

## **THESE**

présentée pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN CHIMIE**

spécialité : **CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE**

par

Jean-Luc GRENIER

### **ELABORATION DE NOUVEAUX ANTIOXYDANTS POTENTIELS INFLUENCE DE LA FONCTION NITRO SUR LES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DE DERIVES POLYPHENOLIQUES**

Soutenue le 20 Juin 1995 devant la commission d'examen

Président : Professeur J-P CATTEAU  
Rapporteurs : Professeur R. MILCENT  
Docteur Z. ABEDINZADEH  
Examineurs : Professeur A. LABLACHE-COMBIER  
Professeur C. CHACHATY  
Professeur P. COTELLE



(...)

Pour savoir la chimie, ils se procurèrent le cours de Regnault et apprirent d'abord que " les corps simples sont peut-être composés ".

On les distingue en métalloïdes et en métaux, différence qui n'a " rien d' absolu ", dit l'auteur. De même, pour les acides et les bases, " un corps pouvant se comporter à la manière des acides ou des bases, suivant les circonstances ".

La notation leur parut baroque. Les proportions multiples troublèrent Pécuchet.

- Puisqu'une molécule de A, je suppose, se combine avec plusieurs parties de B, il me semble que cette molécule doit se diviser en autant de partie ; mais si elle se divise, elle cesse d'être l'unité, la molécule primordiale. Enfin, je ne comprends pas.

Et ils recoururent à un ouvrage moins difficile, celui de Girardin, où ils acquirent la certitude que dix litres d'air pèsent cent grammes, qu'il n'entre pas de plomb dans les crayons, que le diamant n'est que du carbone.

Ce qui les ébahit par-dessus tout, c'est que la terre, comme élément, n'existe pas.

Ils saisirent la manoeuvre du chalumeau, l'or, l'argent, la lessive du linge, l'étamage des casseroles ; puis, sans le moindre scrupule, Bouvard et Pécuchet se lancèrent dans la chimie organique.

Quelle merveille que de retrouver chez les êtres vivants les mêmes substances qui composent les minéraux ! Néanmoins, ils éprouvaient une sorte d'humiliation à l'idée que leur individu contenait du phosphore comme les allumettes, de l'albumine comme les blancs d'oeufs, du gaz hydrogène comme les réverbères.

Après les couleurs et les corps gras, ce fut le tour de la fermentation .

Elle les conduisit aux acides, et la loi des équivalents les embarrassa encore une fois. Ils tâchèrent de l'élucider avec la théorie des atomes ; ce qui acheva de les perdre.

Pour entendre tout cela, selon Bouvard, il aurait fallu des instruments.

La dépense était considérable et ils en avaient déjà trop fait.

Mais le docteur Vaucorbeil pouvait, sans doute, les éclairer.

Ils se présentèrent au moment de ses consultations.

- Messieurs, je vous écoute! quel est votre mal ?

Pécuchet répliqua qu'ils n'étaient pas malades, et ayant exposé le but de leur visite :

- Nous désirons connaître premièrement l'atomicité supérieure.

Le médecin rougit beaucoup, puis les blâma de vouloir apprendre la chimie.

- Je ne nie pas son importance, soyez-en sûrs ! mais actuellement, on la fourre partout! Elle exerce sur la médecine une action déplorable.

(...)

Bouvard et Pécuchet, chapitre III

Gustave FLAUBERT

*A Sophie, ma femme,*

*qui a tué la fatigue et la déprime en me serrant dans ses bras  
qui a traqué de ses yeux la faute grave sur ce "tapuscrit"  
qui va certainement étourdir sa vie en ma présence*

*Tout pour toi*

*Aux Disciples de Bacchus, mes "Ami(e)s de 10 ans " avec qui la vie a plus le goût d'une  
Daube de Boeuf arrosée d'un Graves 1985 que celui d'un cheeseburger noyé de coca-cola*

*Tout mon amour*

*Aux deux Vagabondes des Limbes qui veillent sur moi seconde après seconde, pas après  
pas*

*Toute ma nouvelle vie*

*A Louis-Ferdinand Céline, John Coltrane et Jackson Pollock , pour les feux d'artifice de  
l'âme*

*Toutes mes émotions*

## *REMERCIEMENTS*

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique Physique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, dirigé par Monsieur le Professeur Alain LABLACHE-COMBIER, directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Lille. Je le remercie de m'avoir fait confiance et le prie de trouver en ce mémoire un témoignage de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. C'est un honneur pour moi de le savoir président de ce jury.

Monsieur Jean-Pierre CATTEAU, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Lille, m'a confié le sujet de ce travail. Je tiens vivement à le remercier pour m'avoir reçu dans son équipe. Son oreille attentive a su, dès le lundi matin, se soumettre à mes questions pressantes et ses réponses sont désormais parties intégrantes de ce mémoire. J'espère ne pas les avoir dévaluées et m' être montré digne de la confiance qu'il a bien voulu m'accorder au cours de ces deux années.

Madame Zohreh ABEDINZADEH, Maître de conférences à l'Université René Descartes (PARIS),

Monsieur René MILCENT, Professeur à l'Université Paris VII,

Monsieur Claude CHACHATY du Centre d'Etudes Nucléaires de SACLAY

ont bien voulu juger ce travail. Qu'ils trouvent en ces quelques mots le témoignage de ma sincère gratitude.

Un grand merci revient de droit à MM. les Professeurs Philippe COTELLE et Jean-Luc BERNIER . Ils m'ont prodigué des conseils indispensables pour la bonne marche de mes premières années de recherche scientifique.

Je garderai en mémoire les "p'tits jeunes" qui transitèrent dans ce laboratoire, des sourires et de la persévérance de ces allemands, roumains et français qui furent mes compagnons de route, les acteurs et témoins des succès et échecs...

Et Marc "RMN-ATOR", Annie, Alain, Pierre, Axel, Azélio, Sylvie, Irinel "Laet", "Titine", Eric, Patrice, Stéphane... Je ne vous oublie pas.

# *Table des matières*

## **Introduction : l'oxygène**

<b>I- <u>Les sources d'oxygène</u></b>	
<b>I-1. La genèse primitive de l'oxygène</b>	1
<b>I-2. La photosynthèse</b>	2
<b>II- <u>De la genèse à l'activité de l'oxygène : propriétés fondamentales</u></b>	
<b>II-1. Généralités</b>	5
<b>II-2. Réactivité des espèces activées de l'oxygène (EAO)</b>	
II-2-1. L'oxygène singulet	6
II-2-2. L'anion superoxyde	8
II-2-3. Le radical hydroxyle	9
II-2-4. Les radicaux peroxydes, alkoxydes et phénoxydes	10
<b>III- <u>L'oxygène, bienfaiteur de l'organisme</u></b>	
<b>III-1. Généralités</b>	11
<b>III-2. Le transport de l'oxygène et la respiration</b>	12
<b>III-3. La défense de l'organisme contre l'agression bactérienne</b>	15
<b>IV- <u>L'oxygène destructeur de l'organisme</u></b>	16
<b>IV-1. Les dégâts causés aux structures biochimiques</b>	17
IV-1-1. Les acides nucléiques	17
IV-1-2. Les protéines	19
IV-1-3. Les lipides	20
<b>IV-2. Les EAO. Implications dans des pathologies diverses</b>	
IV-2-1. Le syndrome d'ischémie-reperfusion	21
IV-2-2. L'athérosclérose	22
IV-2-3. Le vieillissement	24
IV-2-4. Le cancer	24
IV-2-5. Le sida	24
<b>V- <u>Les moyens de défense de l'organisme contre les EAO</u></b>	
<b>V-1. Les enzymes</b>	
V-1-1. Les superoxydes dismutases (SOD)	26
V-1-2. La catalase	27

