)	C061	CO ₂ Bn
C069	Ph			C064	COCH ₃

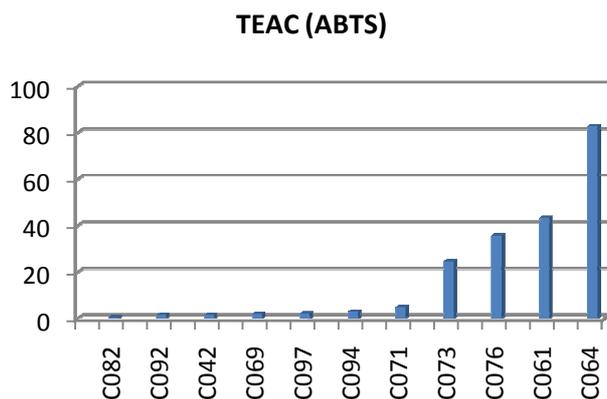
Figure 70 : Numérotation des méthyl 2-(4-alkyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacétate selon R_1

IV.3.1.a. Test à l'ABTS

On remarque tout d'abord que les composés présentant un groupement $R_1 = H$, COCH₃ ou CO₂Bn sont peu actifs par rapport aux composés présentant un groupement R_1 de type phényle (Graphique 9).

Au sein de la famille (**C042**, **C069**, **C071**, **C073**, **C082**, **C092**, **C094**, **C097**) on observe que comme précédemment, le produit le plus actif est le composé **C082** présentant un phénol en para pour R_1 . Ensuite, viennent les composés présentant les groupements Ph, Ph-Me et les composés éthers. Les deux séries de composés **C042** et **C092**, et **C069** et **C097** présentent des TEAC proches ce qui suppose une faible influence du groupement en para du phényle lorsque le substituant est un alkyle ou un éther. On notera tout de même une légère hausse de l'IC₅₀ pour les composés présentant un halogène en para du phényle.

Le composé **C073** présente tout de même une activité antioxydante relativement plus faible que les autres dérivés de cette famille.



Graphique 9 : Variations des propriétés antiradicalaires des méthyl 2-(4-alkyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacétate selon R₁ (test à l'ABTS)

IV.3.1.b. Test de peroxydation lipidique

La plupart des composés de cette famille sont inactifs vis-à-vis de notre modèle de peroxydation lipidique. Seuls les composés **C082** et surtout **C069** ressortent de cette étude (Tableau 17).

N°	LogP	% de protection		% de protection	
		116 µM	Déviatiion Standard	24 µM	Déviatiion Standard
C082	-0,82	23,6	2,5	14,8	3,9
C069	-0,43	54,2	3	13,7	3,4

Tableau 17 : Variations des propriétés antioxydantes des méthyl 2-(4-alkyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacétate selon R₁ (test de peroxydation lipidique)

IV.4. *Evaluation des Dérivés du 4-hydroxyfuran-2(5H)-one*

Ces dérivés ont été modifiés selon les groupements R₁, R₂, R₃ et X (Figure 71) :

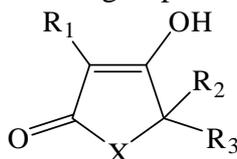
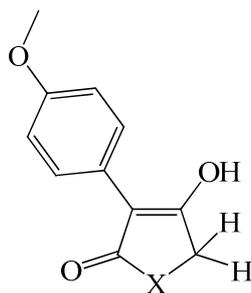


Figure 71 : Schéma général des dérivés du 4-hydrofuran-2(5H)-one

IV.4.1. Modification selon X, $R_1 = C_6H_4-OMe$, $R_2 = R_3 = H$ 

N°	X	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
					116 μ M	Déviation Standard	24 μ M	Déviation Standard
C040	O	1,45	0,04	0,29	25,2	8,0	4,3	6,7
C058	NH	1,55	0,06	-0,38	49,7	0,4	0,6	2,4
C100	NBn	1,95	0,48	1,58	41,6	3,6	39,6	3,9
C057	S	2,17	0,18	0,86	17,1	2,3	-0,4	2,1

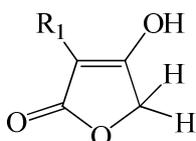
Tableau 18 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés du 4-hydrofuran-2(5H)-one modifiés selon X (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.4.1.a. Test à l'ABTS

Les molécules présentées ici varient par la nature de l'atome X du cycle lactone. On remarque tout d'abord que l'influence de cet atome sur les propriétés antioxydantes est faible. L'activité varie légèrement selon $O > NH > S$ où « > » signifie « plus actif que » (Tableau 18). De plus, en comparant **C058** et **C100**, on remarque que, dans notre exemple, lorsque l'azote est substitué, l'activité baisse.

IV.4.1.b. Test de peroxydation lipidique

On remarque ici que selon le groupement X, les propriétés de protection varient. On obtient des résultats nettement meilleurs pour les dérivés azotés (Tableau 18).

IV.4.2. Modification selon R_1 , $R_2 = R_3 = H$, $X = O$ 

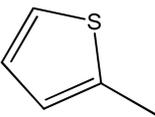
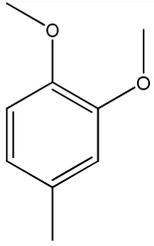
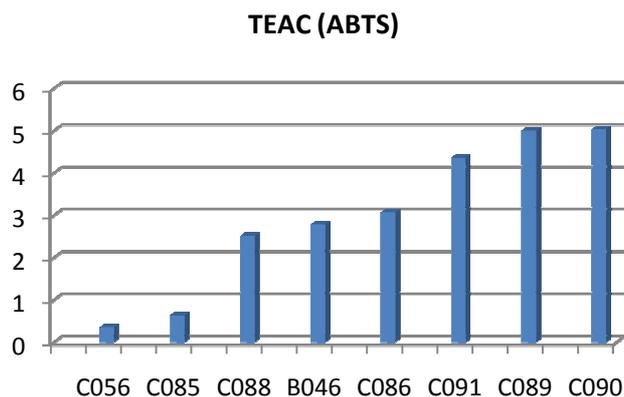
N°	R_1	N°	R_1	N°	R_1
B046	Ph	C056		C088	
B048	C_6H_4-CN (p)	C085	C_6H_4-OH (p)	C086	$C_6H_4-OCH_3$ (m)
C090	C_6H_4-F (p)	C091	C_6H_4-Cl (p)	C089	C_6H_4-Br (p)

Figure 72 : Variations des 4-hydroxyfuran-2(5H)-one selon R_1 IV.4.2.a. Test à l'ABTS

La variation très importante des TEAC pour cette famille de molécule suggère une influence très importante de R_1 sur les propriétés antiradicalaires. On notera tout d'abord que le cycle thiophène induit une très forte augmentation des propriétés antioxydantes des composés. Ensuite, comme à l'accoutumée, les composés possédant un groupement phénol (**C085**) apportent aussi une activité intéressante (Graphique 10).

B046, **C086** et **C088** présentent un pouvoir antioxydant semblable ce qui suppose une influence faible des groupements éthers en méta et en para du phényle. Ces résultats sont similaires aux remarques précédentes.

Les produits **C089**, **C090** et **C091** présentent des TEAC proches, ce qui implique une faible importance de la nature de l'halogène en para sur les propriétés antioxydantes sur ce type de produit. Cependant, on notera un pouvoir antioxydant légèrement supérieur pour le dérivé chloré.



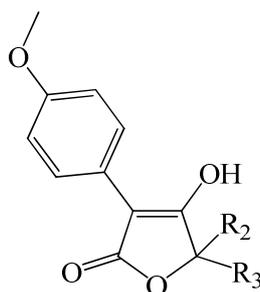
Graphique 10 : Variations des propriétés antiradicalaires des dérivés du 4-hydrofuran-2(5H)-one modifiés selon R_1 (test à l'ABTS)

IV.4.2.b. Test de peroxydation lipidique

La variation très importante du pourcentage de protection pour cette famille de molécules suggère une influence très importante de R_1 sur les propriétés antioxydantes de ces dérivés. Quatre composés (**C056**, **C085**, **C086** et **C088**) présentent des propriétés intéressantes. Le composé présentant un cycle thiophène pour R_1 est ainsi le composé le plus actif dans ce test comme dans le test à l'ABTS (Tableau 19).

N°	LogP	% de protection		% de protection	
		116 μ M	Déviati on Standard	24 μ M	Déviati on Standard
C056	0,4	47,9	0,1	7,3	0,1
C088	0,17	41,4	2,2	21,5	4,8
C085	0,03	31,8	0,4	23,8	2,1
C086	0,29	10,8	4,1	11,5	7,4
C091	0,98	4,3	7,1	2,5	8,2
C090	0,58	4,3	4,9	1,4	4,6
B046	0,42	1,6	3,7	-3,9	0,9
C089	1,25	1,2	3,2	1,4	4,6
B048	0,45	-0,9	3,9	-2,7	3,8

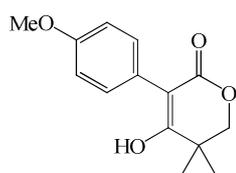
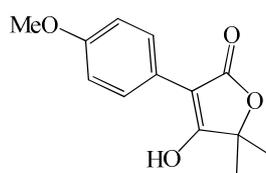
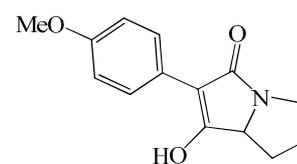
Tableau 19 : Variations des propriétés antioxydantes des dérivés du 4-hydrofuran-2(5H)-one modifiés selon R_1 (test de peroxydation lipidique)

IV.4.3. Modification selon R_2 et R_3 , $R_1 = C_6H_4-OMe$, $X = O$ 

N°	R_2	R_3	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
						116 μ M	Déviation Standard	24 μ M	Déviation Standard
C103	CH ₃	H	1,30	0,16	0,61	40,8	0,4	13,5	0,6
C102	C ₄ H ₉	H	1,86	0,20	1,93	39,5	2,3	16,6	2,5
C106	CH ₃	CH ₃	1,87	0,06	0,83	36,3	1,4	14,5	2,7
C105	$R_2=R_3=$ Cyclohexane		1,92	0,37	1,72	55,7	4,2	29,3	1,7
C104	Ph	H	2,17	0,28	2,01	35,3	4,3	14,6	4,5

Tableau 20 : Variation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés du 4-hydrofuran-2(5H)-one modifiés selon R_2 et R_3 (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

Les cinq composés de cette série présentent des TEAC et des propriétés de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique très proches, ce qui suppose une influence très faible de R_2 et R_3 sur les propriétés de ces dérivés (Tableau 20).

IV.4.4. Modification du cycle lactone, $R_1 = C_6H_4-OMe$ **C107****C106****C101**

N°	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviation Standard	24 μ M	Déviation Standard
C107	1,21	0,13	1,51	39,0	0,3	19,8	1,6
C106	1,87	0,06	0,83	36,3	1,4	14,5	2,7
C101	2,50	0,12	0,15	90,0	3,2	86,2	2,4

Tableau 21 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés du 4-hydrofuran-2(5H)-one modifiés selon le cycle tétronique (ABTS et peroxydation lipidique)

IV.4.4.a. Test à l'ABTS

La nature du cycle tétronique influe légèrement sur les valeurs de TEAC de ce test. Une augmentation de la taille du cycle de 5 à 6 induit une légère augmentation du pouvoir antioxydant. La molécule **C107**, originale par sa structure, est plus active que les 2 autres composés de cette série. Cependant, malgré la grande modification structurale, le TEAC ne varie que très peu (Tableau 21).

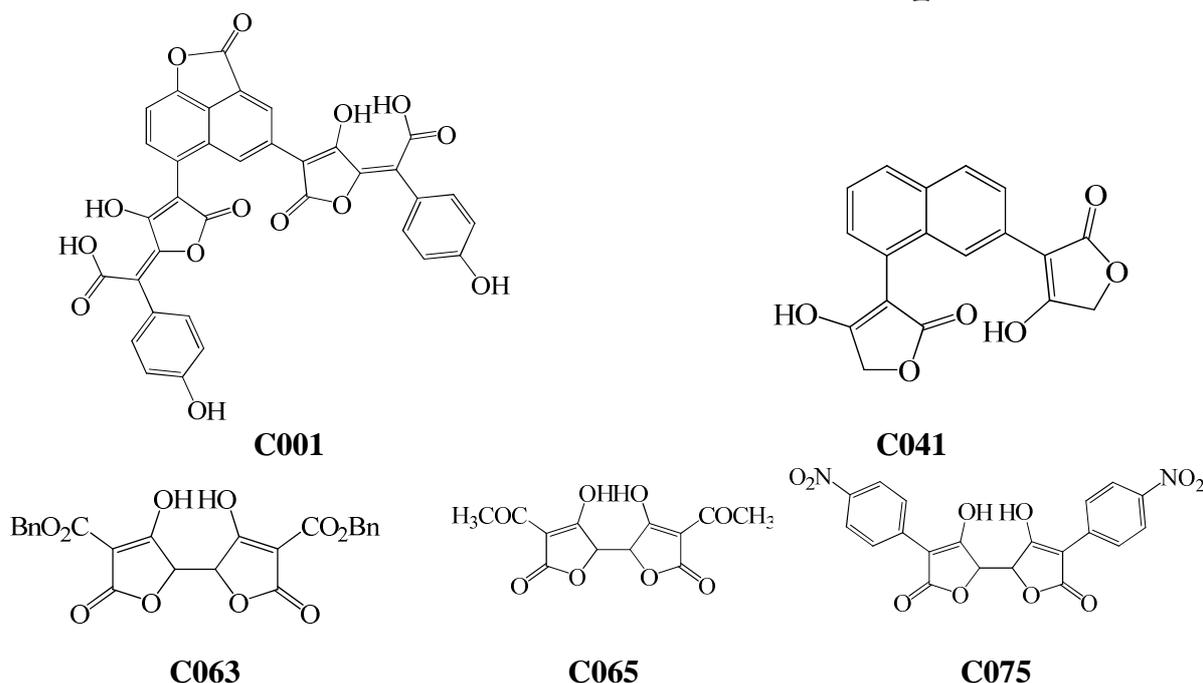
IV.4.4.b. Test de peroxydation lipidique

Les pourcentages de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique des composés présentant des cycles lactones (**C106** et **C107**) sont très proches. **C107** reste comme pour le test à l'ABTS légèrement plus actif que **C106**. Comme précédemment (paragraphe Modification selon X, $R_1 = \text{PhOMe}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$), la substitution de l'oxygène par l'azote dans le cycle permet une forte augmentation des propriétés de protection. Ainsi, il faut noter que le composé **C101** serait plus actif vis-à-vis de la peroxydation lipidique que la vitamine E car il permet une protection quasi-totale vis-à-vis de la peroxydation à 116 μM ainsi qu'à 24 μM (Tableau 21).

IV.4.5. Conclusion

La variation de X ou R1 de ce type de molécule induit une modification importante des propriétés antiradicalaires vis-à-vis du test à l'ABTS. De plus, il faut noter l'activité remarquable de cette famille de produits vis-à-vis des deux tests réalisés. En effet, parmi les 22 molécules testées, 9 permettent une protection supérieure à 30% à 116 μM et 4 permettent une protection supérieure ou égale à 50% à 116 μM vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Une molécule, **C101**, présente même une activité plus importante que celle de la vitamine E qui est le composé de référence de ce test.

IV.5. Evaluation des Dimères Pulviniques



N°	TEAC (μM)	Déviation Standard (μM)	LogP	% de protection	
				116 μM	Déviation Standard %
C001	1,13	0,01	-0,18	16,9	4,1
C041	1,14	0,01	-0,2	17,9	1,8
C075	6,01	0,59	2,49	-9,5	2,3
C065	62,55	18,45	-3,98	6,5	0,1
C063	Inactif	-	0,31	-49,2	1,8

Tableau 22 : Variations des propriétés antioxydantes et antiradicalaires des dimères pulviniques (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

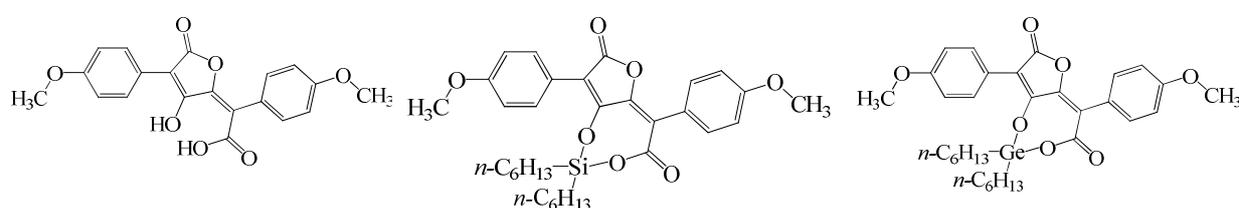
IV.5.1.a. Test à l'ABTS

Les molécules **C001** et **C041** font partie des molécules les plus actives de notre étude vis-à-vis du test à l'ABTS (Tableau 22). Cette activité relativement importante peut s'expliquer par la présence des groupements phénol (**C001**) et énol sur les deux cycles à 5 (**C041**). Les molécules **C063**, **C065** et **C075** présentent des activités très différentes, ce qui suppose une très forte influence des groupements R greffés sur la molécule. On notera que lorsque R est un ester, la molécule est inactive. Cependant, lorsque R est un aldéhyde, une activité intéressante commence à se dessiner. L'activité maximale de ce type de molécules a été obtenue pour R = PhNO₂.

IV.5.1.b. Test de peroxydation lipidique

Comme pour le test à l'ABTS, les molécules **C001** et **C041** sont actives dans ce test de peroxydation lipidique. Le second type de dimère pulvinique présenté ici paraît être nettement moins actif car **C065** est inactif et **C063** est fortement pro-oxydant (Tableau 22).

IV.6. Evaluation des Dérivés Organométalliques d'Acides Pulviques

**P1****P6****P7**

N°	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviation Standard %	24 μ M	Déviation Standard %
P7	5,06	0,28	ND	47,4	0,4	38,5	8,4
P1	6,48	0,44	0,84	67,0	0,9	24,5	1,3
P6	15,11	1,32	ND	-4,8	8,7	-11,9	5,8

Tableau 23 : Evaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organométalliques (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.6.1.a. Test à l'ABTS

Lorsque l'on compare le composé **P1** à ces dérivés organométalliques, on remarque une modification assez intéressante du TEAC. Ainsi, ici, le groupement organogermanié (**P7**) induit une augmentation des propriétés antiradicalaires de **P1** alors que le groupement organosilicié (**P6**) a un effet inverse.

IV.6.1.b. Test de peroxydation lipidique

Le composé **P1** permet une protection importante vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Cependant, ici, ce composé organique permet une meilleure protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique que ses dérivés organométalliques. La baisse de protection est alors de 20% pour le dérivé germanié (le composé silicié étant alors inactif) (Tableau 23).

IV.7. *Evaluation des Flavanoïdes*

Les Flavanoïdes ont été modifiés selon les groupements R_1 , R_2 et X (Figure 73):

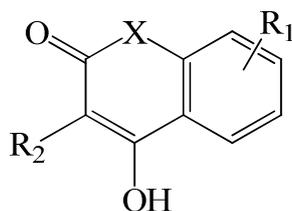
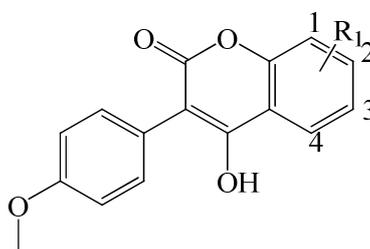


Figure 73 : Schéma général des Flavanoïdes

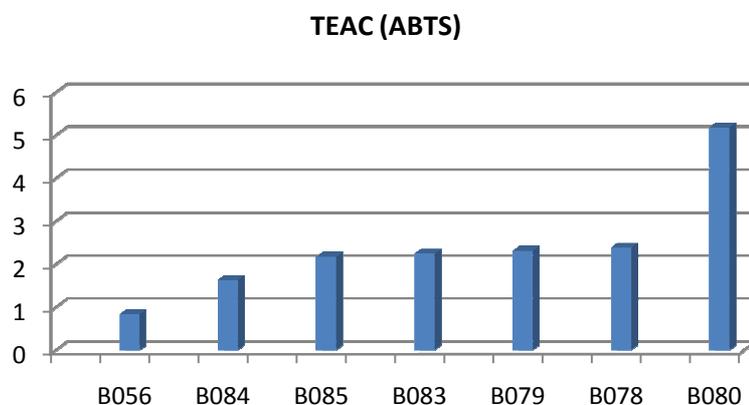
IV.7.1. Modification des flavanoïdes selon R_1 , $R_2 = PhOMe$, $X = O$ 

N°	R_1	N°	R_1
B056	H	B083	OCH ₃ (2)
B078	iPr (1)	B084	OCH ₃ (3)
B079	Cl (2)	B085	F (4)
B080	F (2)		

Figure 74 : Variation des flavanoïdes selon R_1

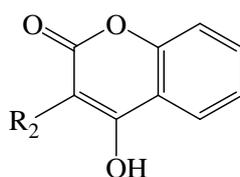
Nous remarquons tout d'abord que l'introduction d'un groupement $R_1 \neq H$ fait ici augmenter le TEAC et donc baisser les propriétés antiradicalaires. De plus, quel que soit le groupement $R_1 (\neq H)$ présent sur la structure du flavanoïde, on observe très peu de variations des propriétés antiradicalaires (Graphique 11). La molécule la plus active de cette série est **B056**. Parmi ces dérivés, seul **B082**, présenterait un faible pouvoir protecteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique (28,0% de protection à 116 μM). Ceci peut être dû au caractère relativement lipophile de ce type de molécules ($\log P > 2,45$).

En comparant **B056** et **B085** ou **B080**, nous avons supposé que l'effet -I du fluor permettrait une meilleure capture des radicaux. Cependant, ici, il semblerait que l'effet soit contraire, ce qui suppose d'autres considérations moléculaires soient prépondérantes.



Graphique 11 : Variations des propriétés antiradicalaires des flavanoïdes modifiés selon R_1

IV.7.2. Modification des flavanoïdes selon R_2 , $R_1 = H$, $X = O$

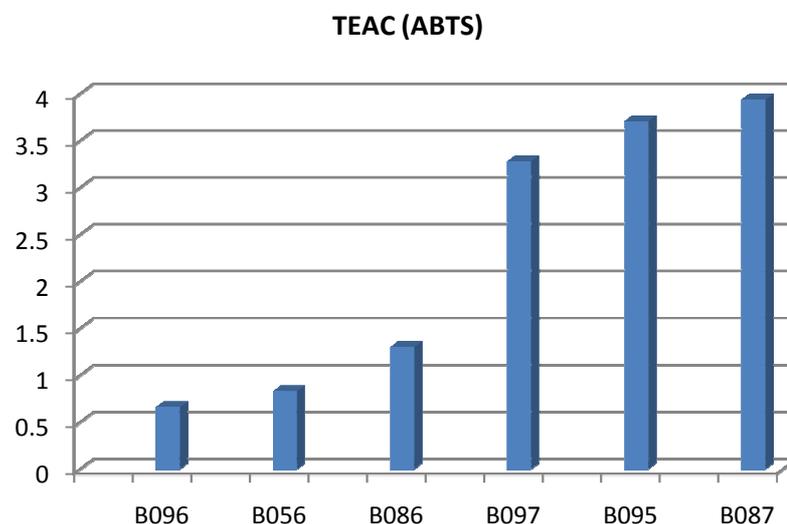


N°	R_2	N°	R_2
B056	Ph-OCH ₃ (p)	B095	Ph-SCH ₃ (p)
B086		B096	
B087	Ph-Br (p)	B097	Ph-OCH ₃ (o)

Figure 75 : Variations des flavanoïdes selon R_2

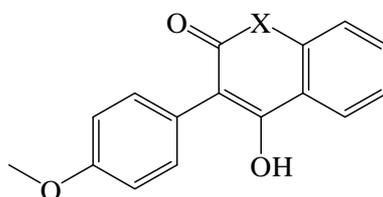
L'introduction d'un groupement R_2 fait ici varier le TEAC et donc les propriétés antiradicalaires des molécules. Les composés les plus actifs de cette série sont **B096** et **B056** (Graphique 12).

Comme précédemment, aucune des molécules testées ici ne présente de propriétés de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Ceci peut être dû au caractère relativement lipophile de ce type de molécules ($\log P > 2,45$).



Graphique 12 : Variations des propriétés antiradicalaires des flavanoïdes modifiés selon R_2

IV.7.3. Modification des flavonoïdes selon X, $R_1 = H$, $R_2 = PhOMe$



N°	X	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
					116 μM	Déviation Standard	24 μM	Déviation Standard
B056	O	0,83	0,15	2,58	3,8	1,0	-7,5	0,2
B094	NH	3,35	0,67	1,90	-1,4	2,8	-2,0	3,0

Tableau 24 : Evaluation des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés des flavanoïdes modifiés selon X (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

Le composé **B056** est l'une des molécules les plus actives de notre étude. Cependant, lorsque l'on modifie le cycle lactone en amide cyclique, l'activité antiradicalaire du flavonoïde vis-à-vis du radical cation $ABTS^+$ diminue (Tableau 24).

IV.8. Conclusion

En conclusion de cette étude sur les dérivés d'acide pulvinique, un ensemble de molécules présente des propriétés antioxydantes et antiradicalaires intéressantes. On notera en effet :

- L'activité antiradicalaire remarquable ($TEAC < 1$) des composés de l'ULP de Strasbourg **B042**, **B056**, **B096**, **B098** et du CEA **C049**, **C050**, **C054**, **C055**, **C078**, **C082**, **C083**.
- Les propriétés de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique de **P1**, **C058**, **C069**, **C100** à **C106**.
- La découverte de molécules très actives vis-à-vis de ces deux modèles (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique) : **B074**, **C020**, **C056**, **C107**.

Les résultats observés par l'ULP de Strasbourg sur l'activité antiradicalaire des deux régioisomères issus de la synthèse des acides pulviniques ont été confirmés. L'isomère 1 est bien le plus actif dans le test à l'ABTS.

De plus, il faut aussi noter l'effet des précurseurs organométalliques sur l'activité des acides pulviniques. En effet, bien qu'une légère baisse d'activité puisse être observée dans le test de peroxydation lipidique pour les molécules présentant un motif organogermanié, **P7** reste intéressant pour notre étude.

V. Evaluation Cellulaire

L'évaluation de la toxicité cellulaire de la Norbadione A et de certains acides pulviniques a été réalisée par le CEA sur des lignées cellulaires V79 (fibroblastes de poumon de hamster de Chine) par le Dr. F. Leteurtre (CEA, SBIGeM). La Norbadione A induit une toxicité cellulaire très importante, car dès 40 μ M, 50% de la croissance cellulaire est inhibée. Cependant, les autres acides pulviniques évalués ne présentent pas de toxicité cellulaire marquée.

VI. Evaluation in vivo

VI.1. Evaluation Toxicologique

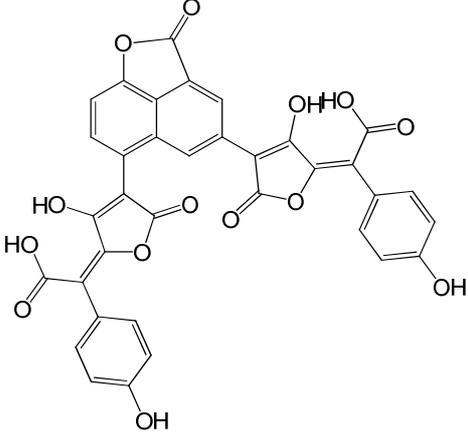
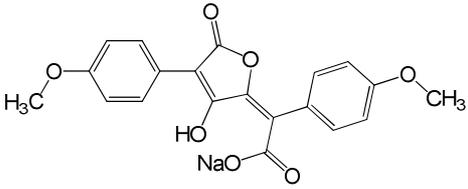
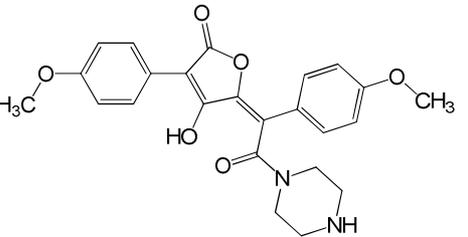
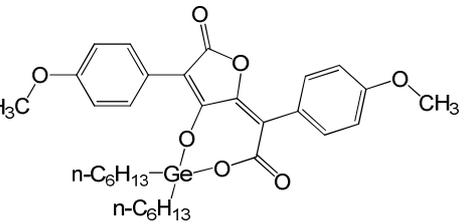
Molécule	DL50 (mg/kg)	Structure
C001	58	
C005	>136	
C008	>436	
P7	>128	

Tableau 25 : Données toxicologiques in vivo des dérivés d'acides pulviniques

Les résultats *in vitro* ont été confirmés par une étude *in vivo*. En effet, alors que la norbadione A (**C001**) présente une toxicité importante ($DL_{50tox/48h} = 58 \text{ mg/kg}$ (0,08 mmol/kg)) l'injection des acides pulviniques **C005** et **C008** par voie intrapéritonéale n'engendre aucun décès à la limite de solubilité correspondant respectivement à 136 mg/kg (0,35 mmol/kg) et à 436 mg/kg (1,00 mmol/kg). Le composé **P7** ne présente, comme son dérivé organique parent, aucune toxicité aigüe (Tableau 25).

VI.2. Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur

Le pouvoir radioprotecteur *in vivo* de ces composés a été évalué (Tableau 26). Seule une légère activité radioprotectrice a été observée pour le composé **C005** :

N°	Modèle Murin	Posologie (mg/kg)	Délai d'injection (IP)	% de survie à 30 jours	
				8,2 Gy	10,2 Gy
C005	Swiss – CD1	68	90 min	40	0
C008	Swiss – CD1	250	60 min	15	-
	Swiss – CD1	218	90 min	20	0
P7	Swiss – CD1	64	20 min	20	-

Tableau 26 : Données de radioprotection *in vivo* des dérivés d'acides pulviniques

VII. Conclusion

Ainsi, il a été synthétisé par notre groupe 7 acides pulviniques symétriques ou dissymétriques, organiques ou organométalliques. L'étude des propriétés biologiques de ces composés ainsi que de l'ensemble des dérivés de cette famille synthétisés par les équipes de l'ULP de Strasbourg et du CEA de Saclay a permis de mettre en évidence les propriétés antioxydantes et antiradicalaires de ce type de dérivés. Cependant, l'effet radioprotecteur de ces composés est relativement faible, ce qui limite leur utilisation en radioprotection. Ces molécules pourraient cependant être utilisées comme compléments afin de permettre l'inhibition des radicaux libres formés lors d'une irradiation.

Chapitre 2 :

Les Acides Salicyliques

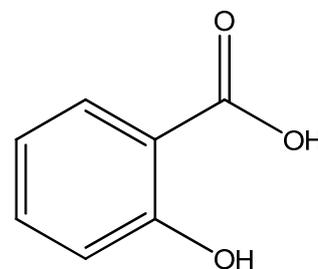
I. Caractéristiques et Propriétés

Les propriétés de l'acide salicylique sont connues depuis le 5^{ème} siècle av J.C. quand Hippocrate, rapporta les effets bénéfiques contre la douleur et la fièvre d'une poudre extraite de l'écorce de saule. Ce n'est cependant qu'en 1826 que J.A. Buchner isola la salicine en petite quantité. En 1828, H. Leroux isola de grandes quantités (30 g) de celle-ci. En 1838, R. Piria eut l'idée de convertir la salicine en un sucre et en un second produit qui était l'acide salicylique. En 1853, C. F. Gerhardt synthétisa pour la première fois ce dérivé^[179].

L'acide salicylique ou acide 2-hydroxybenzoïque est un composé naturel très connu pour ses propriétés biologiques. Ce β -hydroxyacide est synthétisé naturellement par certains végétaux tels que la reine des prés ou l'écorce de saule (salix en latin). Un de ses dérivés, le salicylate de méthyle, se trouve dans de nombreux fruits.

Les sels et les esters de l'acide salicylique sont appelés les salicylates. Sous forme cristalline, ces composés sont généralement incolores.

Ce produit est utilisé dans l'industrie en petites quantités comme conservateur alimentaire et antiseptique. En chimie organique, il est souvent utilisé comme « building block » pour la synthèse de molécules plus complexes.



Acide Salicylique

I.1. Propriétés Biologiques

Les propriétés biologiques et les applications des dérivés de l'acide salicylique sont larges. En effet, ces dérivés sont utilisés comme analgésique, antifongique, exfoliant, anti-inflammatoire...

En 1937, Adriaan Van Herk découvrit l'activité d'un composé agissant sur la thermogenèse végétale, qu'il appela le calorigène. En 1987, ce dernier fut identifié comme étant l'acide salicylique. Plus généralement, l'acide salicylique est une phytohormone nécessaire à la croissance et au développement des plantes. Il agit aussi sur la photosynthèse, le transport d'ions, etc.

La propriété la plus connue de l'acide salicylique est son action contre la fièvre, à laquelle s'ajoutent ses propriétés analgésiques et anti-inflammatoires. Actuellement, l'un de ses dérivés, plus actif, l'acide acétylsalicylique (Aspirine) est couramment utilisé. L'acide salicylique et ses dérivés sont, de plus, utilisés aujourd'hui pour leurs actions analgésiques comme complément de traitement de dermatologie comme par exemple pour traiter l'acné, les psoriasis, les verrues, l'hyperhidrose. Il permet simultanément la desquamation de la peau et la neutralisation des bactéries en limitant l'encombrement et l'encrassement des pores et en accélérant la croissance cellulaire. Par exemple, MOBILAT[®] Gel, et la crème MOVELAT[®], médicaments permettant, par leurs propriétés anti-inflammatoires et analgésiques, de lutter entre autres contre les douleurs musculaires et les rhumatismes, contiennent de l'acide salicylique ; dans LOCASALEN[®], l'acide salicylique permet une meilleure pénétration transépidermique et contribue aux effets bénéfiques de ce médicament.

Dans notre étude, les propriétés antioxydantes de ces dérivés seront exploitées pour inactiver les radicaux libres formés lors de l'irradiation. Il faut aussi noter que l'utilisation d'acide salicylique engendre des effets secondaires sur le système digestif (irritation gastrique, diarrhées, ulcères, etc.).

I.2. Voies de Synthèse

I.2.1. Biosynthèse

La biosynthèse de l'acide salicylique a été décrite récemment^[180, 181]. Elle passe, comme pour les acides pulviniques par la voie du shikimate (Figure 76). Le chorismate synthétisé subit alors plusieurs transformations enzymatiques permettant l'obtention de l'acide salicylique. La première voie de biosynthèse de cet acide correspond à la

transformation par la chorismate mutase (CM) du chorismate en L-Arogénate. La L-phénylalanine alors obtenue réagit comme substrat des phosphatases alcalines (PAL) aboutissant à l'acide *trans*-cinnamique. La voie de synthèse consiste alors en une décarboxylation de l'acide cinnamique en acide benzoïque. L'hydrolase BA2H (Benzoic Acid 2 Hydrolase) permet alors l'obtention de l'acide salicylique par hydroxylation en position 2.

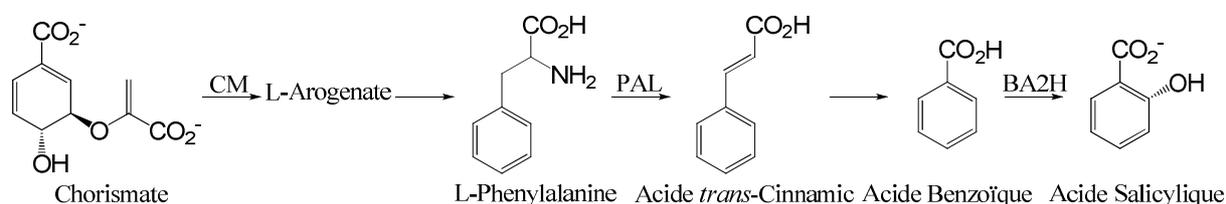
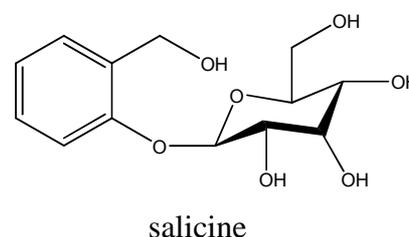


Figure 76 : Biosynthèse de l'acide salicylique

L'acide salicylique est alors en équilibre avec la salicine ou 2-(Hydroxyméthyl)phényl β-D-glucopyranoside. Ce composé est produit dans l'écorce de saule. Il présente des propriétés anti-inflammatoires proches de celles de l'aspirine.



La seconde voie de synthèse correspondrait à l'isomérisation régiosélective en isochorismate du chorismate par l'isochorismate synthase (ICS) (Figure 77). Dans les bactéries, la pyruvate lyase (PL) permet alors l'obtention de l'acide salicylique.

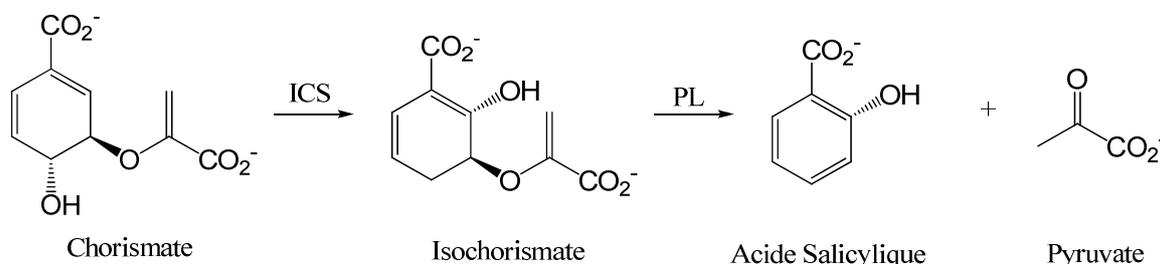


Figure 77 : Voie ICS

1.2.2. Synthèse industrielle

La synthèse industrielle de ce type d'acide se fait par réaction de Kolbe-Schmitt à partir du phénol. On obtient alors un sel qui, après hydrolyse, conduit à l'acide salicylique (Figure 78):

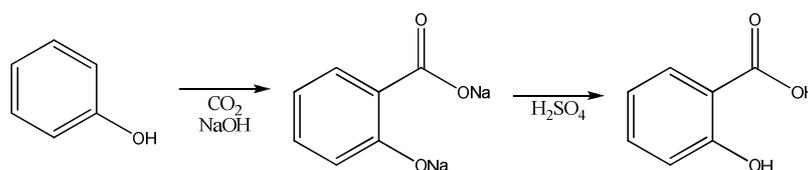


Figure 78 : Synthèse industrielle de l'acide salicylique

II. Synthèse

II.1. Les Dérivés d'Acides Salicyliques Étudiés Commerciaux

Six types de dérivés de l'acide salicylique disponibles commercialement ont été étudiés.

La première modification étudiée est la présence d'un groupement alkyl ou halogène sur la partie aromatique de l'acide salicylique (Figure 79) :

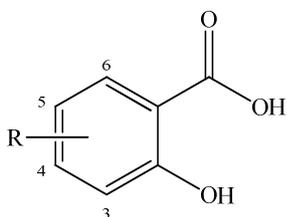


Figure 79 : Structure générale des acides salicyliques commerciaux

	R	N°
Alkyl	H	SC1
	3 Me	SC2
	4 Me	SC3
Halogène	5 I	SC4
	5 Br	SC5

De plus, il a été étudié le bioisostère d'acide salicylique où la fonction phénol est modifiée par la fonction thiophénol (Figure 80):

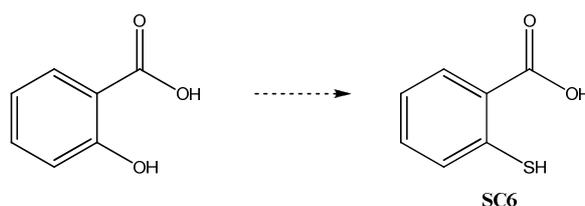


Figure 80 : L'acide thiosalicylique

II.2. Les Dérivés Organiques Synthétisés

A partir de l'acide thiosalicylique, il a été envisagé la formation d'une fonction amide au niveau de l'acide carboxylique. Différentes voies de synthèse ont été envisagées pour cela.

II.2.1. Introduction des aminoalcools

Les aminoalcools sont introduits par simple S_N2 dans un Dean-Starck permettant le déplacement de l'équilibre par élimination de l'eau (Figure 81). **S1** et **S2** sont ainsi obtenus :

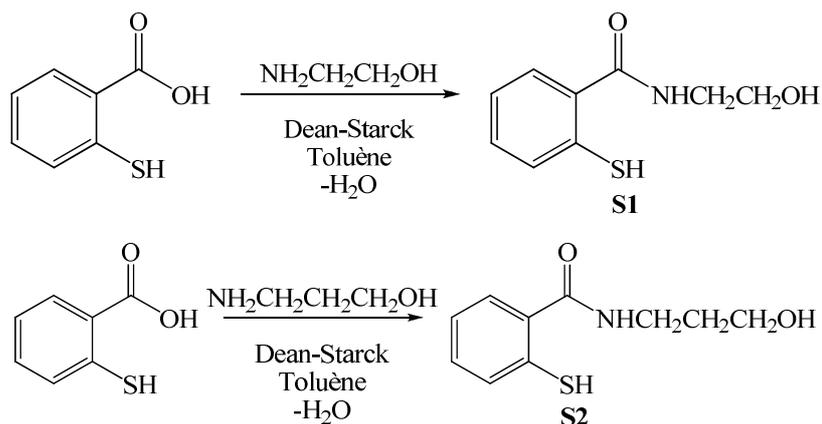


Figure 81 : Synthèse de S1 et S2

II.2.2. Introduction des aminothiols

La méthode de synthèse utilisant un Dean Starck nécessite un chauffage à 110°C. Cependant, lorsque cette méthode a été utilisée pour l'introduction de la cystéamine, un précipité blanc, insoluble dans la plupart des solvants usuels et correspondant a priori à un dimère de cystéamine, a été obtenu. Les rendements de la réaction sont alors très faibles, en raison de l'oxydation de la cystéamine. Ainsi, la méthode au dicyclohexylcarbodiimide (DCC), selon le protocole classique, a été réalisée. Cette méthode a en fait conduit à la formation d'un produit secondaire isolé puis recristallisé. La structure RX de **S3** (Figure 82) présente bien un système benzénique de longueur moyenne de liaison C/C de 1,39 Å et d'angle moyen de 120°. De plus, une liaison double est présente entre N₂ et C₈ (1,26 Å).