V-1-3. Les peroxydases	28
<b>V-2. Les antioxydants non enzymatiques : les piègeurs d'EAO</b>	
V-2-1. Le tocophérol (vitamine E)	29
V-2-2. L'acide ascorbique (vitamine C)	30
V-2-3. L'acide urique	31
V-2-4. Les antioxydants synthétiques	31
Références bibliographiques	34

## **Stratégie de recherche. Choix du modèle d'étude**

<b>VI. <u>Définition et propriétés de l'acide caféique et de ses dérivés</u></b>	39
<b>VII. <u>Réactivité de la fonction nitro envers l'oxygène et les EAO</u></b>	41
<b>VIII. <u>Synthèse : partie théorique</u></b>	
<b>VIII-1. Synthèse des dihydroxynitrobenzènes</b>	
VIII-1-1. Synthèse de la 2-nitrohydroquinone	44
VIII-1-2. Synthèse du 3-nitrocatéchol	44
<b>VIII-2. Synthèse des acides dihydroxy-nitro-cinnamiques</b>	
VIII-2-1. Les acides 3, 4-dihydroxy- 2-, 5- et 6-nitro-cinnamiques ( acides nitrocaféiques)	45
VIII-2-1-1. L'acide 2-nitrocaféique	46
VIII-2-1-2. L'acide 5-nitrocaféique	48
VIII-2-1-3. L'acide 6-nitrocaféique	48
VIII-2-2. Les acides 2, 3-dihydroxy- 4-, 5- et 6-nitro-cinnamiques (acides nitroanthénobiliques)	48
VIII-2-2-1. L'acide 5-nitroanthénobilique	49
VIII-2-2-2. Les acides 4- et 6-nitroanthénobiliques	50
VIII-2-3. Les acides 2, 5-dihydroxy- 3-, 4- et 6-nitro-cinnamiques (acides nitrogrévilliques)	
VIII-2-3-1. L'acide 3-nitrogrévillique	51
VIII-2-3-2. L'acide 4-nitrogrévillique	51
VIII-2-3-3. L'acide 6-nitrogrévillique	52
Références bibliographiques	53

## **Etude physico-chimique**

<b>IX- <u>Détermination des pKa des dérivés nitroaromatiques dihydroxylés en milieu aqueux par spectrophotométrie UV</u></b>	
<b>IX-1. Principe de la méthode</b>	57
<b>IX-2. pKa des nitrodihydroxybenzènes</b>	60
<b>IX-3. pKa des acides caféique et nitrocaféiques</b>	61
<b>IX-4. Conclusion</b>	64
<b>X- <u>Etude voltammétrique. Détermination des potentiels rédox</u></b>	
<b>X-1. Principe de la méthode</b>	65
<b>X-2. Voltammétrie des composés phénoliques et nitroaromatiques</b>	66
<b>X-3. Etude expérimentale</b>	67
X-3-1. Etude des 3- et 4-nitrocatechols	68
X-3-2. Etude de la 2-nitro-hydroquinone	69
X-3-3. Etude des acides nitrocaféiques	73
<b>X-4. Conclusion</b>	76
<b>XI- <u>Etude par résonance paramagnétique électronique (RPE)</u></b>	
<b>XI-1. Notion d'autoxydation. Oxydation des dérivés nitrés diphénoliques en milieu alcalin</b>	77
<b>XI-2. Action du tertiobutoxyde de potassium dans le DMSO</b>	
XI-2-1. Aspect théorique	78
XI-2-2. Approche expérimentale	80
<b>XI-3. Action du borohydrure de sodium dans l'eau</b>	
XI-3-1. Approche expérimentale	84
XI-3-2. Etude des spectres : données structurales	91
<b>XI-4. Conclusion</b>	95
Références bibliographiques	97

## **Propriétés antioxydantes**

<b>XII- <u>Piégeage des radicaux libres</u></b>	
<b>XII-1. Généralités</b>	100
<b>XII-2. Piégeage des radicaux hydroxyles</b>	
XII-2-1. Aspect théorique	103
XII-2-2. Aspect expérimental	104

<b>XII-3. Piégeage des radicaux superoxydes</b>	
XII-3-1. Situation du problème	106
XII-3-2. Inhibition de la xanthine oxydase	106
XII-3-3. Aspect expérimental du piégeage des anions $O_2^{\circ-}$	108
XII-3-4. Conclusion	109

Références bibliographiques	110
-----------------------------	-----

## Synthèse . Partie expérimentale

<b>XIII- <u>Synthèse de la 2-nitro-hydroquinone</u></b>	
<b>XIII-1.</b> Monobenzoyl-hydroquinone	113
<b>XIII-2.</b> 4-benzoyl-2-nitro- hydroquinone	114
<b>XIII-3.</b> 2-nitro-hydroquinone	115
<b>XIV- <u>Synthèse du 3-nitrocatéchol</u></b>	116
<b>XV- <u>Synthèse de l'acide 2-nitrocaféique (E)</u></b>	
<b>XV-1.</b> Acétate de vanilline	117
<b>XV-2.</b> 2-nitrovanilline	118
<b>XV-3.</b> Acide 4-hydroxy-3-méthoxy-2-nitro-cinnamique(E)	119
<b>XV-4.</b> Acide 2-nitrocaféique (E)	120
<b>XVI- <u>Synthèse de l'acide 5-nitrocaféique (E)</u></b>	
<b>XVI-1.</b> 5-nitrovanilline	122
<b>XVI-2.</b> Acide 4-hydroxy-3-méthoxy-5-nitro-cinnamique (E)	123
<b>XVI-3.</b> Acide 5-nitrocaféique (E)	124
<b>XVII- <u>Synthèse de l'acide 6-nitrocaféique (E)</u></b>	125
<b>XVIII- <u>Synthèse de l'acide 2, 3-diméthoxy-5-nitrocinnamique (E)</u></b>	
<b>XVIII-1.</b> 2-hydroxy-3-méthoxy-5-nitrobenzaldéhyde	126
<b>XVIII-2.</b> 2, 3-diméthoxy-5-nitrobenzaldéhyde	127
<b>XVIII-3.</b> Acide 2, 3-diméthoxy-5-nitrocinnamique (E)	128
<b>XIX- <u>Synthèse de l'acide 2, 3-diméthoxy-6-nitrocinnamique (E)</u></b>	
<b>XIX-1.</b> 2-hydroxy-3-méthoxy-6-nitrobenzaldéhyde	129