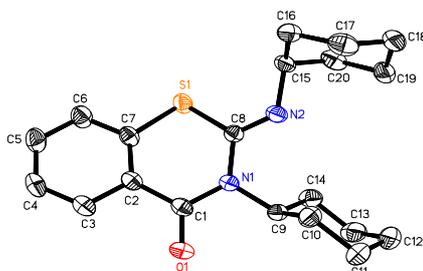


Figure 82 : Structure de S3

(les données complètes de cette structure sont données en Annexe 2)

Ainsi, la réaction se déroulant ici est (Figure 83):

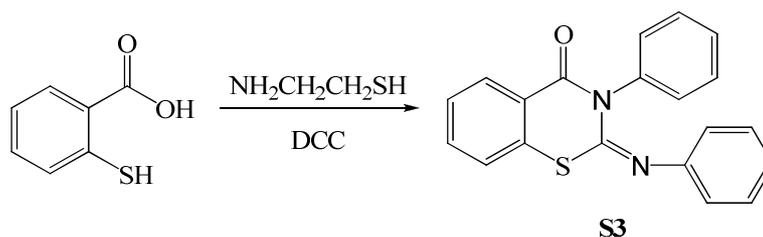


Figure 83 : Synthèse de S3

Le mécanisme supposé de cette réaction fait intervenir un mécanisme concerté où une S_N se réalise entre le soufre et le carbone du diène, et une S_N2t aboutit par déshydratation à la formation de l'amide (Figure 84). Un second équivalent de DCC est nécessaire pour permettre le déplacement de l'équilibre par élimination de l'eau :

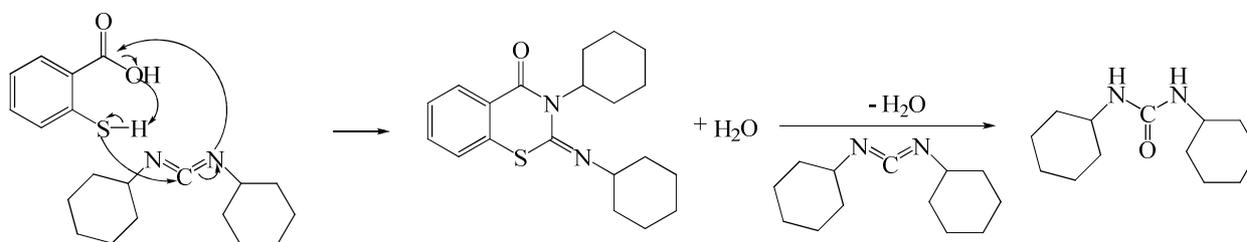


Figure 84 : Mécanisme possible de synthèse de S3

La dernière méthode consiste en une simple substitution nucléophile en présence de tamis moléculaire permettant le déplacement de l'équilibre par élimination de l'eau (Figure 85):

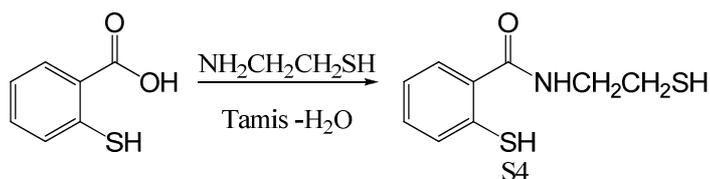
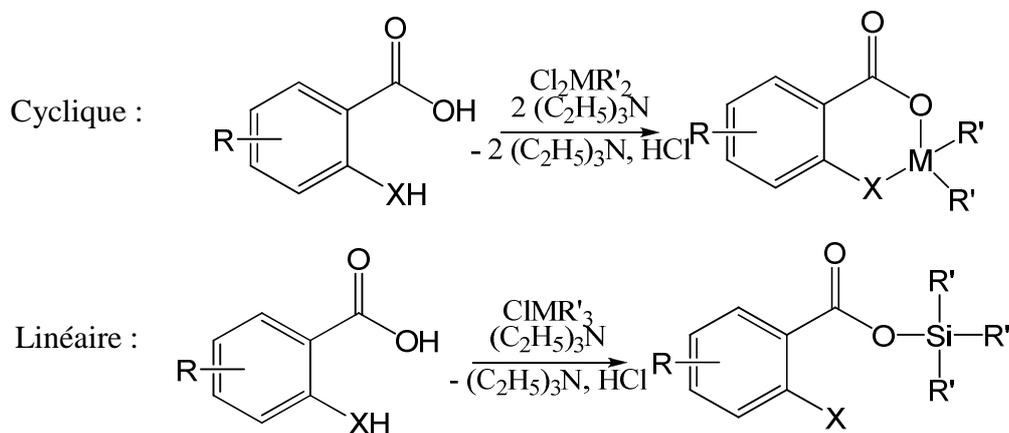


Figure 85 : Synthèse de S4

Cependant, cette réaction conduit à un composé qui est assez instable lorsqu'il est en contact avec l'air. Le produit de dégradation correspondrait, a priori, à l'oxyde d'amide présentant un pont disulfure (disparition des bandes SH observées en IR).

II.3. Les Dérivés Organométalliques Synthétisés

Certaines structures présentées précédemment ont été modifiées en introduisant un groupement organosilicié et organogermanié selon les protocoles classiques exposés dans le chapitre 2 de la partie 2 (Tableau 27).



Acide	R	X	M	R'	Voie	N°
Cyclique	H	O	Si	Me	A1	S5
	5 I	O	Si	Me	A1	S6
	H	S	Si	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	A1	S7
	H	S	Si	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	B1	S7
	H	S	Ge	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	A1	S8
	H	S	Ge	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	B1	S8
Linéaire	H	S	Si	C ₂ H ₅	A3	S9

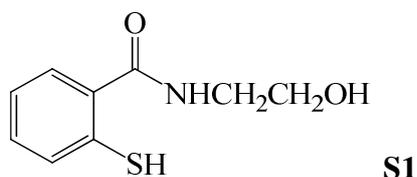
Tableau 27 : Récapitulatif des dérivés organométalliques synthétisés

III. Protocoles de Synthèse

III.1. Les Acides Salicyliques Organiques

III.1.1. Synthèse des Aminoalcools

III.1.1.a. Synthèse du N-(2-hydroxyéthyl)-2-mercaptobenzamide (S1)



A une solution d'acide thiosalicylique (4,00 g, 26,0 mmol) dans 200 ml de toluène anhydre est ajoutée l' aminoéthanol (3,33 g, 54,5 mmol, 2,1 équivalents). Le mélange est porté à reflux pendant 72 heures dans un Dean Stark (le volume d'eau récupéré dans le Dean Stark est constant). Les solvants sont alors évaporés à sec. Le résidu est trituré dans de l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche fine est suspension. Le solide est éliminé par filtration. 2 volumes de pentane sont ajoutés au filtrat. Le précipité formé est récupéré par filtration.

On obtient 3,56 g de produit (18,1 mmol, Rdt : 69,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

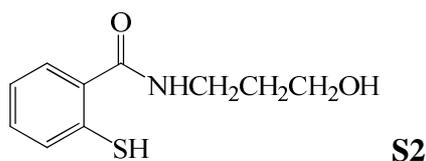
RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,92 (t, J = 5,2Hz, 2H, CH₂CH₂OH), 3,65 (t, J = 5,2Hz, 2H, NCH₂CH₂), 7,12 (t, J = 7,2Hz, 1H_{Ar}), 7,25 (t, J = 7,2Hz, 1 H_{Ar}), 7,50 (d, J = 7,9Hz, 1 H_{Ar}), 7,89 (d, J = 7,2Hz, 1 H_{Ar}), 7,92-8,0 (b, 1H, NH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 41,9 (CH₂N), 58,4 (CH₂O), 124,6 (CH_{Ar}), 124,9 (CH_{Ar}), 130,1 (CH_{Ar}), 136,9 (C_{Ar}-SH), 138,5 (C_{Ar}-CO), 170,8 (C=O)

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 198 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3471,2, ν_{NH} = 2875, ν_{SH} = 2454, ν_{CO} = 1633

Analyse élémentaire (C₉H₁₁NO₂S) :
 Calc.% : C, 54,80 ; H, 5,62 ; N, 7,10
 Exp.% : C, 55,13 ; H, 5,51 ; N, 7,44

III.1.1.b. Synthèse du *N*-(3-hydroxypropyl)-2-mercaptobenzamide (S2)

A une solution d'acide thiosalicylique (4,00 g, 26,0 mmol) dans 200 ml de toluène anhydre est ajouté l'aminopropanol (4,09 g, 54,5 mmol, 2,1 équivalents). Le mélange est porté à reflux pendant 72 heures dans un Dean Stark (le volume d'eau récupéré dans le Dean Stark est constant). Les solvants sont alors évaporés à sec. Le résidu est trituré dans de l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche fine en suspension. Le solide est éliminé par filtration. 2 volumes de pentane sont ajoutés au filtrat. Le précipité formé est récupéré par filtration.

On obtient 3,96 g de produit (18,9 mmol, Rdt : 72,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,72 (p, J = 7,3Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,87 (t, J = 7,2Hz, 2H, CH₂N), 3,33 (b, 2H, OH+SH), 3,51 (t, J = 6,0Hz, 2H, CH₂OH), 7,09 (t, J = 7,4Hz, 1H_{Ar}), 7,21 (t, J = 7,9Hz, 1H_{Ar}), 7,48 (d, J = 8,1Hz, 1H_{Ar}), 7,85 (d, J = 7,5Hz, 1 H_{Ar})

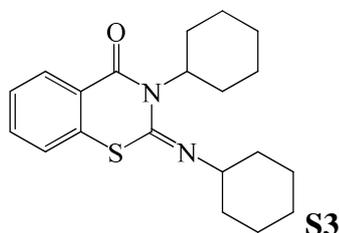
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 30,9 (CH₂), 36,9 (CH₂), 58,3 (CH₂), 124,5 (CH_{Ar}), 124,7 (CH_{Ar}), 129,7 (CH_{Ar}), 130,9 (CH_{Ar}), 137,5 (C_{Ar}-SH), 138,5 (C_{Ar}-CO), 170,2 (C=O)

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 210 [M-1]⁺, 212 [MH]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3452,8, ν_{NH} = 3177, ν_{SH} = 2361, ν_{CO} = 1605

Analyse élémentaire (C₁₀H₁₃NO₂S) : Calc.% : C, 56,85 ; H, 6,20 ; N, 6,63

Exp.% : C, 56,78 ; H, 6,51 ; N, 6,14

III.1.2. Synthèse des AminothiolsIII.1.2.a. Synthèse du 3-cyclohexyl-2-(cyclohexylimino)-benzothiazin-4-one (S3)

A une solution d'acide thiosalicylique (2,00 g, 12,97 mmol) dans le THF sec (54 ml) est ajouté du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (5,88 g, 28,54 mmol, 2,2 équivalents) et du N-hydroxysuccinimide (2,99 g, 25,94 mmol, 2 équivalents). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 jours sous argon.

Le mélange est filtré puis la solution est concentrée sous vide. Le résidu est lavé à l'eau puis récupéré. On recristallise alors le précipité obtenu dans le THF puis une seconde recristallisation est réalisée dans un mélange toluène/pentane (1/1). Après filtration, on récupère 4,12 g de produit sous forme d'aiguilles blanches (12,04 mmol, Rdt : 92,8%).

Caractérisation

Aspect : Aiguilles blanches

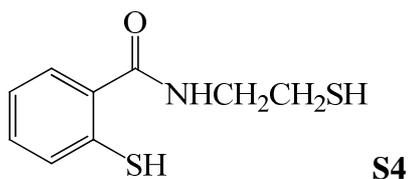
RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,02 - 1,54 (m, 8H, CH₂), 1,54 - 1,97 (m, 12H, CH₂), 3,46 - 3,63 (m, 1H, CH), 4,85 - 4,97 (m, 1H, CH), 7,41 - 7,85 (m, 2H_{Ar}), 7,61 (t, J = 7,8Hz, 1H_{Ar}), 8,14 (dd, J = 8,2Hz, 1H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 24,1 (CH₂), 25,8 (CH₂), 26,7 (CH₂), 29,3 (CH₂), 33,3 (CH₂), 58,3 (HC-N), 58,6 (HC-N), 124,6 (C_{Ar}), 125,7 (CH_{Ar}), 127,2 (CH_{Ar}), 130,9 (CH_{Ar}), 131,6 (C_{Ar}), 133,8 (CH_{Ar}), 140,6 (C=N), 162,5 (C=O)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 343 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1687

Analyse élémentaire (C₂₀H₂₆N₂OS) : Calc.% : C, 70,14 ; H, 7,65 ; N, 8,18
Exp.% : C, 70,84 ; H, 7,12 ; N, 7,64

III.1.2.b. Synthèse du 2-mercapto-*N*-(2-mercaptoéthyl)benzamide (S4)

L'ensemble des solvants utilisés pour cette synthèse et son traitement seront utilisés anhydre et, de plus, ils seront dégazés par barbotage d'argon pendant 30 minutes juste avant utilisation.

A une solution d'acide thiosalicylique (4,00 g, 25,97 mmol) dans du THF anhydre dégazé (320 ml) est ajouté, sous argon, du tamis moléculaire activé de 4 Å puis de la cystéamine (2,10 g, 27,27 mmol, 1,05 équivalents). Le mélange réactionnel est agité pendant 4 jours sous argon. Le mélange se colore en bleu turquoise. Le tamis moléculaire est éliminé par filtration du mélange réactionnel sous argon, puis les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est trituré dans l'éther anhydre et dégazé pour éliminer l'acide thiosalicylique n'ayant pas réagi, puis le précipité obtenu est récupéré par filtration avant d'être dissous dans un minimum d'acétate d'éthyle dégazé. La phase organique est alors lavée avec 20 ml d'eau dégazée, récupérée par canulation, puis séchée sur sulfate de magnésium et évaporée à sec sous vide. On dissout à chaud le produit obtenu dans du THF anhydre dégazé puis on ajoute deux volume de pentane anhydre dégazé. Le précipité formé est récupéré par filtration.

On obtient 4,12 g de produit sous forme d'une poudre blanche (19,34 mmol, Rdt : 74,5%). Le produit est conservé sous argon.

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,92 (t, J = 6,1Hz, 2H, CH₂CH₂SH), 3,05 - 3,12 (m, 3H, NCH₂CH₂+SH), 7,12 - 7,20 (m, 2H, 1H_{Ar}+NH), 7,48 (t, J = 8,0z, 1H_{Ar}), 7,86 (d, J = 8,0Hz, 1H_{Ar}), 7,98 (d, J = 7,0Hz, 1H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 55,3 (CH₂N), 55,6 (CH₂S), 113,0 (CH_{Ar}), 125,2 (CH_{Ar}), 128,6 (CH_{Ar}), 129,1 (CH_{Ar}), 130,8 (C_{Ar}), 171,7 (C=O)

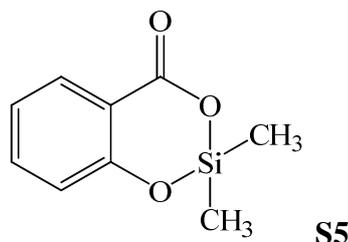
Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 214 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{NH} = 2794, ν_{SH} = 2494 et 2375 et ν_{CO} = 1772

III.2. Les Acides Salicyliques Organométalliques

III.2.1. Synthèse des dérivés de l'acide salicylique

III.2.1.a. Synthèse du 2,2-diméthylbenzodioxasilin-4-one (S5)



Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,00 g de **SC1** (7,24 mmol) dans 90 ml de THF anhydre

1,50 g de triéthylamine (14,85 mmol, 2,05 équivalents)

0,97 g de dichlorodiméthylsilane (7,61 mmol, 1,05 équivalents)

dans 45 ml de THF anhydre.

On récupère 1,33 g de produit (6,88 mmol, Rdt : 95,0%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,10 (m, 3H, CH₃), 6,90 - 6,99 (m, 2H_{Ar}), 7,49 - 7,56 (m, 1H_{Ar}), 7,81 (dd, J = 7,9Hz, 1H_{Ar}).

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,6 (CH₃), 112,7 (C_{Ar}-CO₂), 116,9 (CH_{Ar}), 119,0 (CH_{Ar}), 130,1 (CH_{Ar}), 135,5 (CH_{Ar}), 161,0 (C_{Ar}-O), 171,8 (C=O).

RMN ²⁹Si (59,63 MHz, DMSO, δ, ppm) : -18,56.

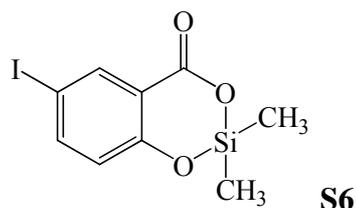
Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 195 [MH]⁺, 212 [MNH₄]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1681

Analyse élémentaire (C₉H₁₀O₃Si): Calc.% : C, 55,65 ; H, 5,19

Exp.% : C, 55,94 ; H, 5,13

III.2.1.b. Synthèse du 6-iodo-2,2-diméthylbenzodioxasilin-4-one (S6)



Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,00 g de **SC4** (3,79 mmol) dans 45 ml de THF anhydre

0,79 g de triéthylamine (7,77 mmol, 2,05 équivalents)

0,51 g de dichlorodiméthylsilane (3,98 mmol, 1,05 équivalents)

dans 25 ml de THF anhydre.

On récupère 1,00 g de produit (3,12 mmol, Rdt : 82,3%).

Caractérisation

Aspect : Poudre Blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,09 (m, 3H, CH₃), 6,82 (d, J = 8,7Hz, 1 H_{Ar}), 7,79 (dd, J = 8,7Hz, 1H), 8,03 (d, J = 2,3Hz, 1H)

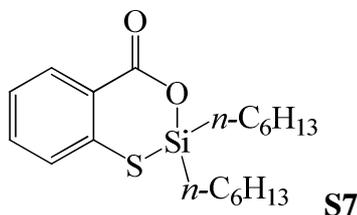
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,7 (CH₃), 81,1 (C_{Ar}-I), 116,1 (C_{Ar}-CO₂), 120,4 (CH_{Ar}), 138,6 (CH_{Ar}), 144,0 (CH_{Ar}), 161,1 (C_{Ar}-O), 171,0 (C=O)

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 321 [MH]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1670

Analyse élémentaire (C₉H₉IO₃Si): Calc.% : C, 33,76 ; H, 2,83

Exp.% : C, 33,54 ; H, 3,04

III.2.2. Synthèse des dérivés de l'acide thiosalicyliqueIII.2.2.a. Synthèse du 2,2-di-*n*-hexylbenzooxathiasilin-4-one (S7)Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **SC6** (6,49 mmol) dans 60 ml de THF anhydre
 - 1,35 g de triéthylamine (13,31 mmol, 2,05 équivalents)
 - 1,83 g de dichlorodi-*n*-hexylsilane (6,82 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 2,11 g de produit (6,03 mmol, Rdt : 92,9%).

Voie B1

Le protocole décrit pour la voie B1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **SC6** (6,49 mmol) dans 60 ml de THF anhydre
 - 2,33 g de bis(diéthylamino)di-*n*-hexylsilane (6,82 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 2,22 g de produit (6,35 mmol, Rdt : 97,8%).

Caractérisation

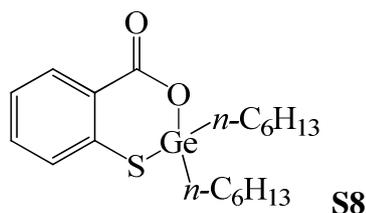
Aspect : Poudre beige

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,14 - 0,44 (m, 4H, C₆H₁₃), 0,46 - 0,70 (m, 6H, C₆H₁₃), 0,79 - 1,44 (m, 16H, C₆H₁₃), 7,11 - 7,21 (m, 1H, Ar), 7,40 (t, J = 8,0Hz, 1H_{Ar}), 7,53 (dd, J = 8,0Hz, 1H_{Ar}), 7,93 (dd, J = 7,0Hz, 1H_{Ar})

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 351 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₉H₃₀O₂SSi) : Calc.% : C, 65,09 ; H, 8,62
Exp.% : C, 65,06 ; H, 7,94

III.2.2.b. Synthèse du 2,2-di-*n*-hexylbenzooxathiagermin-4-one (S8)



Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **SC6** (6,49 mmol) dans 60 ml de THF anhydre
 - 1,35 g de triéthylamine (13,31 mmol, 2,05 équivalents)
 - 2,14 g de dichlorodi-*n*-hexylgermane (6,82 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 2,43 g de produit (6,14 mmol, Rdt : 94,6%).

Voie B1

Le protocole décrit pour la voie B1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **SC6** (6,49 mmol) dans 60 ml de THF anhydre
 - 2,65 g de bis(diéthylamino)di-*n*-hexylgermane (6,82 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 2,47 g de produit (6,26 mmol, Rdt : 96,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre beige

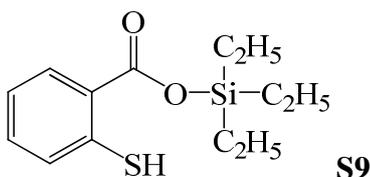
RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,72 - 0,85 (m, 8H, C₆H₁₃), 0,95 - 1,42 (m, 12H, C₆H₁₃), 1,50 - 1,75 (m, 6H, C₆H₁₃), 7,08 - 7,31 (m, 1H, Ar), 7,44 (t, J = 8,2Hz, 1H_{Ar}), 7,55 (dd, J = 8,0Hz, 1H_{Ar}), 7,99 (dd, J = 7,1Hz, 1H_{Ar})

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 397 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₉H₃₀GeO₂S) : Calc.% : C, 57,75 ; H, 7,65

Exp.% : C, 58,21 ; H, 7,95

III.2.2.c. Synthèse du triéthylsilyl 2-mercaptopbenzoate



Voie A3

Le protocole décrit pour la voie A3, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **SC6** (6,49 mmol) dans 60 ml de THF anhydre
- 0,69 g de triéthylamine (6,82 mmol, 1,05 équivalents)
- 1,02 g de chlorotriéthylsilane (6,82 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,68 g de produit (6,25 mmol, Rdt : 96,3%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,46 (q, J = 7,9Hz, 6H, CH₂), 0,91 (t, J = 7,8Hz, 9H, CH₃), 7,23 (t, J = 7,8Hz, 1H_{Ar}), 7,04 (t, J = 7,3Hz, 1H_{Ar}), 7,54 (dd, J = 7,0Hz, 1H_{Ar}), 7,93 (dd, J = 7,8Hz, 1H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 6,2 (CH₃), 7,2 (CH₂), 125,0 (CH_{Ar}), 128,6 (C_{Ar}), 131,4 (CH_{Ar}), 131,9 (CH_{Ar}), 132,9 (CH_{Ar}), 139,5 (C_{Ar}), 168,1 (C=O).

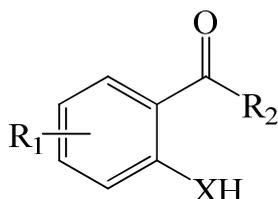
Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 268 [M]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2517, ν_{CO} = 1682

IV. Evaluation in vitro

IV.1. Evaluation des Dérivés Organiques

Le tableau 28 récapitule les résultats obtenus pour les dérivés organiques de l'acide salicylique que nous avons étudiés, de formule générale suivante :



N°	R ₁	R ₂	X	TEAC	Déviaton Standard
SC1	H	OH	O	Inactif	-
SC2	3Me	OH	O	Inactif	-
SC3	4Me	OH	O	Inactif	-
SC4	5I	OH	O	105,03	4,21
SC5	5Br	OH	O	Inactif	-
SC6	H	OH	S	0,71	0,03
S2	H		S	0,63	0,01
S3	H	DCC	S	Inactif	-

Tableau 28 : Variations des propriétés antiradicalaires des dérivés organiques de l'acide salicylique (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

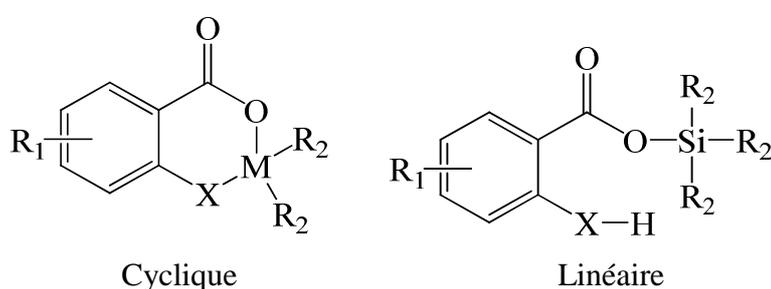
A partir du tableau 28, nous pouvons remarquer l'importance du groupement noté X. En effet, alors que les composés où X = O sont inactifs vis-à-vis du test à l'ABTS, les dérivés où X = S sont, en général, de meilleurs antioxydants que le Trolox. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que le site de capture des radicaux se trouve au niveau de la fonction thiophénol. Cette remarque a été confirmée par l'étude de S3. Dans S3, la fonction thiol n'est plus libre. Le composé est alors logiquement inactif.

Ensuite, par comparaison de SC6 avec S2, nous remarquons que la présence d'un groupement amide permet une meilleure inhibition des radicaux libres que le groupement acide carboxylique. Cet effet avait déjà été évoqué lors de l'étude des acides pulviniques.

Cependant, bien que les dérivés de l'acide thiosalicylique soient relativement actifs vis-à-vis du test à l'ABTS, aucune activité de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique n'a été prouvée. Seul le composé **SC1** (60,2% de protection à 116 μM ; 20,7% de protection à 24 μM), qui est l'acide salicylique, présente des propriétés intéressantes de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique.

IV.2. Evaluation des Dérivés Organométalliques

Le tableau 29 récapitule les résultats obtenus pour les dérivés organométalliques de l'acide salicylique synthétisés de formule générale suivante :



N°	Type	R ₁	X	R ₂	M	TEAC	Dévi- Standard
SC1	-	H	O	-	-	Inactif	-
SC6	-	H	S	-	-	0,71	0,03
S5	Cyclique	H	O	Me	Si	inactif	-
S6	Cyclique	5I	O	Me	Si	46,31	8,14
S8	Cyclique	H	S	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	Ge	0,60	0,02
S9	Linéaire	H	S	C ₂ H ₅	Si	4,22	0,07

Tableau 29 : Variations des propriétés antiradicalaires des dérivés organométalliques de l'acide salicylique (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

Nous remarquons tout d'abord que, malgré l'introduction des précurseurs organométalliques, aucune activité n'est remarquée pour **S5** et **S6** vis-à-vis du radical cation ABTS⁺. Dans la série des acides thiosalicyliques (X = S), cette étude montre qu'une modification cyclique (**S8**) engendre une baisse du TEAC, alors qu'une modification linéaire produit une diminution des propriétés antiradicalaires (**S9**).

Aucun de ces composés n'est cependant actif vis-à-vis de la peroxydation lipidique.

V. Evaluation *in vivo*

V.1. Evaluation Toxicologique

Molécule	DL ₅₀ (mg/kg)	DL ₅₀ (mmol/kg)
SC6	198,1	1,28
S8	286,1	0,72

Tableau 30 : Données toxicologiques *in vivo* des acides salicyliques

Cette évaluation toxicologique montre que les deux dérivés testés sont relativement peu toxiques.

V.2. Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur

Le pouvoir radioprotecteur *in vivo* de ces composés a été évalué :

N°	Modèle Murin	Posologie (mg/kg)	Posologie (mmol/kg)	Délai d'injection (IP)	% de survie à 8,2 Gy
SC6	Swiss – CD1	99,05	0,64	20 min	40
S8	Swiss – CD1	143,05	0,36	20 min	20

Tableau 31 : Données radiopharmacologiques *in vivo* des acides salicyliques

Au regard de ces résultats, on observe que les deux dérivés de l'acide thiosalicylique, bien que relativement antioxydants, ne permettent qu'une très faible protection des souris vis-à-vis des rayonnements ionisants (Tableau 31).

VI. Conclusion

L'étude des propriétés antiradicalaires des dérivés de l'acide salicylique a montré l'importance du groupement thiophénol permettant une capture des radicaux beaucoup plus importante que le groupement phénol. De plus, la fonction acide carboxylique est, comme dans le cas des acides pulviniques, moins active que la fonction amide dans le test à l'ABTS. L'introduction d'un groupement organométallique cyclique permet aussi une amélioration conséquente des propriétés antiradicalaires de ces composés. Cependant, l'étude radiopharmacologique *in vivo* n'a montré qu'un effet radioprotecteur très limité, imposant ce type de molécule comme complément de traitement associé à une molécule à fort potentiel radioprotecteur.

Partie IV :
Modification et
Etude de Molécules
Radioprotectrices

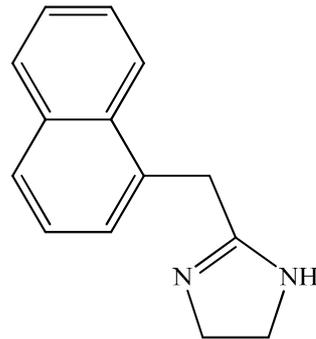
Chapitre 1 :

Les Dérivés de la NMI

I. Caractéristiques et Propriétés

La naphthylméthylimidazoline (NMI) est un composé contenant un noyau imidazole connu pour ses propriétés radioprotectrices. Ce noyau imidazole est lié à un groupement naphthalène, ce qui lui confère des propriétés biologiques intéressantes.

Depuis la découverte des propriétés biologiques, et plus particulièrement des propriétés radioprotectrices de ce « blockbuster », ce composé a fait l'objet de nombreuses études permettant l'obtention de composés phares en radioprotection chimique.



2-(naphthalen-1-ylmethyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole

I.1. Propriétés Biologiques

Les dérivés de la naphthylméthylimidazoline présentent des propriétés biologiques intéressantes dans de nombreux domaines tels que l'ophtalmologie où on le retrouve dans la composition de certains collyres pour le traitement des conjonctivites, ou en médecine générale dans le traitement des rhinites, laryngites, etc.^[182].

Ils ont été utilisés, entre autres, en tant qu'agonistes des α -adrénorécepteurs, comme antibactériens ou comme antifongiques. Les propriétés α -sympathomimétiques de la NMI sont à l'origine d'un effet vaso-constricteur^[183]. Les études menées par Bousquet *et al.* ont permis d'établir le mécanisme d'action de la naphthylméthylimidazoline dans l'organisme^[184]. En effet, il postule la présence de deux récepteurs I1 et I2 des imidazolines permettant, en cas

de stimulation, un effet hypotenseur central. Bien que l'existence de I1 soit contestée, I2 semblerait être l'aminooxydase. Payard *et al.* ont démontré aussi une affinité de la NMI pour ce type de récepteur^[185]. Ce composé est aussi un antagoniste des récepteurs dopaminergiques, ce qui explique son effet sédatif au niveau du système nerveux central.

De plus, Caroline Prouillac, durant sa thèse, a montré l'effet antioxydant et radioprotecteur de la NMI *in vitro*^[21, 186, 187].

Au cours de ces dernières années, la NMI a été beaucoup étudiée pour ses propriétés radioprotectrices. En effet, il a été constaté un FRD de 1,5 pour la NMI chez la souris à une dose de 30 mg/kg administrée par voie intrapéritonéale 15 minutes avant l'irradiation^[186].

Cet effet radioprotecteur intéressant *in vivo* peut être attribué à différentes propriétés telles que :

- L'effet hypotenseur
- Des propriétés antioxydantes
- D'autres effets et/ou une superposition de ces effets.

Cependant, la toxicité de ce composé n'est pas négligeable (50 mg/kg). Afin de limiter cette toxicité et améliorer les propriétés radioprotectrices de la NMI, de nombreux dérivés ont été synthétisés et étudiés ces dernières années (Tableau 32). Entre autres, les dérivés phosphorés suivants présentent des propriétés radioprotectrices remarquables^[101, 188].

Cependant, malgré toutes ces études, le mécanisme d'action impliqué dans l'effet radioprotecteur reste inconnu. Ainsi, nous avons réalisé la synthèse de nouveaux dérivés de la NMI afin de rechercher de nouveaux radioprotecteurs. Ces composés ont été testés *in vitro* afin d'essayer de mieux comprendre leur mode d'action possible.

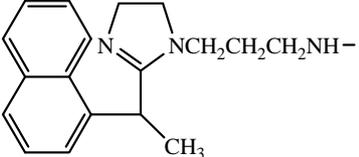
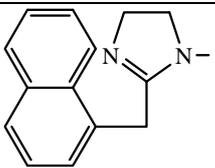
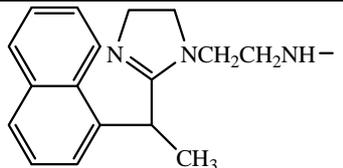
$ \begin{array}{c} R_2 \\ \\ R_1CH_2CHS-P-OH \\ \\ OH \end{array} $			
R ₁	R ₂	DL ₅₀ irradiation (Gy)	FRD
	H	10,10 ± 0,25	1,62
	CH ₃	11,44 ± 0,03	1,84
	CH ₃	9,90 ± 0,04	≈1,60

Tableau 32 : Détermination des FRD de phosphorothioates dérivés de la naphthylméthylimidazoline et de la naphthyléthylimidazoline chez la souris CD1

II. Synthèse

La synthèse des dérivés de la naphthylméthylimidazoline a déjà été explorée par notre groupe durant la thèse de B. Célariés. Les dérivés de la naphthylméthylimidazoline synthétisés durant cette thèse ont montré une activité radioprotectrice remarquable.

II.1. Synthèse de la NMI et de la NEI

II.1.1. Synthèse de la NMI

Ce dérivé est obtenu par traitement par une solution de soude du chlorhydrate commercial (Figure 86).

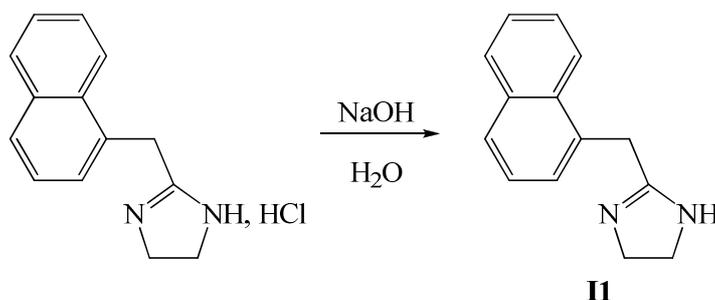


Figure 86 : Obtention de la NMI

Une autre voie de synthèse de la NMI consiste en la déshydratation de l'acide carboxylique précurseur, en présence de diaminoéthyle (Figure 87):

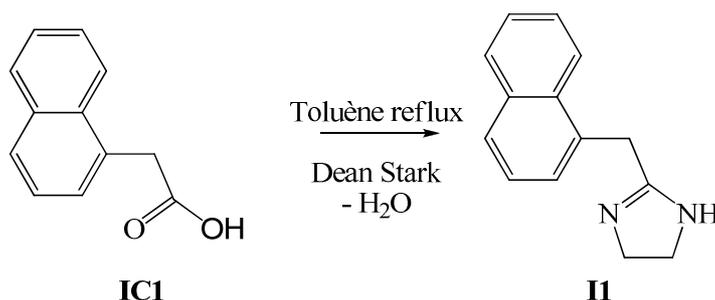


Figure 87 : Synthèse de la NMI par déshydratation

II.1.2. Synthèse de la NEI

Afin d'étudier la stabilisation du radical par les dérivés de la NMI, la naphthyléthylimidazoline (NEI), présentant seulement une substitution du proton du pont par un groupement méthyle, peut être étudiée.

Pour cela, il a dans un premier temps été nécessaire de protéger la fonction amine de la NMI par une fonction « Boc »^[110] (Figure 88) :

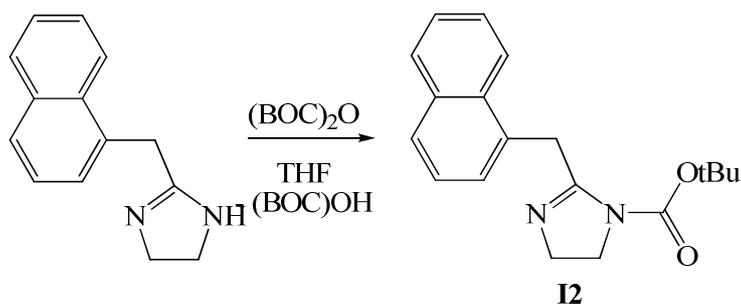


Figure 88 : Synthèse de 12

Puis, le méthyle a été introduit par substitution nucléophile de l'intermédiaire lithié par l'iodure de méthyle (Figure 89):

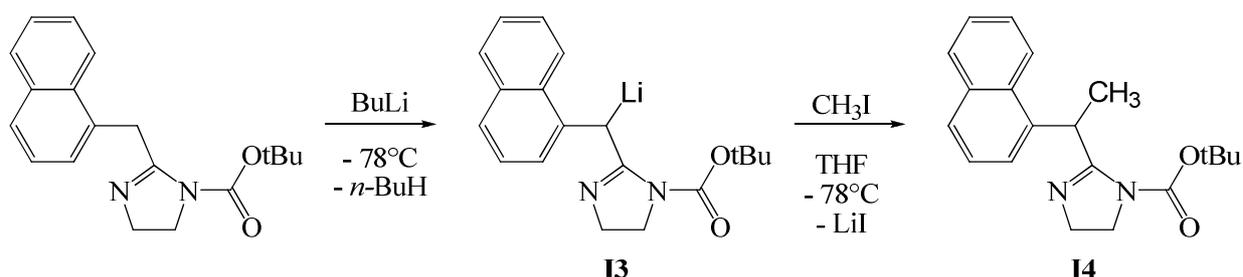


Figure 89 : Synthèse de 14

Le composé est ensuite déprotégé en milieu acide fort pour donner la NEI (Figure 90):

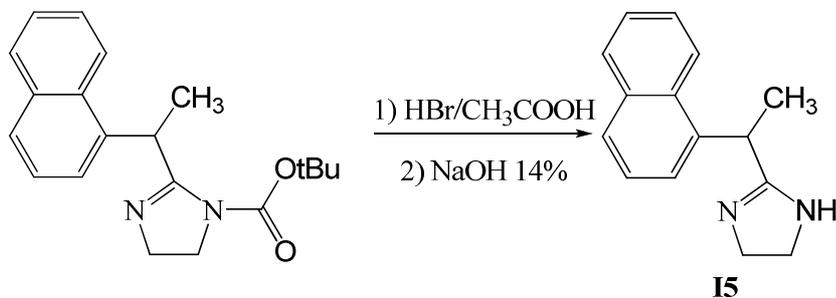


Figure 90 : Synthèse de la NEI

II.2. Synthèse des Thiols

A partir de ces composés, il peut être réalisé la synthèse de molécules hybrides associant deux motifs actifs en radioprotection : le motif « naphtylimidazoline » et les motifs « cystéamine », « WR-2721 », etc. (Figure 91).

Ainsi, la première molécule développée correspond au thiol **16** obtenu par réaction du méthylthiirane sur la NMI (Figure 91) :

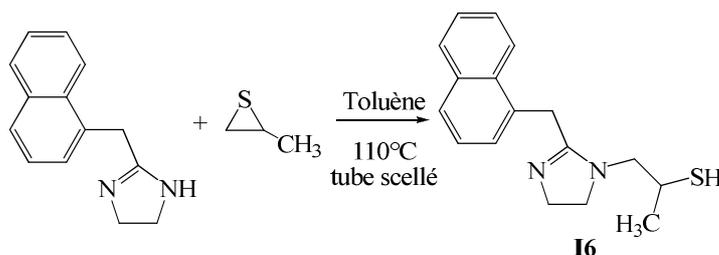


Figure 91 : Synthèse du thiol **16**

II.3. Synthèse des Phosphorothioates

Afin d'améliorer la métabolisation du dérivé, nous avons synthétisé le phosphorothioate correspondant à **16**. Pour cela, il a été réalisé la synthèse de l'intermédiaire **17** (Figure 92) :

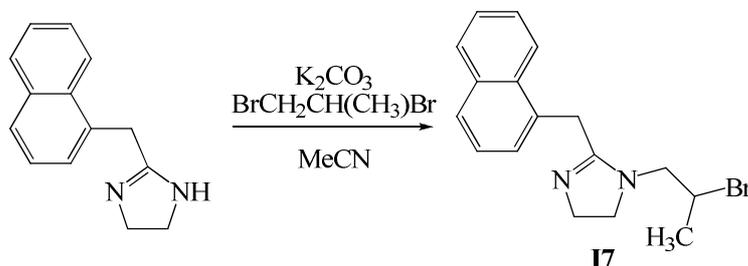


Figure 92 : Synthèse de **17**

La synthèse des molécules bimodales se termine par le greffage du thiophosphate (Figure 93) :

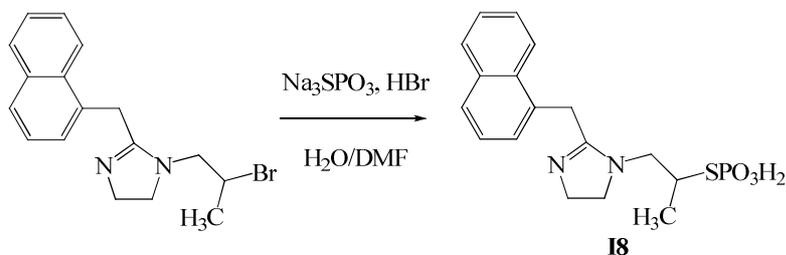
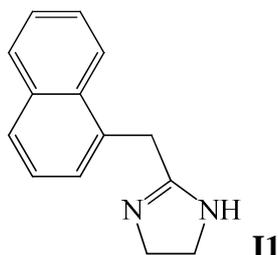


Figure 93 : Synthèse du phosphorothioate **18**

III. Protocoles de Synthèse

III.1. Synthèse de la NMI

Synthèse du 2-(naphthalèn-1-ylméthyl)-4,5-dihydroimidazole (NMI) (II)



A une solution de chlorhydrate de NMI commercial (13,27 g, 53,92 mmol) dans 13,2 ml d'eau distillée chaude sont ajoutés, sous agitation et au goutte à goutte, 12,51 g d'une solution à 2M de soude. Le précipité formé est dissous par addition de 220 ml de toluène. Le mélange est séparé par décantation. La phase organique est récupérée puis séchée sous Na_2SO_4 . Le mélange est filtré puis concentré sous vide. La recristallisation (deux fois) dans 220 ml d'un mélange THF/Ether (1/9) conduit à 10,25 g de produit attendu (48,81 mmol, Rdt : 90,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ^1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 3,48 (s, 4H, CH_2N), 4,01 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_7$ et NH), 7,36 - 7,61 (m, 4H, C_{10}H_7), 7,71 - 7,90 (dd, 2H, C_{10}H_7), 8,06 - 8,18 (m, 1H, C_{10}H_7)

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 34,4 (CH_2N), 51,3 ($\text{CH}_2\text{C}_{10}\text{H}_7$), 124,0 (CH_{Ar}), 125,6 (CH_{Ar}), 126,1 (CH_{Ar}), 126,6 (CH_{Ar}), 127,5 (CH_{Ar}), 128,1 (CH_{Ar}), 128,7 (C_{Ar}), 132,2 (C_{Ar}), 132,4 (C_{Ar}), 133,91 (C_{Ar}), 166,36 ($\text{N}-\text{C}=\text{N}$)

Spectre de masse (EI, CHCl_3) : $m/z = 209$ $[\text{M}-1]^+$

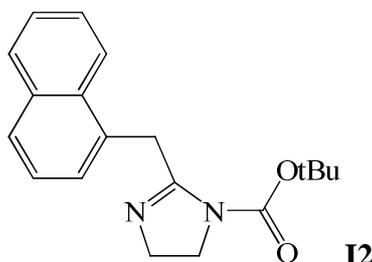
I.R. (cm^{-1}) : $\nu_{\text{NH}} = 3169$

Analyse élémentaire ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2$): Calc.% : C, 79,97 ; H, 6,71 ; N, 13,32

Exp.% : C, 79,87 ; H, 6,72 ; N, 13,37

III.2. Synthèse de la NEI

III.2.1. Synthèse du tertbutyl 2-(naphthalen-1-ylméthyl)-4,5-dihydroimidazole-1-carboxylate (I2)



A une solution de **I1** (20,00 g, 95,2 mmol) dans 500 ml de THF anhydre est ajoutée, goutte à goutte, une solution de (Boc)₂O (24,93 g, 114,2 mmol, 1,2 équivalents) dans 100 ml de THF anhydre. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4h. Les solvants sont alors éliminés sous vide.

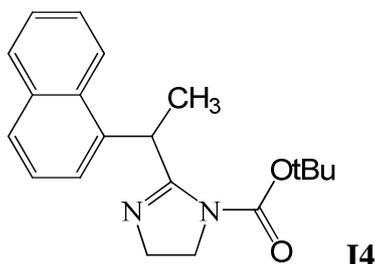
On obtient 26,21 g de **I2** (84,5 mmol, Rdt : 88,8%)

Caractérisation

Aspect: Gomme noire

RMN ¹H (300,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,35 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3,76 (s, 4H, NCH₂CH₂N), 4,49 (s, 2H, CH₂), 7,30 - 8,10 (m, 7H, Ar)

III.2.2. Synthèse du tertbutyl 2-(1-(naphthalèn-1-yl)éthyl)-4,5-dihydroimidazole-1-carboxylate (I4)



A une solution de **I2** (26,2 g, 84,5 mmol) dans 300 ml de THF à -78°C , sont ajoutés goutte à goutte 10,1 ml d'une solution de *n*-butyllithium dans l'hexane (6,5 g, 101,4 mmol, 10 M, 1,2 équivalents) diluée dans 50 ml de THF. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 2h à -78°C , puis une solution d'iodure de méthyle dans 50 ml de THF est ajoutée goutte à goutte. Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 3h. La solution est évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu est ensuite extrait avec 400 ml d'un mélange éther/pentane. Le précipité résiduel est éliminé par filtration. La solution est alors évaporée sous vide.