<b>XIX-2.</b> 2, 3-diméthoxy-6-nitrobenzaldéhyde	130
<b>XIX-3.</b> Acide 2, 3-diméthoxy-6-nitrocinnamique (E)	131
<b>XX-</b> <u>Synthèse de l'acide 2, 5-diméthoxy-3-nitrocinnamique (E)</u>	
<b>XX-1.</b> 2-hydroxy-5-méthoxy-3-nitrobenzaldéhyde	132
<b>XX-2.</b> 2, 5-diméthoxy-3-nitrobenzaldéhyde	133
<b>XX-3.</b> Acide 2, 5-diméthoxy-3-nitrocinnamique (E)	134
<b>XXI-</b> <u>Synthèse de l'acide 2, 5-diméthoxy-4-nitrocinnamique (E)</u>	
<b>XXI-1.</b> 2, 5-diméthoxy-4-nitrobenzaldéhyde	135
<b>XXI-2.</b> Acide 2, 5-diméthoxy-4-nitrocinnamique (E)	136
<b>XXII-</b> <u>Synthèse de l'acide 2, 5-diméthoxy-3-nitrocinnamique (E)</u>	
<b>XXII-1.</b> 2, 5-diméthoxy-6-nitrobenzaldéhyde	137
<b>XXII-2.</b> Acide 2, 5-diméthoxy-6-nitrocinnamique (E)	138
Références bibliographiques	139
<b>Conclusion générale</b>	140

o o o o O O o o o

*Introduction*

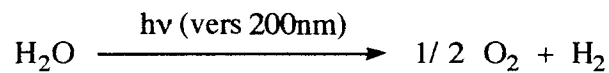
*L'oxygène*

## I- Les sources d'oxygène

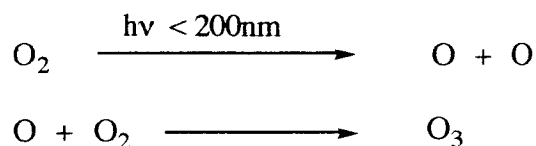
### I-1. La genèse primitive de l'oxygène

L'ascension de l'inerte vers la vie intelligente est une histoire violente dont les accidents constituent les étapes fondamentales. Le Big Bang en est la séquence primitive. Il correspond à la rupture de la symétrie parfaite pour aboutir à l'univers que nous connaissons. C' était il y a environ 15 milliards d'années<sup>1,2</sup>.

L'univers s'étend, mais à une échelle locale, des systèmes solaires se mettent en place. Des planètes se forment et se refroidissent. La Terre, planète encore stérile à sa naissance il y a 4,5 milliards d'années est située à une distance du soleil qui lui permet d'être chauffée sans être brûlée ni glacée. L'atmosphère qui la compose à l'époque (CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O) laisse aisément pénétrer les rayons ultra-violetts de haute énergie. **Les premières traces d'oxygène** peuvent se former<sup>3</sup> :



A son tour, l'oxygène réagit pour former l'ozone :



La teneur de l'atmosphère est encore très pauvre en oxygène, mais la couche d'ozone qui est en train de se former est sans doute primordiale pour l'évolution des macromolécules vers les premières formes de vie. Les algues bleues et les archéobactéries dont on trouve des gisements fossilisés vieux de 3,5 milliards d'années en Afrique du Sud et en Australie mettent en place un processus de biosynthèse primitif qui permet d'augmenter lentement la teneur en oxygène de l'atmosphère. Il y a 1,5 milliards d'années, la concentration atmosphérique en oxygène atteint 1%. Les systèmes se réorganisent pour aboutir lentement à l'apparition des premiers êtres multicellulaires<sup>4,5</sup>.

L'écran d'ozone entraîne une décroissance de l'activité ultra-violette à la surface de la Terre : il y a 500 millions d'années environ, l'évolution d'une vie marine exclusive vers les premières formes de vie "aérienne" est permise. Les systèmes de photosynthèse deviennent de plus en plus performants et l'accroissement de la concentration en oxygène (10% de l'atmosphère) entraîne une modification drastique des processus biochimiques en cours (reconversion des métaux au sein des premiers sites biocatalytiques<sup>6</sup> : les systèmes basés sur la chimie du fer sont peu à peu remplacés par des systèmes fonctionnant au cuivre et au zinc par exemple). Bernal<sup>7</sup> illustre très bien cet "avènement de l'oxygène" (Fig.1) :

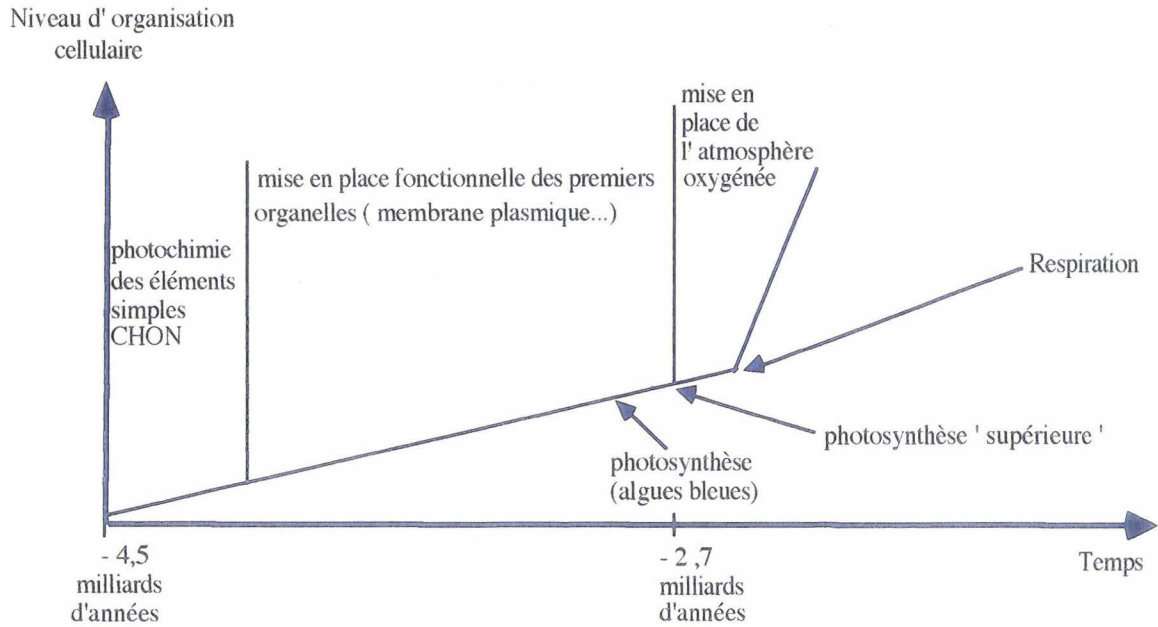


Figure 1 : l'oxygène et la complexification de l'organisation cellulaire

La pente de la courbe s'accroît de façon significative après la mise en place des *processus photosynthétiques*. Ceci indique que l'oxygène peut être considéré comme un maillon évolutif capital.

### I-2. La photosynthèse

La photosynthèse peut être considérée comme la source quasi-exclusive des 22 % d'oxygène que comporte l'atmosphère actuelle. Cependant, chez les plantes, le rôle principal de la photosynthèse est fonctionnel et énergétique : synthèse de dérivés hydrocarbonés et maintien des gradients de protons de part et d'autre des membranes cellulaires. L'oxygène est en fait un " déchet " de ces processus<sup>8,9</sup>.

Le phénomène s'exprime dans les feuilles des plantes, au sein des chloroplastes (Fig. 2)

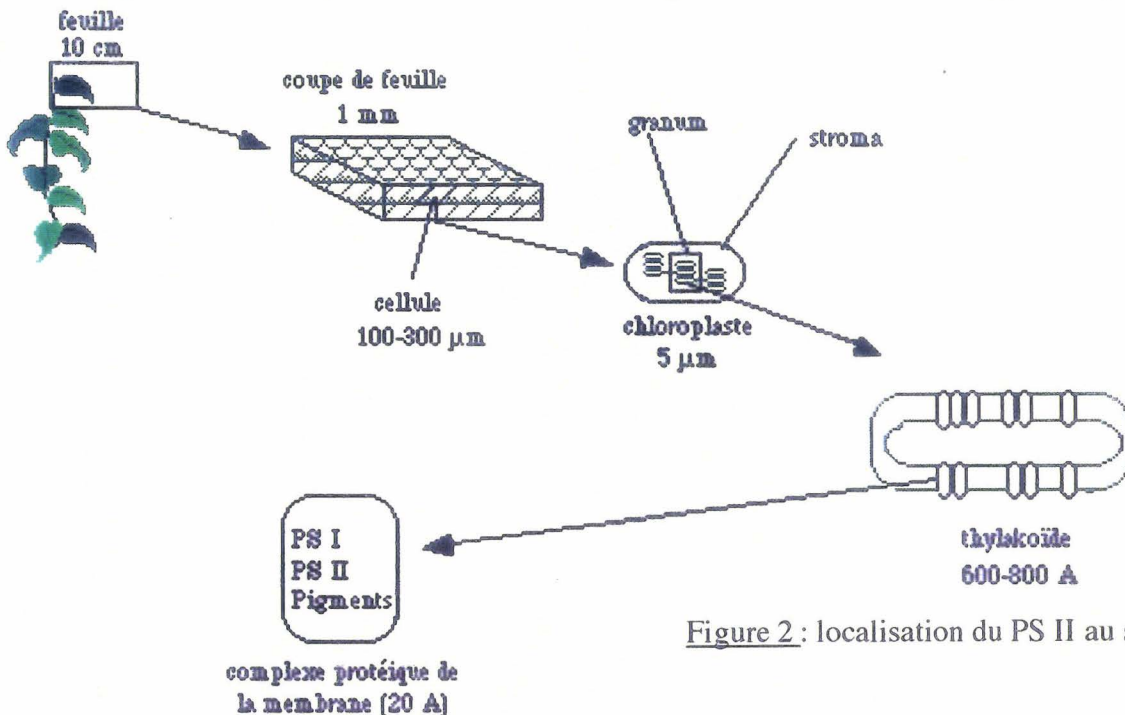
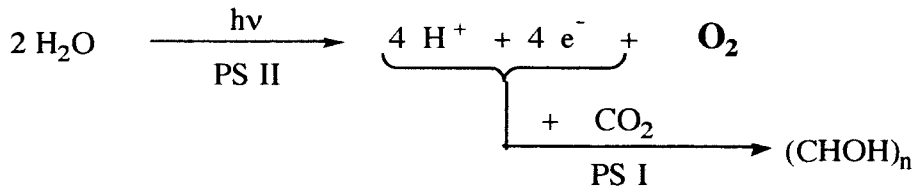


Figure 2 : localisation du PS II au sein de la plante

L'entité photosynthétique est constituée de deux groupes d'objets : les pigments capteurs de l'énergie lumineuse (caroténoïdes, chlorophylles) et le centre réactionnel -qui réunit les photosystèmes I et II (PS I et PS II) - auquel elle est transmise.. PS II est responsable de l'oxydation de l'eau en oxygène, tandis que PS I réduit le dioxyde de carbone :



Les transferts électroniques entre PS I et PS II sont assurés par diverses substances électroactives : plastoquinones, cytochromes et la ferrédoxine. Joliot<sup>10</sup> a démontré, en illuminant des cultures d'algues par des éclairs très brefs, intenses et périodiques, que la libération d'oxygène s'effectue toujours après une série de 4 éclairs . On peut interpréter ce fait en postulant un cycle d'oxydation de l'eau en 5 étapes, chaque étape correspondant à une forme de plus en plus oxydée du PS II. Le retour à l'état réduit correspondrait à la libération d'oxygène.

Des études RPE et EXAFS ont ensuite permis la mise en évidence d'un complexe de manganèse au coeur de ce phénomène<sup>11,12</sup>, ainsi que la caractérisation des états successifs qu'il adopte lors du processus (Fig. 3).

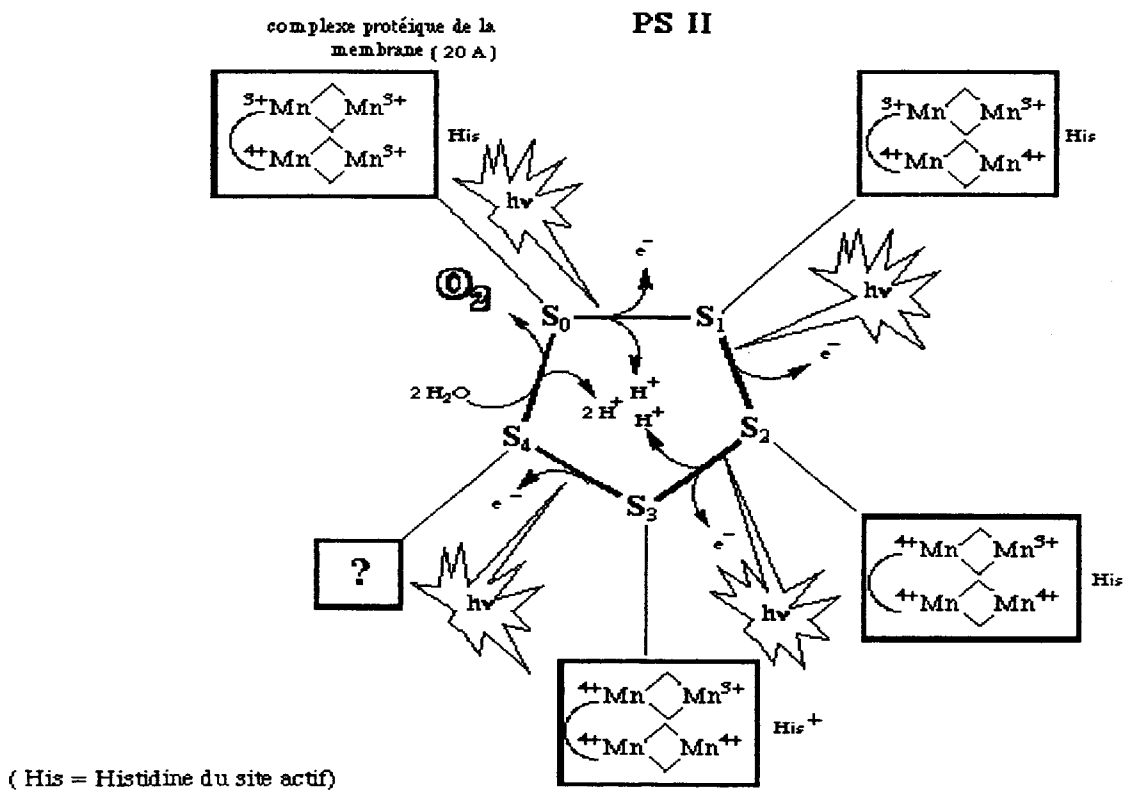
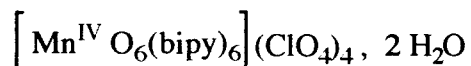


Figure 3 : structure du cluster de PSII au cours de l'oxydation de l'eau

Bien que la structure véritable du complexe soit encore hypothétique, la modélisation chimique permet d'approcher celle-ci de plus en plus finement. Ainsi, les propriétés spectroscopiques des complexes de manganèse du type



sont très semblables à celles du PS II, bien que ses performances physico-chimiques soient négligeables<sup>13</sup>.