On récupère 21,8 g de **I4** (67,2 mmol, Rdt : 79,6%)

Caractérisation

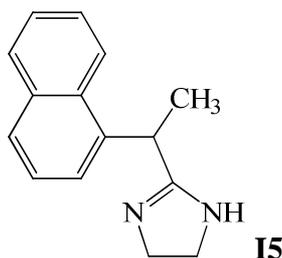
Aspect : Gomme Noire

RMN ^1H (300,13 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 0,99 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,41 (d, 3H, $J=7,0\text{Hz}$, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 3,57 (s, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 5,15 (q, 1H, $J=7,0\text{Hz}$, CH-CH_3), 7,20 - 8,00 (m, 7H, Ar)

RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 19,1 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 27,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 35,8 (CH-CH_3), 47,8 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 51,4 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 83,1 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 123,0 (CH_{Ar}), 123,3 (CH_{Ar}), 125,6 (CH_{Ar}), 125,8 (CH_{Ar}), 126,4 (CH_{Ar}), 127,6 (CH_{Ar}), 128,8 (CH_{Ar}), 131,1 (C_{Ar}), 150,7 (C_{Ar}), 165,4 (N-C=N)

Spectre de masse (EI, CHCl_3) : $m/z = 324$ $[\text{M}]^+$

III.2.3. Synthèse du 2-(1-(naphthalèn-1-yl)éthyl)-4,5-dihydroimidazole
(I5)



A une solution de **I4** (21,8 g, 67,2 mmol) dans 50 ml d'isopropanol sont ajoutés 150 ml d'acide chlorhydrique (5N). Le mélange est maintenu sous agitation pendant une nuit. Les solvants sont alors évaporés sous vide. Le résidu obtenu est trituré dans 100 ml d'une solution de soude 1M. On extrait alors avec 3×100 ml de dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄, puis filtrées. On évapore le filtrat sous vide.

On récupère 9,3 g de **I5** (41,5 mmol, Rdt : 61,7%)

Caractérisation

Aspect : Gomme noire

RMN ¹H (300,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,70 (d, 3H, J = 7,1Hz, CH₃-CH), 3,53 (s, 4H, NCH₂CH₂N), 4,39 (q, 1H, J = 7,1Hz, CH-CH₃), 7,09 (b, 1H, NH), 7,20 - 8,20 (m, 7H, Ar)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 19,0 (CH₃-CH), 35,5 (CH-CH₃), 47,8 (CH₂-N), 123,1 (CH_{Ar}), 124,6 (CH_{Ar}), 125,6 (CH_{Ar}), 126,0 (CH_{Ar}), 126,7 (CH_{Ar}), 128,1 (CH_{Ar}), 129,0 (CH_{Ar}), 131,2 (C_{Ar}), 133,9 (C_{Ar}), 136,7 (C_{Ar}), 171,8 (N-C=N)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 223 [M-1]⁺

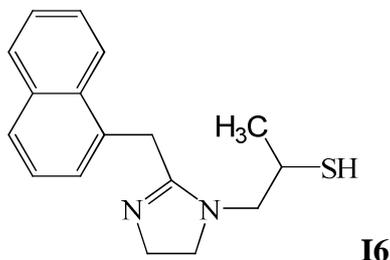
I.R. (cm⁻¹) : ν_{NH} = 3430

Analyse élémentaire (C₁₅H₁₆N₂) : Calc.% : C, 80,32 ; H, 7,19 ; N, 12,49

Exp.% : C, 80,70 ; H, 7,21 ; N, 12,09

III.3. Synthèse des Thiols et des Phosphorothioates

III.3.1. Synthèse du 1-(2-(naphthalèn-1-ylméthyl)-4,5-dihydroimidazol-1-yl)propane-2-thiol (I6)



Une solution de 5,00 g (25,16 mmol) de **I1** et de 1,87 g (25,16 mmol, 1,05 équivalents) de méthylthiirane dans 60 ml de toluène anhydre, est maintenue pendant 48 h, à 110°C, dans un tube scellé. 100 ml d'éther glacé sont ajoutés sous agitation sur le mélange réactionnel. Le précipité formé est alors éliminé par filtration. Le filtrat est concentré sous pression réduite et le résidu est repris dans 100 ml d'un mélange toluène-pentane (1/1). Le précipité correspondant à l'isomère de position est éliminé par filtration. On évapore le filtrat sous vide.

On récupère 2,51 g de **I6** (8,83 mmol, Rdt : 35,1%)

Caractérisation

Aspect : Gomme jaune pâle

RMN ¹H (300,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 2,13 (m, 4H, CH₃ et SH), 2,54 - 2,80 (m, 1H, CHS), 3,11 - 3,89 (m, 6H, CH₂N), 4,03 (s, 2H, CH₂-Ar), 7,30 - 7,52 (m, 4H, H_{Ar}), 7,61 - 7,85 (m, 2H, H_{Ar}), 7,99 - 8,24 (m, 1H, H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 29,2 (CH₃CH), 29,8 (CHSH), 40,7 (CH₂-C₁₀H₇), 44,7 (CH₂N), 46,1 (CH₂N), 50,3 (CHCH₂N), 123,9 (CH_{Ar}), 126,1 (CH_{Ar}), 127,4 (CH_{Ar}), 128,4 (CH_{Ar}), 129,1 (CH_{Ar}), 129,2 (CH_{Ar}), 129,4 (CH_{Ar}), 131,7 (C_{Ar}), 133,9 (C_{Ar}), 134,0 (C_{Ar}), 169,9 (N-C=N)

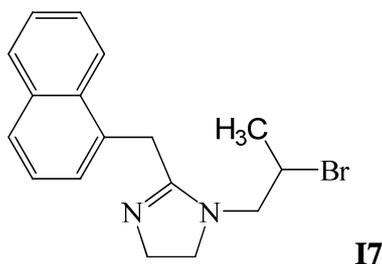
Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 283 [M-1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2538

Analyse élémentaire (C₁₇H₂₀N₂S) : Calc.% : C, 71,79 ; H, 7,09 ; N, 9,85

Exp.% : C, 71,77 ; H, 7,11 ; N, 9,88

III.3.2. Synthèse du 1-(2-bromopropyl)-2-(naphthalèn-1-ylméthyl)-4,5-dihydroimidazole (I7)



A une solution de 1,2-dibromopropane (20,93 g, 104,70 mmol, 4,4 équivalents) dans 200 ml d'acétonitrile anhydre est ajoutée goutte à goutte, sous agitation, une solution de NMI (5,00 g, 23,80 mmol) et de K_2CO_3 (4,92 g, 35,70 mmol, 1,5 équivalents) dans 200 ml d'acétonitrile anhydre. Le mélange est porté à reflux pendant 72h. Après retour à température ambiante, le précipité blanc formé est éliminé par filtration. Le filtrat est alors évaporé sous vide. Le résidu obtenu est alors extrait par 400 ml d'un mélange dichlorométhane/pentane (5/1). La solution est ensuite filtrée puis le filtrat est évaporé à sec.

On récupère 2,32 g de **I7** (7,03 mmol, Rdt : 29,5%).

Caractérisation

Aspect: Poudre noire

RMN 1H (300,13 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) : 1,36 (d, $J=5,6Hz$, 3H, $CHCH_3$), 2,30 - 4,57 (m, 9H, $CHBr$, CH_2N , $CH_2-C_{10}H_7$), 7,06 - 7,60 (m, 4H, H_{Ar}), 7,64 - 8,12 (m, 3H, H_{Ar})

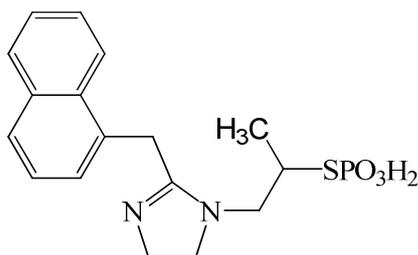
RMN ^{13}C (75,46 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) : 22,4 (CH_3CH), 32,6 ($CHBr$), 40,2 ($CH_2-C_{10}H_7$), 43,6 (CH_2N), 46,1 (CH_2N), 48,1 ($CHCH_2N$), 123,4 (CH_{Ar}), 124,5 (CH_{Ar}), 125,0 (CH_{Ar}), 125,8 (CH_{Ar}), 126,3 (CH_{Ar}), 126,9 (CH_{Ar}), 128,3 (CH_{Ar}), 131,4 (C_{Ar}), 133,4 (C_{Ar}), 133,9 (C_{Ar}), 167,1 ($N-C=N$)

Spectre de masse (EI, $CHCl_3$) : $m/z = 329 [M-1]^+$

Analyse élémentaire ($C_{17}H_{19}BrN_2$) : Calc.% : C, 61,64 ; H, 5,78 ; N, 8,49

Exp.% : C, 61,66 ; H, 5,82 ; N, 8,48

III.3.3. Synthèse du 1-(2-(naphthalèn-1-ylméthyl)-4,5-dihydroimidazo-1-yl)propan-2-yl-O,O-dihydrogène phosphorothioate (I8)

**I8**

A une suspension de 1,09 g de Na_3SPO_3 (6,06 mmol, 1 équivalent) dans 6,5 ml d'eau est ajoutée, goutte à goutte, une solution de **I7** (2,00 g, 6,06 mmol) dans 2 ml d'une solution de HBr (1M). Après solubilisation totale, 3,25 ml de DMF sont ajoutés à 0°C. Le mélange réactionnel est porté à 30°C pendant une nuit. La solution est évaporée sous vide puis le résidu est trituré dans 20 ml de méthanol. La solution est filtrée puis le filtrat est concentré sous vide poussé.

On récupère 0,82 g de **I8** (2,23 mmol, Rdt : 37,2%).

Caractérisation

Aspect: Poudre noire

RMN ^1H (300,13 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 1,25 (d, $J = 5,9\text{Hz}$, 3H, CHCH_3), 1,94 (m, 1H, CHS), 2,46 - 4,29 (m, 8H, CH_2N et $\text{CH}_2\text{-C}_{10}\text{H}_7$), 6,99 - 7,41 (m, 4H, H_{Ar}), 7,51 - 7,89 (m, 3H, H_{Ar}), 9,77 (s, 2H, OH)

RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ , ppm) : 22,3 (CH_3CH), 36,2 (CHS), 43,0 ($\text{CH}_2\text{-C}_{10}\text{H}_7$), 44,3 (CH_2N), 46,3 (CH_2N), 48,7 (CHCH_2N), 122,2 (CH_{Ar}), 123,5 (CH_{Ar}), 124,3 (CH_{Ar}), 125,3 (CH_{Ar}), 126,8 (CH_{Ar}), 127,2 (CH_{Ar}), 128,6 (CH_{Ar}), 131,3 (C_{Ar}), 132,0 (C_{Ar}), 133,2 (C_{Ar}), 167,1 (N-C=N)

RMN ^{31}P (121,49 MHz, None, δ , ppm) : 14,70

Spectre de masse (EI, CHCl_3) : $m/z = 346$ $[\text{M}-18]^+$

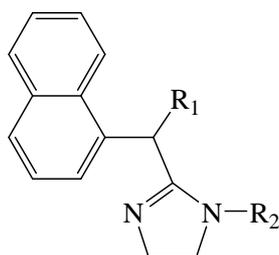
Analyse élémentaire ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$) : Calc.% : C, 56,03 ; H, 5,81 ; N, 7,69
Exp.% : C, 56,11 ; H, 5,90 ; N, 7,71

IV. Evaluation in vitro

IV.1. Evaluation Antioxydante et Antiradicalaire

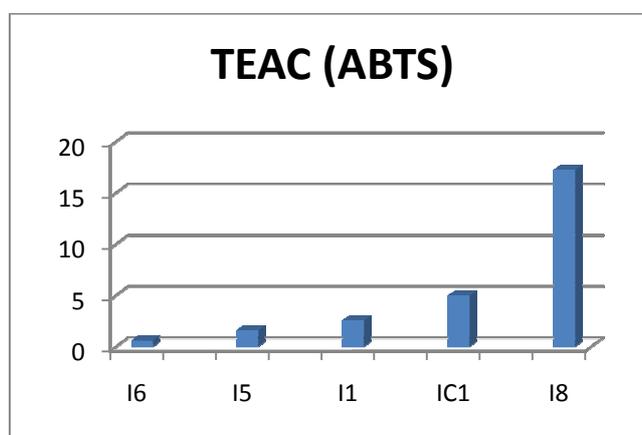
IV.1.1. ABTS et peroxydation lipidique

Le graphique 13 récapitule les résultats du test antiradicalaire, obtenus pour les dérivés de la NMI synthétisés, de formule générale suivante :



N°	R ₁	R ₂
IC1	Acide Carboxylique	
I1	H	H
I5	CH ₃	H

N°	R ₁	R ₂
I6	H	
I8	H	



Graphique 13 : Variations des propriétés antiradicalaires des dérivés de la NMI

Nous remarquons tout d'abord que le composé **IC1**, acide carboxylique précurseur de la synthèse de ces dérivés, est totalement inactif dans ce test. Dès l'introduction du groupement imidazoline, les propriétés antiradicalaires apparaissent. En comparant le NMI **I1** et la NEI **I5**, on remarque l'intérêt de la substitution du proton du pont de la NMI (TEAC = 2,58) par un groupement méthyle donnant la NEI (TEAC = 1,63). Comme supposé, la capture des radicaux par la NEI est plus efficace que pour la NMI :

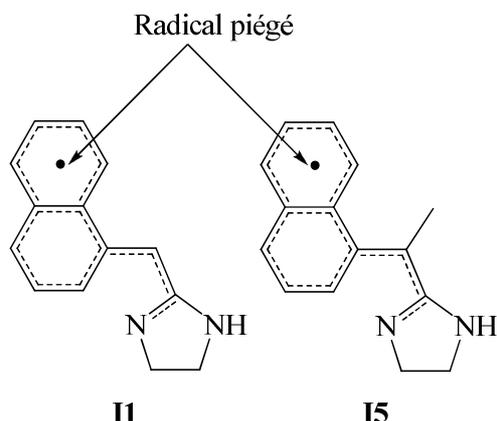
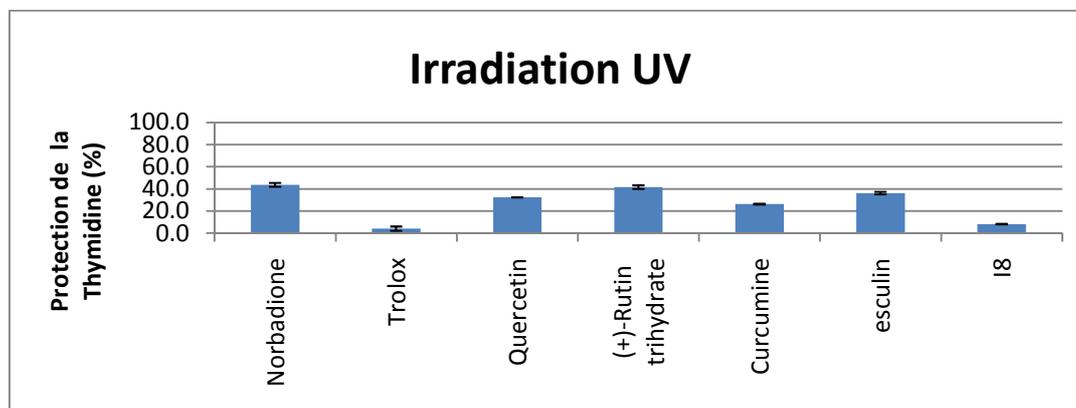


Figure 94 : Capture des radicaux par la NMI et par la NEI

De plus, on remarque que **I8** est peu actif vis-à-vis de ce test, ce qui peut s'expliquer par l'absence de phosphatase alcaline dans le milieu pouvant transformer le phosphorothioate en thiol. L'étude de **I6**, principe actif de **I8**, montre un TEAC faible pour **I6**, c'est-à-dire une nette augmentation des propriétés antiradicalaires. **I6** devient alors un meilleur antioxydant que le Trolox[®]. Ces composés sont cependant inactifs vis-à-vis de la peroxydation lipidique (les résultats sont donnés en annexe).

IV.1.2. Protection de la thymidine

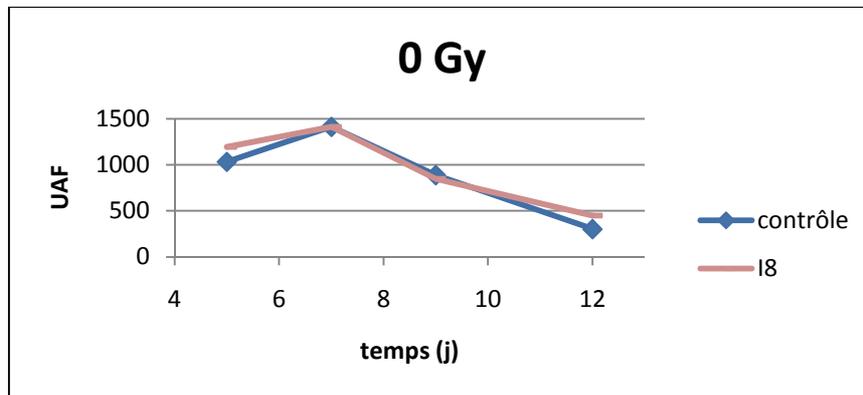
Le pourcentage de protection de la thymidine vis-à-vis d'une irradiation UV pour le composé **I8** a été testé par le CEA de Saclay. Ce composé testé à 100 μM permet une très légère protection de la thymidine lors d'une irradiation UV (environ 10%) (Graphique 14).



Graphique 14 : Propriétés de protection de la thymidine de I8

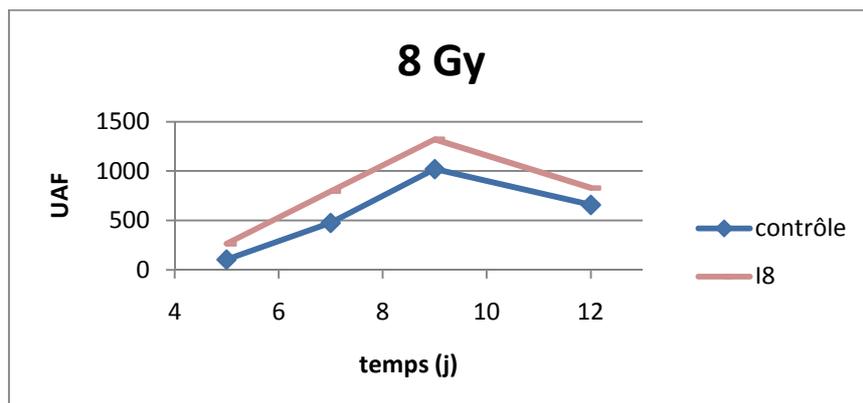
IV.2. Evaluation in vitro Cellulaire

L'évaluation cellulaire de **I8**, prodrogue de **I6**, réalisée par l'ULP de Strasbourg, n'a montré aucune toxicité de ce composé (Graphique 15).



Graphique 15 : Toxicité cellulaire de I8

Un effet protecteur assez intéressant des cellules TK6 irradiées à la dose de 8 Gy a été montré par l'ULP de Strasbourg (graphique 16). En effet, on observe une prolifération cellulaire post-irradiation plus importante pour les cellules traitées avec **I8** que pour les cellules contrôles. D'autres expériences de ce type sont cependant nécessaires afin de confirmer ce résultat.



Graphique 16 : Propriétés de protection cellulaire de I8

V. Evaluation *in vivo*

Afin de compléter l'étude sur la molécule **I8**, nous nous sommes intéressés aux propriétés de radioprotection *in vivo* chez la souris. L'efficacité à 1 mois de ce composé a été montrée (Tableau 33) :

N°	Modèle Murin	Posologie (mg/Kg)	Posologie (mmol/Kg)	Délai d'injection (IP, min)	% de survie à 30 jours	
					Dose : DL ₁₀₀	Dose : DL ₁₀₀ +2Gy
I8	Swiss CD1	140	0,38	20	90	80

Tableau 33 : Evaluation du pouvoir radioprotecteur de I8

Lorsque le composé est injecté à une dose de 140 mg/kg à des souris Swiss CD1, 20 minutes avant irradiation, un effet fortement radioprotecteur est observé. En effet, 80% de survie a été obtenu pour ce composé un mois après irradiation à la dose de 10,2 Gy. De plus, ce taux de survie est resté stable durant les 6 mois post-irradiation. Ainsi, cette molécule reste un composé intéressant pour la radioprotection chimique.

VI. Conclusion

Il a ainsi été synthétisé 8 dérivés de la NMI. Le pouvoir radioprotecteur des dérivés de la NMI a été confirmé par l'étude réalisée à partir des composés **I1** à **I8**. Cette étude a permis de montrer les propriétés antioxydantes et radioprotectrices *in vitro* de **I7** et de **I8**. L'étude *in vivo* a montré un pouvoir radioprotecteur marqué faisant de **I8** un des composés les plus actifs en radioprotection connu actuellement.

Chapitre 2 :

Les Benzothiazoles et les Thiadiazoles

I. Caractéristiques et Propriétés

Les dérivés de l'imidazole sont connus pour leur effet radioprotecteur^[189, 190]. Aussi, les benzimidazoles, présentant un cycle benzène accolé à un cycle imidazole, ont été récemment étudiés comme radioprotecteurs^[191]. Par analogie structurale, nous nous sommes intéressés aux benzothiazoles.

De plus, à partir de l'imidazole, nous avons développé un second type de molécule, les dérivés du thiadiazole. Quelques travaux ont évoqué les propriétés radioprotectrices possibles de ce composé. Le thiadiazole est, bien que quasiment non toxique, inefficace en radioprotection^[192]. En revanche, une modification de la structure de ce dernier, notamment en positions 2 et 5, peut apporter une activité radioprotectrice^[193].

I.1. Les Bioisostères de Benzimidazole et d'Imidazole

Lors d'études antérieures, il a été démontré que la modification d'une structure pouvait améliorer l'activité radioprotectrice et diminuer les effets secondaires des composés. Aussi, la synthèse de bioisostères est une stratégie de la chimie médicinale ayant pour but de réaliser de nouveaux médicaments bio-équivalents à partir de médicaments déjà connus. Le principe actif, que l'on modifie, doit cependant avoir un mode d'action bien défini afin de pouvoir déterminer quels atomes peuvent être modifiés.

I.1.1. Les Bioisostères de Benzimidazole : les Benzothiazoles

La stratégie de synthèse de bio-isostères a pour but d'améliorer l'activité pharmacologique, de gagner en sélectivité pour un récepteur donné ou d'optimiser la pharmacocinétique^[194].

Afin de dessiner un bon bioisostère, il faut prendre en compte divers paramètres :

- La taille, le volume et la distribution électronique des atomes, la polarisabilité, l'angle formé, les effets inductifs et mésomères.
- Le degré d'hydrophilie et de lipophilie de la molécule.
- La réactivité chimique des groupes fonctionnels.
- Les facteurs conformationnels et la possibilité de former ou non des liaisons hydrogènes.

De plus, il a été rapporté dans la littérature le lien étroit entre les différents hétérocycles aromatiques^[194]. Ainsi, nous avons décidé de réaliser des bioisostères de benzimidazole sous la forme de benzothiazoles (Figure 95).

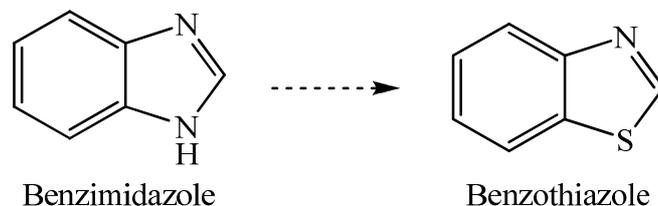


Figure 95 : Les Benzothiazoles

Dans ces structures, le cycle imidazole a été modifié par un cycle thiazole. Ce choix a été réalisé car :

- l'électronégativité de N (3,04) est proche de celle de S (2,58).
- les degrés d'hydrophilie et de lipophilie des deux structures sont similaires :

	Benzimidazole	Benzothiazole
$\log P_{\text{théorique}}(\text{chemdraw})$	1,34	2,02

- les deux cycles présentent une similarité structurale.
- les masses moléculaires des 2 structures sont proches.

I.1.2. Les Bioisostères d'Imidazole : les Thiadiazoles

Il a aussi été décidé de réaliser des bioisostères d'imidazole sous la forme de thiadiazoles (Figure 96) :

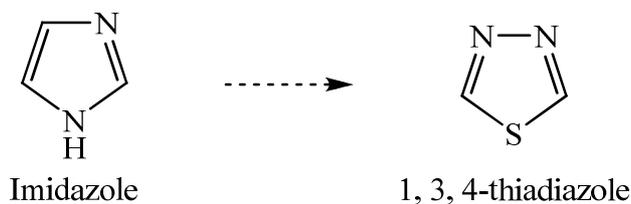


Figure 96 : Les Thiadiazoles

Dans ces structures, le cycle imidazole a été modifié par un cycle thiazole. Ce choix a été réalisé car :

- L'électronégativité de C (2,55) est proche de celle de N (3,04) et, celle de N (3,04) est proche de celle de S (2,58).
- les degrés d'hydrophilie et de lipophilie des molécules varient légèrement :

	Imidazole	Thiadiazole
$\log P_{\text{théorique}}(\text{Chemdraw})$	-0,67	0,53

- les deux cycles présentent une similarité structurale.
- les masses moléculaires des 2 structures sont proches.

II. Synthèse

La synthèse des dérivés du benzothiazole et du thiadiazole a déjà été explorée par notre groupe durant la thèse de C. Prouillac^[21]. Les modifications envisagées ici sont l'introduction d'une fonction thiol ou d'une fonction aminothiols à la place de l'amine présente sur les produits commerciaux **SC7** à **SC11**.

II.1. Synthèse des Dérivés Organiques

Afin de tester ces produits *in vitro* sur culture cellulaire et *in vivo*, la synthèse de quantités importantes (5 à 10 g) de chacun des dérivés thiols et aminothiols a été réalisée.

II.1.1. Synthèse des dérivés organiques

II.1.1.a. Synthèse des intermédiaires chlorés

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse des dérivés de benzothiazoles et de thiadiazoles ayant pour parent les amines aromatiques suivantes (Tableau 34) :

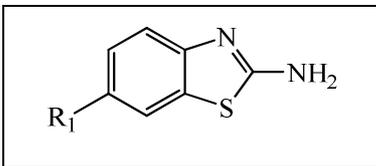
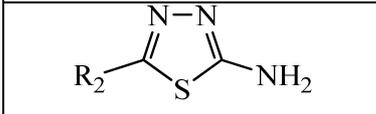
	R ₁ ou R ₂ =	N°
	H	SC7
	CH ₃	SC8
	C ₂ H ₅ O	SC9
	SCH ₂ CH ₃	SC10
	CH ₂ CH ₃	SC11

Tableau 34 : Les précurseurs des dérivés de benzothiazole et de thiadiazole

La première étape de la synthèse consiste en une chloration selon une réaction de Sandmeyer dans l'acide chlorhydrique en présence de cuivre et de nitrite de sodium^[195].

Cette réaction, dont le mécanisme est le suivant, passe par la formation d'un diazonium :

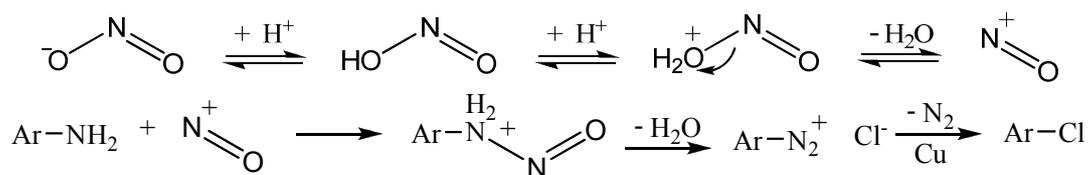
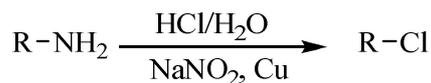


Figure 97 : Réaction de Sandmeyer

Il a ainsi été possible d'obtenir les dérivés chlorés **B1** à **B3** et **T1** et **T2** :



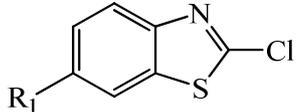
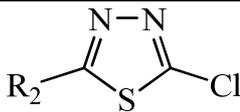
	R ₁ ou R ₂ =	N°
	H	B1
	CH ₃	B2
	C ₂ H ₅ O	B3
	SCH ₂ CH ₃	T1
	CH ₂ CH ₃	T2

Tableau 35 : Synthèse des intermédiaires chlorés.

II.1.1.b. Synthèse des thiols

La synthèse des thiols consiste ensuite en une réaction de la thiourée sur le dérivé chloré selon le mécanisme suivant^[195] (Figure 98) :

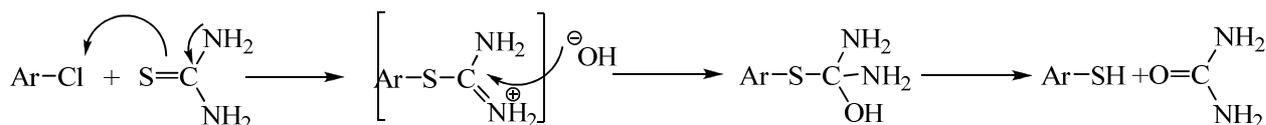
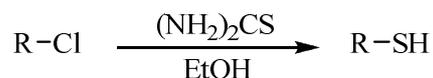


Figure 98 : Synthèse des thiols

Il a donc été synthétisé les thiols **B4** à **B6** et **T3** et **T4** correspondants dont la structure a été confirmée par la résolution de la structure RX de **B5** (les caractéristiques de cette structure sont données en annexe):



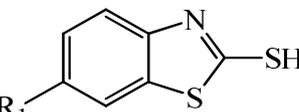
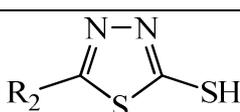
	R ₁ ou R ₂ =	N°
	H	B4
	CH ₃	B5
	C ₂ H ₅ O	B6
	SCH ₂ CH ₃	T3
	CH ₂ CH ₃	T4

Tableau 36 : Synthèse des thiols

Afin de déterminer l'importance de la fonction thiol, il a été synthétisé le benzothiazole **B7**, sel de potassium de **B5** (Figure 99) :

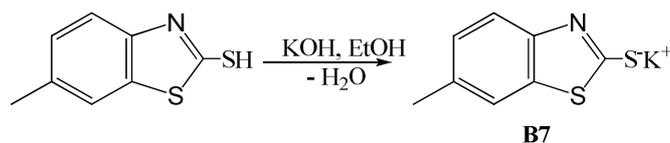


Figure 99 : Synthèse de **B7**, sel de potassium de **B5**

II.1.1.c. Synthèse des aminothiols

La synthèse des aminothiols est réalisée par réaction de la cystéamine sur le dérivé chloré (Figure 100) :



Figure 100 : Synthèse des aminothiols

A partir des intermédiaires chlorés, nous avons obtenu les aminothiols suivants (Tableau 37) :

$$\text{R-Cl} \xrightarrow[\text{THF}]{\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SH}} \text{R-NHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$$

	R ₁ ou R ₂ =	N°
	H	B8
	CH ₃	B9
	C ₂ H ₅ O	B10
	SCH ₂ CH ₃	T5
	CH ₂ CH ₃	T6

Tableau 37 : Synthèse des aminothiols

II.2. La Synthèse des Dérivés Organométalliques

Suite à l'étude *in vivo* des composés organiques précédents, le dérivé le plus actif se révèle être le 6-méthylbenzothiazole-2-thiol (**B5**). Afin d'améliorer les propriétés radioprotectrices de ce composé, nous avons réalisé la synthèse d'un ensemble de dérivés organométalliques de types dialkylbis(6-méthylbenzothiazol-2-ylthio)silane et dialkylbis(6-méthylbenzothiazol-2-ylthio)germane selon les voies A2 et B2 décrites précédemment dans le chapitre 2 de la partie II (Figure 101).

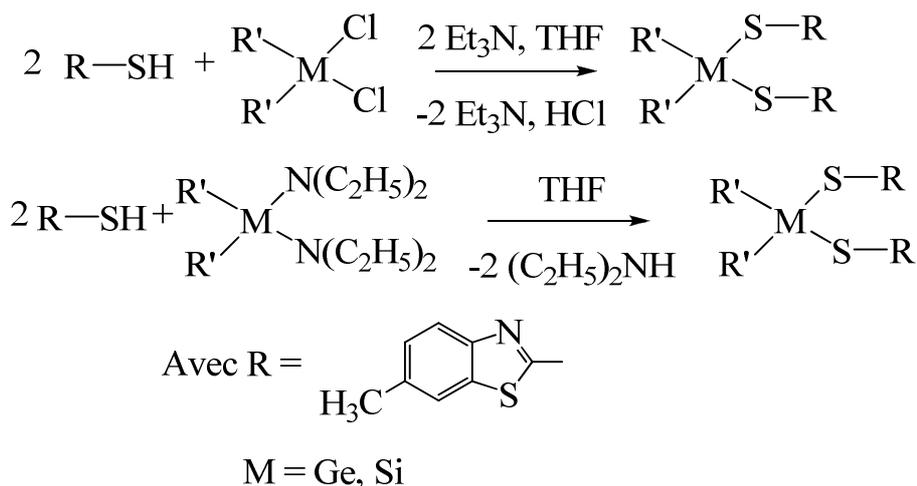


Figure 101 : Synthèse des dialkylbis(6-méthylbenzothiazol-2-ylthio)germane et des dialkylbis(6-méthylbenzothiazol-2-ylthio)silane

L'ensemble des dérivés et les rendements associés à leurs synthèses sont donnés dans le tableau 38 :

M=	R'	R''	N°	Voie	Rendement
Si	CH ₃	CH ₃	B11	A2	95,2
Ge	CH ₃	CH ₃	B12	A2	93,9
Si	C ₆ H ₁₃	C ₆ H ₁₃	B13	A2	66,9
				B2	97,2

Tableau 38 : Synthèse des dérivés organométalliques de B5

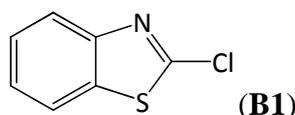
Les rendements de la plupart de ces réactions sont supérieurs à 90%. Seule la synthèse de **B13** par la voie A2 donne un rendement plus faible. Cependant, nous remarquons que la synthèse de **B13** selon la voie B2 donne de meilleurs résultats, ce qui confirme les remarques générales sur la synthèse des dérivés organométalliques et l'intérêt de cette méthode pour obtenir des produits purs de façon simple et avec des rendements élevés.

III. Protocoles de Synthèse

III.1. Les Dérivés Organiques

III.1.1. Synthèse des intermédiaires chlorés

III.1.1.a. Synthèse du 2-chlorobenzothiazole (B1)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (105 ml/45 ml) et de cuivre métal (1,70 g) est ajouté, par petites fractions à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (6,90 g, 100,00 mmol, 3,00 équivalents) et de 2-aminobenzothiazole (5,00 g, 33,33 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis le mélange est chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux.

Le mélange réactionnel obtenu, de couleur verte, est extrait au chloroforme (3 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10%). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu rouge visqueux correspondant à 4,95 g de composé (29,29 mmol, Rdt : 87,9%).

Caractérisation

Aspect : Gomme rouge

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 7,34 - 7,95 (m, 4H, C₆H₄)

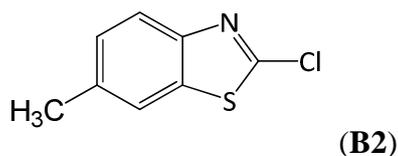
RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 121,8 (CH_{Ar}), 123,6 (CH_{Ar}), 126,5 (CH_{Ar}), 127,4 (CH_{Ar}), 150,7 (C_{Ar}-N), 153,6 (N=C_{Ar}-S), 172,9 (C_{Ar}-SH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 169 [M]⁺

Analyse élémentaire (C₇H₄CINS) : Calc.% : C, 49,56 ; H, 2,38 ; N, 8,26

Exp.% : C, 49,08 ; H, 2,11 ; N, 9,01

III.1.1.b. Synthèse du 2-chloro-6-méthylbenzothiazole (B2)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (100 ml/40 ml) et de cuivre métal (1,60 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (6,31 g, 91,44 mmol, 3,00 équivalents) et de 2-amino-6-méthylbenzothiazole (5,00 g, 30,48 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis le mélange est chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux.

Le mélange réactionnel obtenu, de couleur verte, est extrait au chloroforme (3 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10%). La phase organique de couleur orange est ensuite séchée une nuit sur sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un solide orange correspondant à 3,88 g de composé (21,20 mmol, Rdt : 69,6%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 2,32 (s, 3H, CH₃), 7,01 - 7,81 (m, 3H, C₆H₃)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 21,5 (CH₃), 120,8 (CH_{Ar}), 122,3 (CH_{Ar}), 128,2 (CH_{Ar}), 136,0 (C_{Ar}), 149,0 (C_{Ar}-N), 152,0 (N=C_{Ar}-S), 172,0 (C_{Ar}-SH)

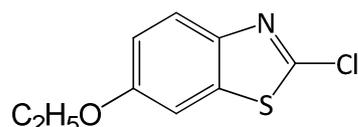
Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 184 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₈H₆ClNS) : Calc.% : C, 52,32 ; H, 3,29 ; N, 7,63

Exp.% : C, 52,04 ; H, 3,34 ; N, 7,58

Point de fusion : 50-52°C.

III.1.1.c. Synthèse du 2-chloro-6-éthoxybenzothiazole (B3)



(B3)

A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (160 ml/60 ml) et de cuivre métal (2,6 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (10,66 g 154,5 mmol, 3,00 équivalents) et de 2-amino-6-éthoxybenzothiazole (10,00 g, 51,5 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis le mélange est chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux.

Le mélange obtenu, de couleur verte, est extrait au chloroforme (3 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10%). La phase organique rouge est ensuite séchée sur sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un solide correspondant à 7,42 g de composé (34,67 mmol, Rdt : 67,3%).

Caractérisation

Aspect : Poudre rouge

RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,35 (t, J = 7,0Hz, 3H, CH₃), 4,07 (q, J = 7,0Hz, 2H, OCH₂), 7,09 - 7,85 (m, 3H, C₆H₃)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,0 (CH₃), 64,2 (CH₂), 106,0 (CH_{Ar}), 116,8 (CH_{Ar}), 123,4 (CH_{Ar}), 137,6 (C_{Ar}), 145,0 (C_{Ar}-N), 149,7 (N=C_{Ar}-S), 157,4 (C_{Ar}-SH)

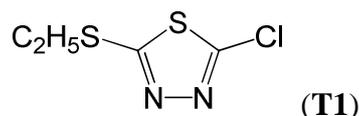
Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 214 [M+1]⁺

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

Exp.% : C, 49,17 ; H, 3,76 ; N, 6,80

Point de fusion : 54-56°C.

III.1.1.d. Synthèse du 2-chloro-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (T1)



A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (200 ml/80 ml) et de cuivre métal (3,20 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (12,85 g, 186,33 mmol, 3,00 équivalents) et de 2-amino-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (10,00 g, 62,11 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis le mélange est chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux.

Le mélange obtenu, de couleur verte, est extrait au chloroforme (3 x 50 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées avec une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10%). La phase organique est ensuite séchée sur du sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu huileux rouge épais correspondant à 6,41 g de composé (35,41 mmol, Rdt : 57,0%).

Caractérisation

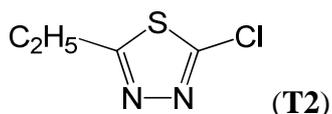
Aspect : Gomme rouge

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,37 (t, J = 7,6Hz, 3H, CH₃), 3,24 (q, J = 7,6Hz, 2H, CH₂)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 14,4 (CH₃), 28,4 (CH₂), 152,6 (C_{Ar}-S), 168,2 (C_{Ar}-Cl)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 181 [M+1]⁺

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

III.1.1.e. Synthèse du 2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (T2)

A un mélange d'acide chlorhydrique/eau (50 ml/21 ml) et de cuivre métal (0,80 g) est ajouté, par petites fractions, à 0°C et sous agitation, un mélange de nitrite de sodium (3,21 g 46,50 mmol, 3,00 équivalents) et de 2-amino-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (2,00 g, 15,50 mmol). L'agitation est maintenue pendant deux heures à température ambiante puis le mélange est chauffé à 50°C jusqu'à la fin du dégagement gazeux.

Le mélange obtenu, de couleur verte, est extrait au chloroforme (3 x 50 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées par une solution diluée d'acide sulfurique (100 ml à 10%). La phase organique est ensuite séchée sur du sulfate de sodium. Après filtration, la concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu huileux rouge épais correspondant à 1,6 g de composé (10,74 mmol, Rdt : 69,3%).

Caractérisation

Aspect : Gomme rouge

RMN ¹H (300,13 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 1,31 (t, J = 6,0Hz, 3H, CH₃), 3,00 (q, J = 6,0Hz, 2H, CH₂)

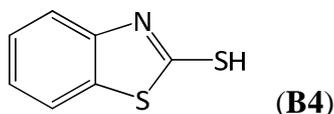
RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 14,3 (CH₃), 24,4 (CH₂), 153,9 (C_{Ar}-S), 175,1 (C_{Ar}-Cl)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 149 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₄H₅ClN₂S) :
 Calc. % : C, 32,33 ; H, 3,39 ; N, 18,85
 Exp. % : C, 33,01 ; H, 3,11 ; N, 18,45

III.1.2. Synthèse des thiols

III.1.2.a. Synthèse du Benzothiazole-2-thiol (B4)



A une solution de 2-chlorobenzothiazole (2,50 g, 14,79 mmol) dans 36 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (3,03 g, 47,33 mmol, 3,20 équivalents). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est ensuite refroidi dans un bain de glace.

Une solution d'acide chlorhydrique diluée (50 ml à 5%) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,27 g de produit (7,60 mmol, Rdt : 51,4%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 3,49 (s, 1H, SH), 7,15 - 7,48 (m, 4H, C₆H₄)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 112,4 (C_{Ar}), 121,4 (CH_{Ar}), 124,7 (CH_{Ar}), 127,2 (CH_{Ar}), 130,0 (C_{Ar}-N), 140,3 (N=C_{Ar}-S), 190,9 (C_{Ar}-SH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 167 [M]⁺

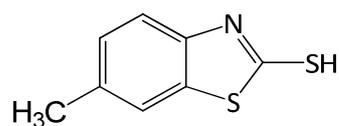
I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2664

Analyse élémentaire (C₇H₅NS₂) : Calc.%: C, 50,27; H, 3,01; N, 8,37

Exp.%: C, 50,55; H, 2,82; N, 8,86

Point de fusion : 170-172°C.

III.1.2.b. Synthèse du 6-méthyl-benzothiazole-2-thiol (B5)



(B5)

A une solution de 2-chloro-6-méthylbenzothiazole (2,00 g, 10,87 mmol) dans 60 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (2,50 g, 34,78 mmol, 3,20 équivalents). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est refroidi dans un bain de glace.

Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5%) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,83 g de **B5** (10,05 mmol, Rdt : 92,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

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

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,2 (CH₃), 112,7 (CH_{Ar}), 123,7 (CH_{Ar}), 128,6 (CH_{Ar}), 130,6 (C_{Ar}), 134,5 (C_{Ar}-N), 139,7 (N=C_{Ar}-S), 184,3 (C_{Ar}-SH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 182 [M+1]⁺

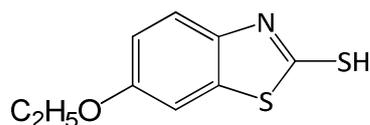
I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2509

Analyse élémentaire (C₈H₇NS₂) : Calc. % : C, 53,00 ; H, 3,89 ; N, 7,73

Exp. % : C, 52,60 ; H, 4,03 ; N, 7,99

Point de fusion : 150-152°C

III.1.2.c. Synthèse du 6-éthoxy-benzothiazole-2-thiol (B6)



(B6)

A une solution de 2-chloro-6-éthoxybenzothiazole (1,54 g, 7,94 mmol) dans 60 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (1,93 g, 25,41 mmol, 3,20 équivalents). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est ensuite refroidi dans un bain de glace.

Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5%) est ajoutée sous agitation. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 0,56 g de produit (2,65 mmol, Rdt : 33,4%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,32 (t, J = 6,0Hz, 3H, CH₃), 3,56 (s, 1H, SH), 4,00 (q, J = 6,0Hz, 2H, CH₂), 6,94 - 7,31 (m, 3H, C₆H₃)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,1 (CH₃), 64,2 (CH₂), 106,9 (CH_{Ar}), 113,6 (CH_{Ar}), 115,6 (CH_{Ar}), 131,1 (C_{Ar}), 135,6 (C_{Ar}-N), 156,3 (N=C_{Ar}-S), 188,8 (C_{Ar}-SH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 212 [M+1]⁺

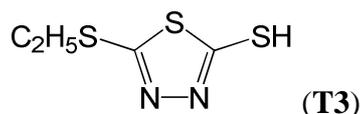
I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2509

Analyse élémentaire (C₉H₉NOS₂) : Calc.% : C, 51,16 ; H, 4,29 ; N, 6,63

Exp.% : C, 51,03 ; H, 3,85 ; N, 7,20

Point de fusion : 180-182°C

III.1.2.e. Synthèse du 5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (T3)



A une solution de 2-chloro-5-éthylthio-1,3,4-thiadiazole (2,00 g, 11,11 mmol) dans 60 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (2,39 g, 33,33 mmol, 3,00 équivalents). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est refroidi dans un bain de glace.

Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5%) est ajoutée sous agitation. Le mélange réactionnel est filtré et la phase aqueuse est extraite au chloroforme (2 x 100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,56 g de dérivé (8,72 mmol, Rdt : 78,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,31 (t, J = 9,0Hz, 3H, CH₃), 3,16 (q, J = 9,0Hz, 2H, CH₂), 7,03 (s, 1H, SH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO₃, δ, ppm) : 14,9 (CH₃), 28,2 (CH₂), 162,1 (C_{Ar}-S), 188,3 (C_{Ar}-SH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 179 [M+1]⁺

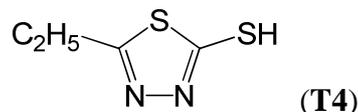
I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2528

Analyse élémentaire (C₄H₆N₂S₃) : Calc.% : C, 26,95 ; H, 3,39 ; N, 15,71

Exp.% : C, 25,73 ; H, 3,56 ; N, 16,77

Point de fusion : 102-104°C

III.1.2.f. Synthèse du 5-éthyl-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (T4)



A une solution de 2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (1,80 g, 12,16 mmol) dans 30 ml d'éthanol est ajoutée de la thiourée (2,94 g, 38,68 mmol, 3,20 équivalents). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant trois heures puis est refroidi dans un bain de glace.

Une solution diluée d'acide chlorhydrique (50 ml à 5%) est ajoutée sous agitation. Le mélange est extrait au chloroforme (2 x 50 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et concentration du filtrat sous pression réduite, le solide obtenu est recristallisé dans l'éthanol pour conduire à 1,65 g de composé (11,30 mmol, Rdt : 92,0%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

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

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 12,7 (CH₃), 24,4 (CH₂), 166,0 (C_{Ar}-S), 189,4 (C_{Ar}-SH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 146 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2523

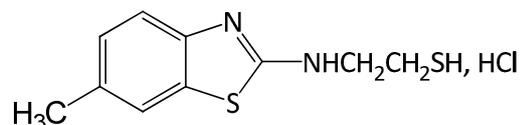
Analyse élémentaire (C₄H₆N₂S₂) : Calc.% : C, 32,85 ; H, 4,14 ; N, 19,16

Exp.% : C, 31,63 ; H, 4,00 ; N, 20,52

Point de fusion : 68-70°C

III.1.3.b. Synthèse du 2-(6-méthylbenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol

(B9)



(B9)

A une solution de 2-chloro-6-méthylbenzothiazole (2,00 g, 10,92 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (0,85 g, 11,04 mmol, 1,01 équivalents). Le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures.

La cystéamine n'ayant pas réagi est éliminée par filtration sous argon. Après concentration du filtrat, sous pression réduite, on obtient un résidu visqueux jaune repris par 10 ml de THF. Le solide obtenu après filtration correspond à 0,98 g de composé (4,34 mmol, Rdt : 39,7%).

Caractérisation

Aspect : Poudre Orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,43 (s, 3H, CH₃), 3,26 (t, J = 6,0Hz, 2H, NHCH₂), 3,36 (s, 1H, SH), 3,64 (t, J = 6,0Hz, 2H, CH₂SH), 7,30 - 7,83 (m, 3H, C₆H₃), 8,47 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,4 (CH₃), 30,4 (NHCH₂), 38,6 (CH₂SH), 121,3 (CH_{Ar}), 122,0 (CH_{Ar}), 128,2 (CH_{Ar}), 134,9 (C_{Ar}), 135,3 (C_{Ar}-N), 151,1 (N=C_{Ar}-S), 164,4 (C_{Ar}-NH)

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 225 [M+1]⁺

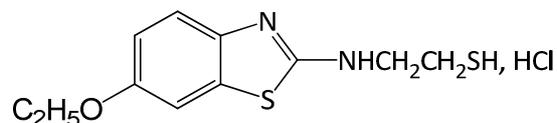
I.R. (cm⁻¹) : ν_{NH} = 3434, ν_{SH} = 2580

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

Point de fusion : 170-172°C

III.1.3.c. Synthèse du 2-(6-éthoxybenzothiazol-2-ylamino)éthanethiol

(B10)



(B10)

A une solution de 2-chloro-6-éthoxybenzothiazole (2,00 g, 9,39 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (0,759 g, 9,86 mmol, 1,05 équivalents). Le mélange est chauffé à reflux pendant trois heures.

La cystéamine n'ayant pas réagi est éliminée par filtration sous argon. Après concentration du filtrat, sous pression réduite, on obtient un résidu visqueux jaune repris par 10 ml de THF. Le solide obtenu après filtration correspond à 0,905 g de composé (3,12 mmol, Rdt : 33,2%).

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,34 (t, J = 6,0Hz, 3H, CH₃), 3,19 (t, J = 6,0Hz, 2H, CH₂SH), 3,34 (s, 1H, SH), 3,56 (t, J = 6,0Hz, 2H, NHCH₂), 4,05 (q, J = 6,0Hz, 2H, CH₃CH₂), 7,02 - 7,84 (m, 3H_{Ar}), 8,42 (s, 1H, NH)

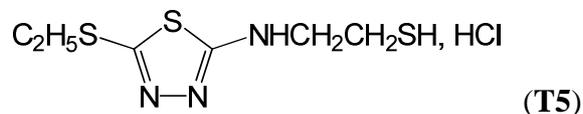
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,1 (CH₃), 31,2 (NHCH₂), 38,4 (CH₂SH), 64,2 (CH₃CH₂), 106,0 (CH_{Ar}), 116,0 (CH_{Ar}), 122,2 (CH_{Ar}), 136,7 (C_{Ar}), 147,4 (C_{Ar}-N), 156,5 (N=C_{Ar}-S), 162,4 (C_{Ar}-NH)

Spectre de masse : m/z = 255 [M+1]⁺

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

Exp.% : C, 51,85 ; H, 5,98 ; N, 10,67

III.1.3.d. Synthèse du 2-(5-éthylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino) éthanethiol (T5)



A une solution de 2-chloro-5-(éthylthio)-1,3,4-thiadiazole (3,00 g, 16,66 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (1,35 g, 17,49 mmol, 1,05 équivalents). Le mélange est maintenu à reflux pendant trois heures.

Après retour à température ambiante, la cystéamine n'ayant pas réagi est filtrée sous argon. La concentration du filtrat sous pression réduite conduit à un résidu visqueux jaune, lequel est repris dans 20 ml d'un mélange THF/pentane (1/3). Le solide obtenu est filtré. Il correspond à 1,37 g de composé attendu (7,10 mmol, Rdt : 42,6%)

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

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

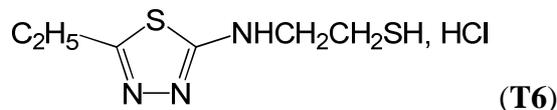
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 15,0 (CH₃), 31,2 (CH₂CH₃), 38,6 (NHCH₂), 39,1 (CH₂SH), 164,1 (C_{Ar}), 166,2 (C_{Ar})

Spectre de masse (EI, CHCl₃) : m/z = 222 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{NH} = 3375, ν_{SH} = 2539

Analyse élémentaire (C₆H₁₁N₃S₃) :
 Calc.% : C, 32,55 ; H, 5,01 ; N, 18,98
 Exp.% : C, 32,22 ; H, 4,85 ; N, 19,47

III.1.3.e. Synthèse du 2-(5-éthyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylamino)éthane thiol (T6)



A une solution de 2-chloro-5-éthyl-1,3,4-thiadiazole (3,00 g, 20,27 mmol) dans 20 ml de THF anhydre est ajoutée de la cystéamine (1,64 g, 21,29 mmol, 1,05 équivalents). Le mélange est maintenu à reflux pendant trois heures.

Après retour à température ambiante, la cystéamine n'ayant pas réagi est filtrée sous argon. La concentration du filtrat sous pression réduite conduit ensuite à un résidu visqueux jaune, lequel est repris dans 20 ml d'un mélange THF/pentane (1/3). Le solide obtenu est filtré. Il correspond à 1,16 g de composé attendu (5,14 mmol, Rdt : 25,4%)

Caractérisation

Aspect : Poudre orange

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,37 (t, J = 6,00Hz, 3H, CH₃), 3,06 (q, J = 6,00Hz, 2H, CH₃CH₂), 3,43 (s, 1H, SH), 3,61 (t, J = 6,00Hz, 2H, CH₂SH), 3,80 (t, J = 6,00Hz, 2H, NHCH₂), 8,62 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 14,0 (CH₃), 23,8 (CH₂), 32,9 (NHCH₂), 39,8 (CH₂SH), 164,3 (C₂-aryl), 172,8 (C₅-aryl)

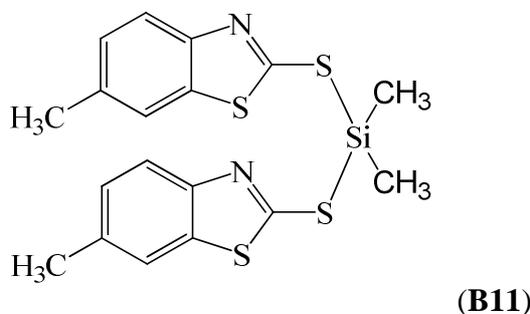
Spectre de masse : m/z = 188 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2036, ν_{NH} = 3372.

Analyse élémentaire (C₆H₁₂N₃O₃PS₃) : Calc. % : C, 23,91 ; H, 4,01 ; N, 13,94
Exp. % : C, 23,54 ; H, 4,87 ; N, 13,45

III.2. Les Dérivés Organométalliques

III.2.1.a. Synthèse du diméthylbis(6-méthylbenzothiazol-2-ylthio)silane (**B11**)



Voie A2

Le protocole décrit pour la voie A2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

2,00 g de **B5** (11,03 mmol) dans 50 ml de THF anhydre

1,17 g de triéthylamine (11,58 mmol, 1,05 équivalents)

0,74 g de dichlorodiméthylsilane (5,79 mmol, 0,50 équivalents)

dans 20 ml de THF anhydre.

On récupère 2,19 g de produit (5,25 mmol, Rdt : 95,2%).

Caractérisation

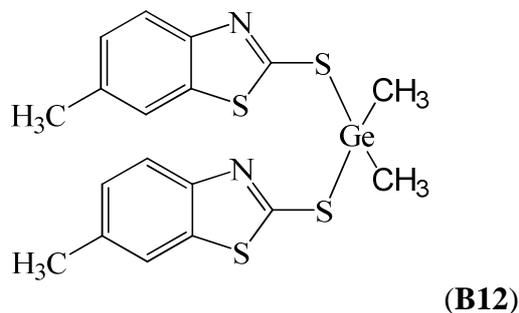
Aspect : Poudre jaune

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,12 (s, 6H, CH₃Si), 2,35 (s, 3H, CH₃), 7,18-7,26 (m, 2H, Ar), 7,45-7,56 (m, 4H, Ar)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,7 (CH₃Si), 21,2 (CH₃-Ar), 112,6 (CH_{Ar}), 112,7 (CH_{Ar}), 125,4 (CH_{Ar}), 127,9 (C_{Ar}), 134,3 (C_{Ar}-N), 158,6 (N=C_{Ar}-S), 173,7 (C_{Ar}-S)

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 419 [M+1]⁺

III.2.1.b. Synthèse du diméthylbis(6-méthylbenzothiazol-2-ylthio)germane (B12)



Voie A2

Le protocole décrit pour la voie A2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

2,00 g de **B5** (11,03 mmol) dans 50 ml de THF anhydre

1,17 g de triéthylamine (11,58 mmol, 1,05 équivalents)

1,00 g de dichlorodiméthylgermane (5,79 mmol, 0,50 équivalents)

dans 20 ml de THF anhydre.

On récupère 2,40 g de produit (5,18 mmol, Rdt : 93,9%).

Caractérisation

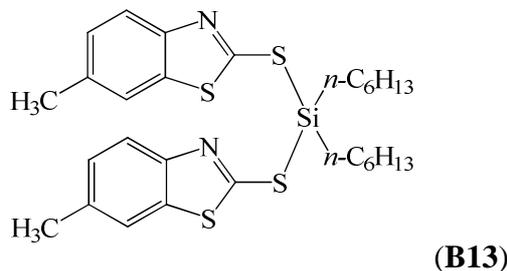
Aspect : Poudre jaune

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,51 (s, 6H, CH₃Ge), 2,35 (s, 3H, CH₃), 7,15-7,26 (m, 2H, Ar), 7,45-7,58 (m, 4H, Ar)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,6 (CH₃Ge), 21,2 (CH₃-Ar), 112,6 (CH_{Ar}), 112,6 (CH_{Ar}), 122,1 (CH_{Ar}), 128,6 (C_{Ar}), 134,3 (C_{Ar}-N), 158,5 (N=C-S), 171,0 (C_{Ar}-S)

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 464 [M]⁺

III.2.1.c. Synthèse du dihexylbis(6-methylbenzothiazol-2-ylthio) silane (B13)



Voie A2

Le protocole décrit pour la voie A2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 2,00 g de **B5** (11,03 mmol) dans 50 ml de THF anhydre
- 1,17 g de triéthylamine (11,58 mmol, 1,05 équivalents)
- 1,55 g de dichlorodi-*n*-hexylsilane (5,79 mmol, 0,50 équivalents)
- dans 20 ml de THF anhydre.

On récupère 2,06 g de produit (3,69 mmol, Rdt : 66,9%).

Voie B2

Le protocole décrit pour la voie B2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 2,00 g de **B5** (11,03 mmol) dans 50 ml de THF anhydre
- 1,98 g de bis(diéthylamino)di-*n*-hexylsilane (5,79 mmol, 0,50 équivalents)
- dans 20 ml de THF anhydre.

On récupère 2,99 g de produit (5,36 mmol, Rdt : 97,2%).

Caractérisation

Aspect : Poudre jaune

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,88 - 0,95 (m, 6H, CH₃-CH₂), 1,12 - 1,52 (m, 16H, CH₂), 1,62 - 1,72 (m, 4H, CH₂), 2,21 (s, 6H, CH₃), 7,15-7,24 (m, 2H, Ar), 7,24-7,33 (m, 4H, Ar)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,1 (CH₂Si), 14,2 (CH₃), 16,3 (CH₂), 31,0 (CH₃-Ar), 31,7 (CH₂), 31,7 (CH₂), 33,0 (CH₂), 111,8 (CH_{Ar}), 121,5 (CH_{Ar}), 128,3 (CH_{Ar}), 130,2 (C_{Ar}), 134,9 (C_{Ar}), 138,1 (C_{Ar}-N), 155,1 (N=C-S) 168,4 (C_{Ar}-S)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 467 [M-C₆H₁₉]⁺, 389 [M-C₁₂H₂₆+1]⁺

IV. Evaluation in vitro

IV.1. Evaluation des Dérivés Organiques

L'ensemble de l'étude antiradicalaire vis-à-vis de l'ABTS des composés **B4** à **B9** et **T3** à **T6** a été réalisé par Caroline Prouillac durant sa thèse. Aussi, nous nous intéresserons essentiellement à l'évaluation de la protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique des composés **B4** à **B9**, **T3** à **T6**, **Ca1** à **Ca37** (**Ca1** à **Ca37** étant des composés synthétisés en quantités suffisantes durant la thèse de Caroline Prouillac pour réaliser les tests désirés ; leur synthèse n'est donc pas exposée ici).

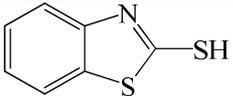
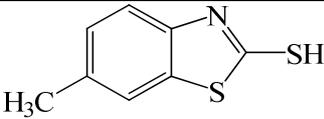
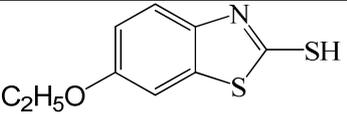
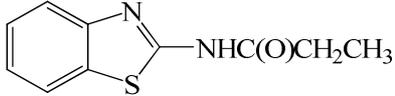
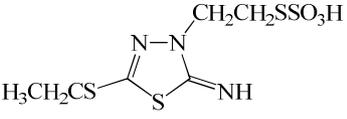
N°	Structure	LogP	% de protection		% de protection	
			116 μM	Dévi- ation Standard	24 μM	Dévi- ation Standard
B4		3,42	49,30	2,51	-0,30	0,39
B5		3,90	52,31	4,62	33,79	4,31
B6		3,63	20,11	1,73	-0,67	2,39
Ca1		2,79	53,32	1,89	2,74	3,66
Ca34		2,54	21,61	1,22	-1,94	2,65

Tableau 39 : Variations des propriétés antioxydantes (test de peroxydation lipidique) des benzothiazoles et des thiadiazoles organiques

Parmi l'ensemble des benzothiazoles et des thiazoles testés, seuls quelques composés présentent des propriétés de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique (Tableau 39). Dans la famille des thiols, les composés **B4** et **B5** présentent de bonnes propriétés de protection à 116 μM (50% de protection), alors que le composé **B6** est deux fois moins

efficace. Lorsque l'on s'intéresse à la protection à 24 μM , seul **B5** reste actif (34% de protection). D'autres composés présentent des propriétés de protection. L'amide **Ca1** protège à 50% de la peroxydation lipidique dans notre modèle, malgré son inactivité vis-à-vis de l'ABTS. Dans la série des amides, ce composé est le seul actif. Les molécules **Ca1** à **Ca3** ne variant que par la partie R (R=H, Me ou C₂H₅O respectivement), on peut supposer que la variation des propriétés de protection ne dépend que de la variation de la lipophilie de la molécule (logP). Il faut aussi noter que le sulfonate **Ca34** présente aussi une légère activité protectrice à 116 μM .

La famille des thiols (**B4** à **B6**) présentant une forte activité vis-à-vis de la peroxydation lipidique ainsi que dans les différents tests réalisés (ABTS, protection de la thymidine etc.), ont été testés *in vivo* chez la souris.

IV.2. Evaluation des Dérivés Organométalliques

N°	TEAC	Déviation Standard	% de protection		% de protection	
			116 μM	Déviation Standard	24 μM	Déviation Standard
B5	3,66	0,21	52,3	4,6	33,8	4,3
B7	2,88	0,08	-1,9	1,7	-2,0	2,1
B13	1,30	0,02	49,4	0,1	18,9	3,6

*Tableau 40 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organométalliques de **B5** (tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)*

Tout d'abord, nous remarquons que la formation du sel de potassium **B6** permet une légère augmentation des propriétés antiradicalaires de **B5** (Tableau 40). Cependant, par cette modification, la molécule est rendue nettement plus hydrophile, ce qui limite son activité vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Par contre, l'introduction d'un groupement organométallique (**B13**) permet une nette diminution du TEAC. Cette augmentation du caractère antiradicalaire est a priori due à la présence de deux motifs « 6-méthylbenzothiazole-2-thiol (**B5**) » sur **B13**. Cependant, on observe que le composé **B13** est 3 fois plus actif que **B5**, aussi, l'augmentation du caractère antiradicalaire serait également due à une contribution du précurseur organométallique. Le pourcentage de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique est pour **B13** le même à 116 μM (mais est plus faible à 24 μM) que pour **B5**.

V. Evaluation *in vivo*

V.1. Evaluation Toxicologique

Les dérivés organiques les plus intéressants selon les tests décrits précédemment, ainsi qu'un dérivé organométallique, ont été évalués *in vivo* chez la souris selon le protocole décrit au chapitre 3 de la partie 2. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous (Tableau 41). Les DL_{50tox/48heures} n'ont pas pu être déterminées par manque de solubilité des produits, dans la plupart des cas.

N°	DL _{50tox/48h} (mg/kg)	DL _{50tox/48h} (mmol/kg)
B4	>960	>5,75
B5	>520	>2,87
B8	>616	>2,50
B9	>1456	>5,60
T3	866	4,87
T4	>680	>4,66
T6	>736	>3,27
B13	>130	>0,23

Tableau 41 : Evaluation toxicologique *in vivo* des benzothiazoles et de thiadiazoles

V.2. Evaluation du Pouvoir Radioprotecteur

L'étude radiopharmacologique a permis de mettre en évidence l'efficacité des benzothiazoles et des thiadiazoles en termes de protection vis-à-vis des rayonnements ionisants (Tableau 42). De manière générale, les benzothiazoles sont plus actifs que les thiadiazoles. De plus, il faut noter que les thiols (**B4** et **B5**) sont plus actifs que l'aminothiols **B8**. Le composé le plus actif de cette série est le composé **B5**, offrant une très forte protection à 8,2 Gy lorsqu'il est injecté 20 minutes avant irradiation (100% de survie à 30 jours). Ce composé permet aussi une protection très importante lorsqu'il est injecté 90 minutes avant l'irradiation (80% de survie à 30 jours). Aucun de ces composés ne permet une protection à 10,2 Gy.

B13, dérivé organométallique de **B5**, permet aussi une protection importante à 8,2 Gy lorsqu'il est injecté 20 minutes avant irradiation (67% de survie à 30 jours). Ce pourcentage de survie, bien que moins important que pour **B5**, suppose tout de même une activité très importante de **B13** étant donné la dose très faible de composé injectée (0,12 mmol/kg) en comparaison à celle utilisée pour tester **B5** qui est environ dix fois plus importante (1,44 mmol/kg).

N°	Modèle Murin	Posologie (mg/kg)	Posologie (mmol/kg)	Délai d'injection (IP)	% de survie	
					Dose : DL100	Dose : DL100+2Gy
B4	Swiss – CD1	480	2,87	90	60	0
	B6D2F1	240	1,44	20	90	-
		480	2,87	20	100	-
B5	Swiss – CD1	260	1,44	90	80	0
	B6D2F1	260	1,44	20	100	0
B8	Swiss – CD1	308	1,25	90	60	0
	B6D2F1	308	1,25	20	60	0
T3	Swiss – CD1	349	1,96	90	0	0
T4	Swiss – CD1	340	2,33	90	30	0
T6	Swiss – CD1	268	1,19	90	0	0
B13	Swiss – CD1	65	0,12	20	67	0

Tableau 42 : Evaluation radiopharmacologique des benzothiazoles et de thiadiazoles

VI. Conclusion

Ainsi, l'étude sur les dérivés de benzothiazole et de thiadiazole a permis de définir une nouvelle classe d'agents radioprotecteurs. J'ai ainsi réalisé, pour cette étude, la synthèse et l'évaluation *in vitro* et *in vivo* d'une série de 13 dérivés du benzothiazole et de 6 dérivés du thiadiazole. L'étude d'une trentaine de composés issus des travaux de C. Prouillac a aussi été complétée par le test de peroxydation lipidique. De cette étude, ressortent principalement les thiols dérivés du benzothiazole, offrant des résultats intéressants *in vitro* et *in vivo*. L'introduction du précurseur organométallique a permis de mettre en évidence son effet sur les propriétés antiradicalaires. Enfin, le composé **B13** reste très actif en radioprotection chimique.

Chapitre 3 :

Les Naphtalimides

I. Caractéristiques et Propriétés

L'anhydride naphtalique possède une fonction naphtalène sur laquelle est greffé un anhydride. Ce composé présente un site réactif, sur lequel il est possible d'introduire par déshydratation des composés présentant des fonctions amines primaires. Ce type de molécule est, comme pour l'anhydride phtalique, grandement utilisé pour la protection des fonctions amines primaires en synthèse organique. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux naphthalimides qui présentent des propriétés intéressantes. De plus, à partir des anhydrides naphthaliques, nous avons obtenus un autre dérivé, la naphtolactame (Figure 102).

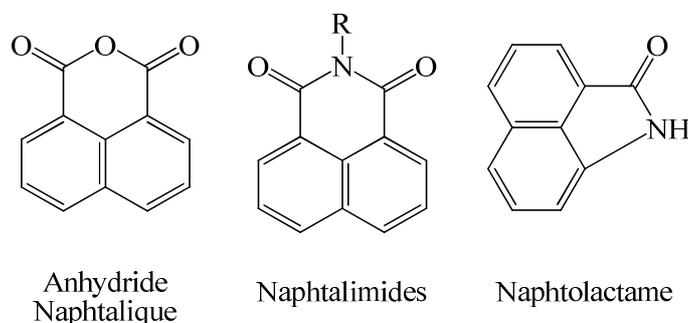


Figure 102 : Les dérivés de l'Anhydride Naphtalique

Propriétés Biologiques des Naphtalimides

De nombreuses propriétés sont accordées aux naphthalimides et aux naphtolactames. Ces dernières ont, entre autres, été étudiées comme antagonistes des récepteurs à la sérotonine ainsi que comme pharmacophores^[196, 197]. Les naphthalimides sont connus pour leurs propriétés anti-tumorales. Cependant, ces composés sont cytotoxiques non seulement pour les cellules tumorales mais aussi pour les cellules saines^[198-202].

Les dérivés de l'anhydride naphthalique possèdent des propriétés radioprotectrices intéressantes. Les naphthalimides ont été étudiés par Piper *et al.* dans les années 70^[203-205]. Les propriétés radioprotectrices de ces composés peuvent s'expliquer de différentes façons. Entre autres, ils sont connus pour leur potentiel pour réaliser des mono- ou bis-intercalations au niveau de l'ADN et ainsi pouvoir protéger de très près l'ADN par capture des radicaux se formant^[206].

De plus, le second type de dérivés de l'anhydride naphthalique présenté ici, les naphtolactames, serait capable d'agir sur le transport de l'oxygène et donc pourrait induire une hypoxie qui peut limiter l'effet oxygène et la production de radicaux dans l'organisme après irradiation.

II. Synthèse

II.1. Les Dérivés Organiques

II.1.1. Synthèse des naphthalimides N1 à N4

Nous désirons tout d'abord introduire des amino-alcools et des amino-mercaptans dans l'anhydride naphthalique par déshydratation. L'hydroxylamine et la cystéamine ont été introduites en utilisant de la pyridine ou du DMF sur tamis moléculaire^[207] (Figure 103) :

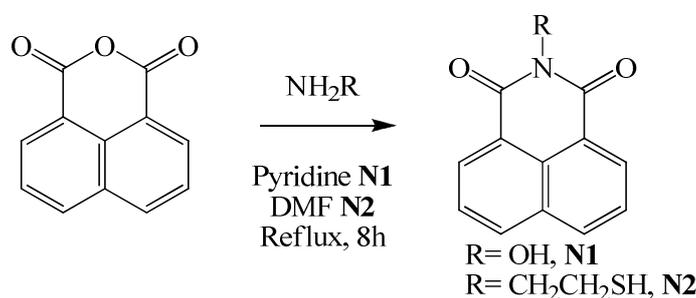


Figure 103 : Synthèse des Naphtalimides N1 et N2

Les deux autres amino-alcools ont été introduits par déshydratation à l'aide d'un Dean Starck (Figure 104) :

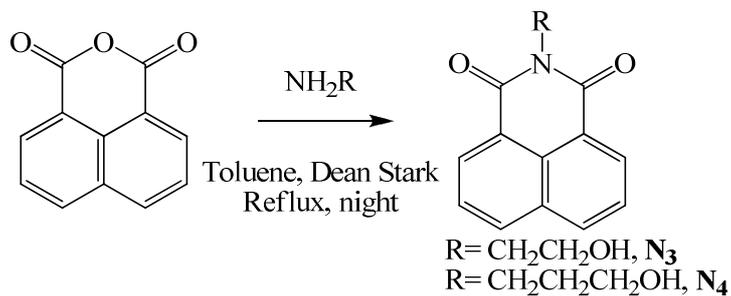


Figure 104 : Synthèse des Naphtalimide N3 et N4

II.1.2. Synthèse du sulfonate N5

Un sulfonate a été synthétisé selon le protocole décrit par Cammidge *et al.*^[207] La structure RX de ce composé est donnée en annexe (Figure 105).

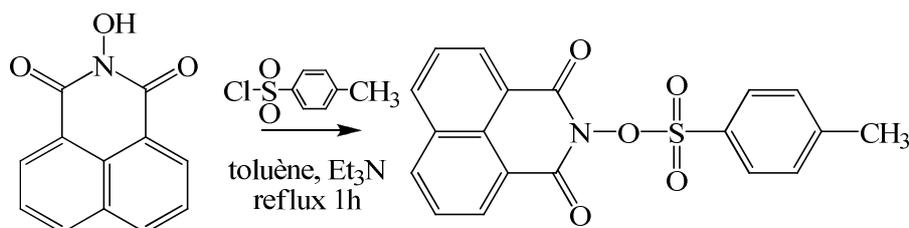


Figure 105 : Synthèse de N5

II.1.3. Synthèse de la naphtolactame N6

Par traitement en milieu basique du sulfonate, on réalise une décarboxylation qui est suivie d'une cyclisation en milieu acide pour donner la naphtolactame^[207] (Figure 106) :

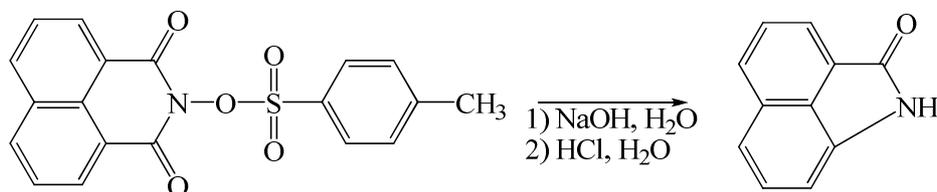


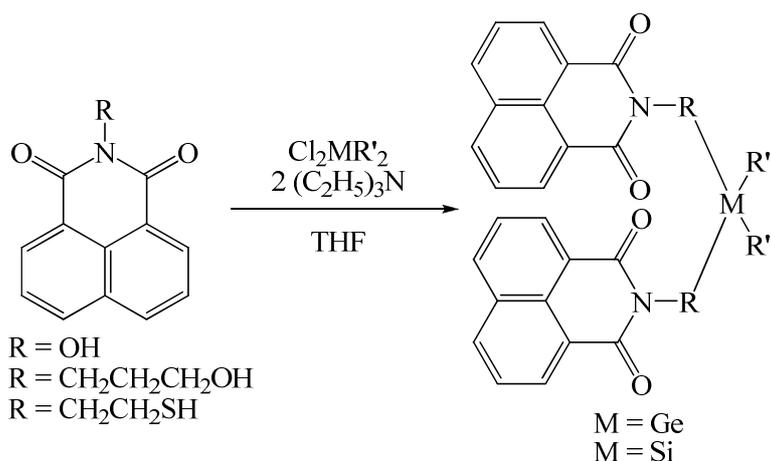
Figure 106 : Synthèse de N6

II.2. Les Dérivés Organométalliques

Plusieurs composés organométalliques ont été synthétisés et caractérisés selon les protocoles décrits précédemment.

II.2.1. Synthèse des dialkylgermanes et silanes correspondants

Les dérivés organométalliques de type dialkylgermane et dialkylsilane ont été synthétisés selon les voies A2 et B2 décrites au chapitre 2 de la partie 2 (Tableau 43).

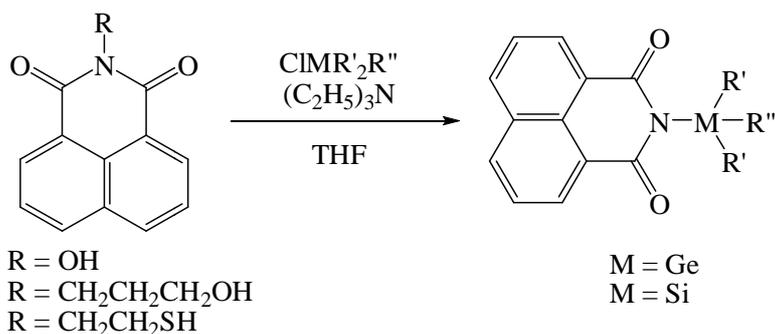


R=	M	R' = R''	Voie	N°
OH	Si	CH ₃	A2	N7
CH ₂ CH ₂ SH	Ge	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	A2 et B2	N8
CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	Si	CH ₃	A2	N9
	Si	Ph	A2	N10
	Ge	CH ₃	A2	N11

Tableau 43 : Synthèse des dialkylgermanes et des dialkylsilanes

II.2.2. Synthèse des trialkylgermananes et silanes correspondants

Les dérivés organométalliques de type trialkylgermane et trialkylsilane ont été synthétisés selon la voie A3 décrite au chapitre 2 de la partie 2 (Tableau 44).

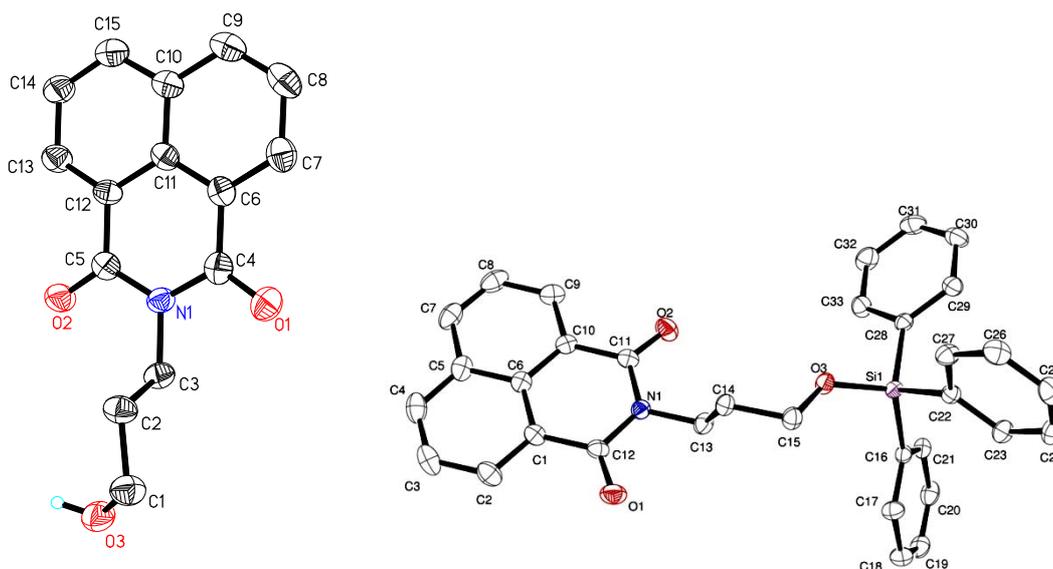


R=	M	R'=R''	N°
OH	Si	C ₂ H ₅	N12
CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	Si	CH ₃	N13
	Si	Ph	N14
	Ge	CH ₃	N15
	Ge	Ph	N16

Tableau 44 : Synthèse des trialkylgermanes et des trialkylsilanes

II.3. Données RX

Les structures des composés **N4** et **N14** ont été obtenues (Figure 107). Ces deux structures permettent de confirmer l'obtention de ces deux composés. Nous pouvons aussi remarquer que l'introduction d'un groupement organométallique n'induit aucune variation de la longueur de la liaison C-O de l'alcool portant O₃ (1,42 Å). Une légère modification de l'angle C₂-C₁-O₃ (112,7°) (respectivement C₁₄-C₁₅-O₃ (108,98°)) est observée lors de l'introduction du précurseur silicié.


 Figure 107 : Structure de **N4** et de **N14**

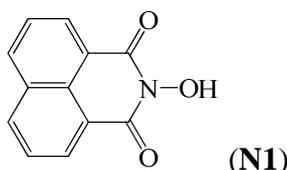
(les données complètes de ces structures sont données en Annexe 2)

III. Protocoles de Synthèse

III.1. Les Dérivés Organiques

III.1.1. Synthèse des naphthalimides

III.1.1.a. Synthèse du 2-hydroxybenzoisoquinoline-1,3-dione (N1)



A une solution d'anhydride-1,8-naphtalique (10,00 g, 50,50 mmol) dans 500 ml de pyridine anhydre sont ajoutés le chlorhydrate d'hydroxylamine (5,23 g, 75,75 mmol, 1,5 équivalents) et K_2CO_3 (10,45 g, 75,75 mmol, 1,5 équivalents). Le mélange est porté à reflux pendant 1 nuit sur tamis moléculaire. La solution noircit. La solution est laissée revenir à température ambiante, puis le tamis est éliminé par filtration. Après évaporation à sec, le produit est recristallisé à chaud dans l'éthanol absolu.

On récupère 9,56 g de produit par filtration (44,87 mmol, Rdt : 88,9%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanc cassé

RMN 1H (300,13 MHz, DMSO, δ , ppm) : 7,86 (t, J = 7,4Hz, 2H_{Ar}), 8,46 (t, J = 9,1Hz, 4H_{Ar}), 10,75 (s, 1H, OH)

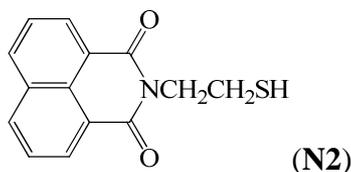
RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO, δ , ppm) : 122,8 (C_{Ar}), 126,7 (CH_{Ar}), 127,8 (C_{Ar}), 131,3 (CH_{Ar}), 131,8 (C_{Ar}), 135,0 (CH_{Ar}), 161,3 (C=O)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 214 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3482,3, ν_{CO} = 1707,2 et 1661,8

Analyse élémentaire (C₁₂H₇NO₃) :
 Calc.% : C, 67,61 ; H, 3,31 ; N, 6,57
 Exp.% : C, 67,37 ; H, 2,77 ; N, 6,45

III.1.1.b. Synthèse du 2-(2-mercaptoéthyl)-benzoisoquinoline-1,3-dione (N2)



A une solution d'anhydride-1,8-naphtalique (10,00 g, 50,5 mmol) dans 500 ml de DMF anhydre sont ajoutés 1,1 équivalents de cystéamine (4,28 g, 55,5 mmol). Le mélange est porté à reflux pendant 1 nuit sur tamis moléculaire. La solution noircit.

Ensuite, on laisse la solution revenir à température ambiante, puis on élimine le tamis par filtration. On ajoute alors 500 ml d'eau au mélange réactionnel. Le précipité obtenu est récupéré par filtration puis lavé à l'éthanol. On recristallise le produit à chaud dans l'éthanol absolu. Le précipité blanc correspond à 10,64 g de produit (41,4 mmol, Rdt : 81,9%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanc cassé

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,20 (s, 1H, SH), 3,09 (t, J = 6,5Hz, 2H, CH₂SH), 4,40 (t, J = 5,7Hz, 2H, CH₂N), 7,88 (dd, J = 8,1Hz, 2H_{Ar}), 8,35 - 8,51 (m, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,8 (CH₂N), 42,8 (CH₂SH), 122,4 (C_{Ar}), 127,6 (CH_{Ar}), 127,8 (C_{Ar}), 131,2 (CH_{Ar}), 131,7 (C_{Ar}), 134,8 (CH_{Ar}), 163,7 (C=O)

Spectre de masse (EI): m/z = 257 [M]⁺

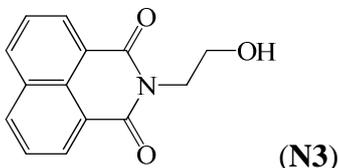
Spectre de masse (DCI, CH₂Cl₂): m/z = 258 [M+1]⁺, 275 [M+NH₄]⁺,

292 [M+N₂H₇]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2584,3, ν_{CO} = 1694,3 et 1657,2

Analyse élémentaire (C₁₄H₁₁NO₂S) : Calc.% : C, 65,35 ; H, 4,31 ; N, 5,44

Exp.% : C, 65,31 ; H, 4,48 ; N, 5,21

III.1.1.c. Synthèse du 2-(2-hydroxyéthyl)benzoisoquinoline-1,3-dione(N3)

A une solution d'anhydride-1,8-naphtalique (5 g, 25,23 mmol) dans 300 ml de toluène est ajouté 2,00 équivalents d'éthanolamine (3,08 g, 50,46 mmol). Le mélange est porté à reflux pendant 2 jours dans un Dean Starck (la quantité d'eau récoltée est alors constante).

On laisse la solution revenir à température ambiante, puis le solvant est évaporé à sec. Le résidu obtenu est recristallisé à chaud dans l'éthanol absolu. Le précipité blanc récupéré après refroidissement sous forme d'aiguilles fines correspond à 5,94 g de produit attendu (24,64 mmol, Rdt : 97,7%).

Caractérisation

Aspect : Cristaux blancs (aiguilles)

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 3,63 (t, J = 6,3Hz, 2H, CH₂OH), 4,12 (t, J = 6,6Hz, 2H, NCH₂CH₂), 4,84 (s, 1H, OH), 7,76 (t, J = 8,2Hz, 2H_{Ar}), 8,34 (td, J = 9,1Hz, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 40,0 (CH₂N), 58,3 (CH₂OH), 122,5 (C_{Ar}), 127,5 (CH_{Ar}), 127,7 (C_{Ar}), 131,0 (CH_{Ar}), 131,6 (C_{Ar}), 134,5 (CH_{Ar}), 163,9 (C=O)

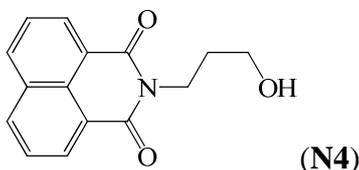
Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 242 [M+1]⁺, 259 [M+NH₄]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3483,9, ν_{CO} = 1695,8 et 1630,3

Analyse élémentaire (C₁₄H₁₁NO₃) :

Calc. % :	C, 69,70 ; H, 4,60 ; N, 5,81
Exp. % :	C, 69,79 ; H, 4,48 ; N, 5,78

III.1.1.d. Synthèse du 2-(3-hydroxypropyl)benzoisoquinoline-1,3-dione (N4)



A une solution d'anhydride-1,8-naphtalique (5 g, 25,23 mmol) dans 300 ml de toluène sont ajoutés 2,00 équivalents de propanolamine (3,79 g, 50,46 mmol). Le mélange est porté à reflux pendant 2 jours dans un Dean Starck (la quantité d'eau récoltée est alors constante).

On laisse la solution revenir à température ambiante, puis on évapore à sec. Le résidu obtenu est recristallisé à chaud dans l'éthanol absolu. Le précipité blanc récupéré après refroidissement sous forme d'aiguilles fines correspond à 6,08 g de produit attendu (23,83 mmol, Rdt : 94,5%).