De nombreuses questions sont cependant rémanentes : l'influence des polypeptides environnants sur la structure propre du cluster<sup>14</sup> ; le mécanisme intime de l'oxydation de l'eau, qui se fait directement à partir des 4 électrons provenant de l'oxydation du cluster, est encore difficilement corrélé avec l'oxydation pas à pas de celui-ci, etc...

Malgré tout, l'oxygène est enfin présent. Ses *propriétés physico-chimiques* originales vont avoir un rôle primordial dans le cadre de son action au sein des organismes supérieurs...



## II- De la genèse à l'activité de l'oxygène : propriétés fondamentales

### II-1. Généralités

Dans son état fondamental, la molécule de dioxygène, plus commodément nommée oxygène dans la suite de l'exposé, est un composé relativement stable. Cependant, il peut, dans certaines conditions de température et de pression donner des réactions particulièrement exothermiques. Citons le cas classique du mélange détonant  $H_2 / O_2$ . Cette réactivité est due à l'électronégativité importante de l'oxygène ainsi qu'à la relativement faible énergie de liaison qui le caractérise. Il peut ainsi se combiner avec tous les éléments de la classification périodique, exception faite de l'hélium, du néon et de l'argon.

Dans les conditions normales de température et de pression, il est relativement inerte vis-à-vis de la majorité des composés organiques. En effet, sa structure électronique montre l'existence d'un biradical paramagnétique (Fig. 4) . Il ne peut donc pas réagir aisément avec des composés dont tous les électrons sont appariés<sup>15</sup>.

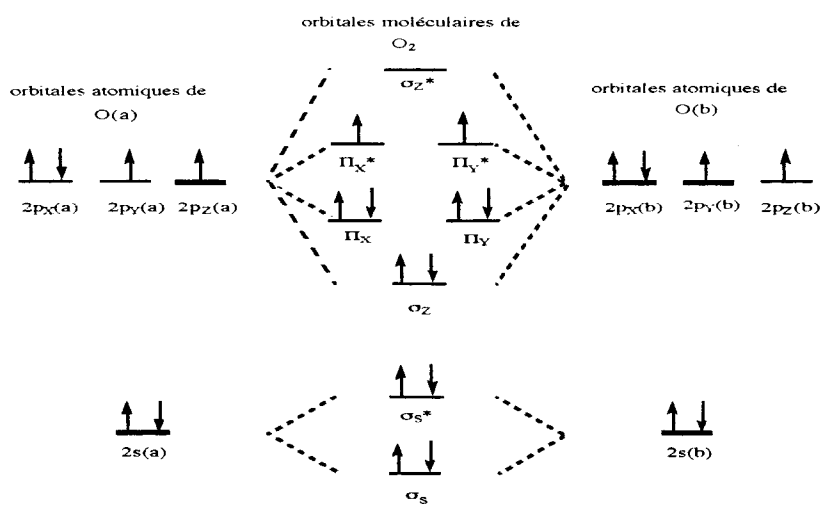
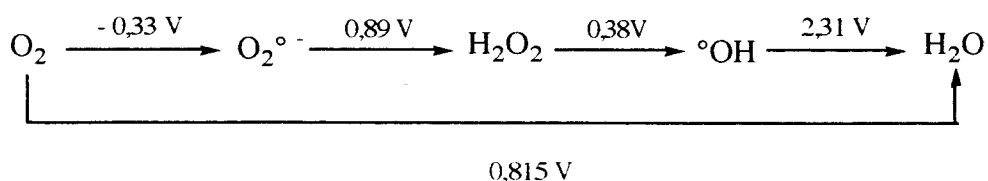


Figure 4 : orbitales moléculaires de  $O_2$

L'oxygène peut néanmoins facilement se combiner avec des structures comportant des électrons célibataires : radicaux libres, métaux de transition. C'est cette réactivité qui est à la base des processus fondamentaux de transport et d'activation de l'oxygène. Ils impliquent des transferts électroniques entre l'oxygène et des substrats divers. Les potentiels rédox correspondant à sa réduction sont les suivants :



La première réduction de l'oxygène nécessite un apport d'énergie. Cette barrière est fondamentale. Elle empêche en effet la destruction oxydative des structures organiques, favorisée thermodynamiquement par le potentiel de la réduction globale de l'oxygène en eau <sup>16a</sup>.

Parallèlement à ces formes activées par réduction, l'oxygène peut aussi être activé par excitation électronique pour donner naissance à l'oxygène singulet. Dans ce cas, l'électron se trouvant dans l'orbitale  $\Pi^*_y$  est déplacé avec changement de spin vers l'orbitale  $\Pi^*_x$ . L'orbitale  $\Pi^*_y$  devient donc vacante. L'état excité n'est plus soumis à l'interdiction de spin et corrélativement l'oxygène singulet est plus réactif que l'oxygène triplet de l'état fondamental.

Les différents modes de production des formes activées de l'oxygène sont résumées dans la figure 5. Elles ont toutes la particularité de présenter une *réactivité importante* vis-à-vis d'un grand nombre de substrats.

## II-2. Réactivité des espèces activées de l'oxygène (EAO)

### II-2-1. L'oxygène singulet

L'oxygène singulet peut réagir suivant différents modes :

- Par transfert énergétique vers la molécule réagissante. C'est le phénomène de quenching ou désactivation. Les acides nucléiques, les acides aminés aromatiques, hétérocycliques y sont très sensibles. Leurs états excités semblent impliqués dans les processus de dégradation des biomolécules, mais les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés <sup>16b</sup>.
- par addition sur des doubles liaisons C=C

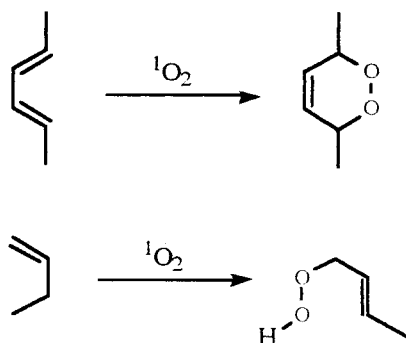
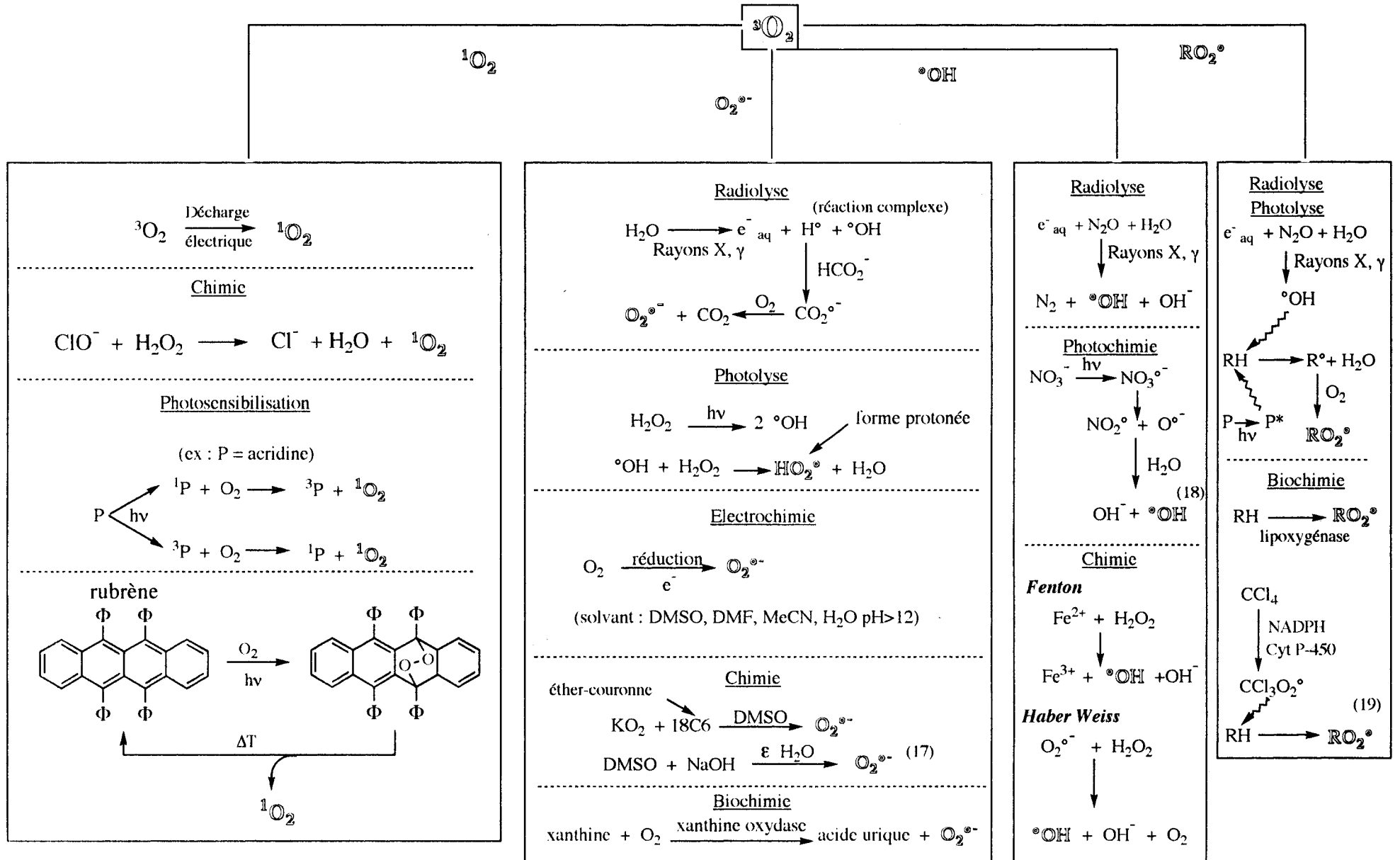




Figure 5 : de l'oxygène "inerte" à ses formes activées. Les modes de production les plus courants

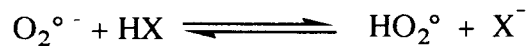


La majorité des informations recueillies dans ce tableau provient de la référence 16, sauf indication

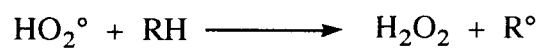
## II-2-2. L'anion superoxyde

### ○ Réactions de déprotonation

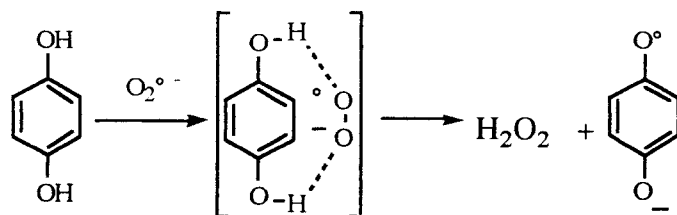
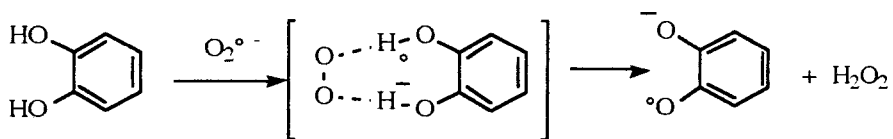
En solution aqueuse, l'anion superoxyde est très peu réactif du fait de sa haute énergie de solvation.



La constante d'acidité de l'équilibre ( $\text{pK}_a = 4,8$ ) lui permet d'être protoné à pH physiologique dans une proportion de 1%. Le radical perhydroxyle ainsi formé est beaucoup plus réactif que l'anion lui-même. En effet, il peut en plus arracher un proton à des substrats à liaisons C-H activées (catéchols, polyènes),



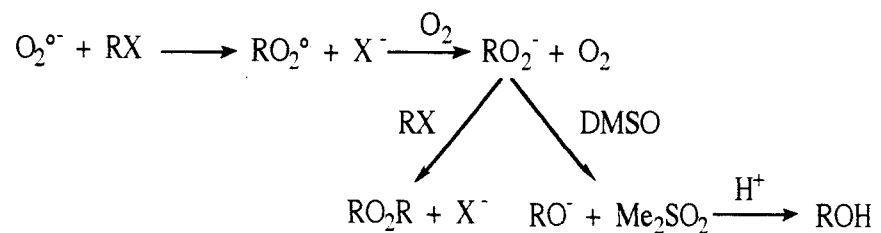
La déprotonation et le transfert électronique permettent d'expliquer l'observation de radicaux lors de la réaction en présence de composés oxydables<sup>20</sup> :



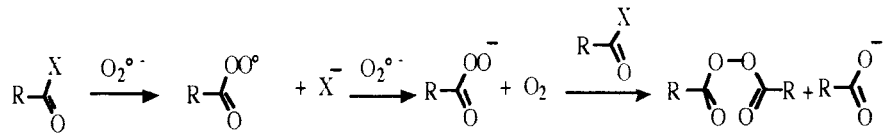
### ○ Réactions nucléophiles

L'anion superoxyde est un excellent nucléophile, ce qui lui confère la propriété de transformer de nombreux composés organiques :

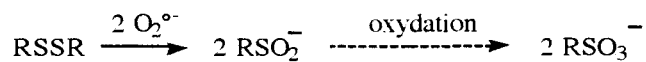
\* les halogénures en peroxydes ou alcools



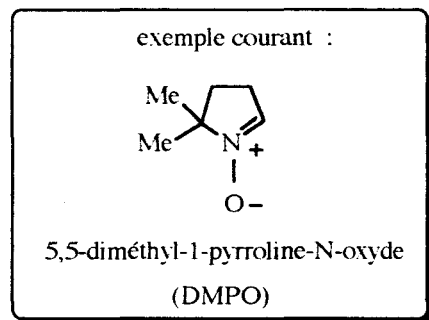
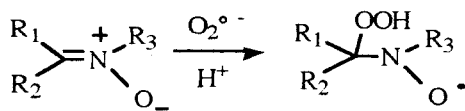
\* les dérivés acylés en peracides



\* les disulfures en acides sulfiniques et sulfoniques



\* les nitrones en composés d'addition nucléophile. Cette réaction est à la base de la technique de piégeage des radicaux libres, indispensable à leur mise en évidence et à leur caractérisation<sup>21</sup>.