Caractérisation

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,80 (p, J = 7,4Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,51 (t, J = 6,2Hz, 2H, CH₂CH₂OH), 4,08 (t, J = 4,5Hz, 2H, NCH₂CH₂), 4,53 (s, 1H, OH), 7,80 (t, J = 8,1Hz, 2H_{Ar}), 8,53 (td, J = 8,3Hz, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 31,5 (CH₂CH₂CH₂), 38,0 (CH₂N), 59,5 (CH₂OH), 122,4 (C_{Ar}), 127,6 (CH_{Ar}), 127,7 (C_{Ar}), 131,0 (CH_{Ar}), 131,6 (C_{Ar}), 134,6 (CH_{Ar}), 163,8 (C=O)

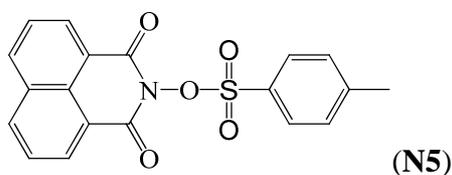
Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 256 [M]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{OH} = 3423,0, ν_{CO} = 1693,8 et 1643,0

Analyse élémentaire (C₁₅H₁₃NO₃) :

Calc. % :	C, 70,58 ; H, 5,13 ; N, 5,49
Exp. % :	C, 69,96 ; H, 5,03 ; N, 5,39

III.1.2. Synthèse du 1,3-dioxobenzoisoquinolin-2-yl 4-méthylbenzène sulfonate (N5)



Une solution d'anhydride-1,8-naphtalique (2,00 g, 10,1 mmol) et chlorhydrate d'hydroxylamine (0,77 g, 11,1 mmol, 1,1 équivalents) dans la pyridine anhydre (50 ml) est portée à reflux pendant 1h. Après retour à température ambiante, on ajoute par portions, avec précaution, le chlorure de *p*-toluène sulfonyle (2,11 g, 11,1 mmol, 1,1 équivalents). On porte à reflux le mélange réactionnel pendant 1h.

Le mélange est ajouté à 350 ml d'eau. On récupère ensuite le précipité formé par filtration puis on le lave avec une solution à 0,5 N de soude dans l'eau pour éliminer le N-hydronaphtalamide résiduel. On recristallise alors le produit dans le toluène.

On récupère 2,97 g de produit (8,1 mmol, Rdt : 80,2%).

Caractérisation

Aspect : Aiguilles jaunes

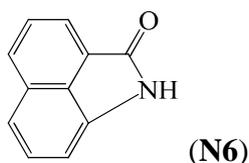
RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 2,34 (s, 3H, CH₃), 7,53 (d, J = 8,0Hz, 2H_{Ar}), 7,90 - 7,98 (m, 4H_{Ar}), 8,49 - 8,58 (m, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 21,8 (CH₃), 122,4 (C_{Ar}), 127,9 (CH_{Ar}), 129,4 (CH_{Ar}), 130,7 (CH_{Ar}), 132,0 (C_{Ar}), 132,2 (CH_{Ar}), 136,0 (CH_{Ar}), 147,2 (C_{Ar}), 160,2 (C=O)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 368 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1693,6 et 1644,8

Analyse élémentaire (C₁₉H₁₃NO₅S) :
 Calc.% : C, 62,12 ; H, 3,57 ; N, 3,81
 Exp.% : C, 62,79 ; H, 3,10 ; N, 3,81

III.1.3. Synthèse du benzoindol-2-one (N6)

Une solution de sulfonate **N5** (2,50 g, 6,81 mmol) est portée à ébullition dans un mélange eau/éthanol (175 ml/750 ml) pendant 2h en présence de NaOH (2,72 g, 68,11 mmol, 10 équivalents). On élimine l'éthanol par distillation. Après retour à température ambiante, on ajoute à froid 35 ml d'acide chlorhydrique concentré. On laisse précipiter pendant la nuit. Le solide est récupéré par filtration, lavé à l'eau et séché à 100°C. On recristallise le produit dans le toluène. Le produit est récupéré sous forme d'aiguille jaune.

On récupère 1,08 g de produit (6,41 mmol, Rdt : 94,1%).

Caractérisation

Aspect : Aiguilles jaunes

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 7,00 (d, J = 6,8Hz, 1H_{Ar}), 7,45 - 7,51 (m, 1H_{Ar}), 7,57 (d, J = 8,3Hz, 1H_{Ar}), 7,78 (t, J = 8,2Hz, 1H_{Ar}), 8,02 (d, J = 6,9Hz, 1H_{Ar}), 8,13 (d, J = 8,1Hz, 1H_{Ar}), 10,81 (s, 1H, NH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 106,6 (CH_{Ar}), 119,9 (CH_{Ar}), 124,2 (CH_{Ar}), 126,1 (C_{Ar}), 127,4 (C_{Ar}), 129,3 (CH_{Ar}), 129,4 (C_{Ar}), 129,5 (CH_{Ar}), 131,3 (CH_{Ar}), 138,6 (C_{Ar}), 169,3 (C=O)

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 170[M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{NH} = 3195,4, ν_{CO} = 1738,3

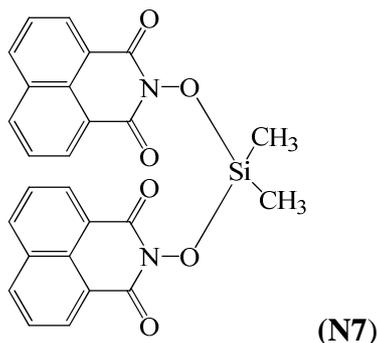
Analyse élémentaire (C₁₁H₇NO) : Calc.% : C, 78,09 ; H, 4,17 ; N, 8,28

Exp.% : C, 77,41 ; H, 4,97 ; N, 7,98

III.2. Les Dérivés Organométalliques

III.2.1. Synthèse des dialkylgermanes et silanes

III.2.1.a. Synthèse du 2-2'-(diméthylsilanediyl)bis(oxy)bis(benzoisoquinoline-1,3-dione) (N7)



Voie A2

Le protocole décrit pour la voie A2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,00 g de **N1** (4,69 mmol) dans 60 ml de THF anhydre

0,50 g de triéthylamine (4,92 mmol, 1,05 équivalents)

0,33 g de dichlorodiméthylsilane (2,58 mmol, 0,55 équivalents)

dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,11 g de produit (2,31 mmol, Rdt : 98,5%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,10 (t, 6H, CH₃), 7,91 (dd, J = 7,3Hz, 4H_{Ar}), 8,42 - 8,53 (m, 8H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 0,9 (CH₃), 122,9 (C_{Ar}), 126,8 (C_{Ar}), 127,6 (CH_{Ar}), 128,1 (CH_{Ar}), 131,3 (CH_{Ar}), 131,9 (C_{Ar}), 133,0 (CH_{Ar}), 135,1 (CH_{Ar}), 135,9 (CH_{Ar}), 161,4 (C=O)

RMN ²⁹Si (59,63 MHz, DMSO, δ, ppm) : -21,07

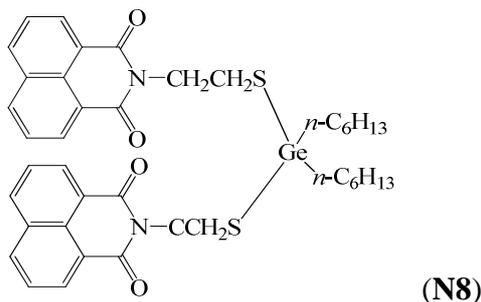
Spectre de masse (DCI, THF) : 500 [M+NH₄]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1708,0 et 1660,9

Analyse élémentaire (C₂₆H₁₈N₂O₆Si) : Calc.% : C, 64,72 ; H, 3,76 ; N, 5,81

Exp.% : C, 64,80 ; H, 3,69 ; N, 4,92

III.2.1.b. Synthèse du 2-2'-(2,2'-(di-*n*-hexylgermanediyl)bis(sulfane diyl)bis(éthane-2,1-diyl))bis(benzoisoquinoline-1,3-dione (N8)



Voie A2

Le protocole décrit pour la voie A2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **N2** (3,89mmol) dans 60 ml de THF anhydre
 - 0,41 g de triéthylamine (4,08 mmol, 1,05 équivalents)
 - 0,67 g de dichlorodi-*n*-hexylgermane (2,14 mmol, 0,55 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 0,85 g de produit (1,12 mmol, Rdt : 57,6%).

Voie B2

Le protocole décrit pour la voie B2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,00 g de **N2** (3,89mmol) dans 60 ml de THF anhydre
- 0,83 g de N,N,N',N'-tétraéthyl-1,1-di-*n*-hexylgermanediamine (2,14 mmol, 0,55 équivalents) dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,38 g de produit (1,82 mmol, Rdt : 93,6%).

Caractérisation

Aspect : Poudre beige

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,81 - 0,86 (m, 6H, CH₃-CH₂), 1,21 - 1,39 (m, 16H, CH₂), 1,53 - 1,84 (m, 4H, CH₂), 2,83 (t, J = 6,4Hz, 4H, CH₂), 4,15 (t, J = 6,5Hz, 4H, CH₂), 7,78 (t, J = 7,0Hz, 4H_{Ar}), 8,33 (dd, J = 8,1Hz, 8H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 12,3 (CH₂), 14,3 (CH₃), 21,8 (CH₂N), 22,4 (CH₂), 31,2 (CH₂), 32,7 (CH₂), 42,8 (CH₂SH), 123,1 (C_{Ar}), 128,5 (CH_{Ar}), 128,8 (C_{Ar}), 132,1 (CH_{Ar}), 132,7 (C_{Ar}), 135,3 (CH_{Ar}), 166,6 (C=O)

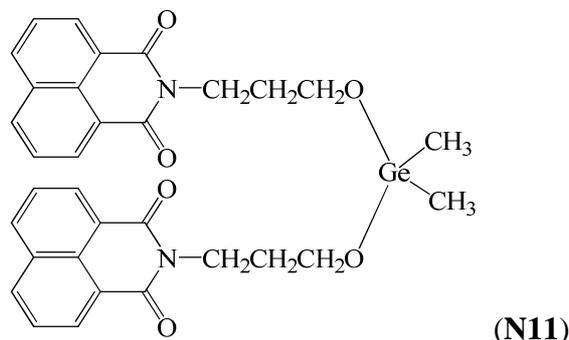
Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 671 [M-C₆H₁₃]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1708,2 et 1680,8

Analyse élémentaire (C₄₀H₄₆GeN₂O₄S₂) : Calc.% : C, 63,58 ; H, 6,14 ; N, 3,71

Exp.% : C, 63,38 ; H, 7,68 ; N, 3,19

III.2.1.e. Synthèse du 2-2'-(3,3'-(diméthylgermanediyl)bis (oxy)bis (propane-3,1-diyl))bis(benzoisoquinoline-1,3-dione (N11)



Voie A2

Le protocole décrit pour la voie A2, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,13 g de **N4** (4,44 mmol) dans 60 ml de THF anhydre

0,47 g de triéthylamine (4,66 mmol, 1,05 équivalents)

0,42 g de dichlorodiméthylgermane (2,44 mmol, 0,55 équivalents)

dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,25g de produit (2,05 mmol, Rdt : 92,3%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

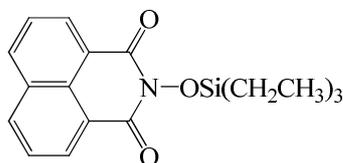
RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,51 (s, 6H, CH₃), 1,80 (p, J = 6,9Hz, 4H, CH₂CH₂CH₂), 3,53 (t, J = 5,5Hz, 4H, CH₂OH), 4,13 (t, J = 7,0Hz, 4H, CH₂N), 7,86 (dd, J = 7,5Hz, 4H_{Ar}), 8,43 (q, J = 8,0Hz, 8H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 5,1 (CH₃), 31,5 (CH₂CH₂CH₂), 38,1 (CH₂N), 59,5 (CH₂O), 122,5 (CH_{Ar}), 127,6 (C_{Ar}), 127,9 (CH_{Ar}), 131,1 (C_{Ar}), 131,1 (CH_{Ar}), 134,7 (C_{Ar}), 163,8 (C=O)

Spectre de masse (DCI, THF) : 612 [M]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1695,7 et 1643,4

Analyse élémentaire (C₃₂H₃₀GeN₂O₆) : Calc.% : C, 62,88 ; H, 4,95 ; N, 4,58
Exp.% : C, 63,04 ; H, 4,74 ; N, 4,19

III.2.2. Synthèse des trialkylgermanes et silanesIII.2.2.a. Synthèse du 2-(triéthylsilyloxy)benzoisoquinoline-1,3-dione(N12)**(N12)**Voie A3

Le protocole décrit pour la voie A3, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,00 g de **N1** (4,69 mmol) dans 60 ml de THF anhydre

0,50 g de triéthylamine (4,92 mmol, 1,05 équivalents)

0,70 g de chlorotriéthylsilane (4,66 mmol, 1,05 équivalents)

dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,07 g de produit (3,27 mmol, Rdt : 69,72%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,44 (q, J = 8,0Hz, 6H, CH₂), 0,89 (t, J = 7,4Hz, 9H, CH₃), 7,89 (dd, J = 8,2Hz, 2H_{Ar}), 8,50 (td, J = 9,7Hz, 4H_{Ar})

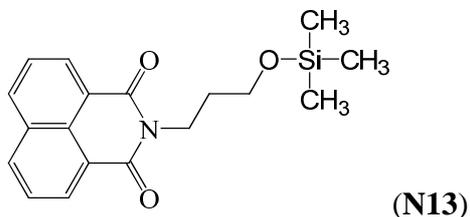
RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 6,2 (CH₃), 7,3 (CH₂), 122,9 (C_{Ar}), 126,8 (CH_{Ar}), 127,8 (C_{Ar}), 131,2 (CH_{Ar}), 131,3 (CH_{Ar}), 131,9 (C_{Ar}), 135,1 (CH_{Ar}), 161,3 (C=O)

RMN ²⁹Si (59, 63 MHz, DMSO, δ, ppm) : 13,03

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 328 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1707,2 et 1661,8

III.2.2.b. Synthèse du 2-(3-(triméthylsilyloxy)propyl)benzoisoquinoline-1,3-dione (N13)



Voie A3

Le protocole décrit pour la voie A3, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

- 1,13 g de **N4** (4,44 mmol) dans 60 ml de THF anhydre
- 0,47 g de triéthylamine (4,66 mmol, 1,05 équivalents)
- 0,50 g de chlorotriméthylsilane (4,66 mmol, 1,05 équivalents)
- dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,30 g de produit (3,98 mmol, Rdt : 89,6%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : -0,01 (s, 9H, CH₃), 1,87 (p, J = 6,7Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,68 (q, J = 6,1Hz, 2H, CH₂OH), 4,16 (t, J = 7,0Hz, 2H, CH₂N), 7,89 (td, J = 7,4Hz, 2H_{Ar}), 8,51 (q, J = 8,3Hz, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : -0,1 (CH₃), 30,9 (CH₂CH₂CH₂), 38,1 (CH₂N), 59,5 (CH₂O), 122,6 (C_{Ar}), 127,7 (CH_{Ar}), 131,1 (C_{Ar}), 131,3 (CH_{Ar}), 131,8 (C_{Ar}), 134,7 (CH_{Ar}), 163,9 (C=O)

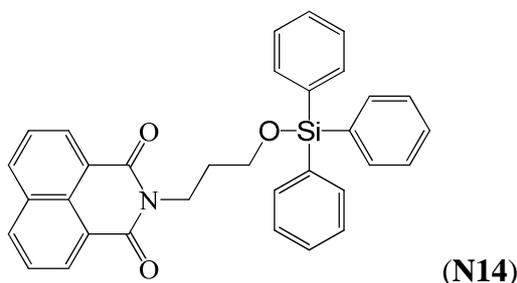
RMN ²⁹Si (59, 63 MHz, DMSO, δ, ppm) : 16,59

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 328 [M+1]⁺, 345 [M+NH₄]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1703,0 et 1657,7

Analyse élémentaire (C₁₈H₂₁NO₃Si) : Calc.% : C, 66,02 ; H, 6,46 ; N, 4,28
Exp.% : C, 66,89 ; H, 6,54 ; N, 4,02

III.2.2.c. Synthèse du 2-(3-(triphéthylsilyloxy)propyl)benzoisoquinoline-1,3-dione (N14)



Voie A3

Le protocole décrit pour la voie A3, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,13 g de **N4** (4,44 mmol) dans 60 ml de THF anhydre

0,47 g de triéthylamine (4,66 mmol, 1,05 équivalents)

1,37 g de dichlorodiméthylgermane (4,66 mmol, 1,05 équivalents)

dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 2,11 g de produit (4,12 mmol, Rdt : 92,8%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 1,95 (p, J = 6,5Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,87 (t, J = 6,2Hz, 2H, CH₂OH), 4,20 (t, J = 6,9Hz, 2H, CH₂N), 7,32 - 7,42 (m, 8H_{Ar}), 7,43 - 7,53 (m, 7H_{Ar}) 7,87 (t, J = 8,1Hz, 2H_{Ar}), 8,47 (q, J = 7,3Hz, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 31,0 (CH₂CH₂CH₂), 37,8 (CH₂N), 59,5 (CH₂O), 122,6 (C_{Ar}), 127,6 (C_{Ar}), 128,4 (C_{Ar}), 130,6 (CH_{Ar}), 131,1 (CH_{Ar}), 131,8 (CH_{Ar}), 134,1 (CH_{Ar}), 134,8 (CH_{Ar}), 135,2 (CH_{Ar}), 163,9 (C=O)

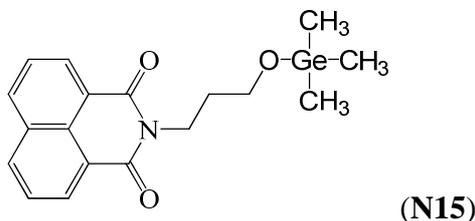
Spectre de masse (DCI, THF) : 514 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1697,2 et 1660,5

Analyse élémentaire (C₃₃H₂₇NO₃Si) : Calc.% : C, 76,41 ; H, 4,49 ; N, 2,97

Exp.% : C, 76,54 ; H, 5,07 ; N, 2,68

III.2.2.d. Synthèse du 2-(3-(triméthylgermyloxy)propyl)benzoisoquinoline-1,3-dione (N15)



Voie A3

Le protocole décrit pour la voie A3, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

1,13 g de **N4** (4,44 mmol) dans 60 ml de THF anhydre

0,47 g de triéthylamine (4,66 mmol, 1,05 équivalents)

0,72 g de chlorotriméthylgermane (4,66 mmol, 1,05 équivalents)

dans 30 ml de THF anhydre.

On récupère 1,59 g de produit (4,26 mmol, Rdt : 95,9%).

Caractérisation

Aspect : Poudre blanche

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,26 (s, 9H, CH₃), 1,81 (p, J = 7,3Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,52 (q, J = 5,4Hz, 2H, CH₂O), 4,12 (t, J = 7,5Hz, 2H, CH₂N), 7,88 (t, J = 8,1Hz, 2H_{Ar}), 8,48 (q, J = 7,3Hz, 4H_{Ar})

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,7 (CH₃), 31,5 (CH₂CH₂CH₂), 38,1 (CH₂N), 59,5 (CH₂O), 122,5 (C_{Ar}), 127,6 (CH_{Ar}), 127,7 (C_{Ar}), 131,1 (CH_{Ar}), 131,7 (C_{Ar}), 134,6 (CH_{Ar}), 163,8 (C=O)

Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 372 [M]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{CO} = 1695,6 et 1652,1

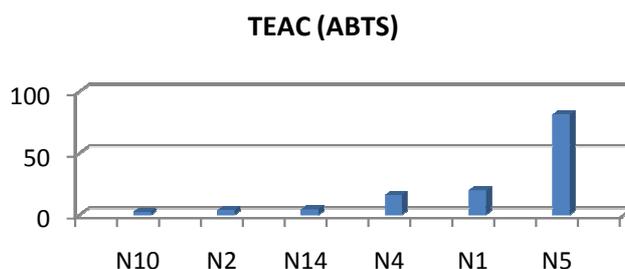
Analyse élémentaire (C₁₈H₂₁GeNO₃) : Calc.% : C, 58,12 ; H, 5,69 ; N, 3,77

Exp.% : C, 58,75 ; H, 5,67 ; N, 3,50

IV. Evaluation in vitro

IV.1. Evaluation des Propriétés Antiradicalaires et Antioxydantes

La plupart des composés de cette famille présentent des propriétés antioxydantes et antiradicalaires trop faibles pour être mesurées (nous sommes ici limités par la solubilité des produits). Parmi les dérivés organiques, seul **N2** semble posséder des propriétés antiradicalaires convenables pour notre étude, ce qui confirme l'intérêt des thiols pour l'inhibition radicalaire. De plus, on voit tout de même apparaître un effet intéressant sur les propriétés d'inhibition du radical cation ABTS⁺ lors de l'introduction des précurseurs organométalliques. En effet, on observe une chute du TEAC, c'est-à-dire une nette augmentation des propriétés antiradicalaires pour certains dérivés organométalliques (**N10** et **N14**) en comparaison avec leur dérivé organique parent **N4**. La présence de deux motifs de type « **N4** » sur la molécule **N10** permet une amélioration de l'activité en comparaison à la molécule **N14** qui présente un seul motif « **N4** ». Nous devons aussi noter que les silanols Ph₂SiOH₂ (**Si1**) et Ph₃SiOH (**Si2**) étudiés ici ne possèdent pas de propriétés antiradicalaires. La stratégie « sulfonate » (**N5**) inactive les propriétés antiradicalaires de **N1**. Cette inactivation peut être due à la résistance de la liaison « O-S » empêchant la libération du principe actif.



Graphique 17 : Variations des propriétés antiradicalaires des naphtalimides (test à l'ABTS)

N°	LogP	% de protection		% de protection	
		116 μM	Déviati Standard	24 μM	Déviati Standard
N3	1,47	42,0	0,5	1,2	0,9
N4	1,57	32,4	2,6	-1,3	1,1

Tableau 45 : Variations des propriétés antioxydantes des naphtalimides (test de peroxydation lipidique)

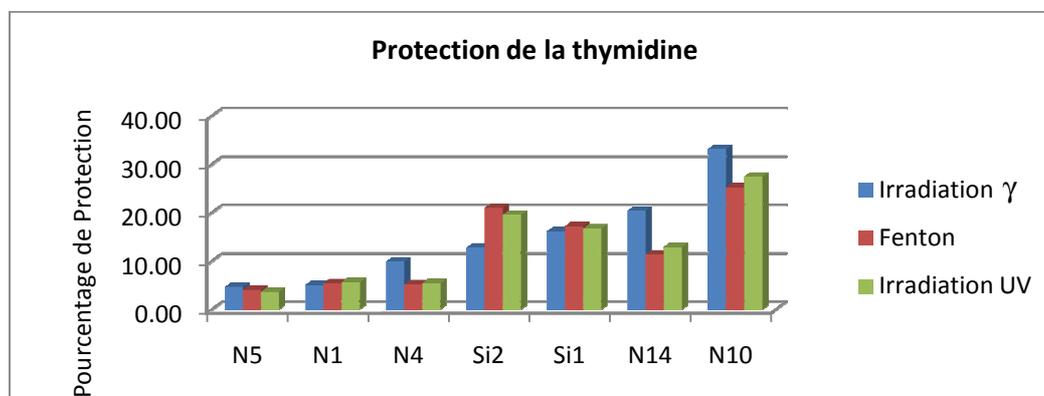
En considérant les propriétés de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique, on observe que seuls deux composés **N3** et **N4** permettent une protection à 116 μM (Tableau 45). Cependant, aucune protection n'est observée à 24 μM . Ces observations laissent supposer l'importance de la fonction alcool primaire libre, nécessaire à la protection dans ce modèle. De plus, cette fonction doit être portée par une chaîne alkyle, un lien direct entre l'alcool et l'azote N-OH ne permettant aucune protection (**N1**). De ces observations, un mécanisme possible d'inhibition des radicaux pourrait être l'oxydation de la fonction terminale alcool de la naphtalimide, réduisant ainsi les lipoperoxydes inducteurs de la peroxydation lipidique.

Aucun des deux silanols ne permet de protection vis-à-vis de la peroxydation lipidique.

IV.2. Evaluation des Propriétés de Protection de la Thymidine

Les tests suivants sont un extrait des tests réalisés par l'équipe du CEA de Saclay. Seuls quelques résultats obtenus avec cette famille de composés seront présentés.

Un second intérêt de l'utilisation de précurseurs organométalliques est l'effet sur la protection de la thymidine (Graphique 18). En effet, on observe que, quel que soit le type d'irradiation utilisé, on a une nette augmentation (environ 10%) de la protection de la thymidine par les molécules présentant un précurseur organométallique (**N10** et **N14**) en comparaison avec leurs dérivés organiques parents (**N1** et **N4**). De plus, le test des silanols a montré que ces composés permettent une protection de la thymidine. Ainsi, l'augmentation d'efficacité due aux précurseurs organométalliques peut s'expliquer par l'addition des propriétés de protection des silanols à celles des composés organiques.

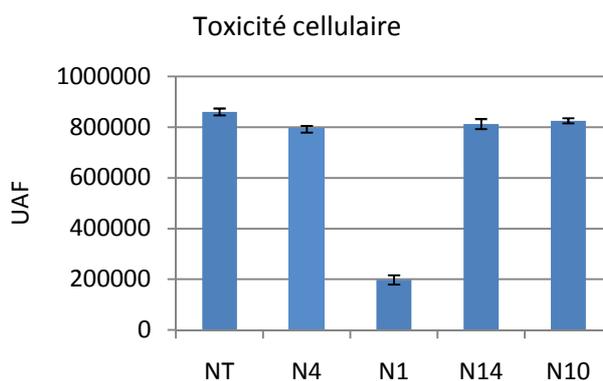


Graphique 18 : Variations des propriétés de protection de la thymidine

IV.3. Evaluation de la Protection Cellulaire

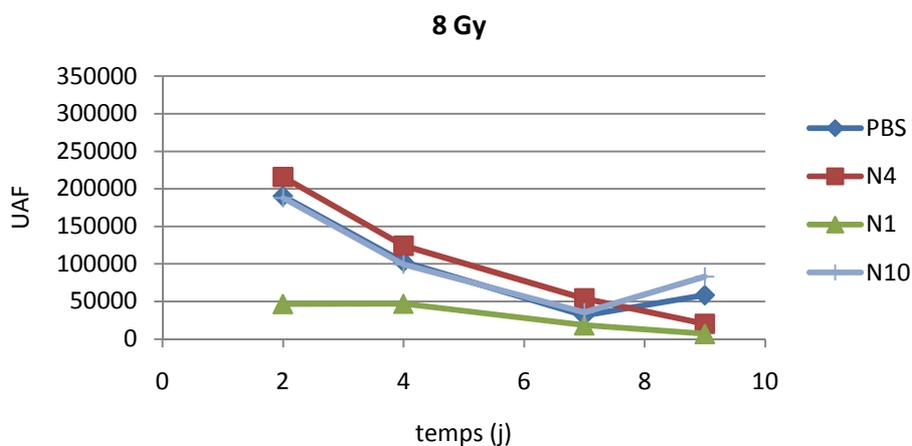
Les tests suivants sont un extrait des tests réalisés par l'équipe de l'ULP de Strasbourg. Seuls quelques résultats obtenus avec cette famille de composés seront présentés.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer, à partir de l'évaluation de la toxicité cellulaire, que seul le composé **N1** présente une certaine toxicité cellulaire (Graphique 19). L'introduction d'un groupement organométallique sur **N4** n'induit aucune toxicité (**N10** et **N14**).



Graphique 19 : Variations de la toxicité cellulaire des naphtalimides

De plus, les deux composés organiques **N1** et **N4** ne permettent aucune protection. Cependant, l'introduction de précurseurs organométalliques influe sur la protection cellulaire. Nous observons alors une augmentation du pouvoir radioprotecteur pour **N10** en comparaison avec **N4** (Graphique 20).



Graphique 20 : Variations des propriétés radioprotectrices cellulaires des naphtalimides

IV.4. Conclusion

Ainsi, l'évaluation des dérivés des naphtalimides a montré que bien que ces composés soient, pour la plupart, inactifs vis-à-vis du test à l'ABTS et de la peroxydation lipidique, quelques composés (**N10** et **N14**) permettent de montrer un effet des groupements organosiliciés sur les propriétés antiradicalaires. Cet effet du précurseur organométallique est aussi observable lors du test de protection de la thymidine réalisé par l'équipe du CEA de Saclay. Les premiers résultats de protection cellulaire obtenus par l'équipe de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg semblent également aller dans le sens d'une augmentation de l'effet radioprotecteur par l'introduction des précurseurs organométalliques.

V. Conclusion

Dans cette partie, nous avons synthétisé 16 naphtalimides organiques et organométalliques. Ces composés, bien que ne présentant pas de propriétés radioprotectrices marquées, ont permis d'avancer dans la compréhension de l'effet « organométallique » observé lors d'études précédentes en radioprotection chimique. Les premiers éléments expliquant la baisse de la toxicité et l'augmentation des propriétés radioprotectrices *in vivo* par l'introduction de précurseurs organométalliques seraient respectivement la baisse de la toxicité cellulaire et l'augmentation du pouvoir de protection de la thymidine et peut-être des cellules. Cette augmentation des propriétés de protection pourrait elle-même s'expliquer par l'augmentation des propriétés de piégeage des radicaux observée lors du test à l'ABTS.

Partie V :
Perspectives

Les Dithiols

I. Caractéristiques, Propriétés et Synthèse

Comme évoqué dans la partie 2, de nombreuses molécules contenant du soufre ont été étudiées pour la radioprotection chimique. Entre autres, les dérivés du 1,2-dithiol-3-thione apparaissent comme des radioprotecteurs potentiels^[88, 89]. Nous nous intéresserons à une structure proche, le 4,5-dimercapto-1,3-dithiole-2-thione, largement utilisé en recherche en électronique pour ses propriétés de transfert électronique.

La synthèse d'un composé organogermanié issu de ce dérivé a été réalisée à partir du 2-thioxo-1,3-dithiole-2-thione, selon le schéma réactionnel suivant (Figure 108) :

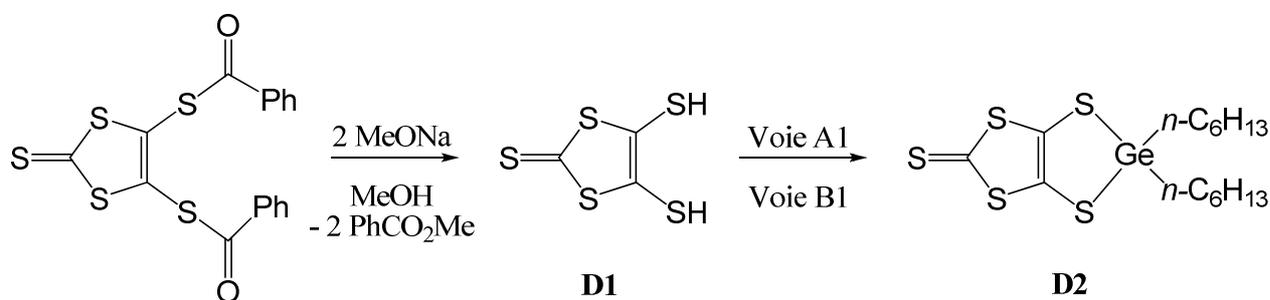
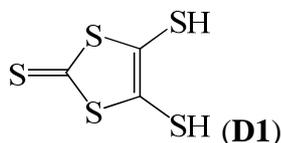


Figure 108 : Synthèse de D1 et de D2

La première étape consiste en une méthanolyse du thioester menant au sel de sodium du 2-thioxo-1,3-dithiole-4,5-bis(thioalate). L'hydrolyse acide de ce dérivé conduit alors au 4,5-dimercapto-1,3-dithiole-2-thione **D1**. Ce composé est alors conservé sous argon. Il a ensuite été utilisé pour la synthèse du composé **D2** selon les deux protocoles classiques.

II. Protocoles de Synthèse

II.1.1.a. Synthèse du 4,5-dimercapto-1,3-dithiole-2-thione (**D1**)



A une solution sous agitation de S,S'-2-thioxo-1,3-dithiole-4,5-diyl dibenzothioate (4,00 g, 9,85 mmol) dans le méthanol (100 ml) est ajouté doucement du méthanolate de sodium (5,48 g, 98,54 mmol, 10 équivalents). Le mélange devient rose puis bordeaux. La réaction est très exothermique.

Après 2 heures d'agitation, on évapore le méthanol à sec. Le résidu est trituré pendant 1 nuit dans un mélange dichlorométhane/pentane (2/1). Puis le précipité est récupéré par filtration puis est lavé avec 2×20 ml d'eau puis 2×20 ml d'acétone avant d'être séché par 2×20 ml d'éther. Le produit est récupéré sous forme de poudre (1,04 g, 5,26 mmol, Rdt : 53,3%).

Caractérisation

Aspect : Poudre beige claire

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 3,15 (s, 2H, SH)

RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ, ppm) : 126,0 (C_{Ar})

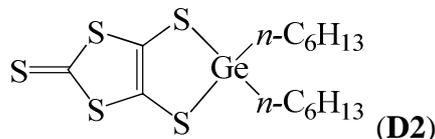
Spectre de masse (DCI, THF) : m/z = 199 [M+1]⁺

I.R. (cm⁻¹) : ν_{SH} = 2361,7 et 2358,2

Analyse élémentaire (C₃H₂S₅) : Calc.% : C, 18,16 ; H, 1,02

Exp.% : C, 19,08 ; H, 2,13

II.1.1.b. Synthèse du 2, 2-di-*n*-hexyl-[1,3]dithiolo[4,5][1,3,2]dithia
germole-5-thione (D2)



Voie A1

Le protocole décrit pour la voie A1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

0,50 g de **D1** (2,52 mmol) dans 30 ml de THF anhydre

0,52 g de triéthylamine (5,18 mmol, 2,05 équivalents)

0,83 g de dichloro-di-*n*-hexylgermane (2,65 mmol, 1,05 équivalents)

dans 15 ml de THF anhydre.

On récupère 0,94 g de produit (2,14 mmol, Rdt : 84,9%).

Voie B1

Le protocole décrit pour la voie B1, au chapitre 2 de la partie 2, est réalisé avec :

0,50 g de **D1** (2,52 mmol) dans 30 ml de THF anhydre

1,03 g de bis(diéthylamino)di-*n*-germane (2,65 mmol, 1,05 équivalents)

dans 15 ml de THF anhydre.

On récupère 1,06 g de produit (2,41 mmol, Rdt : 95,6%).

Caractérisation

Aspect : Poudre noire

RMN ¹H (300,13 MHz, DMSO, δ, ppm) : 0,78 - 0,90 (m, 8H), 1,10 - 1,75 (m, 18H)

RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO, δ, ppm) : 11,5 (CH₂), 13,8 (CH₃), 23,8 (CH₂), 33,6 (CH₂), 125,4 (C_{Ar})

Spectre de masse (FAB, DMSO) : m/z = 441 [M+1]⁺

Analyse élémentaire (C₁₀H₁₂N₂S₂) : Calc.% : C, 41,01 ; H, 5,97

Exp.% : C, 40,32 ; H, 7,33

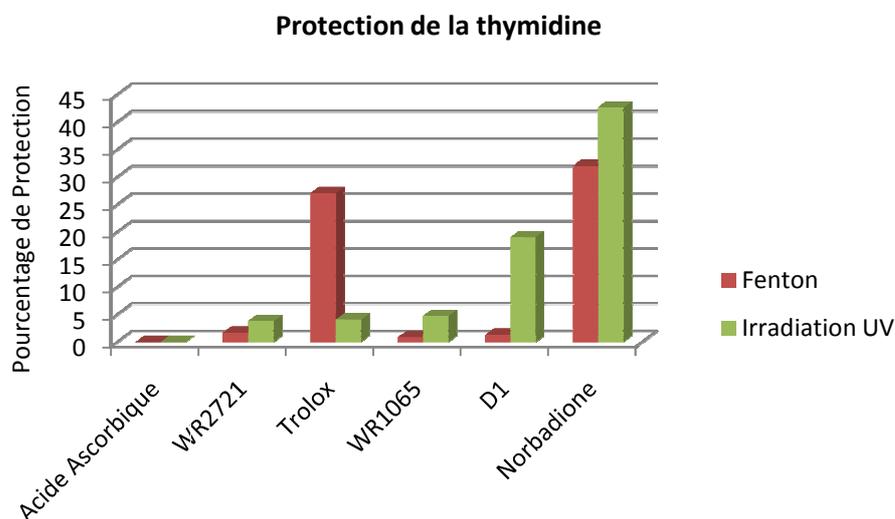
III. Evaluation in vitro

Par manque de solubilité, le composé **D2** n'a pas pu être étudié ici. Le composé **D1**, précurseur organique de **D2** a quant à lui montré des propriétés antiradicalaires et antioxydantes faibles (Tableau 46) :

N°	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviatiion Standard	24 μ M	Déviatiion Standard
D1	4,38	0,30	3,58	0,6	0,9	0,6	1,1

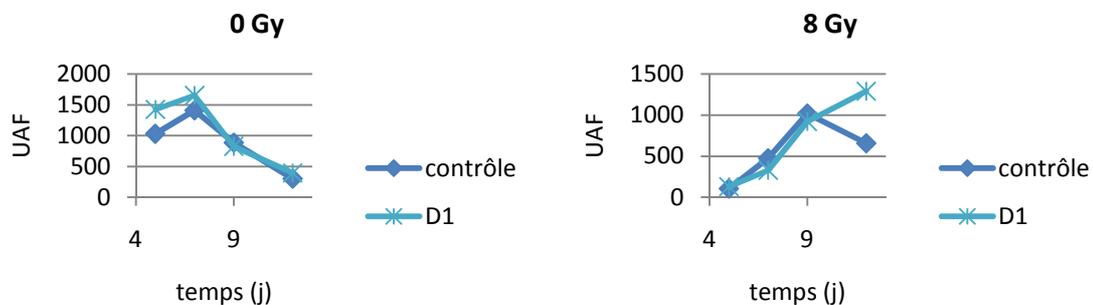
Tableau 46 : Propriétés antiradicalaires et antioxydantes de D1

Cependant, l'intérêt de ce composé apparaît au regard des tests réalisés par le CEA de Saclay. Lors du test de protection de la thymidine, il a été montré que le composé **D1** permettait une protection intéressante vis-à-vis d'une irradiation UV (Graphique 21). Ce composé est cependant inactif lors d'une dégradation radicalaire de la thymidine telle que celle réalisée lors de la réaction de Fenton. Cette inactivité peut s'expliquer par les propriétés antiradicalaires très faibles de **D1**.



Graphique 21 : Variations des propriétés de protection de la thymidine

L'étude sur cultures cellulaires réalisée par l'Université Louis Pasteur de Strasbourg a montré que **D1** n'était pas toxique et permettait une protection intéressante des cellules à 8 Gy avec une croissance nettement plus importante au 9^{ème} jour post-irradiation pour les cellules traitées par **D1** en comparaison avec les cellules non traitées (Graphique 22). Ces résultats restent à confirmer par d'autres études cellulaires.



Graphique 22 : Toxicité cellulaire et effet radioprotecteur in vitro de D1

IV. Conclusion

Au regard de ces premiers résultats, il semblerait que le 4,5-dimercapto-1,3-dithiole-2-thione puisse avoir un intérêt en radioprotection chimique. Il reste cependant à optimiser cette molécule par modification de la structure étudiée ici ainsi qu'à développer des composés plus hydrophiles.

*Conclusion
Générale*

L'objectif de ce travail était la synthèse et l'évaluation de nouveaux composés antioxydants organiques et organométalliques pour la radioprotection. Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'un Programme d'Etudes Amont (PEA) financé par la Direction Générale de l'Armement.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons présenté les effets des rayonnements ionisants sur l'organisme et ainsi justifié la nécessité de la mise en place d'une radioprotection chimique. La présentation des effets des rayonnements nous a permis de définir quelques axes pouvant orienter la recherche de nouveaux composés radioprotecteurs et permettre une meilleure compréhension de la radioprotection chimique. Les deux axes principaux étudiés ont été la synthèse et le développement de molécules antioxydantes et la modification de molécules présentant déjà des propriétés radioprotectrices connues.

La seconde partie de notre travail a été consacrée à définir les différents tests réalisés en collaboration avec d'autres équipes.

Il a ensuite été développé, dans les parties 3 et 4, deux grands types de molécules :

Des molécules antioxydantes

- Les acides pulviniques sont issus d'un travail réalisé en collaboration avec l'équipe de Thierry Le Gall du CEA de Saclay et l'équipe d'Alain Wagner de l'ULP de Strasbourg. Ces composés sont, pour la majorité d'entre eux, très fortement antioxydants. Leur pouvoir radioprotecteur est cependant limité. Ces composés pourraient être un traitement complémentaire dans le but d'améliorer les propriétés d'une molécule fortement active en radioprotection. Au cours de ce travail sur les acides pulviniques, il a aussi été possible d'évoquer une relation structure/activité antioxydante.
- Les acides salicyliques, sous la forme d'acide thiosalicylique, sont, comme les acides pulviniques, des molécules qui présentent d'intéressantes propriétés antioxydantes.
- Les dérivés du thiadiazole permettent une protection antioxydante et antiradicalaire intéressante.

Des molécules radioprotectrices

- La synthèse et l'étude *in vivo* de l'efficacité à court et long terme des dérivés de la NMI ont permis de confirmer un effet fortement radioprotecteur de ce type de molécules considérées comme des composés de référence en radioprotection chimique.
- Les dérivés du benzothiazole sont des composés antioxydants dont certains dérivés donnent une radioprotection assez intéressante à 8,2 Gy ($DL_{100irr/30jours}$). Cependant, aucune activité radioprotectrice n'a pu être montrée à 10,2 Gy ($DL_{100irr/30jours} + 2$ Gy), ce qui limite l'utilisation de ce type de composés en radioprotection chimique.
- Les dérivés des naphthalimides sont des composés ne présentant pas de propriétés antiradicalaires. Une légère activité radioprotectrice a été montrée *in vitro* pour certains dérivés. Cette activité peut être due aux propriétés d'intercalation de l'ADN de ce type de molécule. De plus, grâce à cette famille de composé, il a été possible de développer l'influence des précurseurs organométalliques sur les propriétés biologiques des composés.

Une dernière famille de composés a aussi été développée. Cette famille correspond à une nouvelle classe de radiosensibilisateurs qui a été découverte durant ce travail. Ces radiosensibilisateurs pourraient permettre un meilleur traitement des cancers radiorésistants par radiothérapie. Ces composés sont actuellement en cours d'étude à l'ULP de Strasbourg.

L'ensemble de nos résultats suggère tout d'abord que des molécules présentant seulement des propriétés antioxydantes ne permettent pas nécessairement une radioprotection chimique efficace. Cependant, couplée à une seconde activité (anti-apoptotique, activateur de la prolifération cellulaire, etc.), les propriétés antiradicalaires pourraient permettre une meilleure protection.

La réelle limitation au développement de nouveaux radioprotecteurs est de définir quels tests *in vitro* sont réellement prédictifs de l'efficacité *in vivo*, d'abord sur modèle rongeur puis sur modèle primate non humain. En effet, actuellement, aucun test ne permet de prédire de façon simple et fiable la probabilité de protection *in vivo*. Bien que le test d'irradiation des TK6 réalisé par l'ULP de Strasbourg semble être un point essentiel de l'étude *in vitro*, la réalisation de ce test de manière courante est actuellement limitée par les

moyens humains qu'il demande. Idéalement, ce test devrait être développé afin de le réaliser en screening. Ce test reste cependant insuffisant car, dans certains cas, des molécules se révèlent inactives dans ce test et actives *in vivo*. Aussi, la recherche d'autres tests apparaît comme essentielle (irradiation de plasmides, etc.). De plus, un score « radioprotection », résultant de la combinaison de plusieurs tests *in vitro* basés sur des mécanismes réactionnels différents, pourrait constituer un bon prédicteur.