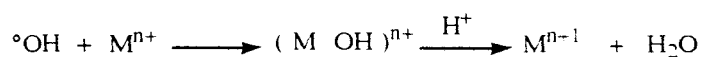


La chimie de l'anion superoxyde est particulièrement foisonnante et ne s'arrête pas à ces exemples. Sa richesse (transfert d'électrons, substitutions et additions nucléophiles, complexation par les métaux...) est très bien mise en évidence dans l'ouvrage d'Afanas'ev<sup>22</sup>, que l'on consultera avec profit.

### II-2-3. Le radical hydroxyle

$^{\circ}\text{OH}$  est un radical particulièrement réactif. Les constantes de vitesses associées aux réactions sont très élevées ( $10^9$ - $10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>23</sup>, ce qui rend son identification directe difficile. Les trois types de réaction sont :

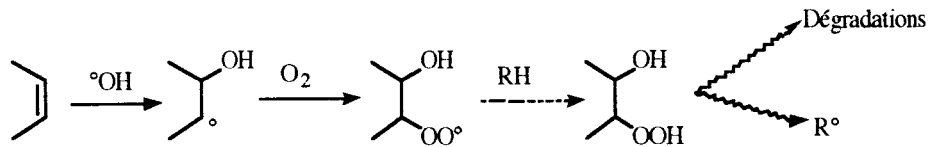
○ Le transfert d'électron



○ L'arrachement d'hydrogène

Toutes les liaisons C-H sont susceptibles de réagir de la sorte, avec formation de radicaux libres.

○ L'addition sur une double liaison



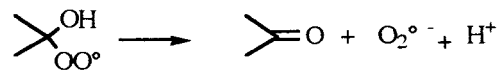
C'est la base de nombreuses réaction de dégradation (sucres des acides nucléiques par exemple)

**II-2-4. Les radicaux peroxydes, alkoxydes et phénoxydes**

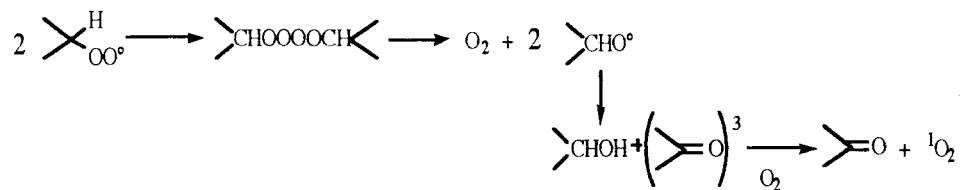
Tous les radicaux carbonés réagissent sur l'oxygène pour donner ce type d'intermédiaires.

Les radicaux peroxydes ( $RO_2^\bullet$ ) subissent deux types de réarrangement :

○ élimination de superoxyde



○ formation de dérivés carbonylés et d'oxygène singulet



Ces réactions sont excessivement importantes car elles mettent en jeu des agents ultimes de la toxicité de l'oxygène.

Les radicaux phénoxydes sont, quant à eux, plus impliqués dans les phénomènes d'antioxydation que d'oxydation. On les rencontrent dans la vitamine E<sup>24</sup>, les flavonoïdes<sup>25</sup>, antioxydants bien connus. Ces études montrent bien que plus le radical phénoxyde est stable, meilleures sont les propriétés antioxydantes, la stabilisation s'effectuant par délocalisation de l'électron dans un nuage  $\Pi$  de grande densité électronique.



La majeure partie de ces réactions se retrouvent au sein de l'organisme vivant et touchent toutes les catégories de macromolécules essentielles à la vie. En condition non pathologique, lorsque les défenses naturelles équilibrent les dégâts causés, les produits oxydés sont éliminés au fur et à mesure de leur formation. Dans ce cas, *l'oxygène construit l'organisme.*

### III- L'oxygène, bienfaiteur de l'organisme

#### III-1. Généralités

Les organismes aérobies sont, par définition, ceux qui fabriquent leur énergie à partir de l'oxygène. C'est là sa face positive. Il serait pourtant faux de penser que la quantité d'oxygène ingurgitée se retrouve à pression équivalente au niveau de son site principal de métabolisme, la mitochondrie. Max<sup>26</sup> explicite ce gradient de pression en le comparant avec la variation de concentration du gaz dans l'atmosphère en fonction de l'altitude au dessus du niveau de la mer (Fig.6)

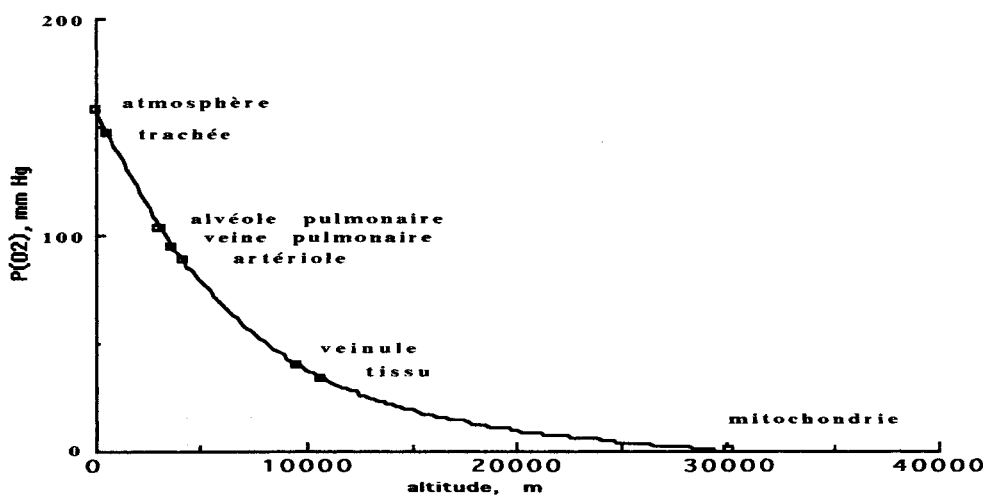


Figure 6 : variation de la pression partielle d'oxygène dans les organes

Même soumise à un environnement "faiblement oxygéné", la mitochondrie subit un stress oxydatif particulièrement important. Ames<sup>27</sup> rappelle qu'une cellule de rat, lors de son métabolisme normal métabolise  $10^{12}$  molécules d'O<sub>2</sub>, dont 98 % subit une réduction totale en eau. Les 2 % restants subissent une réduction incomplète et engendrent  $2 \cdot 10^{10}$  anions superoxydes et la même quantité de peroxyde d'hydrogène ! La mitochondrie assure sa protection par une régénération rapide (remplacement d'une centaine d'entre elles par jour). L'équilibre est fragile et Max conclut : "... life is an ultimately losing attempt to remain reduced in an oxidative world...life on this planet is destined for an oxidative doom. "

Le transport, la diffusion de l'oxygène des poumons vers les mitochondries ainsi que l'activation sont assurés par des métalloprotéines à fer et à cuivre, provenant selon toute vraisemblance des systèmes primitifs destinés à protéger les organismes anaérobies contre ce nouvel élément qu' était l'oxygène<sup>28</sup>.