Partie VI :
Annexes

Annexe 1 :

Evaluation *in vitro*

I. Evaluation des Dérivés d'Acides Pulviniques

IV.2. Annexe : Evaluation des Dérivés d'Acides Pulviniques

IV.2.1. Modification des acides pulviniques selon R_1 , $R_2 = H$, $R_3 = CO_2Me$

N°	ABTS		LogP	Peroxydation lipidique			
	TEAC	Déviation Standard		% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviation Standard	24 μ M	Déviation Standard
C083	0,48	0,01	26,0	4,3	6,8	0,9	26,0
C093	6,51	0,31	-14,6	2,3	-11,0	3,8	0,3
C095	15,40	3,11	-0,02	-25,3	6,2	-12,9	2,6
C062	17,71	5,44	-0,3	-52,7	0,1	-35,4	0,8
C072	18,51	0,49	0,65	33,9	0,9	-14,8	3,6
C074	18,70	3,09	1,08	-14,5	2,0	-7,3	1,4
C070	46,19	5,48	-4,2	2,2	-6,1	2,5	-4,2

Tableau A1 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes selon R_1

(Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

*IV.2.2. Modification des acides pulviniques selon R_2 , $R_1 = C_6H_4-$
 OMe , $R_3 = CO_2Me$*

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviatiion Standard	24 μ M	Déviatiion Standard
C050	1,06	0,15	-0,21	11,2	1,5	-1,0	9,1
C049	1,16	0,23	-0,15	-4,1	2,0	-6,9	6,9
C053	1,24	0,02	0,84	7,9	2,0	0,5	5,4
C039	1,56	0,10	0,84	32,1	1,8	6,7	0,5
C038	1,67	0,30	1,23	-15,9	3,0	-5,9	6,1
C044	2,47	0,23	0,53	-4,7	0,3	-5,4	4,1
C051	2,69	0,24	1,16	8,0	2,9	3,2	1,2
C046	2,75	0,30	2,15	-67,3	2,6	-5,5	4,6
C052	3,86	0,23	2,22	4,7	0,5	1,9	0,3
C045	3,97	0,25	1,79	1,0	5,6	1,2	3,6
C048	6,18	0,68	2,15	76,3	1,4	37,8	3,1
C043	9,59	3,25	-0,31	44,2	0,1	13,9	0,9
C047	12,11	6,68	-0,31	49,5	3,1	18,0	6,0

Tableau A2 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes selon R_2

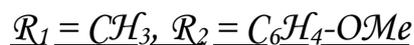
(Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

*IV.2.3. Modification des acides pulviniques selon R_2 , $R_1 = C_6H_4-$
 OMe , $R_3 = CO_2Me$*

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviatiion Standard	24 μ M	Déviatiion Standard
C078	1,12	0,19	ND	12,8	1,0	2,6	1,0
C112	1,37	0,02	3,34	-2,49	0,84	-3,98	0,61
C014	2,12	0,92	0,69	-11,2	1,3	-6,9	3,9
C096	2,63	0,24	1,15	9,7	4,7	-3,5	3,5
P2	3,33	0,30	0,01	-0,89	0,58	-4,07	3,66
P1	6,48	0,44	0,84	67,0	0,9	24,5	1,3

Tableau A3 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes selon R_3

(Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.2.4. Modification des acides pulviniques dissymétriques selon R₃,

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 µM	Déviation Standard	24 µM	Déviation Standard
B098	0,68	0,18	3,72	-8,0	1,0	-4,6	1,0
B074	0,72	0,07	2,00	68,6	1,2	57,5	0,5
B042	0,82	0,01	-1,02	2,0	2,9	-0,4	1,2
B038	1,76	0,11	-0,56	ND	ND	ND	ND
B019	1,84	0,68	-1,04	2,5	4,4	-2,6	3,8
B041	2,05	0,56	-0,53	2,2	1,1	1,9	2,3
B012	2,31	0,24	-1,43	6,0	0,3	-0,2	1
B002	3,09	0,16	0,04	9,5	2,0	2,4	0,8
B010	3,50	1,03	0,7	ND	ND	ND	ND
B052	8,83	1,34	-0,42	ND	ND	ND	ND
B008	9,54	0,35	0,6	ND	ND	19,5	1,3
B040	10,07	0,29	-0,69	4,4	2,4	-0,3	2,0
P5	10,09	1,79	-1,05	5,3	1,8	0,9	1,9
B018	10,28	0,58	-1,53	5,9	5,3	-3,6	5,0

*Tableau A4 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes selon R₃**(Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)**IV.2.5. Autres acides pulviniques testés*

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 µM	Déviation Standard	24 µM	Déviation Standard
C055	0,61	0,23	-0,08	10,3	3,7	2,3	5,1
C020	0,92	0,05	0,58	64,6	0,8	39,9	4,0
C054	1,07	0,30	0,97	3,3	3,2	1,5	1,7
B023	1,35	0,01	0,97	21,4	3,8	4,5	2,2
C067	2,60	0,38	-1,54	ND	ND	ND	ND
C098	2,61	0,24	-1,72	-26,4	0,9	-14,7	2,1
B053	3,46	0,22	0,18	ND	ND	ND	ND
B047	71,08	0,77	0,17	1,1	1,6	-1,5	1,7
C077	ND	ND	-0,18	25,7	0,4	6,8	1,7

*Tableau A5 : Autres acides pulviniques testés**(Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)*

IV.3. Annexe : Evaluation *in vitro* des Dérivés du méthyl 2-(4-alkyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacetate

Modification selon R_1 , $R_2 = OH$, $R_3 = CO_2Me$

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviation Standard	24 μ M	Déviation Standard
C082	0,60	0,02	-0,82	23,6	2,5	14,8	3,9
C092	1,54	0,15	0,05	-17	4,2	-14,6	7,6
C042	1,55	0,09	-0,56	-5,0	1,7	-6,6	2,0
C069	1,94	0,20	-0,43	54,2	3	13,7	3,4
C097	2,16	0,11	1,17	9,9	4,3	-5	5,2
C094	2,94	0,48	-0,28	-17,8	8,6	-10,5	4,9
C071	4,91	1,42	0,4	10,6	6,0	-6,2	1,2
C073	24,63	4,37	0,11	-4,2	1,8	-26,4	4,1
C076	35,76	20,05	-1,97	-2,7	2,4	-2,3	3,2
C061	43,34	8,33	-0,56	5,9	0,1	-5,7	1,2
C064	82,69	34,80	-2,7	0,4	2,1	-4,4	3,1

Tableau A6 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des méthyl 2-(4-alkyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacetate selon R_1 (Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.4. Annexe : Evaluation *in vitro* des Dérivés du 4-hydroxyfuran-2(5H)-one

IV.4.2. Modification selon R_1 , $R_2 = R_3 = H$, $X = O$

N°	ABTS		N°	ABTS	
	TEAC	Déviation Standard		TEAC	Déviation Standard
C056	0,35	0,01	B046	2,78	0,10
C085	0,63	0,08	C086	3,07	0,24
B090	1,10	0,03	C091	4,36	0,30
C088	2,51	0,24	C089	5,00	0,61
B049	2,65	0,43	C090	5,03	1,30

Tableau A7 : Variations des propriétés antiradicalaires selon R_1 (Test à l'ABTS)

IV.7. Annexe : Evaluation *in vitro* Des Flavanoïdes

IV.7.1. Modification des flavanoïdes selon R_1 , $R_2 = C_6H_4-OMe$, $X = O$

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviati on Standard	24 μ M	Déviati on Standard
B056	0,83	0,15	2,58	-0,4	7,3	-9,0	2,7
B084	1,63	0,28	2,45	2,9	8,0	-6,9	2,8
B085	2,17	0,18	2,74	-2,6	0,7	-5,0	1,6
B083	2,24	0,16	2,45	3,0	2,3	-10,7	1,0
B079	2,31	0,13	3,14	-2,1	1,8	-6,5	4,1
B078	2,38	0,27	3,81	2,8	4,3	-9,2	3,8
B080	5,18	0,18	2,74	1,7	1,7	3,4	3,4
B057	ND	-	2,45	-2,8	2,0	-6,4	3,4
B081	ND	-	3,01	-1,3	2,0	-4,5	5,0
B082	ND	-	3,06	28,0	3,0	-0,6	2,3

Tableau A8 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des flavanoïdes selon R_1 (Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.7.2. Modification des flavanoïdes selon R_2 , $R_1 = H$, $X = O$

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 μ M	Déviati on Standard	24 μ M	Déviati on Standard
B096	0,66	0,07	2,37	4,4	1,9	-3,8	1,4
B056	0,83	0,15	1,17	3,8	1,0	-7,5	0,2
B086	1,30	0,28	2,45	-0,6	1,8	-10,3	4,9
B097	3,28	0,25	2,58	0,3	1,7	-2,9	5,6
B095	3,71	0,29	3,14	5,9	4,6	-0,6	2,5
B087	3,94	0,30	3,53	-4,4	2,9	-6,0	4,5

Tableau A9 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des flavanoïdes selon R_2 (Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

II. Evaluation des Dérivés de l'Acide Salicylique

IV.1. Annexe : Les Dérivés Organiques

N°	ABTS		Peroxydation lipidique				
	TEAC	Déviation Standard	LogP	% de protection		% de protection	
				116 µM	Déviatiion Standard	24 µM	Déviatiion Standard
SC1	Inactif	-	2,27	60,2	0,9	20,7	4,9
SC2	Inactif	-	1,69	-0,6	1,1	0,1	1,2
SC3	Inactif	-	1,69	0,9	0,2	1,2	1,0
SC4	105,03	4,21	2,56	1,5	1,2	1,8	1,7
SC5	Inactif	-	2,03	1,5	2,6	0,8	0,8
SC6	0,71	0,03	1,78	4,4	2,4	-1,7	3,2
S1	ND	-	0,84	0,8	1,6	0,6	1,7
S2	0,63	0,01	0,95	2,1	1,5	0,5	0,5
S3	Inactif	-	5,69	-2,6	5,5	-5,1	4,4

Tableau A10 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organiques de l'acide salicylique (Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.2. Annexe : Les Dérivés Organométalliques

N°	Peroxydation lipidique			
	% de protection		% de protection	
	116 µM	Déviatiion Standard	24 µM	Déviatiion Standard
S5	1,77	1,84	1,56	1,47
S6	0,75	0,31	0,04	0,84
S8	-22,64	1,10	-8,55	2,72
S9	-9,04	3,44	-7,48	2,00

Tableau A11 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organométalliques de l'acide salicylique (Tests de peroxydation lipidique)

III. Evaluation des Dérivés de la NMI

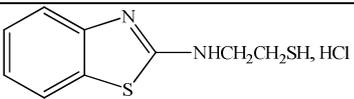
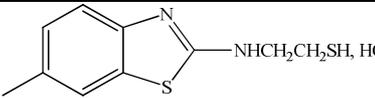
N°	ABTS		LogP	Peroxydation lipidique			
	TEAC	Déviation Standard		% de protection		% de protection	
				116 µM	Déviation Standard	24 µM	Déviation Standard
IC1	inactif	-	2,53	-2,6	0,8	-1,4	2,0
I1	2,58	0,01	2,63	-0,1	1,4	-0,2	0,3
I5	1,63	0,03	3,2	-0,3	0,2	1,7	0,7
I6	0,61	0,09	3,64	-5,7	2,6	-6,5	1,5
I8	17,26	0,21	4,07	-7,1	5,6	-7,2	3,5

Tableau A12 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés de la NMI

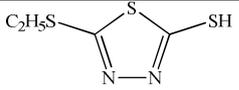
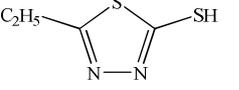
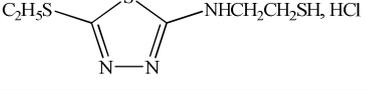
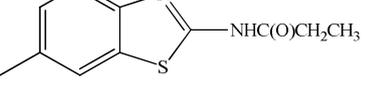
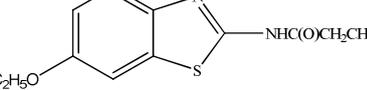
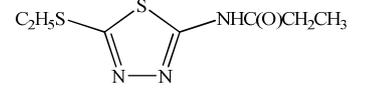
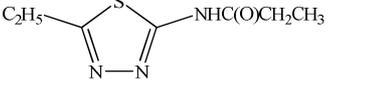
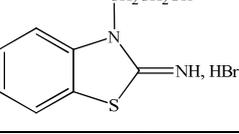
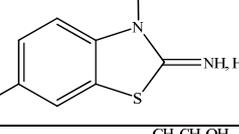
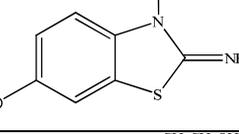
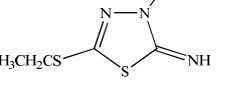
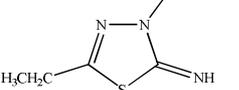
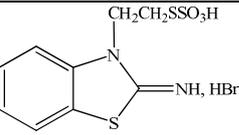
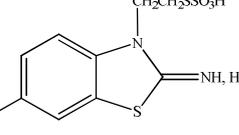
(Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV. Evaluation des Dérivés de Benzothiazoles et de Thiadiazoles

IV.1. Annexe : Evaluation *in vitro* des Dérivés Organiques

N°	Structure	LogP	Peroxydation lipidique			
			% de protection		% de protection	
			116 µM	Déviation Standard	24 µM	Déviation Standard
B7		3,04	-6,47	1,33	-4,62	3,48
B8		3,53	17,51	1,03	2,24	4,86

Partie VI, Annexe 1 : Evaluation *in vitro*

T3		3,45	-6,41	6,34	-4,96	5,62
T4		2,94	0,59	0,4	-1,1	4,0
T5		3,08	-4,82	4,02	-3,45	4,84
Ca2		3,28	-0,28	1,0	1,8	1,0
Ca3		3,00	-0,50	0,6	1,3	0,8
Ca4		2,83	-0,98	2,2	-1,1	2,0
Ca5		2,31	0,63	2,0	0,9	1,6
Ca21		2,52	1,10	1,5	2,1	1,1
Ca22		3,00	-3,91	0,6	-4,4	2,3
Ca23		2,73	1,47	1,1	0,9	1,5
Ca24		1,98	2,86	2,2	-1,0	0,9
Ca25		1,14	1,05	0,8	0,1	1,3
Ca31		3,08	2,08	1,4	-0,7	1,9
Ca32		3,57	1,11	1,6	-0,4	0,8

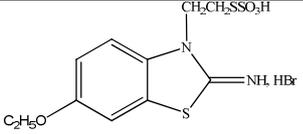
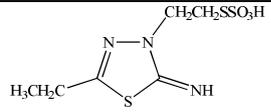
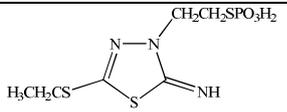
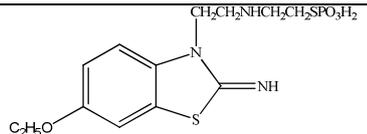
Ca33		3,29	0,35	1,7	-1,6	0,7
Ca35		1,71	1,31	1,9	-1,2	2,6
Ca36		2,90	-0,93	0,5	0,2	1,8
Ca37		3,2	-4,03	1,2	-2,3	2,3

Tableau A13 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organiques des benzothiazoles et des thiazoles (Test de peroxydation lipidique)

V. Evaluation des Naphthalimides

IV.1. Annexe : Les Dérivés Organiques

N°	ABTS		LogP	Peroxydation lipidique			
	TEAC	Déviation Standard		% de protection		% de protection	
				116 μM	Déviation Standard	24 μM	Déviation Standard
N1	19,70	0,34	1,92	-2,2	0,5	-3,4	1,9
N2	3,68	0,14	2,30	-1,7	1,4	-1,0	2,0
N3	Inactif	-	1,47	42,0	0,5	1,2	0,9
N4	Inactif	-	1,57	32,4	2,6	-1,3	1,1
N5	81,26	20,42	3,88	-4,5	1,5	-6,0	1,9
N6	101,92	27,67	1,8	0,1	2,2	0,0	1,1
Si1	Inactif	-	ND	-1,3	0,6	-1,2	0,7
Si2	Inactif	-	ND	-0,4	1,5	-0,8	1,8

Tableau A14 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organiques des naphthalimides et des silanols (Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

IV.2. Annexe : Les Dérivés Organométalliques

N°	ABTS		Peroxydation lipidique			
	TEAC	Déviation Standard	% de protection		% de protection	
			116 µM	Déviation Standard	24 µM	Déviation Standard
N7	>18,8	-	-1,6	3,9	0,5	1,7
N8	>23,1	-	-1,4	0,7	-1,4	0,7
N9	>45,0	-	-2,1	0,7	-2,0	1,1
N10	16,88	0,47	-6,9	1,4	-6,9	3,7
N11	>10,5	-	-7,1	2,3	-5,6	2,6
N12	>106,51	-	-0,1	3,2	-0,4	3,5
N13	>13,84	-	-5,3	7,7	-7,9	3,5
N14	4,42	0,01	-6,5	1,2	-8,5	4,9
N15	>86,8	-	-11,5	3,6	-9,1	4,5
N16	>16,4	-	-6,3	2,4	-1,2	4,2

Tableau A15 : Variations des propriétés antiradicalaires et antioxydantes des dérivés organométalliques des naphthalimides (Tests à l'ABTS et de peroxydation lipidique)

Annexe 2 :

Tests in vitro,

CEA de Saclay et

ULP de Strasbourg

I. Test de Protection de la

Thymidine

I.1. Principe

Ce test *in vitro* a été mis au point au laboratoire par F. Taran (CEA/SCBM) en collaboration avec les équipes de C. Créminon et D. Boquet (CEA/SPI) et de S. Pin et J.-P. Renault (CEA/SIS2M).

Ce test consiste à évaluer la protection de la thymidine, nucléoside de l'ADN, par un agent antioxydant, lorsqu'elle est soumise à un stress oxydant : irradiation γ , irradiation UV à 254 nm en présence de peroxyde d'hydrogène ou stress de type Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). La thymidine intacte est ensuite quantifiée par un dosage immuno-enzymatique qui fait appel à un anticorps spécifique de la thymidine. Ce test est réalisé dans des plaques à 96 puits.

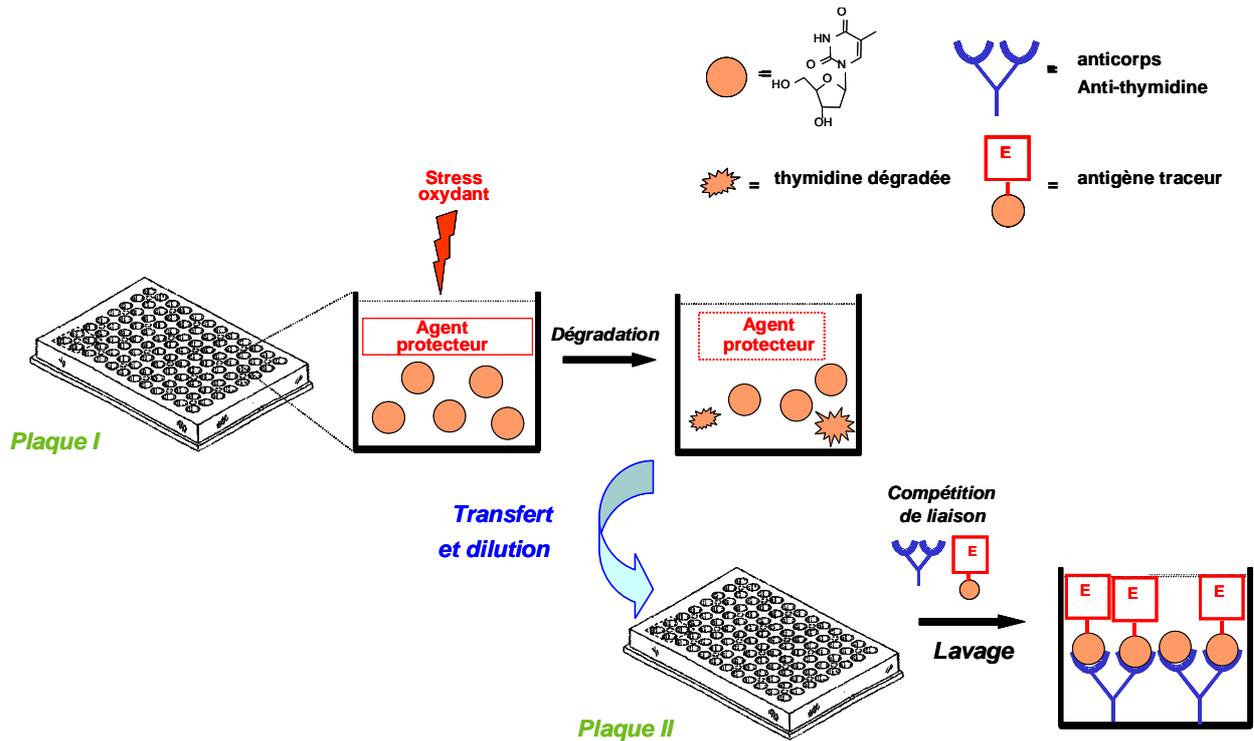


Figure A1 : Principe du Test

Le test est réalisé en deux étapes successives, effectuées dans deux plaques différentes (Figure A1). Dans un premier temps, une solution de thymidine (Ag) et une solution de l'agent protecteur à étudier sont introduites dans les puits de la plaque I. Ensuite, le mélange est soumis à un stress oxydant. Au cours de cette étape d'oxydation, la thymidine va être plus ou moins dégradée suivant la capacité de protection du composé introduit.

Ensuite, une quantité bien définie de solution de chaque puits de la plaque I est transférée dans la plaque II. Cette plaque a été recouverte au préalable d'anticorps de chèvre capables de reconnaître les immunoglobulines de souris. Dans les puits de la plaque II sont ajoutés l'anticorps Ac, qui est une immunoglobuline de souris reconnaissant spécifiquement la thymidine, et l'antigène traceur (Ag*), qui est un analogue de la thymidine comportant un enzyme, l'acétylcholinestérase. L'anticorps (Ac) se fixe sur la phase solide et la compétition vis-à-vis des sites de liaison de Ac s'établit entre Ag (la thymidine intacte) et Ag*. Au bout de deux heures à température ambiante, l'équilibre est atteint et une phase de lavage permet d'éliminer toutes les espèces non fixées sur la phase solide.

On ajoute alors dans chaque puits le réactif d'Ellman, constitué d'acétylthiocholine et d'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque), ou DTNB (Figure A2). La réaction enzymatique avec ce produit conduit à la formation d'un thiol aromatique de couleur jaune, détecté à 414 nm. La mesure de l'absorbance permet de déduire la concentration d'adduit [Ac-Ag*] dans chaque puits et la quantité de thymidine intacte.

Partie VI, Annexe 2 : Protocoles des tests *in vitro* (CEA de Saclay, ULP de Strasbourg)

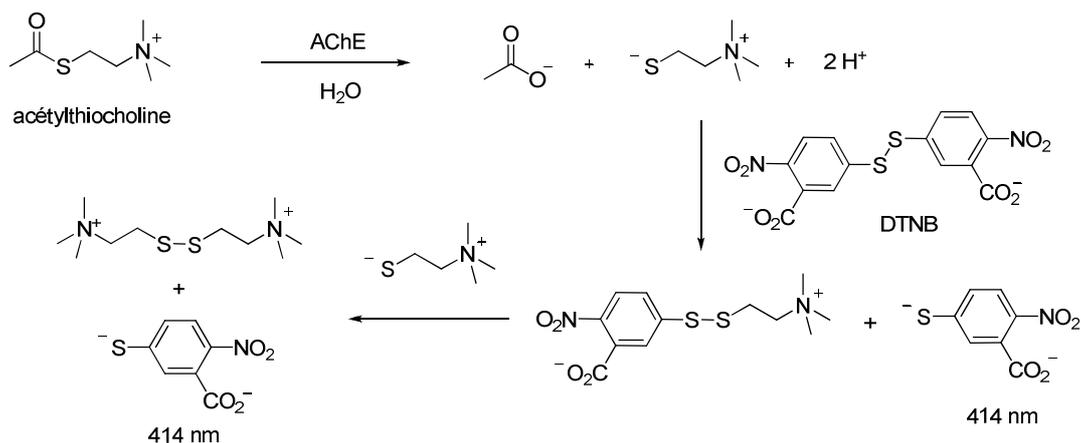
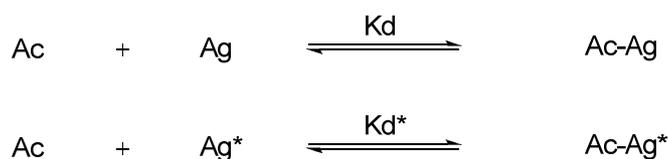


Figure A2 : Le Réactif d'Ellman

Principe du dosage par compétition : Dans un mélange Ag/Ag*/Ac, si la concentration en anticorps Ac est inférieure à la concentration totale en antigène (Ag et Ag*), il y aura compétition pour les sites de liaison de l'anticorps, avec formation simultanée de complexes anticorps-antigène (Ac-Ag) et anticorps-antigène traceur (Ac-Ag*) selon les deux réactions équilibrées suivantes :



Les concentrations initiales en anticorps (Ac) et en antigène traceur (Ag*) sont fixées. L'augmentation de la concentration en antigène (Ag) entraîne donc l'augmentation de la concentration en complexe (Ac-Ag), au détriment du complexe (Ac-Ag*). De ce fait, la concentration [Ac-Ag*] est inversement proportionnelle à la concentration [Ag] dans le milieu.

Le pourcentage de protection de la thymidine (P) est calculé selon la formule suivante :

$$P = ([\text{Thd}]_{\text{antiox}} - [\text{Thd}]_{\text{ox}}) / ([\text{Thd}]_{\text{ini}} - [\text{Thd}]_{\text{ox}}) \times 100$$

Avec : [Thd]_{ini} = concentration initiale en thymidine

[Thd]_{ox} = concentration en thymidine mesurée en l'absence d'agent de protection

[Thd]_{antiox} = concentration en thymidine mesurée en présence de l'agent de protection

Les tests ont été réalisés au CEA-Saclay par S. Laurent, B. Nadal (SCBM) et S. Pin (SIS2M, laboratoire de radiolyse) en collaboration avec M. C. Nevers (SPI) et l'Institut Curie d'Orsay.

I.2. *Protocole*

Composition du tampon EIA : $[K_2PO_4] = 0,08$ M, $[KH_2PO_4] = 0,02$ M, $[NaCl] = 0,15$ M, $[BSA] = 145$ μ M, $[NaN_3] = 1,5$ mM

Solution de lavage : [tween 20] = 0,05% de tween 20 (v/v), tampon phosphate à 10 mM (pH = 7,4) dans l'eau.

Réactif d'Ellman : $[DTNB] = 250$ μ M, [acétylthiocholine] = 76 mM, $[NaCl] = 1,45$ M, tampon phosphate 10 mM (pH 7,4). L'absorbance à 414 nm est lue par un lecteur de plaque Labsystem Multiskan Biochromatique.

Préparation des plaques CAS :

Cette étape consiste à adsorber sur la surface des puits des anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris. Dans chaque puits sont disposés 200 μ l d'une solution d'anticorps (AFFinipure, Goat Anti-Mouse IgG+IgM, H+L) à 5 μ g/ml dans le tampon phosphate 50 mM (pH 7,4). Après 16 heures à température ambiante, la plaque est lavée avec la solution de lavage. Dans chaque puits sont introduits 300 μ l de tampon EIA. Ensuite la plaque est recouverte d'un film adhésif.

Dosage par compétition de la thymidine :

Dans une plaque CAS sont introduits 50 μ l de la solution de thymidine à doser dans le tampon EIA et 50 μ l d'une solution d'anticorps mAb72 contre l'AMT à 9,6 ng/ml dans le tampon EIA, 50 μ l d'une solution de traceur enzymatique AMT-AChE à 2 UEll/ml dans le tampon EIA. Le témoin LNS (liaison non spécifique) est déterminé par la mesure de l'absorbance d'un mélange de 50 μ l de la solution du traceur enzymatique et de 100 μ l de tampon EIA. Le signal B_0 est obtenu en l'absence de thymidine par le mélange de 50 μ l de la solution d'anticorps, de 50 μ l de la solution du traceur enzymatique et de 50 μ l de tampon EIA. La plaque est agitée pendant 2 heures à température ambiante, lavée 3 fois avec une solution de lavage, puis 200 μ l du réactif d'Ellman sont additionnés. Après une heure d'agitation, l'absorbance à 414 nm est lue dans chaque puits.

I.2.1. *Protocole général par irradiation γ :*

Plaque I : plaque en quartz

Plaque 96 puits de 300 μ l (irradiation Institut Curie d'Orsay)

Partie VI, Annexe 2 : Protocoles des tests *in vitro* (CEA de Saclay, ULP de Strasbourg)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Tox				Tox	Tox				Tox	
B		Tox				Tox	Tox				Tox	
C		Tox	Antioxydants			Tox	Tox	Antioxydants			Tox	
D		Tox				Tox	Tox				Tox	
E		Tox				Tox	Tox				Tox	
F		Tox				Tox	Tox				Tox	
G		Tox				Tox	Tox				Tox	
H		Tox				Tox	Tox				Tox	

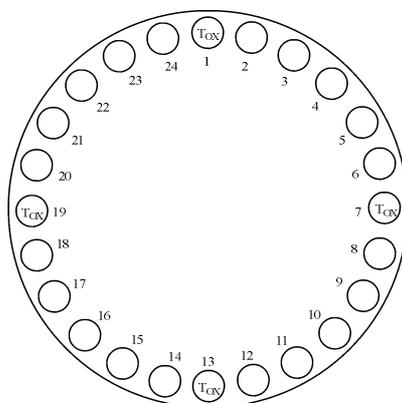
Témoins Tox : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test),

Colonnes 3 à 5 et 8 à 10: étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée).

Colonnes 1 et 12 : vide. **Colonnes 2, 6, 7 et 11** : Tox : 75 µl de thymidine à 30 µM dans le tampon phosphate pH 7,4, à 50 mM, 75 µl d'eau. **Colonnes 3 à 5 et 8 à 10** : 75 µl de thymidine à 30 µM dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 3,75 µl d'agent protecteur à 2 mM dans l'eau, 71,25 µl d'eau.

Irradiation gamma pendant 135 minutes (340 Gy) avec deux ouvertures de l'irradiateur après 45 et 90 minutes, à l'aide d'un irradiateur IBL-637 (¹³⁷Cs), Institut Curie d'Orsay.

Plaquette cylindrique (irradiation CEA/SIS2M)



Puits 1, 7, 13 et 19 : Tox : 75 µl de thymidine à 30 µM dans le tampon phosphate pH 7,4, à 50 mM, 75 µl d'eau.

Autres puits : 75 µl de thymidine à 30 µM dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 3,75 µl d'agent protecteur à 2 mM dans l'eau, 71,25 µl d'eau.

Irradiation gamma pendant 30 minutes (180 Gy) à l'aide d'irradiateur GammaCell 3000 Elan (¹³⁷Cs, CEA/SIS2M).

Plaque II : plaque CAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
A		LNS	28	28	T _{ox}							T _{ox}					
B		LNS	14	14	T _{ox}							T _{ox}					
C		LNS	7	7	T _{ox}	Antioxydants						T _{ox}					
D		LNS	3,5	3,5	T _{ox}												T _{ox}
E		B ₀	1,75	1,75	T _{ox}												T _{ox}
F		B ₀	0,87	0,87	T _{ox}												T _{ox}
G		B ₀	0,44	0,44	T _{ox}							T _{ox}					
H		B ₀	0,22	0,22	T _{ox}							T _{ox}					

Colonne 1 : vide. **Colonne 2** : 50 µl de tampon EIA dilué 2 fois. **Colonnes 3 et 4** : 50 µl de thymidine (à concentration variable) dans le tampon EIA dilué 2 fois. **Colonnes 5 à 12** : 25 µl de tampon EIA, addition de 25 µl des solutions des puits de la *plaque I*.

Colonnes 2 à 12 : 50 µl de mAb72 à 9,6 ng/ml dans tampon EIA (sauf LNS, 50 µl de tampon EIA), 50 µl d'AMT-AChE à 2 UEll/ml dans le tampon EIA.

Agitation pendant 2h à 20°C. Lavage trois fois par du tampon de lavage. Addition de 200 µl du réactif d'Ellman. Lecture de la densité optique à 414 nm après 1h.

I.2.2. Protocole général du test par UV/H₂O₂:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
A		LNS	560	560													
B		LNS	280	280													
C		B ₀	140	140		Antioxydants											
D		B ₀	70	70													
E		B ₀	35	35													
F		B ₀	17,5	17,5													
G		T _{ox}	8,75	8,75													
H		T _{ox}	4,4	4,4													

Témoins LNS, B₀, et colonnes 3 et 4 : dosage par compétition de la thymidine (calibrage du test, concentration en µM), **Témoins Tox** : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test), **Colonnes 5 à 12** : étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée).

Plaque I : 96 puits de 300 µl.

Colonne 1 : vide. **Colonne 2** : LNS et B₀ : 100 µl d'eau. **Tox** : 50 µl de thymidine à 140 µM dans le tampon phosphate pH = 7,4 à 50 mM, 25 µl d'eau, 25 µl de H₂O₂ à 20 mM dans l'eau. **Colonnes 3 et 4** : 50 µl de thymidine (concentration variable) dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 50 µl d'eau. **Colonnes 5 à 12** : 50 µl de thymidine à 140 µM dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 25 µl d'agent protecteur dans l'eau, 25 µl de H₂O₂ à 20 mM dans l'eau.

Irradiation à 254 nm, 1,75 J/cm². Irradiateur Bio-Sun 3W, Vilbert Lourmat (Marne la Vallée).

Partie VI, Annexe 2 : Protocoles des tests *in vitro* (CEA de Saclay, ULP de Strasbourg)

Plaque II : plaque CAS

Colonne 1 : vide. **Colonnes 2 à 12** : 50 µl de tampon EIA, addition de 5 µl des solutions des puits de la *plaque I*, 50 µl de mAb72 à 9,6 ng/ml dans le tampon EIA (sauf LNS, 50 µl de tampon EIA), 50 µl d'AMT-AChE à 2 UEll/ml dans le tampon EIA.

Agitation pendant 2h à 20°C. Lavage trois fois par du tampon de lavage. Addition de 200 µl du réactif d'Ellman. Lecture de la densité optique à 414 nm après 1h.

I.2.3. Protocole général du test par stress Fenton :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		LNS	560	560								
B		LNS	280	280								
C		B ₀	140	140			Antioxydants					
D		B ₀	70	70								
E		B ₀	35	35								
F		B ₀	17,5	17,5								
G		Tox	8,75	8,75								
H		Tox	4,4	4,4								

Témoins LNS, B₀, et colonnes 3 et 4 : dosage par compétition de la thymidine (calibrage du test, concentration µM), **Témoins Tox** : expérience en l'absence d'agent protecteur (calibrage du test), **Colonnes 5 à 12** : étude des agents protecteurs (2 puits par molécule testée).

Plaque I : 96 puits de 300 µl.

Colonne 1 : vide. **Colonne 2** : LNS et B₀ : 110 µl d'eau. Tox : 50 µl de thymidine à 140 µM dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 25 µl d'eau, 25 µl de Fe/EDTA à 2,8 mM dans l'eau, 10 µl de H₂O₂ à 770 mM dans l'eau. **Colonnes 3 et 4** : 50 µl de thymidine (concentration variable) dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 60 µl d'eau. **Colonnes 5 à 12** : 25 µl d'agent protecteur dans l'eau, 25 µl de Fe/EDTA à 2,8 mM dans l'eau, 50 µl de thymidine à 140 µM dans le tampon phosphate pH 7,4 à 50 mM, 10 µl de H₂O₂ à 770 mM dans l'eau.

Agitation pendant 30 minutes à 20°C.

Plaque II : plaque CAS

Colonne 1 : vide. **Colonnes 2 à 12** : 50 µl de tampon EIA, addition de 5 µl des solutions des puits de la *plaque I*, 50 µl de mAb72 à 9,6 ng/ml dans le tampon EIA (sauf LNS, 50 µl de tampon EIA), 50 µl d'AMT-AChE à 2 UEll/ml dans le tampon EIA.

Agitation pendant 2h à 20°C. Lavage trois fois par du tampon de lavage. Addition de 200 µl du réactif d'Ellman. Lecture de la densité optique à 414 nm après 1h.

II. Test de Protection Cellulaire

II.1. Principe

Ce test *in vitro* a été mis au point par P. Bischoff et A. Le Roux de l'ULP de Strasbourg.

Ce test consiste à évaluer la protection cellulaire par un agent antioxydant lorsque des cellules sont soumises à une irradiation. La quantité de cellules ayant survécu à l'irradiation est quantifiée par fluorimétrie selon le test à l'Alamarblue®. Ce test est réalisé dans des flacons de 12,5 ml. La lecture au fluorimètre est réalisée dans des plaques 96 puits (Falcon 3072).

II.2. Protocole de Toxicité Cellulaire

Deux flacons sont préparés par ajout de 5 ml d'une solution contenant 200 000 cellules/ml.

Une solution mère de composé à tester est préparée dans du PBS à la concentration souhaitée. 0,5 ml de cette solution mère sont ajoutés au premier flacon. Dans le second flacon, 0,5 ml de PBS sont ajoutés.

Au bout de 24h, le milieu de culture est éliminé puis des plaques sont préparées. Pour cela, le contenu des flacons est centrifugé à 200 rpm pendant 10min dans des tubes de 15 ml à fond conique. Les cellules sont remises en suspension et récupérées par ajout de 5 ml de milieu de culture frais. 4 plaques 96 puits (Falcon 3072) sont alors préparées par ajout de 5 x 200 µl/puits.

Au bout de 2, 4, 7 et 9 jours, on ajoute 20 µl d'Alamarblue® par puits. On incube alors la plaque pendant 4h avant lecture au fluorimètre.

Les courbes de survie cellulaire sont alors tracées.

II.3. Protocole de Protection Cellulaire

Deux flacons sont préparés par ajout de 5 ml d'une solution contenant 200 000 cellules/ml.

Une solution mère de composé à tester est préparée dans du PBS à la concentration souhaitée. 0,5 ml de cette solution mère sont ajoutés au premier flacon. Dans le second flacon, 0,5 ml de PBS sont ajoutés.

Les deux flacons sont alors irradiés par des Rayons X à la dose de 8 Gy.

Au bout de 24h, le milieu de culture est éliminé puis des plaques sont préparées. Pour cela, le contenu des flacons est centrifugé à 200 rpm pendant 10min dans des tubes de 15 ml à fond conique. Les cellules sont remises en suspension et récupérées par ajout de 5 ml de milieu de culture frais. 4 plaques 96 puits (Falcon 3072) sont alors préparées par ajout de 5 x 200 µl/puits.

Au bout de 2, 4, 7 et 9 jours, on ajoute 20 µl d'Alamarblue® par puits. On incube alors la plaque pendant 4h avant lecture au fluorimètre.

Les courbes de survie cellulaire sont alors tracées.

Annexe 3 :

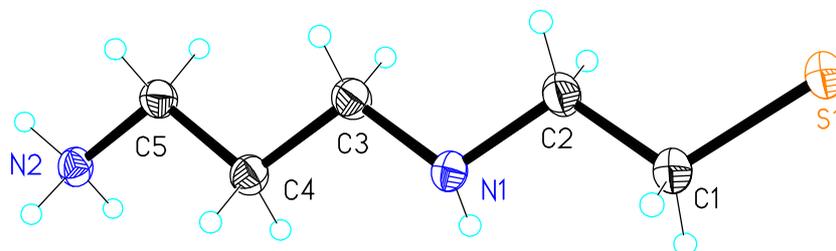
Données

Cristallographiques

L'ensemble des données collectées du cristal et des détails de l'affinage sont répertoriées dans les pages suivantes. Les cristaux ont été prélevés à température ambiante et enduits d'une couche d'huile. Un cristal a été sélectionné pour l'analyse sur un diffractomètre Bruker-AXS CCD 1000 (longueur d'onde 0,71073 Å, température 273(2) K) et une correction d'absorption semi-empirique a été utilisée. La structure a été résolue par les méthodes directes (SHELXS-97) et les paramètres ont été affinés par la méthode des moindres carrés sur F^2 . Les valeurs R sont définies comme $R1 = \Sigma |F_0| - |F_c| / \Sigma |F_0|$ et $wR2 = (\Sigma w(F_0^2 - F_c^2)^2 / \Sigma w(F_0^2)^2)^{0,5}$ [208-210].

I. Composés de Référence

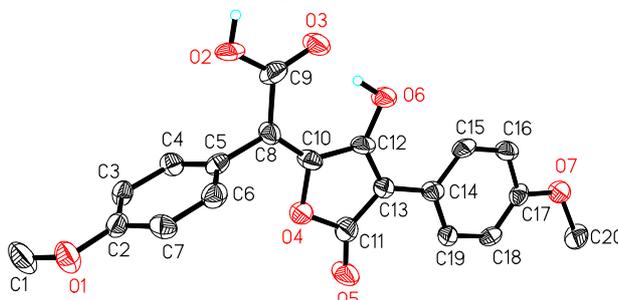
WR-1065, 2-(3-aminopropylamino)éthanethiol



	C ₅ H ₁₄ N ₂ S		Echelle θ de collecte des données	2,78 to 26,37°
Masse moléculaire	134,24		Echelles des indices hkl	-8 ≤ h ≤ 8 -13 ≤ k ≤ 6 -12 ≤ l ≤ 13
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	4182
Groupe d'espace	P2(1)/c		Réflexions indépendantes	1504 [R(int) = 0,0251]
Paramètres de maille	a = 6,8695(9) Å b = 10,4604(13) Å c = 10,4510(13) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 101,520(2)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,8%
Volume	735,86(16) Å ³		Max/min de transmission	1,000000 and 0,7421601
Groupe formulaire Z	4		Données	1504
			Contraintes	0
			Paramètres	89
Densité (calculée)	1,212 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,039
Coefficient d'absorption	0,347 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0340 wR2 = 0,0837
F(000)	296		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0462 wR2 = 0,0891
Dimension du cristal	0,1 x 0,1 x 0,5 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,331 and -0,172 e.Å ⁻³

II. Dérivés des Acides Pulviniques

*Acide 2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)-
2-(4-éthoxyphényl)acétique*

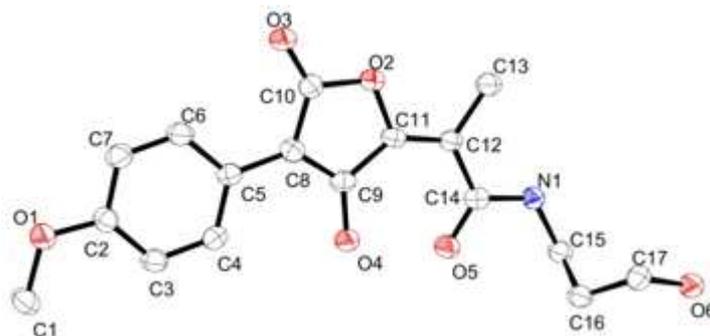


Formule brute	C ₂₄ H ₂₆ O ₈		Echelle θ de collecte des données	5,12 to 24,71°
Masse moléculaire	442,45		Echelles des indices hkl	-17 ≤ h ≤ 17 -19 ≤ k ≤ 19 -23 ≤ l ≤ 23
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	54694
Groupe d'espace	P2(1)/c		Réflexions indépendantes	7826 [R(int) = 0,3140]
Paramètres de maille	a = 14,9658(6) Å b = 16,6154(6) Å c = 19,7340(8) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 109,171(3)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,0%
Volume	4635,0(3) Å ³		Max/min de transmission	
Groupe formulaire Z	8		Données	7826
			Contraintes	0
			Paramètres	595
Densité (calculée)	1,268 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	0,711
Coefficient d'absorption	0,095 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0501 wR2 = 0,0593
F(000)	1872		Indices R (toutes données)	R1 = 0,2456 wR2 = 0,0877
Dimension du cristal	0,30 x 0,20 x 0,05 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,322 and - 0,267 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
O(1)-C(2)	1,376(5)	C(2)-O(1)-C(1)	116,9(4)
O(1)-C(1)	1,419(5)	C(10)-O(4)-C(11)	107,9(4)
O(2)-C(9)	1,271(5)	C(17)-O(7)-C(20)	116,7(3)
O(3)-C(9)	1,266(5)	O(1)-C(2)-C(3)	125,4(5)
O(4)-C(10)	1,388(4)	O(1)-C(2)-C(7)	114,6(5)
O(4)-C(11)	1,425(5)	C(3)-C(2)-C(7)	120,0(4)
O(5)-C(11)	1,219(5)	C(2)-C(3)-C(4)	119,0(5)
O(6)-C(12)	1,308(5)	C(5)-C(4)-C(3)	122,0(5)
O(7)-C(17)	1,372(4)	C(6)-C(5)-C(4)	117,9(5)
O(7)-C(20)	1,445(4)	C(6)-C(5)-C(8)	120,2(5)
C(2)-C(3)	1,377(5)	C(4)-C(5)-C(8)	122,0(4)
C(2)-C(7)	1,386(6)	C(5)-C(6)-C(7)	121,0(5)
C(3)-C(4)	1,399(5)	C(2)-C(7)-C(6)	120,2(5)
C(4)-C(5)	1,385(6)	C(10)-C(8)-C(9)	122,6(4)
C(5)-C(6)	1,382(5)	C(10)-C(8)-C(5)	119,6(4)
C(5)-C(8)	1,498(5)	C(9)-C(8)-C(5)	117,8(4)
C(6)-C(7)	1,392(5)	O(3)-C(9)-O(2)	122,0(4)
C(8)-C(10)	1,346(5)	O(3)-C(9)-C(8)	123,1(5)
C(8)-C(9)	1,497(5)	O(2)-C(9)-C(8)	114,9(5)
C(10)-C(12)	1,482(5)	C(8)-C(10)-O(4)	118,1(4)
C(11)-C(13)	1,435(5)	C(8)-C(10)-C(12)	135,3(4)
C(12)-C(13)	1,370(5)	O(4)-C(10)-C(12)	106,6(4)
C(13)-C(14)	1,471(5)	O(5)-C(11)-O(4)	117,4(4)
C(14)-C(15)	1,396(5)	O(5)-C(11)-C(13)	133,2(5)
C(14)-C(19)	1,398(5)	O(4)-C(11)-C(13)	109,4(4)
C(15)-C(16)	1,388(5)	O(6)-C(12)-C(13)	127,9(4)
C(16)-C(17)	1,381(5)	O(6)-C(12)-C(10)	122,7(4)
C(17)-C(18)	1,366(5)	C(13)-C(12)-C(10)	109,4(4)
C(18)-C(19)	1,397(5)	C(12)-C(13)-C(11)	106,6(4)
		C(12)-C(13)-C(14)	128,5(4)
		C(11)-C(13)-C(14)	124,9(4)
		C(15)-C(14)-C(19)	117,5(4)
		C(15)-C(14)-C(13)	120,3(4)
		C(19)-C(14)-C(13)	122,2(4)
		C(16)-C(15)-C(14)	121,0(4)
		C(17)-C(16)-C(15)	120,3(4)
		C(18)-C(17)-O(7)	125,0(4)
		C(18)-C(17)-C(16)	120,0(4)
		O(7)-C(17)-C(16)	115,0(4)
		C(17)-C(18)-C(19)	120,1(4)
		C(18)-C(19)-C(14)	121,1(4)

*2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)-
N-(3-hydroxypropyl)propanamide*

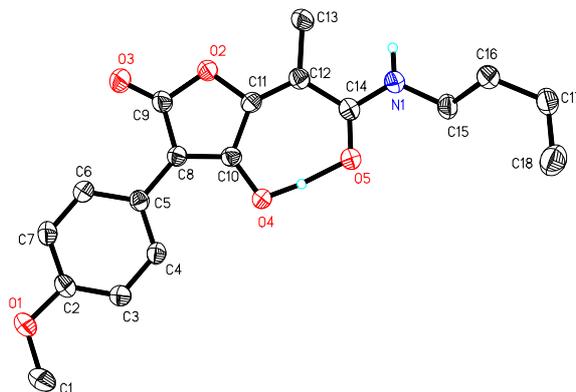


Formule brute	C ₁₇ H ₁₉ N O ₂		Echelle θ de collecte des données	2,09 to 25,34°
Masse moléculaire	333,3		Echelles des indices hkl	-9 ≤ h ≤ 9 -17 ≤ k ≤ 17 -17 ≤ l ≤ 17
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	13847
Groupe d'espace	P2(1)/c		Réflexions indépendantes	2817 [R(int) = 0,0862]
Paramètres de maille	a = 8,0258(5) Å b = 14,7149(7) Å c = 14,8327(9) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 118,302(4)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	100,0%
Volume	1542,32(16) Å ³		Max/min de transmission	
Groupe formulaire Z	4		Données	2817
			Contraintes	0
			Paramètres	224
Densité (calculée)	1,436 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,011
Coefficient d'absorption	0,109 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0488 wR2 = 0,1070
F(000)	704		Indices R (toutes données)	R1 = 0,1110 wR2 = 0,1369
Dimension du cristal	0,6 x 0,08 x 0,06 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,230 and - 0,273 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
C(1)-O(1)	1,425(3)	O(1)-C(2)-C(3)	125,2(3)
C(2)-O(1)	1,374(4)	O(1)-C(2)-C(7)	115,5(3)
C(2)-C(3)	1,383(4)	C(3)-C(2)-C(7)	119,3(3)
C(2)-C(7)	1,389(4)	C(2)-C(3)-C(4)	119,7(3)
C(3)-C(4)	1,389(4)	C(3)-C(4)-C(5)	121,8(3)
C(4)-C(5)	1,400(4)	C(4)-C(5)-C(6)	117,1(3)
C(5)-C(6)	1,401(4)	C(4)-C(5)-C(8)	121,9(3)
C(5)-C(8)	1,476(4)	C(6)-C(5)-C(8)	120,9(3)
C(6)-C(7)	1,376(4)	C(7)-C(6)-C(5)	121,1(3)
C(8)-C(9)	1,365(4)	C(6)-C(7)-C(2)	120,9(3)
C(8)-C(10)	1,447(4)	C(9)-C(8)-C(10)	106,3(3)
C(9)-O(4)	1,319(3)	C(9)-C(8)-C(5)	129,3(3)
C(9)-C(11)	1,481(4)	C(10)-C(8)-C(5)	124,4(3)
C(10)-O(3)	1,218(3)	O(4)-C(9)-C(8)	126,8(3)
C(10)-O(2)	1,397(4)	O(4)-C(9)-C(11)	123,9(3)
C(11)-C(12)	1,353(4)	C(8)-C(9)-C(11)	109,3(3)
C(11)-O(2)	1,390(3)	O(3)-C(10)-O(2)	117,7(3)
C(12)-C(14)	1,486(4)	O(3)-C(10)-C(8)	132,7(3)
C(12)-C(13)	1,507(4)	O(2)-C(10)-C(8)	109,6(2)
C(14)-O(5)	1,266(3)	C(12)-C(11)-O(2)	117,8(2)
C(14)-N(1)	1,329(4)	C(12)-C(11)-C(9)	135,8(3)
C(15)-N(1)	1,465(4)	O(2)-C(11)-C(9)	106,4(2)
C(15)-C(16)	1,522(4)	C(11)-C(12)-C(14)	122,0(3)
C(16)-C(17)	1,524(4)	C(11)-C(12)-C(13)	120,2(3)
C(17)-O(6)	1,435(4)	C(14)-C(12)-C(13)	118,0(3)
		O(5)-C(14)-N(1)	118,7(3)
		O(5)-C(14)-C(12)	123,1(3)
		N(1)-C(14)-C(12)	118,2(3)
		N(1)-C(15)-C(16)	112,0(3)
		C(15)-C(16)-C(17)	113,8(3)
		O(6)-C(17)-C(16)	111,5(3)
		C(2)-O(1)-C(1)	118,1(2)
		C(11)-O(2)-C(10)	108,5(2)
		C(4)-C(5)-C(8)	121,9(3)

N-butyl-2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)propanamide

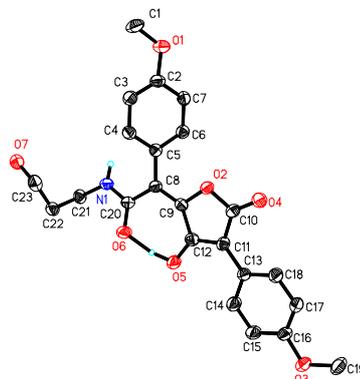


Formule brute	C ₁₈ H ₂₁ N O ₅		Echelle θ de collecte des données	5,12 to 28,28°
Masse moléculaire	331,36		Echelles des indices <i>hkl</i>	-21 ≤ <i>h</i> ≤ 21 -9 ≤ <i>k</i> ≤ 11 -28 ≤ <i>l</i> ≤ 31
Système cristallographique	Orthorhombic		Réflexions recueillies	39082
Groupe d'espace	Pbca		Réflexions indépendantes	4108 [R(int) = 0,0648]
Paramètres de maille	a = 16,4064(5) Å b = 8,6169(3) Å c = 23,5664(7) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,4%
Volume	3331,64(18) Å ³		Max/min de transmission	0,9885 and 09443
Groupe formulaire Z	8		Données Contraintes Paramètres	4108 0 229
Densité (calculée)	1,321 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F ²	1,036
Coefficient d'absorption	0,097 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2 σ (I)]	R1 = 0,0428 wR2 = 0,0975
F(000)	1408		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0721 wR2 = 0,1108
Dimension du cristal	0,6 x 0,14 x 0,12 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,206 and -0,182 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
O(1)-C(2)	1,3689(16)	C(2)-O(1)-C(1)	117,17(12)
O(1)-C(1)	1,428(2)	C(11)-O(2)-C(9)	108,33(10)
O(2)-C(11)	1,3902(15)	C(14)-N(1)-C(15)	123,20(13)
O(2)-C(9)	1,4000(16)	O(1)-C(2)-C(7)	115,77(12)
O(3)-C(9)	1,2096(16)	O(1)-C(2)-C(3)	124,94(13)
O(4)-C(10)	1,3145(16)	C(7)-C(2)-C(3)	119,29(12)
O(5)-C(14)	1,2579(17)	C(2)-C(3)-C(4)	119,76(13)
N(1)-C(14)	1,3302(17)	C(3)-C(4)-C(5)	121,75(12)
N(1)-C(15)	1,4638(18)	C(4)-C(5)-C(6)	117,23(12)
C(2)-C(7)	1,385(2)	C(4)-C(5)-C(8)	121,94(11)
C(2)-C(3)	1,3883(19)	C(6)-C(5)-C(8)	120,83(12)
C(3)-C(4)	1,3907(19)	C(7)-C(6)-C(5)	121,04(14)
C(4)-C(5)	1,395(2)	C(6)-C(7)-C(2)	120,90(13)
C(5)-C(6)	1,4075(18)	C(10)-C(8)-C(9)	106,54(11)
C(5)-C(8)	1,4702(18)	C(10)-C(8)-C(5)	129,08(12)
C(6)-C(7)	1,3767(19)	C(9)-C(8)-C(5)	124,38(11)
C(8)-C(10)	1,3676(18)	O(3)-C(9)-O(2)	117,75(13)
C(8)-C(9)	1,446(2)	O(3)-C(9)-C(8)	132,90(13)
C(10)-C(11)	1,4751(19)	O(2)-C(9)-C(8)	109,35(11)
C(11)-C(12)	1,3541(18)	O(4)-C(10)-C(8)	126,82(12)
C(12)-C(14)	1,4886(19)	O(4)-C(10)-C(11)	124,08(12)
C(12)-C(13)	1,503(2)	C(8)-C(10)-C(11)	109,10(12)
C(15)-C(16)	1,515(2)	C(12)-C(11)-O(2)	117,13(12)
C(16)-C(17)	1,530(2)	C(12)-C(11)-C(10)	136,18(13)
C(17)-C(18)	1,513(2)	O(2)-C(11)-C(10)	106,67(11)
		C(11)-C(12)-C(14)	121,60(13)
		C(11)-C(12)-C(13)	119,67(12)
		C(14)-C(12)-C(13)	118,73(11)
		O(5)-C(14)-N(1)	119,51(13)
		O(5)-C(14)-C(12)	123,56(12)
		N(1)-C(14)-C(12)	116,92(13)
		N(1)-C(15)-C(16)	111,40(13)
		C(15)-C(16)-C(17)	112,53(13)
		C(18)-C(17)-C(16)	113,87(13)

*2-(3-hydroxy-4-(4-méthoxyphényl)-5-oxofuran-2-ylidène)-
N-(3-hydroxypropyl)-2-(4-méthoxyphényl)acétamide*



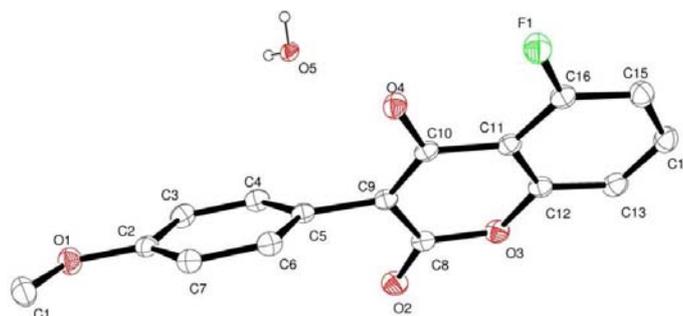
Formule brute	C ₂₃ H ₂₃ N O ₇		Echelle θ de collecte des données	5,12 to 24,71°
Masse moléculaire	425,42		Echelles des indices hkl	-9 ≤ h ≤ 9 -22 ≤ k ≤ 22 -30 ≤ l ≤ 31
Système cristallographique	Orthorhombic		Réflexions recueillies	42159
Groupe d'espace	Pbca		Réflexions indépendantes	3434 [R(int) = 0,2512]
Paramètres de maille	a = 7,9666(4) Å b = 19,0797(10) Å c = 26,6423(16) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,1%
Volume	4049,6(4) Å ³		Max/min de transmission	1,000000 and 0,680767
Groupe formulaire Z	8		Données	3434
			Contraintes	0
			Paramètres	290
Densité (calculée)	1,396 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	0,993
Coefficient d'absorption	0,104 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0579 wR2 = 0,1017
F(000)	1792		Indices R (toutes données)	R1 = 0,1449 wR2 = 0,1338
Dimension du cristal	0,5 x 0,03 x 0,03 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,238 and -0,253 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
O(1)-C(2)	1,377(4)	C(2)-O(1)-C(1)	117,9(3)
O(1)-C(1)	1,429(4)	C(10)-O(2)-C(9)	108,2(3)
O(2)-C(10)	1,392(4)	C(16)-O(3)-C(19)	116,8(3)
O(2)-C(9)	1,397(4)	C(20)-N(1)-C(21)	122,8(3)
O(3)-C(16)	1,376(4)	C(3)-C(2)-O(1)	125,0(4)
O(3)-C(19)	1,434(4)	C(3)-C(2)-C(7)	120,0(4)
O(4)-C(10)	1,220(4)	O(1)-C(2)-C(7)	115,1(3)
O(5)-C(12)	1,322(4)	C(2)-C(3)-C(4)	119,7(4)
O(6)-C(20)	1,256(4)	C(3)-C(4)-C(5)	121,8(3)
O(7)-C(23)	1,434(4)	C(4)-C(5)-C(6)	116,9(3)
N(1)-C(20)	1,335(4)	C(4)-C(5)-C(8)	122,0(3)
N(1)-C(21)	1,466(4)	C(6)-C(5)-C(8)	121,0(3)
C(2)-C(3)	1,374(5)	C(7)-C(6)-C(5)	121,9(3)
C(2)-C(7)	1,404(5)	C(6)-C(7)-C(2)	119,7(4)
C(3)-C(4)	1,389(5)	C(9)-C(8)-C(5)	119,7(3)
C(4)-C(5)	1,402(5)	C(9)-C(8)-C(20)	120,1(3)
C(5)-C(6)	1,402(5)	C(5)-C(8)-C(20)	120,1(3)
C(5)-C(8)	1,489(4)	C(8)-C(9)-O(2)	116,9(3)
C(6)-C(7)	1,373(5)	C(8)-C(9)-C(12)	137,3(3)
C(8)-C(9)	1,353(4)	O(2)-C(9)-C(12)	105,8(3)
C(8)-C(20)	1,490(5)	O(4)-C(10)-O(2)	117,4(3)
C(9)-C(12)	1,479(5)	O(4)-C(10)-C(11)	132,1(3)
C(10)-C(11)	1,437(5)	O(2)-C(10)-C(11)	110,5(3)
C(11)-C(12)	1,370(5)	C(12)-C(11)-C(10)	105,7(3)
C(11)-C(13)	1,470(5)	C(12)-C(11)-C(13)	129,5(3)
C(13)-C(18)	1,399(5)	C(10)-C(11)-C(13)	124,8(3)
C(13)-C(14)	1,400(5)	O(5)-C(12)-C(11)	126,8(3)
C(14)-C(15)	1,380(5)	O(5)-C(12)-C(9)	123,4(3)
C(15)-C(16)	1,391(5)	C(11)-C(12)-C(9)	109,8(3)
C(16)-C(17)	1,380(5)	C(18)-C(13)-C(14)	116,8(3)
C(17)-C(18)	1,382(5)	C(18)-C(13)-C(11)	121,4(3)
C(21)-C(22)	1,522(5)	C(14)-C(13)-C(11)	121,8(3)
C(22)-C(23)	1,517(5)	C(15)-C(14)-C(13)	121,5(3)
		C(14)-C(15)-C(16)	120,2(4)
		O(3)-C(16)-C(17)	124,7(3)
		O(3)-C(16)-C(15)	115,7(3)
		C(17)-C(16)-C(15)	119,6(3)
		C(16)-C(17)-C(18)	119,8(3)
		C(17)-C(18)-C(13)	122,1(3)
		O(6)-C(20)-N(1)	118,3(3)
		O(6)-C(20)-C(8)	123,8(3)
		N(1)-C(20)-C(8)	117,9(3)
		N(1)-C(21)-C(22)	112,9(3)
		C(23)-C(22)-C(21)	114,2(3)
		O(7)-C(23)-C(22)	112,2(3)

III. Dérivés des Flavanoïdes

5-fluoro-3-(4-méthoxyphényl)chroman-2,4-dione

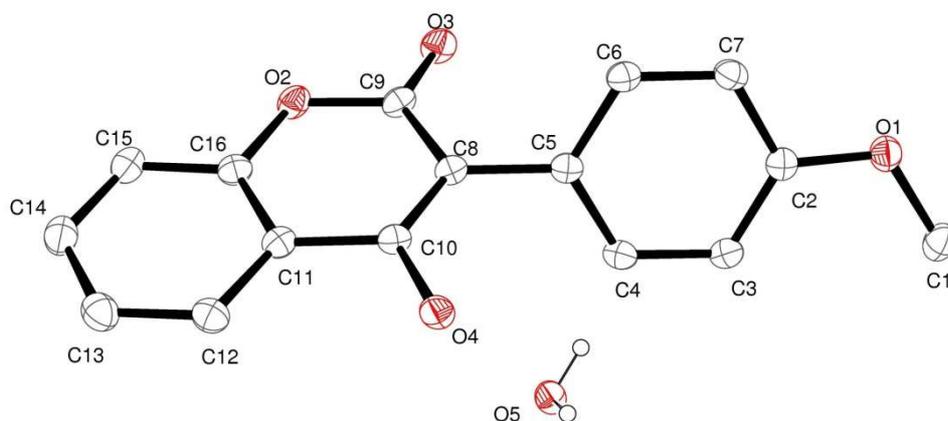


Formule brute	C ₁₆ H ₁₁ F O ₄ , H ₂ O		Echelle θ de collecte des données	2,22 to 25,33°
Masse moléculaire	304,26		Echelles des indices hkl	-9 ≤ h ≤ 9 -17 ≤ k ≤ 18 -14 ≤ l ≤ 14
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	15131
Groupe d'espace	P2(1)/c		Réflexions indépendantes	2456 [R(int) = 0,0344]
Paramètres de maille	a = 7,71760(10) Å b = 15,0310(3) Å c = 12,0156(2) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 105,4610(10)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	100,0%
Volume	1343,41(4) Å ³		Max/min de transmission	
Groupe formulaire Z	4		Données Contraintes Paramètres	2456 2 207
Densité (calculée)	1,504 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F ²	1,016
Coefficient d'absorption	0,121 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0313 wR2 = 0,0782
F(000)	632		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0425 wR2 = 0,0853
Dimension du cristal	0,28 x 0,22 x 0,14 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,213 and -0,181 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
C(1)-O(1)	1,4369(18)	O(1)-C(2)-C(7)	124,57(13)
C(2)-O(1)	1,3674(18)	O(1)-C(2)-C(3)	115,83(13)
C(2)-C(7)	1,390(2)	C(7)-C(2)-C(3)	119,60(14)
C(2)-C(3)	1,397(2)	C(4)-C(3)-C(2)	120,28(13)
C(3)-C(4)	1,377(2)	C(3)-C(4)-C(5)	121,10(13)
C(4)-C(5)	1,398(2)	C(6)-C(5)-C(4)	117,88(13)
C(5)-C(6)	1,393(2)	C(6)-C(5)-C(9)	120,63(13)
C(5)-C(9)	1,489(2)	C(4)-C(5)-C(9)	121,43(13)
C(6)-C(7)	1,388(2)	C(7)-C(6)-C(5)	121,74(13)
C(8)-O(2)	1,2221(17)	C(6)-C(7)-C(2)	119,40(13)
C(8)-O(3)	1,3773(18)	O(2)-C(8)-O(3)	115,53(12)
C(8)-C(9)	1,4408(19)	O(2)-C(8)-C(9)	125,61(13)
C(9)-C(10)	1,371(2)	O(3)-C(8)-C(9)	118,86(12)
C(10)-O(4)	1,3339(16)	C(10)-C(9)-C(8)	120,03(13)
C(10)-C(11)	1,454(2)	C(10)-C(9)-C(5)	123,15(12)
C(11)-C(12)	1,4000(19)	C(8)-C(9)-C(5)	116,71(12)
C(11)-C(16)	1,407(2)	O(4)-C(10)-C(9)	124,11(13)
C(12)-O(3)	1,3767(17)	O(4)-C(10)-C(11)	115,73(12)
C(12)-C(13)	1,386(2)	C(9)-C(10)-C(11)	120,16(12)
C(13)-C(14)	1,380(2)	C(12)-C(11)-C(16)	115,15(13)
C(14)-C(15)	1,391(2)	C(12)-C(11)-C(10)	118,13(13)
C(15)-C(16)	1,372(2)	C(16)-C(11)-C(10)	126,73(13)
C(16)-F(1)	1,3477(16)	O(3)-C(12)-C(13)	115,96(12)
		O(3)-C(12)-C(11)	120,81(13)
		C(13)-C(12)-C(11)	123,23(14)
		C(14)-C(13)-C(12)	118,73(14)
		C(13)-C(14)-C(15)	120,68(14)
		C(16)-C(15)-C(14)	118,96(15)
		F(1)-C(16)-C(15)	117,38(13)
		F(1)-C(16)-C(11)	119,38(13)
		C(15)-C(16)-C(11)	123,24(14)
		C(2)-O(1)-C(1)	117,75(11)
		C(12)-O(3)-C(8)	121,88(11)

3-(4-méthoxyphényl)chroman-2,4-dione



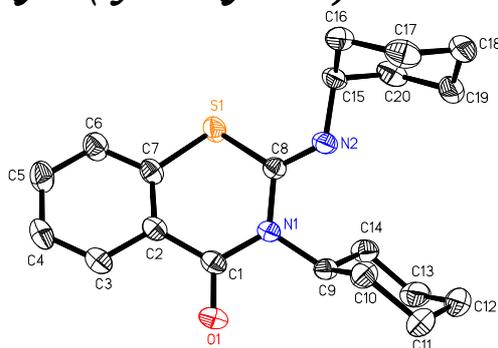
Formule brute	C ₁₆ H ₁₂ O ₄ , H ₂ O		Echelle θ de collecte des données	2,24 to 31,89°
Masse moléculaire	286,27		Echelles des indices hkl	-11 ≤ h ≤ 11 -22 ≤ k ≤ 21 -17 ≤ l ≤ 14
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	20413
Groupe d'espace	P2(1)/c		Réflexions indépendantes	4495 [R(int) = 0,0311]
Paramètres de maille	a = 7,657(5) Å b = 14,970(10) Å c = 11,922(11) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 106,23(5)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,5%
Volume	1312,1(18) Å ³		Max/min de transmission	
Groupe formulaire Z	4		Données	4495
			Contraintes	2
			Paramètres	198
Densité (calculée)	1,449 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,056
Coefficient d'absorption	0,108 mm ⁻¹		Indices finaux R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0528 wR2 = 0,1353
F(000)	600		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0860 wR2 = 0,1524
Dimension du cristal	0,25 x 0,22 x 0,16 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,469 and - 0,268 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
C(1)-O(1)	1,423(2)	O(1)-C(2)-C(3)	124,62(13)
C(2)-O(1)	1,3624(19)	O(1)-C(2)-C(7)	115,73(13)
C(2)-C(3)	1,380(2)	C(3)-C(2)-C(7)	119,64(14)
C(2)-C(7)	1,389(2)	C(2)-C(3)-C(4)	119,55(14)
C(3)-C(4)	1,391(2)	C(5)-C(4)-C(3)	121,44(13)
C(4)-C(5)	1,385(2)	C(4)-C(5)-C(6)	118,03(14)
C(5)-C(6)	1,394(2)	C(4)-C(5)-C(8)	120,52(12)
C(5)-C(8)	1,481(2)	C(6)-C(5)-C(8)	121,39(13)
C(6)-C(7)	1,375(2)	C(7)-C(6)-C(5)	121,01(14)
C(8)-C(10)	1,363(2)	C(6)-C(7)-C(2)	120,32(13)
C(8)-C(9)	1,436(2)	C(10)-C(8)-C(9)	119,88(14)
C(9)-O(3)	1,2034(19)	C(10)-C(8)-C(5)	123,31(13)
C(9)-O(2)	1,379(2)	C(9)-C(8)-C(5)	116,73(12)
C(10)-O(4)	1,322(2)	O(3)-C(9)-O(2)	115,71(13)
C(10)-C(11)	1,448(2)	O(3)-C(9)-C(8)	125,87(14)
C(11)-C(16)	1,384(2)	O(2)-C(9)-C(8)	118,42(13)
C(11)-C(12)	1,389(2)	O(4)-C(10)-C(8)	124,46(14)
C(12)-C(13)	1,372(2)	O(4)-C(10)-C(11)	114,87(12)
C(13)-C(14)	1,379(3)	C(8)-C(10)-C(11)	120,66(13)
C(14)-C(15)	1,376(3)	C(16)-C(11)-C(12)	118,69(15)
C(15)-C(16)	1,394(2)	C(16)-C(11)-C(10)	117,45(13)
C(16)-O(2)	1,364(2)	C(12)-C(11)-C(10)	123,85(14)
		C(13)-C(12)-C(11)	120,24(16)
		C(12)-C(13)-C(14)	120,31(16)
		C(15)-C(14)-C(13)	121,04(16)
		C(14)-C(15)-C(16)	118,13(16)
		O(2)-C(16)-C(11)	121,74(14)
		O(2)-C(16)-C(15)	116,67(14)
		C(11)-C(16)-C(15)	121,59(14)
		C(2)-O(1)-C(1)	117,56(12)
		C(16)-O(2)-C(9)	121,69(12)

IV. Dérivés de l'Acide Salicylique

3-cyclohexyl-2-(cyclohexylimino)-benzothiazin-4-one



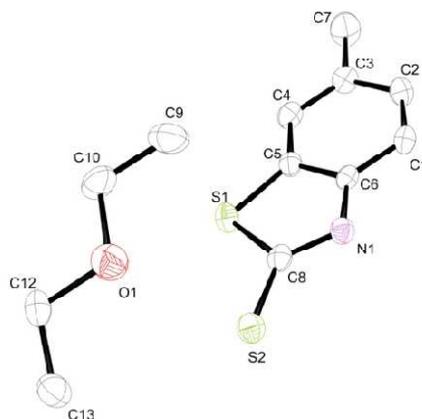
Formule brute	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O S		Echelle θ de collecte des données	5,21 to 28,28°
Masse moléculaire	342,49		Echelles des indices hkl	-13 ≤ h ≤ 13 -15 ≤ k ≤ 15 -21 ≤ l ≤ 21
Système cristallographique	Triclinic		Réflexions recueillies	24919
Groupe d'espace	P ⁻¹		Réflexions indépendantes	8723 [R(int) = 0,0376]
Paramètres de maille	a = 9,8057(2) Å b = 11,6266(3) Å c = 15,8942(3) Å	α = 89,4970(10)° β = 80,0800(10)° γ = 89,3220(10)°	Précision autour de θ	98,4%
Volume	735,86(16) Å ³		Max/min de transmission	0,9812 and 0,8943
Groupe formulaire Z	4		Données	8723
			Contraintes	0
			Paramètres	433
Densité (calculée)	1,275 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,016
Coefficient d'absorption	0,190 mm ⁻¹		Indices finaux R [I > 2σ(I)]	R1=0,0435 wR2=0,0981
F(000)	736		Indices R (toutes données)	R1=0,0686 wR2=0,1107
Dimension du cristal	0,60 x 0,40 x 0,10 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,368 and -0,315 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)		Angle (°)	
S(1)-C(7)	1,7519(16)	C(7)-S(1)-C(8)	101,75(7)	C(27)-S(2)-C(28)	102,72(7)
S(1)-C(8)	1,7858(14)	C(1)-N(1)-C(8)	124,72(12)	C(21)-N(3)-C(28)	125,07(12)
O(1)-C(1)	1,2227(18)	C(1)-N(1)-C(9)	115,91(12)	C(21)-N(3)-C(29)	116,13(11)
N(1)-C(1)	1,3927(19)	C(8)-N(1)-C(9)	118,95(11)	C(28)-N(3)-C(29)	118,45(11)
N(1)-C(8)	1,4162(18)	C(8)-N(2)-C(15)	121,64(12)	C(28)-N(4)-C(35)	121,66(13)
N(1)-C(9)	1,5002(18)	O(1)-C(1)-N(1)	120,37(14)	O(2)-C(21)-N(3)	120,44(13)
N(2)-C(8)	1,2576(18)	O(1)-C(1)-C(2)	120,23(14)	O(2)-C(21)-C(22)	119,79(13)
N(2)-C(15)	1,4717(19)	N(1)-C(1)-C(2)	119,36(13)	N(3)-C(21)-C(22)	119,73(13)
C(1)-C(2)	1,485(2)	C(7)-C(2)-C(3)	118,86(14)	C(27)-C(22)-C(23)	118,79(14)
C(2)-C(7)	1,387(2)	C(7)-C(2)-C(1)	123,91(14)	C(27)-C(22)-C(21)	123,86(13)
C(2)-C(3)	1,403(2)	C(3)-C(2)-C(1)	117,10(14)	C(23)-C(22)-C(21)	117,22(14)
C(3)-C(4)	1,377(2)	C(4)-C(3)-C(2)	120,99(16)	C(24)-C(23)-C(22)	121,14(16)
C(4)-C(5)	1,387(3)	C(3)-C(4)-C(5)	119,52(16)	C(23)-C(24)-C(25)	119,43(15)
C(5)-C(6)	1,377(2)	C(6)-C(5)-C(4)	120,58(15)	C(26)-C(25)-C(24)	120,72(15)
C(6)-C(7)	1,400(2)	C(5)-C(6)-C(7)	119,99(16)	C(25)-C(26)-C(27)	119,63(15)
C(9)-C(14)	1,526(2)	C(2)-C(7)-C(6)	120,03(15)	C(22)-C(27)-C(26)	120,25(14)
C(9)-C(10)	1,526(2)	C(2)-C(7)-S(1)	122,80(11)	C(22)-C(27)-S(2)	122,84(11)
C(10)-C(11)	1,534(2)	C(6)-C(7)-S(1)	117,14(13)	C(26)-C(27)-S(2)	116,87(12)
C(11)-C(12)	1,523(3)	N(2)-C(8)-N(1)	119,52(12)	N(4)-C(28)-N(3)	119,29(13)
C(12)-C(13)	1,520(3)	N(2)-C(8)-S(1)	122,38(11)	N(4)-C(28)-S(2)	122,03(12)
C(13)-C(14)	1,533(2)	N(1)-C(8)-S(1)	117,86(10)	N(3)-C(28)-S(2)	118,46(10)
C(15)-C(16)	1,523(3)	N(1)-C(9)-C(14)	112,89(13)	N(3)-C(29)-C(34)	112,65(12)
C(15)-C(20)	1,528(3)	N(1)-C(9)-C(10)	113,15(13)	N(3)-C(29)-C(30)	113,73(13)
C(16)-C(17)	1,520(2)	C(14)-C(9)-C(10)	112,40(13)	C(34)-C(29)-C(30)	112,33(12)
C(17)-C(18)	1,517(3)	C(9)-C(10)-C(11)	109,86(14)	C(29)-C(30)-C(31)	109,67(13)
C(18)-C(19)	1,520(3)	C(12)-C(11)-C(10)	111,27(15)	C(32)-C(31)-C(30)	111,72(14)
C(19)-C(20)	1,521(2)	C(13)-C(12)-C(11)	111,33(15)	C(33)-C(32)-C(31)	110,90(13)
S(2)-C(27)	1,7501(16)	C(12)-C(13)-C(14)	111,51(16)	C(32)-C(33)-C(34)	110,77(14)
S(2)-C(28)	1,7827(14)	C(9)-C(14)-C(13)	109,05(14)	C(29)-C(34)-C(33)	109,54(13)
O(2)-C(21)	1,2258(18)	N(2)-C(15)-C(16)	109,13(15)	N(4)-C(35)-C(36)	108,51(17)
N(3)-C(21)	1,3909(19)	N(2)-C(15)-C(20)	108,24(14)	N(4)-C(35)-C(40)	108,82(14)
N(3)-C(28)	1,4179(18)	C(16)-C(15)-C(20)	110,92(13)	C(36)-C(35)-C(40)	110,86(14)
N(3)-C(29)	1,4996(17)	C(17)-C(16)-C(15)	112,39(14)	C(37)-C(36)-C(35)	112,49(16)
N(4)-C(28)	1,2586(19)	C(18)-C(17)-C(16)	111,38(16)	C(36)-C(37)-C(38)	111,48(19)
N(4)-C(35)	1,469(2)	C(17)-C(18)-C(19)	111,43(13)	C(37)-C(38)-C(39)	110,81(15)
C(21)-C(22)	1,487(2)	C(18)-C(19)-C(20)	110,91(14)	C(40)-C(39)-C(38)	111,31(16)
C(22)-C(27)	1,389(2)	C(19)-C(20)-C(15)	111,98(15)	C(39)-C(40)-C(35)	112,35(16)
C(22)-C(23)	1,400(2)				
C(23)-C(24)	1,381(2)				
C(24)-C(25)	1,386(3)				
C(25)-C(26)	1,381(2)				
C(26)-C(27)	1,404(2)				
C(29)-C(34)	1,521(2)				
C(29)-C(30)	1,530(2)				
C(30)-C(31)	1,531(2)				
C(31)-C(32)	1,526(3)				
C(32)-C(33)	1,523(2)				
C(33)-C(34)	1,534(2)				
C(35)-C(36)	1,519(3)				
C(35)-C(40)	1,526(3)				
C(36)-C(37)	1,516(3)				
C(37)-C(38)	1,518(3)				
C(38)-C(39)	1,519(3)				
C(39)-C(40)	1,512(3)				

V. Dérivés du Benzothiazole

6-Méthylbenzothiazole-2-thiol



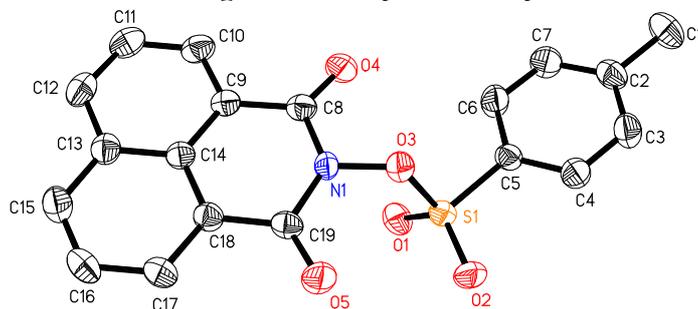
Formule brute	C ₈ H ₆ NS ₂ , C ₄ H ₁₀ O		Echelle θ de collecte des données	2,94 to 22,39 °
Masse moléculaire	254,38		Echelles des indices hkl	-12 ≤ h ≤ 12 -16 ≤ k ≤ 16 -22 ≤ l ≤ 22
Système cristallographique	Orthorhombic		Réflexions recueillies	21967
Groupe d'espace	P b c a		Réflexions indépendantes	2478 [R(int) = 0,0883]
Paramètres de maille	a = 10,331 Å b = 14,061 Å c = 18,634 Å	$\alpha = 90,0^\circ$ $\beta = 90,0^\circ$ $\gamma = 90,0^\circ$	Précision autour de θ	100,0%
Volume	2706,8 Å ³		Max/min de transmission	
Groupe formulaire Z	8		Données	2478
			Contraintes	0
			Paramètres	148
Densité (calculée)	1,248 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	0,967
Coefficient d'absorption	0,374 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0404 wR2 = 0,0995
F(000)	1080		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0673 wR2 = 0,1089
Dimension du cristal	0,25 x 0,075 x 0,025 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,567 and -0,451 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
S(2)-C(8)	1,708(3)	C(5)-S(1)-C(8)	90,41(12)
S(1)-C(5)	1,747(3)	C(2)-C(1)-C(6)	119,0(2)
S(1)-C(8)	1,774(3)	C(10)-O(1)-C(12)	113,0(2)
C(1)-C(2)	1,376(4)	C(13)-C(12)-O(1)	110,0(2)
C(1)-C(6)	1,396(3)	N(1)-C(8)-S(2)	125,1(2)
O(1)-C(10)	1,498(3)	N(1)-C(8)-S(1)	113,27(19)
O(1)-C(12)	1,506(3)	S(2)-C(8)-S(1)	121,65(15)
C(12)-C(13)	1,497(4)	C(8)-N(1)-C(6)	111,9(2)
C(8)-N(1)	1,315(3)	C(1)-C(2)-C(3)	122,0(2)
N(1)-C(6)	1,398(3)	C(4)-C(5)-C(6)	121,3(2)
C(9)-C(10)	1,489(4)	C(4)-C(5)-S(1)	130,2(2)
C(2)-C(3)	1,397(4)	C(6)-C(5)-S(1)	108,47(19)
C(5)-C(4)	1,393(4)	C(5)-C(4)-C(3)	119,0(2)
C(5)-C(6)	1,396(3)	C(4)-C(3)-C(2)	119,2(2)
C(7)-C(3)	1,506(4)	C(4)-C(3)-C(7)	121,3(2)
C(4)-C(3)	1,395(4)	C(2)-C(3)-C(7)	119,5(2)
		C(9)-C(10)-O(1)	110,6(2)
		C(1)-C(6)-C(5)	119,5(2)
		C(1)-C(6)-N(1)	124,5(2)
		C(5)-C(6)-N(1)	115,9(2)

VI. Dérivés des Naphthalimides

1,3-dioxobenzoisoquinolin-2-yl 4-méthylbenzènesulfonate

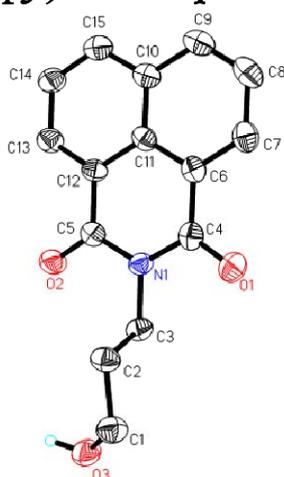


Formule brute	C ₁₉ H ₁₃ N O ₅ S		Echelle θ de collecte des données	5,14 to 26,37°
Masse moléculaire	367,36		Echelles des indices hkl	-16 ≤ h ≤ 16 -12 ≤ k ≤ 11 -16 ≤ l ≤ 16
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	18603
Groupe d'espace	P2(1)/n		Réflexions indépendantes	3348 [R(int) = 0,0650]
Paramètres de maille	a = 12,9566(4) Å b = 9,6089(3) Å c = 13,3686(4) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 97,347(2)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,2%
Volume	1650,71(9) Å ³		Max/min de transmission	0,9955 and 0,9348
Groupe formulaire Z	4		Données	3348
			Contraintes	0
			Paramètres	236
Densité (calculée)	1,478 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,037
Coefficient d'absorption	0,228 mm ⁻¹		Indices finaux R [I > 2σ(I)]	R1=0,0447 wR2=0,0992
F(000)	760		Indices R (toutes données)	R1=0,0960 wR2=0,1274
Dimension du cristal	0,30 x 0,20 x 0,02 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,289 and -0,342 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
S(1)-O(2)	1,4194(19)	O(2)-S(1)-O(1)	120,14(13)
S(1)-O(1)	1,424(2)	O(2)-S(1)-O(3)	107,33(11)
S(1)-O(3)	1,6596(19)	O(1)-S(1)-O(3)	106,24(11)
S(1)-C(5)	1,747(3)	O(2)-S(1)-C(5)	109,24(13)
O(3)-N(1)	1,398(3)	O(1)-S(1)-C(5)	112,04(13)
O(4)-C(8)	1,216(3)	O(3)-S(1)-C(5)	99,69(11)
O(5)-C(19)	1,207(3)	N(1)-O(3)-S(1)	114,97(15)
N(1)-C(8)	1,406(3)	O(3)-N(1)-C(8)	115,6(2)
N(1)-C(19)	1,418(3)	O(3)-N(1)-C(19)	115,5(2)
C(1)-C(2)	1,514(4)	C(8)-N(1)-C(19)	128,9(2)
C(2)-C(7)	1,381(4)	C(7)-C(2)-C(3)	118,3(3)
C(2)-C(3)	1,392(4)	C(7)-C(2)-C(1)	121,2(3)
C(3)-C(4)	1,389(4)	C(3)-C(2)-C(1)	120,5(3)
C(4)-C(5)	1,377(4)	C(4)-C(3)-C(2)	121,1(3)
C(5)-C(6)	1,396(4)	C(5)-C(4)-C(3)	118,9(3)
C(6)-C(7)	1,372(4)	C(4)-C(5)-C(6)	121,2(3)
C(8)-C(9)	1,469(4)	C(4)-C(5)-S(1)	118,7(2)
C(9)-C(10)	1,377(4)	C(6)-C(5)-S(1)	120,1(2)
C(9)-C(14)	1,420(4)	C(7)-C(6)-C(5)	118,5(3)
C(10)-C(11)	1,400(4)	C(6)-C(7)-C(2)	122,1(3)
C(11)-C(12)	1,364(4)	O(4)-C(8)-N(1)	120,3(3)
C(12)-C(13)	1,420(4)	O(4)-C(8)-C(9)	125,6(3)
C(13)-C(15)	1,418(4)	N(1)-C(8)-C(9)	114,1(2)
C(13)-C(14)	1,418(4)	C(10)-C(9)-C(14)	120,0(3)
C(14)-C(18)	1,420(4)	C(10)-C(9)-C(8)	119,4(3)
C(15)-C(16)	1,371(4)	C(14)-C(9)-C(8)	120,6(2)
C(16)-C(17)	1,392(4)	C(9)-C(10)-C(11)	120,4(3)
C(17)-C(18)	1,386(4)	C(12)-C(11)-C(10)	120,9(3)
C(18)-C(19)	1,460(4)	C(11)-C(12)-C(13)	120,6(3)
		C(15)-C(13)-C(14)	118,8(3)
		C(15)-C(13)-C(12)	122,6(3)
		C(14)-C(13)-C(12)	118,6(3)
		C(13)-C(14)-C(18)	119,3(2)
		C(13)-C(14)-C(9)	119,4(2)
		C(18)-C(14)-C(9)	121,3(3)
		C(16)-C(15)-C(13)	120,7(3)
		C(15)-C(16)-C(17)	120,8(3)
		C(18)-C(17)-C(16)	120,5(3)
		C(17)-C(18)-C(14)	120,0(3)
		C(17)-C(18)-C(19)	119,1(3)
		C(14)-C(18)-C(19)	120,9(2)
		O(5)-C(19)-N(1)	119,7(3)
		O(5)-C(19)-C(18)	126,3(2)
		N(1)-C(19)-C(18)	114,0(2)

2-(3-hydroxypropyl)benzoisoquinoline-1,3-dione

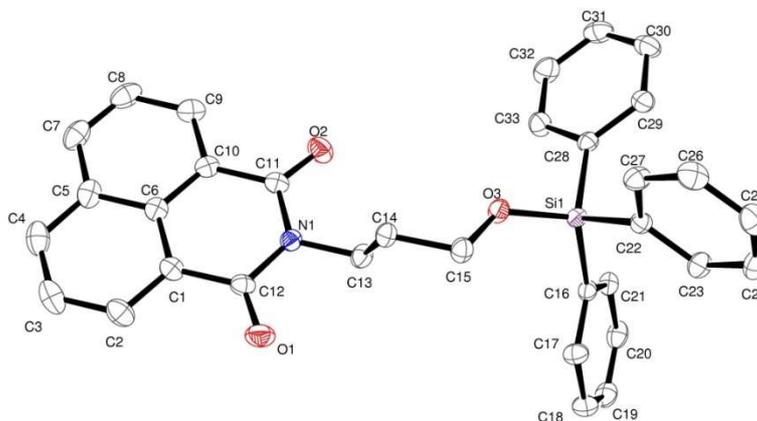


Formule brute	C ₁₅ H ₁₃ N O ₃		Echelle θ de collecte des données	5,13 to 24,71°
Masse moléculaire	255,26		Echelles des indices hkl	-4 ≤ h ≤ 5 -13 ≤ k ≤ 13 -26 ≤ l ≤ 26
Système cristallographique	Monoclinic		Réflexions recueillies	15208
Groupe d'espace	P2(1)/n		Réflexions indépendantes	2072 [R(int) = 0,1308]
Paramètres de maille	a = 4,8409(3) Å b = 11,1474(6) Å c = 22,7547(11) Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 95,311(4)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	Précision autour de θ	99,1%
Volume	1222,65(12) Å ³		Max/min de transmission	0,9981 and 0,9798
Groupe formulaire Z	4		Données	2072
			Contraintes	0
			Paramètres	173
Densité (calculée)	1,387 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	0,991
Coefficient d'absorption	0,097 mm ⁻¹		Indices finaux R[I > 2σ(I)]	R1=0,0447 wR2=0,0829
F(000)	536		Indices R (toutes données)	R1=0,1205 wR2=0,1073
Dimension du cristal	0,21 x 0,05 x 0,02 mm ³		$\Delta\rho$ (min/max)	0,209 and -0,215 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)	
N(1)-C(5)	1,390(3)	C(5)-N(1)-C(4)	124,2(2)
N(1)-C(4)	1,399(3)	C(5)-N(1)-C(3)	118,5(2)
N(1)-C(3)	1,478(3)	C(4)-N(1)-C(3)	117,2(2)
O(1)-C(4)	1,225(3)	O(3)-C(1)-C(2)	112,7(2)
O(2)-C(5)	1,237(3)	C(1)-C(2)-C(3)	111,4(2)
O(3)-C(1)	1,421(3)	N(1)-C(3)-C(2)	112,5(2)
C(1)-C(2)	1,510(3)	O(1)-C(4)-N(1)	119,9(3)
C(2)-C(3)	1,521(4)	O(1)-C(4)-C(6)	122,7(3)
C(4)-C(6)	1,480(4)	N(1)-C(4)-C(6)	117,4(3)
C(5)-C(12)	1,472(4)	O(2)-C(5)-N(1)	119,1(3)
C(6)-C(7)	1,375(4)	O(2)-C(5)-C(12)	122,7(3)
C(6)-C(11)	1,413(4)	N(1)-C(5)-C(12)	118,2(3)
C(7)-C(8)	1,407(4)	C(7)-C(6)-C(11)	120,4(3)
C(8)-C(9)	1,364(4)	C(7)-C(6)-C(4)	119,9(3)
C(9)-C(10)	1,417(4)	C(11)-C(6)-C(4)	119,7(3)
C(10)-C(15)	1,412(4)	C(6)-C(7)-C(8)	119,9(3)
C(10)-C(11)	1,422(4)	C(9)-C(8)-C(7)	121,1(3)
C(11)-C(12)	1,418(4)	C(8)-C(9)-C(10)	120,4(3)
C(12)-C(13)	1,374(4)	C(15)-C(10)-C(9)	122,6(3)
C(13)-C(14)	1,408(4)	C(15)-C(10)-C(11)	118,6(3)
C(14)-C(15)	1,372(4)	C(9)-C(10)-C(11)	118,8(3)
		C(6)-C(11)-C(12)	120,9(2)
		C(6)-C(11)-C(10)	119,4(3)
		C(12)-C(11)-C(10)	119,7(3)
		C(13)-C(12)-C(11)	119,9(3)
		C(13)-C(12)-C(5)	120,7(3)
		C(11)-C(12)-C(5)	119,5(3)
		C(12)-C(13)-C(14)	120,5(3)
		C(15)-C(14)-C(13)	120,5(3)
		C(14)-C(15)-C(10)	120,7(3)

2-(3-(triphénylsilyloxy)propyl)benzoisoquinoline-1,3-dione



Formule brute	$C_{33}H_{27}NO_3Si$		Echelle θ de collecte des données	1,71 to 25,35°
Masse moléculaire	513,65		Echelles des indices hkl	-12 ≤ h ≤ 12 -12 ≤ k ≤ 13 -14 ≤ l ≤ 12
Système cristallographique	triclinic		Réflexions recueillies	20549
Groupe d'espace	P -1		Réflexions indépendantes	4837 [R(int) = 0,0246]
Paramètres de maille	a = 10,4797(2) Å b = 10,8525(2) Å c = 12,4088(3) Å	$\alpha = 79,995(1)^\circ$ $\beta = 75,040(1)^\circ$ $\gamma = 78,898(1)^\circ$	Précision autour de θ	99,9%
Volume	1326,42(5) Å ³		Max/min de transmission	
Groupe formulaire Z	2		Données	4837
			Contraintes	0
			Paramètres	343
Densité (calculée)	1,286 Mg/m ³		Qualité d'ajustement sur F²	1,039
Coefficient d'absorption	0,124 mm ⁻¹		Indices finaux R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0348 wR2 = 0,0874
F(000)	540		Indices R (toutes données)	R1 = 0,0464 wR2 = 0,0957
Dimension du cristal	0,4 x 0,36 x 0,24 mm ³		Δρ (min/max)	0,313 and -0,288 e.Å ⁻³

Partie VI, Annexe 3 : Données Cristallographiques

Longueur de Liaison (Å)		Angle (°)		Angle (°)	
C(1)-C(2)	1,379(2)	C(2)-C(1)-(C6)	119,85(17)	C(19)-C(18)-(C17)	120,05(17)
C(1)-C(6)	1,412(2)	C(2)-C(1)-(C12)	120,08(16)	C(18)-C(19)-(C20)	119,69(16)
C(1)-C(12)	1,474(2)	C(6)-C(1)-(C12)	120,07(15)	C(19)-C(20)-(C21)	120,04(16)
C(2)-C(3)	1,405(3)	C(1)-C(2)-(C3)	120,47(19)	C(20)-C(21)-(C16)	121,52(16)
C(3)-C(4)	1,361(3)	C(4)-C(3)-(C2)	120,38(19)	C(23)-C(22)-(C27)	117,31(15)
C(4)-C(5)	1,412(3)	C(3)-C(4)-(C5)	121,18(19)	C(23)-C(22)-(Si1)	121,60(12)
C(5)-C(7)	1,414(3)	C(4)-C(5)-(C7)	123,27(18)	C(27)-C(22)-(Si1)	120,86(12)
C(5)-C(6)	1,421(2)	C(4)-C(5)-(C6)	118,44(18)	C(24)-C(23)-(C22)	121,26(16)
C(6)-C(10)	1,413(2)	C(7)-C(5)-(C6)	118,29(18)	C(25)-C(24)-(C23)	119,96(17)
C(7)-C(8)	1,357(3)	C(1)-C(6)-(C10)	120,38(15)	C(24)-C(25)-(C26)	120,12(16)
C(8)-C(9)	1,406(3)	C(1)-C(6)-(C5)	119,68(16)	C(25)-C(26)-(C27)	120,03(17)
C(9)-C(10)	1,380(2)	C(10)-C(6)-(C5)	119,94(16)	C(26)-C(27)-(C22)	121,31(16)
C(10)-C(11)	1,476(2)	C(8)-C(7)-(C5)	120,96(18)	C(29)-C(28)-(C33)	117,41(15)
C(11)-O(2)	1,2203(19)	C(7)-C(8)-(C9)	120,96(18)	C(29)-C(28)-(Si1)	122,67(12)
C(11)-N(1)	1,398(2)	C(10)-C(9)-(C8)	120,12(18)	C(33)-C(28)-(Si1)	119,90(12)
C(12)-O(1)	1,2203(19)	C(9)-C(10)-(C6)	119,71(16)	C(30)-C(29)-(C28)	121,25(16)
C(12)-N(1)	1,399(2)	C(9)-C(10)-(C11)	119,91(16)	C(31)-C(30)-(C29)	120,10(17)
C(13)-N(1)	1,478(2)	C(6)-C(10)-(C11)	120,37(14)	C(32)-C(31)-(C30)	119,77(17)
C(13)-C(14)	1,520(2)	O(2)-C(11)-(N1)	120,34(15)	C(31)-C(32)-(C33)	120,29(18)
C(14)-C(15)	1,507(2)	O(2)-C(11)-(C10)	122,62(15)	C(32)-C(33)-(C28)	121,17(17)
C(15)-O(3)	1,4240(19)	N(1)-C(11)-(C10)	117,05(14)	C(11)-N(1)-(C12)	124,49(14)
C(16)-C(21)	1,396(2)	O(1)-C(12)-(N1)	119,76(16)	C(11)-N(1)-(C13)	118,24(13)
C(16)-C(17)	1,397(2)	O(1)-C(12)-(C1)	122,76(16)	C(12)-N(1)-(C13)	117,26(13)
C(16)-Si(1)	1,8751(15)	N(1)-C(12)-(C1)	117,47(14)	C(15)-O(3)-(Si1)	129,14(10)
C(17)-C(18)	1,387(2)	N(1)-C(13)-(C14)	111,78(13)	O(3)-Si(1)-(C28)	102,58(6)
C(18)-C(19)	1,376(3)	C(15)-C(14)-(C13)	112,34(13)	O(3)-Si(1)-(C22)	112,41(6)
C(19)-C(20)	1,383(3)	O(3)-C(15)-(C14)	108,98(13)	C(28)-Si(1)-(C22)	111,07(7)
C(20)-C(21)	1,389(2)	C(21)-C(16)-(C17)	116,94(14)	O(3)-Si(1)-(C16)	111,46(6)
C(22)-C(23)	1,395(2)	C(21)-C(16)-(Si1)	122,06(12)	C(28)-Si(1)-(C16)	111,06(7)
C(22)-C(27)	1,401(2)	C(17)-C(16)-(Si1)	120,96(12)	C(22)-Si(1)-(C16)	108,24(7)
C(22)-Si(1)	1,8683(16)	C(18)-C(17)-(C16)	121,76(16)		
C(23)-C(24)	1,389(2)				
C(24)-C(25)	1,376(3)				
C(25)-C(26)	1,376(3)				
C(26)-C(27)	1,383(2)				
C(28)-C(29)	1,395(2)				
C(28)-C(33)	1,398(2)				
C(28)-Si(1)	1,8618(16)				
C(29)-C(30)	1,386(2)				
C(30)-C(31)	1,377(3)				
C(31)-C(32)	1,376(3)				
C(32)-C(33)	1,383(2)				
O(3)-Si(1)	1,6385(11)				

Annexe 4 :

Références

Bibliographiques

1. H. M. Patt, E. B. Tyree, R. L. Straube and D. E. Smith, *Science*, 1949. **110**: p. 213.
2. P. Kuna, M. Dostal, O. Neruda, J. Knajfi, P. Petyrek, et al., *J. Appl. Biomed.*, 2004. **2**: p. 43-49.
3. A. C. Müller, S. Pigorsch, C. Beyer, C. Lautenschläger and J. Dunst, *Strahlenther Onkol.*, 2004. **8**: p. 517-525.
4. G. K. Alderton, *Nature Reviews Cancer*, 2008. **8**: p. 412-413.
5. J. R. N. Cherry, ed. *Chap 48: Les Rayonnements Ionisants*, . ed. è.é. Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail. 2000.
6. Y. S. Cordoliani, ed. *Chapitre II : Grandeurs et unités en radioprotection*. . ed. F.d. radiologie. Vol. 42. 2002. 248-252.
7. ICRU., ed. *Fundamental quantities and units for ionizing radiation*. . ICRU Report 60, ed. I.P. Bethesda. 1998.
8. S. Billon, A. Morin, S. Caër, H. Baysson, J. P. Gambard, J. C. Backe, A. Rannou, M. Tirmarche and D. Laurier, *Radiation Protection Dosimetry*, 2005. **113**(3): p. 314-320.
9. G. V. Buxton, *Radiation-induced damage to DNA : from model compounds to cell*, in *Radiation Chemistry*, M. Spothem-Maurizot, et al., Editors. 2008, EDP Science. p. 3-16.
10. A. P. Breen and J. A. Murphy, *Free Rad. Biol. Med.*, 1995. **18**: p. 1033-1077.
11. G. V. Buxton, *Chap 1: An overview of the radiation chemistry of liquids*, in *L'actualité chimique (livre), Radiation chemistry, from basics to applications in material and life sciences*, M. Spothem-Maurizot, et al., Editors. 2008, EDP Science: Les Ulis. p. 3-16.
12. M. Spothem-Maurizot, M. Begusova and M. Charlier, *L'Actualité Chimique*, 2003. **269-270**: p. 97-102.
13. CEA, *Les clés du CEA.*, 2000. **43**.
14. M. Fontecave and J. L. Pierre, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1991. **128**: p. 505-520.
15. A. Favier, *L'Actualité Chimique*, 2003. **269-270**: p. 108-115.
16. R. L. Wartens, K. G. Hofer, C. R. Harris and J.M. Smith, *Curr. Top. Radiat. Res.*, 1977. **Q12**: p. 389-407.
17. S. Corde, *Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforcateurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse*. Thèse, 2002, Université Joseph Fourier: Grenoble.

18. M. Tubiana, J. Dutreix and A. Wambersie, eds. *Science et Pratique Médicale*. ed. Radiobiologie. 1997, Hermann: Paris.
19. E. Moustacchi, *Mutat. Res.*, 2000. **464**: p. 35-40.
20. J.P. Pouget, *Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire: mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées*. Thèse, 2000, Université Paris XI: Paris.
21. C. Prouillac, *Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro*. Thèse, 2006, Université Paul Sabatier de TOULOUSE III: Toulouse.
22. T. Douki and J. Cadet, *Chap 12: Radiation-induced damage to DNA: from model compounds to cell.*, in *Radiation Chemistry*, M. Spothem-Maurizot, et al., Editors. 2008, EDP Science. p. 177-190.
23. J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparoutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat and S. Sauvaigo, *Mutat. Res.* , 1999. **424**: p. 9-21.
24. S. Wallace, *Radiat. Res.*, 1988. **150**: p. S60-S79.
25. M. Nold and H. Wennemers, *Chem. Commun.*, 2004: p. 1800-1801.
26. W. Wang, J.C. Liu and P.J. Gao, *Chinese Chemical Letters*, 2002. **13**(8): p. 773-776.
27. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third edition. 1985, Oxford University Press.
28. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, et al., *Chemico-Biological Interactions*, 2006. **160**: p. 1-40.
29. M.M. Elkind and H. Sutton, *Radiat. Res.*, 1959. **13**: p. 556-593.
30. A. Boissière, *Contribution « K » à l'effet biologique des rayonnements ionisants*. Thèse, 2004, Université Paris VI: Paris.
31. D. Averbeck, *Cancer/Radiother.*, 2000. **4**: p. 335-354.
32. S. Boiteux, ed. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*. Vol. 26. 2002.
33. M. Frankenberg-Schwager, *Radiat. Environ. Biophys.*, 1990. **29**: p. 273-292.
34. Ikushima, T., H. Aritomi, and J. Morisita, *Mutat. Res.*, 1996. **358**: p. 193-198.
35. H. Nilsen and H.E. Krokan, *Carcinogenesis*, 2001. **22**: p. 987-998.
36. J. Goudable and A. Favier, *Nutr. Clin. Metabol.*, 1997. **11**(2): p. 115-120.
37. Z. A. Wood, E. Schroder, J. Robin Harris and L. B. Poole, *Trends Biochem. Sci.*, 2003. **28**(1): p. 32-40.
38. G.E. Arteel and H. Sies, *Env. Toxicol. Pharmacol.*, 2001. **10**(4): p. 153-158.
39. L. Lee, N. Koo and D.B. Min, *Comp. Rev. Food Sci. Saf.* , 2004. **3**: p. 21-33.
40. A. Samuni, J. Aronovitch, D. Godinger, M. Chevion and G. Czapski, *Eur. J. Biochem.* , 1983. **137**(1-2): p. 119-124.
41. T. Chepda, C. Perier, A. Chamson and J. Frey, *Nutr. Clin. Metabol.*, 1997. **11**(2): p. 115-120.
42. T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Boloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi and R. D. Lele, *J. Assoc. Physicians India*, 2004. **52**: p. 794-804.
43. G.T. Vatassery, W.E. Smith and H.T. Quach, *Lipids*, 1989. **24**(12): p. 1043-1047.
44. A.C. Chan, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1993. **71**(9): p. 725-731.
45. J. Cillard and P. Cillard, *Ann. Nutr. Aliment.*, 1980. **34**(3): p. 579-591.
46. L. Bravo, *Nutr. Rev.*, 1998. **56**: p. 317-333.
47. J.B. German and R.L. Walzem, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000. **20**: p. 561-593.
48. W.O. Foye, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 1981.
49. L. Eldjarn and A. Pihl, *J. Biol. Chem.* , 1956. **223**(1): p. 341-352.
50. E.S. Copeland, *Photochem. Photobiol.* , 1978. **28**: p. 839-844.
51. C.D.G. Jarrett, M.M.o.R. Casualties., Editor. 1999, Armed Forces Radiobiology Research Institute: Bethesda, Maryland.

52. S. Keith, E. Muray, Spoo W., 1999, *Toxicological profile for ionizing radiation*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), www.atsdr.cdc.gov
53. J.M. Cosset, *Cancer/Radiother.*, 1997. **1**: p. 823-835.
54. Y.S. Cordoliani, ed. *Chapitre VI: Effets pathologiques des rayonnements ionisants: les effets déterministes.*, ed. F.d. radiologie. Vol. 43. 2002.
55. T.J. Cervený, T.J. MacVittie and R.W. Young, 1989, Armed Forces Radiobiology Research Institute: Bethesda, Maryland. p. 17-36.
56. J.C. Nénot, *Techniques de l'ingénieur*, 1999. **BN3902**.
57. W.M. Dale, L.H. Gray and W.J. Meredith, *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 1949. **242(A)**: p. 33-62.
58. S.J. Hosseinimehr, *Drug Discovery Today*, 2007. **12**: p. 794-805.
59. J.S. Greenberger, *in vivo*, 2009. **23**: p. 323-336.
60. J. F. Weiss, K. S. Kumar, T. L. Walden, R. Neta, M. R. Landauer and E. P. Clark, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1990. **57**: p. 709-722.
61. S.R. Venkatachalam and S. Chattopadhyay, *Curr. Org. Chem.*, 2005. **9**: p. 389-404.
62. J.F. Weiss and M.R. Landauer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* , 2000. **899**: p. 44-60.
63. J.R. Maisin, C. Albert and A. Henry, *Radiat. Res.*, 1993. **135**: p. 332-337.
64. M. W. Epperly, J. A. Gretton, S. J. DeFilippi, C. A. Sikora, D. Liggitt, G. Koe and J. S. Greenberger, *Radiat. Res.* , 2001. **155**: p. 2-14.
65. M. W. Epperly, V. E. Kagan, C. A. Sikora, J. E. Gretton, S. J. Defilippi, D. Bar-Sagi and J. S. Greenberger, *Int. J. Cancer*, 2001. **96**: p. 221-231.
66. H. Guo, J. A. Seixas-Silva Jr., M. W. Epperly, J. E. Gretton, D. M. Shin, D. Bar-Sagi, H. Archer and J. S. Greenberger, *Radiat. Res.*, 2003. **159**: p. 361-370.
67. M. W. Epperly, M. Carpenter, A. Agarwal, P. Mitra, S. Nie and J. S. Greenberger, *in vivo*, 2004. **18**: p. 401-410.
68. M. W. Epperly, R. Wegner, A. J. Kanai, V. Kagan, E. E. Greenberger, S. Nie and J. S. Greenberger, *Radiat. Res.*, 2007. **167**: p. 289-297.
69. S. Emami, S. J. Hosseinimehr, S. M. Taghdisi and S. Akhlaghpour, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , 2007. **17**: p. 45-48.
70. V.K. Singh and V.S. Yadav, *Exp. Mol. Pathol.* , 2005. **78**: p. 156-169.
71. L. S. Constone, S. Harwell, P. Keng, F. Lee, P. Rubin and D. Siemann, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* , 1991. **20**: p. 447-56.
72. J. Vavrova, *Folia Biol.*, 1995. **41**: p. 23-30.
73. S. M. Hahn, M. C. Krishna, A. M. DeLuca, D. Coffin and J. B. Mitchell, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000. **28**: p. 953-958.
74. A. Mourret, C. Agnius-Delord and R. Rinaldi, *C.R. Série D*, 1972. **275**: p. 2985-2988.
75. A. Mourret, C. Agnius-Delord and R. Rinaldi, *C.R. Série D*, 1972. **275**: p. 1575-1578.
76. A. Mourret and R. Rinaldi, CEA, 1971. *Rapport 25*.
77. R. F. Martin, S. Broadhurst, M. E. Reum, C. J. Squire, G. R. Clark, P. N. Lobachevsky, J. M. White, C. Clark, D. Sy, M. Spothem-Maurizot and D. K. Kelly, *Cancer Res.*, 2004. **64**: p. 1067-1070.
78. R. J. Hodgkiss, I. Roberts, M. E. Watts and M. Woodcock, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1987. **52**: p. 735-744.
79. D. Murray, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Fourth Edition*, J.I. Kroschwitz and M. Howe-Grant, Editors.
80. R. J. Hodgkiss, I. Roberts, M. E. Watts and M. Woodcock, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1987. **52**: p. 735-744.
81. D. J. Grdina, B. Nagy, C. K. Hill, R. L. Wells and C. Peraino, *Carcinogenesis*, 1985. **6(6)**: p. 929-931.
82. R.C. Fahey, *Pharmacol. Ther.* , 1988. **39**: p. 101-108.

83. D. Murray, in *Radioprotectors: Chemical Biological and Clinical perspective*, E.A. Bump and K. Malaker, Editors. 1996, CRC press, Inc.: Boca Raton, Fla.
84. J. Denekamp, A. Rojas, and G. Stevens, *Pharmacol Ther*, 1988. **39**: p. 59-66.
85. X. Zhang, P.P. Lai, and Y.C. Taylor, *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1992. **24**(4): p. 713-719
86. P. J. Meechan, D. J. Haraf, A. M. Diamond and D. J. Grdina, *Radiation research* 1994. **140**(3): p. 437-40.
87. R. E. Meyn, L. C. Stephens, D. W. Voehringer, M. D. Story, N. Mirkovic and L. Milas, *Radiation research*, 1993. **136**: p. 327-334.
88. W.O. Foye, *Ann. Pharmacother.*, 1992 **26**: p. 1144-1147.
89. B. A. Teicher, J. Stemwedel, T. S. Herman, P. K. Ghoshal and A. Rosowsky, *British journal of cancer*, 1990. **62**(1): p. 17-22.
90. Z. M. Bacq, H. A. Lecomte, P. Fischer and J. Blavier, *Arch. Int. Physiol.* LIX, 1951: p. 442-446.
91. Z. M. Bacq, M. L. Beaumariage, R. Goutier and P. Van Caneghem, *Br. J. Pharmacol.*, 1968. **34**: p. 202-203.
92. J. L. Schwartz, S. M. Giovanazzi, T. Karison, C. Jones and D. Grdina, *J. Radiat. Res.*, 1988. **113**: p. 145-154.
93. J.R. Piper, C.R. Stringfellow, and T.P. Johnston, *J. Med. Chem.* , 1969. **1**(244-253).
94. J. R. Piper, R. Stringfellow, R. D. Elliott and T. P. Johnston, *J. Med. Chem.*, 1969. **12**(236-243).
95. H. Sedlmeier and O. Messerschmidt, *Strahlentherapie*, 1980. **156**(8): p. 572-578.
96. M. M. Kligerman, D. J. Glover, A. T. Turrisi, A. L. Norfleet, J. M. Yuhas, L. R. Coia et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1984. **10**: p. 1773-1776.
97. J.M. Yuhas and J.B. Storer, *J. Nat. Cancer Inst.* , 1969. **42**: p. 331-335.
98. J.M. Yuhas, *Radiat. Res.*, 1970. **44**: p. 621-628.
99. J.M. Yuhas, J.O. Proctor, and L.H. Smith, *Radiat. Res.*, 1973. **54**: p. 222-233.
100. J. R. Rasey, A. M. Spence, C. C. Badger, K. A. Krohn, D. M. Vera and J. C. Livesey., *Pharmacol. Ther.*, 1988. **39**: p. 33-43.
101. B. Célariès, C. Amourette, C. Lion and G. Rima, *Radioprotection*, 2005. **40**: p. 57-71.
102. B. Holmberg and B. Sörbo, *Nature*, 1959. **183**: p. 832.
103. D.L. Klayman and W.F. Gilmore, *J. Org. Chem.*, 1964. **7**: p. 823-824.
104. D.L. Klayman, M.M. Grenan, and D.P. Jacobus, *J. Med. Chem.*, 1969. **12**: p. 510-512.
105. D.L. Klayman, J.D. White, and T.R. Sweeney, *J. Org. Chem.*, 1964. **29**: p. 3737-3738.
106. J. C. Roberts, K. E. Koch, S. R. Detrick, R. L. Wartens and G. Lubec, *Radiat. Res.*, 1995. **143**: p. 203-213.
107. B. Célariès, C. Amourette, C. Lion and G. Rima, *Appl. Organometal. Chem.*, 1999. **13**: p. 1-12.
108. J.F. Weiss and M.R. Landauer, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2009. **85**(7): p. 539-573.
109. J. R. Maisin, G. Mattelin, A. Fridman-Manduzio and J. van der Parren, *Radiat. Res.*, 1968. **35**(26-44).
110. B. Celaries, *Etude et applications de nouveaux dérivés organosiliciés, -germaniés, -phosphorés et -séléniés en radioprotection chimique*. Thèse, 2003, Université de Toulouse: Toulouse.
111. M. Lesbre, J. Satge, and P. Mazerolles, eds. *The organic compounds of germanium*. J. Wiley and Sons. 1973: New York.
112. B. Célariès, C. Amourette, C. Lion and G. Rima, *Appl. Organomet. Chem.*, 2003. **17**: p. 561-569.
113. M.S. Blois, *Nature*, 1958. **181**: p. 1199-1200.

114. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Food Science and Technology*, 1995. **28**: p. 25-30.
115. P. Molyneux, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 2003. **26**: p. 211-219.
116. C. Rice-Evans and N.J. Miller, *Methods Enzymol.*, 1994. **234**: p. 279-293.
117. C. Henriquez, C. Aliaga, and E. Lissi, *Int. J. Chem. Kinetics*, 2002. **34**(12): p. 659-665.
118. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999. **26**(9/10): p. 1231-1237.
119. C. Rice-Evans, N. J. Miller, P. G. Bowell, P. M. Bramley and J. B. Pridham, *Free Radical Res.*, 1995. **22**: p. 375-383.
120. G.J. Marco, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1968. **45**: p. 594-598.
121. M.S. Taga, E.E. Miller, and D.E. Pratt, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984. **61**: p. 928-931.
122. H.E. Miller, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1971. **48**: p. 91.
123. J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan, *Eur. J. Biochem.*, 2000. **267**: p. 5421-5426.
124. C.S. Weilx, *Biometrics*, 1952. **8**(3): p. 249-263.
125. P. Bonet-Maury and F. Patti, *J. Radiol. Electrol. Arch. Electr. Méd.*, 1950. **31**: p. 286.
126. D.J. Finney, *Probit. Analysis*, 1947. Cambridge University Press.
127. M. Gill and W. Steglich, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1987. **51**: p. 1-317.
128. S. Huneck, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 2001. **81**: p. 1-276.
129. P.C. Beaumont, R.L. Edwards, and G.C. Elsworthy, *J. Chem. Soc. C* 1968: p. 2968-2974.
130. W. Steglich, W. Furtner, and A.Z. Porx, *Naturforsch. B: Chem. Sci.*, 1968. **23**: p. 1044-1050.
131. J. Bebert, *Journal de Pharmacie et des Sciences Accessoires*, 1831. **17**: p. 696-700.
132. A. Spiegel, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1883. **219**: p. 1-56.
133. B. Steffan and W. Steglich, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1984. **23**: p. 445-447.
134. M. Winner, A. Gimenez, H. Schmidt, B. Sontag, B. Steffan and W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004. **43**: p. 1883-1886.
135. U. Söderberg, *Acta Physiol. Scand.*, 1953. **27**: p. 97-98.
136. F.R.J. Foden, J. McCormick, and D.M. O'Mant, *J. Med. Chem.*, 1975. **18**: p. 199-203.
137. B.B. Newbould, *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, 1963. **21**: p. 127-136.
138. R.G. Benedict and L.R. Brady, *J. Pharm. Sci.*, 1972. **61**: p. 1820-1822.
139. C. J. G. Duncan, M. Cuendet, F. R. Fronczek, J. M. Pezzuto, R. G. Mehta, M. T. Hamann and S. A. Ross, *J. Nat. Prod.*, 2003. **66**: p. 103-107.
140. S. A. Van der Sar, J. W. Blunt, A. L. J. Cole, L. B. Din and M. H. G. Munro, *J. Nat. Prod.*, 2005. **68**: p. 1799-1801.
141. D. Dias, J.M. White, and S. Urban, *Nat. Prod. Res.*, 2007. **21**: p. 366-376.
142. L. J. Rashan, M. T. Ayoub, L. Al-Omar and R. W. Al-Khayatt, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1990. **6**: p. 155-158.
143. A. Kasuga, Y. Aoyagi, and T. Sugahara, *J. Food Sci.*, 1995. **60**: p. 1113-1115.
144. S. Meunier, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin, J.-P. Renault et al., *ChemBioChem*, 2004. **5**: p. 832-840.
145. S. Meunier, M. Hanédanian, M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, S. Pin et al., *ChemBioChem*, 2005. **6**: p. 1234-1241.
146. G. Read, L.C. Vining, and H. Haskins, *Can. J. Chem.*, 1962. **40**: p. 2357-2361.
147. K. Mosbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964. **17**: p. 363-367.
148. K. Mosbach, *Acta Chem. Scand.*, 1967. **21**: p. 2331-2334.
149. W.S.G. Maass and A.C. Neish, *Can. J. Bot.*, 1967. **45**: p. 59-72.
150. K. Mosbach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1969. **8**: p. 240-250.

151. J. Volhard, Justus Liebigs Ann. Chem. , 1894. **282**: p. 1-21.
152. F. Kögl and H. Becker, Liebigs Ann. Chem. , 1928. **465**: p. 211-242.
153. R.L. Frank, G.R. Clark and J.N. Coker, J. Am. Chem. Soc., 1950. **72**: p. 1824-1826.
154. H.W. Moore and R.J. Wikholm, Tetrahedron Lett., 1968. **9**: p. 5049-5052.
155. R.J. Wikholm and H.W. Moore, J. Am. Chem. Soc., 1972. **94**: p. 6152-6158.
156. H.J. Lohrisch, H. Schmidt and W. Steglich, Justus Liebigs Ann. Chem., 1986: p. 195-204.
157. G. Pattenden, N.A. Pegg, and R.W. Kenyon, Tetrahedron Lett. , 1987. **28**: p. 4749-4752.
158. G. Pattenden and N.A. Pegg, J. Chem. Soc., , 1991. Perkin Trans. **1**: p. 2363-2372.
159. H. Besl, A. Bresinsky, C. Kilpert, W. Marschner, H. M. Schmidt and W. Z. Steglich, Naturforsch., 2008. **63(b)**: p. 887-893.
160. M. Asano and Y. Kameda, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1934: p. 1522-1526.
161. O.P. Mittal and T.R. Seshadri, J. Chem. Soc. C, 1956: p. 1734-1735.
162. B. Åkermark, Acta Chem. Scand., 1961. **15**: p. 1695-1700.
163. D. Habrant, *Synthèse et caractérisation de nouveaux antioxydants, dérivés mono-aromatiques d'acides pulviniques, pour des applications en dermo-cosmétique*, Thèse, 2008, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
164. D. Habrant, A. Le Roux, S. Poigny, S. Meunier, A. Wagner and C. Mioskowski, J. Org. Chem., 2008. **73**: p. 9490-9493.
165. Rao, Y.S., Chem. Rev. , 1976. **76**: p. 625-694.
166. A.L. Zografos, Georgiadis D. Synthesis, 2006: p. 3157-3188.
167. G. Pattenden, Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 1978. **35**: p. 133-198.
168. R. Brückner, Curr. Org. Chem. , 2001. **5**: p. 679-718.
169. D.W. Knight and G. Pattenden, J. Chem. Soc. C 1979. Perkin Trans. **1**: p. 62-69.
170. D.R. Gedge, G. Pattenden, and A.G. Smith, J. Chem. Soc. C, 1986. Perkin Trans. **1**: p. 2127-2131.
171. G. Pattenden, N. Pegg, and A.G. Smith, Tetrahedron Lett., 1986(27): p. 403-406.
172. G. Pattenden, M.W. Turvill, and A.P. Chorlton, J. Chem. Soc. C, 1991. Perkin Trans. **1**: p. 2357-2361.
173. J. Weinstock, J. E. Blank, H.-J. Oh and B. M. Sutton, J. Org. Chem. , 1979. **44**: p. 673-676.
174. P. Langer and M. Stoll, Angew. Chem. Int. Ed., 1999(38): p. 1803-1805.
175. M. Desage-El Murr, S. Nowaczyk, T. Le Gall, C. Mioskowski, B. Amekraz and C. Moulin, Angew. Chem. Int. Ed., 2003. **42**: p. 1289-1293.
176. R. Ramage, G.J. Griffiths, and J.N.A. Sweeney, J. Chem. Soc. C, 1984. Perkin Trans. **1**: p. 1547-1553.
177. B. Heurtaux, C. Lion, T. Le Gall and C. Mioskowski, J. Org. Chem. , 2005. **70**: p. 1474-1477.
178. A. Mallinger, T. Le Gall, and C. Mioskowski, J. Org. Chem., 2009. **74**: p. 1124-1129.
179. K.C. Nicolaou and T. Montagnon, eds. *Molecules that Changed the World*. 2008, Wiley VCH: Weinheim.
180. H.I. Lee, J. Leon, and I. Raskin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92**: p. 4076-4079.
181. M. C. Wildermuth, J. Dewdney, G. Wu and F. M. Ausubel, Nature, 2001. **414**: p. 562-565.
182. M.J. Ogidigben, T.C. Chu, and D.E. Potter, *Exp. Eye Res.*, 2001. **72**: p. 331-339.
183. B. Szabo, Pharmacol. Therap., 2002. **93**: p. 1-35.
184. P. Bousquet, J. Feldman, and J. Schwartz, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1984. **230(1)**: p. 232-236.

185. M. Anastassiadou, S. Danoun, L. Crane, G. Baziard-Mouysset, M. Payard, D. H. Caignard, M. C. Rettori and P. Renard, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2001. **9**(3): p. 585-592.
186. J. D. Laval, V. Roman, J. Laduranty, I. Miginac, C. Lion, H. Sentenac-Roumanou and M. Fatome, *Eur. J. Med. Chem.*, 1993. **28**: p. 709-713.
187. C. Prouillac, B. Célariès, P. Vicendo and G. Rima, *C. R. Biologies*, 2006. **329**(3): p. 196-199.
188. B. Célariès, C. Prouillac, C. Amourette, C. Lion and G. Rima, *Phosphorus, Sulfur and Related Element*, 2006. **181**(10): p. 2345-2360.
189. J.P. Caravel and C. Luu Duc, *Il Farmaco*, 1981. **26**: p. 47-57.
190. A. Mourret and R. Rinaldi, *Commis. Energ. At. Rapp.*, 1971. **25**.
191. V. A. Anisimova, A. A. Spasov, V. A. Kosolapov, A. F. Kucheryavenko, O. V. Ostrovskii, N. P. Larionov et al., *Pharm. Chem. J.*, 2005. **39**(476-483).
192. L. L. Petrova, L. V. Trufanova, M. L. Petrov, M. A. Abramov, N. I. Zmitrovich and N. A. Terent'eva, *Pharm. Chem. J.*, 1994. **28**: p. 99-102.
193. G. N. Krutovskikh, A. M. Rusanov, G. G. Gornaeva, L. P. Vartanyan and M. B. Kolesova, *Pharm. Chem. J.*, 1977. **11**(4): p. 484-488.
194. L. Morreira and E.J. Barreiro, *Current Medicinal Chemistry*, 2005. **12**: p. 23-49.
195. A. Foroumadi, Z. Kiani, and F. Soltani, *Il farmaco*, 2003. **58**: p. 1073-1076.
196. J. L. Malleron, M. T. Comte, C. Gueremy, J. F. Peyronel, A. Truchon, J. C. Blanchard, A. Doble, O. Piot et al., *J. Med. Chem.*, 1991. **34**(8): p. 2477-2483.
197. M. L. Lopez-Rodriguez, E. Porrás, M. J. Morcillo, B. Benham, L. J. Soto, J. L. Lavandera, J. A. Ramos et al., *J. Med. Chem.*, 2003. **46**(26): p. 5638-5650.
198. M. F. Brana, M. Cacho, M. A. Garcia, B. Pascual-Teresa, A. Ramos, N. Acero, F. Llinares et al., *J. Med. Chem.*, 2002. **45**: p. 5813-5816.
199. M. F. Brana, G. Dominguez, B. Saez, C. Romerdalh, S. Robinson and T. Barlozzari, *Eur. J. Med. Chem.*, 2002. **37**: p. 541-551.
200. M. F. Brana, C. Monica, A. Ramos, M. T. Dominguez, J. M. Pozuelo, C. Abradelo, M. F. Rey-Stolle et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2003. **1**: p. 648-654.
201. D. P. Jindal, V. Bedi, B. Jit, N. Karkra, S. Guleria, R. Bansal, A. Paluszczak and R. W. Hartmann, *Il Farmaco*, 2005. **60**: p. 283-290.
202. H. Yin, Y. Xu, and X. Qian, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2007. **15**: p. 1356-1362.
203. J.R. Piper, L.M. Rose, and T.P. Johnston, *J. Med. Chem.*, 1975. **18**(8): p. 803-812.
204. J.R. Piper, L.M. Rose, and T.P. Johnston, *J. Med. Chem.*, 1979. **22**(6): p. 631-639.
205. J. R. Piper, C. R. Stringfellow, R. D. Elliott and T. P. Johnston, 1971. **14**(4): p. 345-350.
- A. Kamal, O. Srinivas, P. Ramulu, G. Ramesh and P. Praveen Kumar, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2003. **13**: p. 3577-3581.
207. A.N. Cammidge and O. Ozturk, *J. Org. Chem.*, 2002. **67**: p. 7457-7464.
208. SADABS, *Program for data collection*, Bruker-AXS.
209. G.M. Sheldrick, *Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger structures*. *Acta Crystallogr.*, 1990. **A46**: p. 467-473.
210. G.M. Sheldrick, *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*. 1997, University de Göttingen.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

Thèse d'Université, spécialité Chimie-Biologie-Santé

Soutenue le 13 Octobre 2010

Damien CRESSIER

Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et organométalliques contre les effets des rayonnements ionisants.

Ce travail s'inscrit dans un Programme d'Etudes Amont dont le but est la synthèse et l'évaluation de nouveaux composés organiques et organométalliques présentant des propriétés antioxydantes, radioprotectrices et radiosensibilisatrices dans un rapport activité/toxicité convenable. Nous avons ainsi réalisé la synthèse de nouveaux motifs dérivés de l'acide pulvinique, de l'acide salicylique, de la naphtyl-méthyl-imidazoline, du benzothiazole, du thiadiazole et des naphthalimides. Tous ces composés ont été caractérisés par spectroscopie RMN (^1H , ^{13}C , ^{31}P), par spectrométrie de masse, analyse élémentaire et pour certains d'entre eux par diffraction des rayons X. L'activité de la plupart des composés a été évaluée par des tests *in vitro* et *in vivo*, en collaboration avec le CEA de Saclay, l'ULP de Strasbourg et le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de La Tronche. Les résultats expérimentaux ont montré une relation structure/activité antioxydante pour les acides pulviniques. La modification des propriétés biologiques induites par l'introduction d'organométalliques a aussi été étudiée. De plus, parmi ces composés, de nouvelles classes d'antioxydants, de composés radioprotecteurs et de dérivés radiosensibilisateurs ont été définies.

Mots clés : radioprotection chimique, antioxydant, benzothiazole, thiadiazole, acide pulvinique, acide salicylique, naphtyl-méthyl-imidazoline, naphthalimides, silicium, germanium.

Synthesis and evaluation of new organic and organometallic derivatives against ionizing radiation.

This work falls under a research program which aims to synthesize new organic and organometallic compounds having antioxidant activity and/or an interesting radioprotective or radiosensitive activity without toxicity. That is why we carried out the synthesis of new derivatives of pulvinic acid, salicylic acid, naphtyl-methyl-imidazoline, benzothiazole, thiadiazole and naphthalimides. These compounds were characterized by NMR (^1H , ^{13}C , ^{31}P), by mass spectrometry, elementary analyzes and for some of them by X-rays diffraction. The activity of the majority of them was evaluated by *in vitro* and *in vivo* tests in collaboration with the "CEA" (Saclay), the university of Strasbourg (ULP) and the "Centre de Recherche du Service de Santé des Armées" of La Tronche (CRSSA). The experimental results show a structure/activity relationship between pulvinic acid and antioxidant properties. The modifications of biological properties due to organometallic ligands have also been developed. Moreover, new classes of antioxidants, radioprotective and radiosensitive agents have been defined.

Key words : chemical radioprotection, antioxydant, benzothiazole, thiadiazole, pulvinic acid, salicylic acid, naphtyl-methyl-imidazoline, naphthalimides, silicium, germanium.

Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée, UMR 5069-CNRS/UPS, Université Paul Sabatier, Toulouse III, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, Cedex 09, France