L' interaction métal-oxygène est primordiale dans le cadre de l'activation de la molécule au sein d'enzymes oxydantes. En effet, l' interaction se fait par l'intermédiaire d'un transfert électronique partiel entre le métal et l'oxygène, dans ce sens. Les électrons viennent se placer dans l'orbitale antiliante vacante ( $\Pi^*$ ). De ce fait, l'ordre de liaison entre les deux atomes d'oxygène diminue en même temps que l'énergie de liaison, alors que la distance interatomique augmente :

	$O_2$	$O_2^{o-}$	$O_2^{2-}$	$2 O^{o-}$
<b>ordre de liaison</b>	2	1,5	1	0
<b><math>\nu O_2</math> (<math>cm^{-1}</math>)</b>	1580	1097	802	$\infty$
<b>d(O-O) , A</b>	1,21	1,33	1,49	$\infty$

La différence entre "transport" et "activation" provient en grande partie des pouvoirs électrodonneurs des ligands entourant le métal, et de la structure du complexe dans les métalloprotéines, qui influent de façon plus ou moins importante sur la solidité des liaisons O-O. La compréhension de ces modulations d'effet électronique en fonction des ligands et de la structure du complexe représente à l'heure actuelle un domaine de recherche très actif dans le but de mettre au point des catalyseurs d'oxydation de plus en plus spécifiques et actifs et de mieux comprendre le rôle des métaux dans le site actif des enzymes<sup>29,30</sup>.

### III-2. Le transport de l'oxygène et la respiration

La connaissance des mécanismes intimes est encore lacunaire, mais en se basant sur le modèle de la coopérativité de Monod, Wyman et Changeux, et aidé par les techniques modernes (biocristallographie, spectroscopie femtoseconde), on peut schématiser le transport sur la figure 7 <sup>31</sup>. L'hémoglobine comporte 4 sous-unités identiques, qui, en première instance, se trouvent dans un état de faible affinité pour l'oxygène. La fixation d'une molécule d' $O_2$  sur l'hème d'une des sous-unités entraîne de loin en loin une modification de la conformation des autres sous-unités en sites à très haute affinité pour  $O_2$  (forme R). Ce phénomène résulte du changement de géométrie de l'hème . Lorsque

l'oxygène arrive à destination, un facteur hétérotrope vient se fixer sur l'hémoglobine et entraîne la libération de l'oxygène, qui diffuse au sein de la cellule cible.

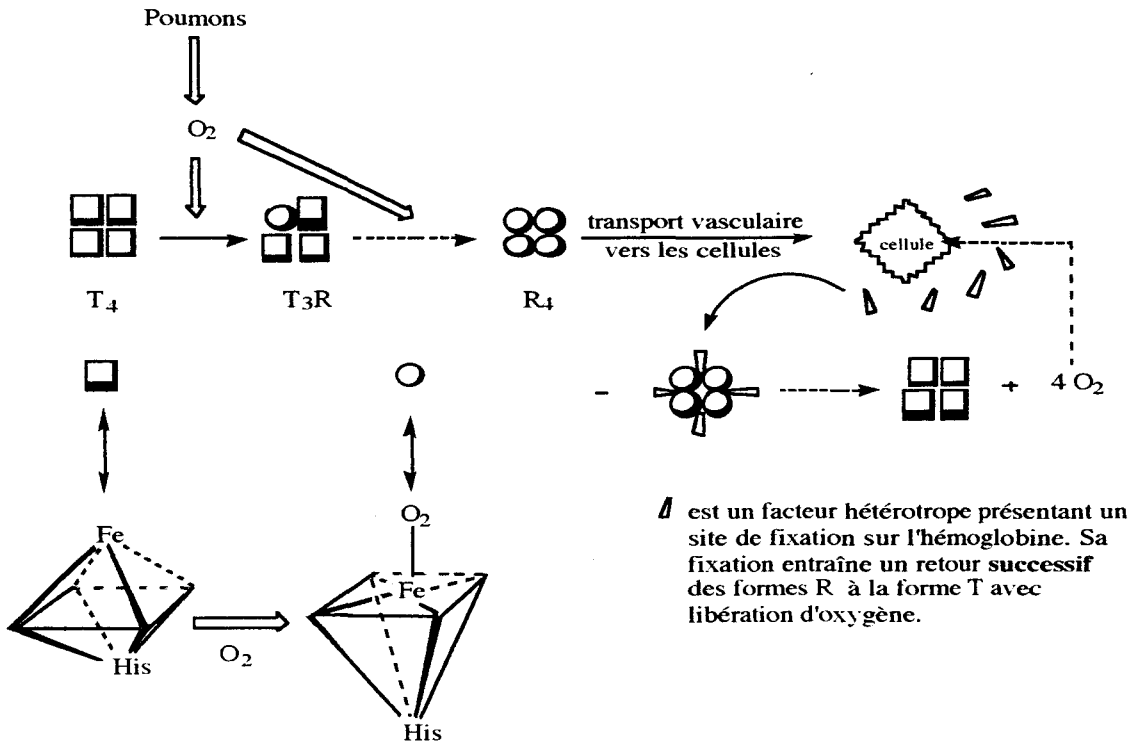


Figure 7: le transport de l'oxygène par l'hémoglobine

Arrivé au niveau de la mitochondrie, l'oxygène est réduit par la chaîne de phosphorylation oxydative. Ce métabolisme est à la base de la production d'énergie stockée sous forme d'ATP<sup>9</sup> (Fig. 8).

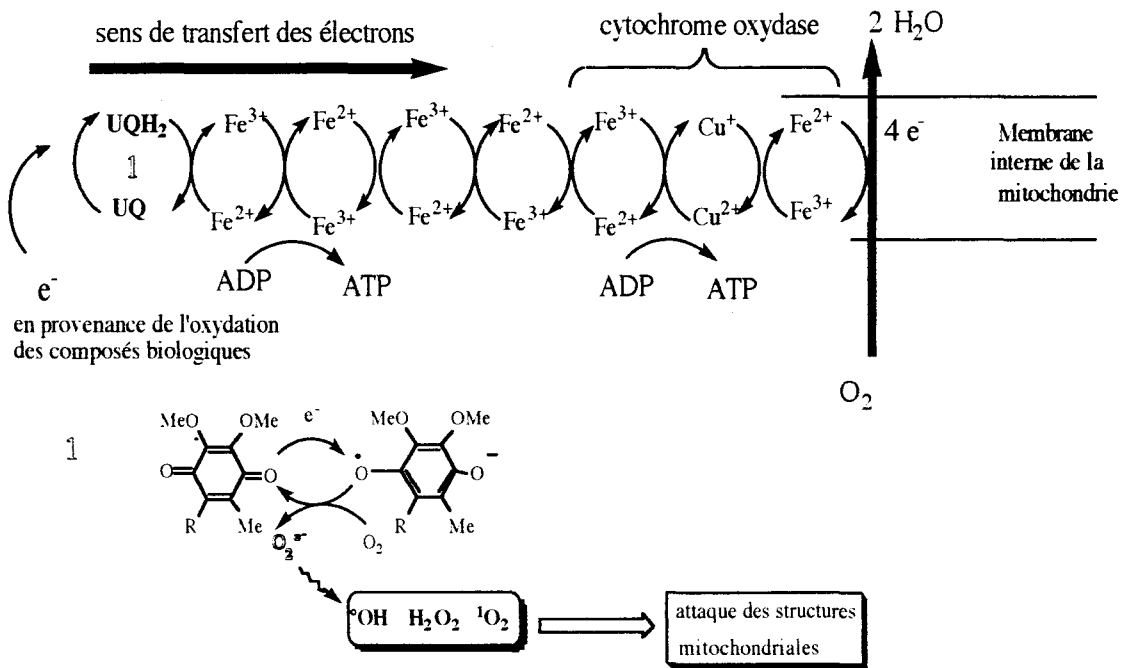
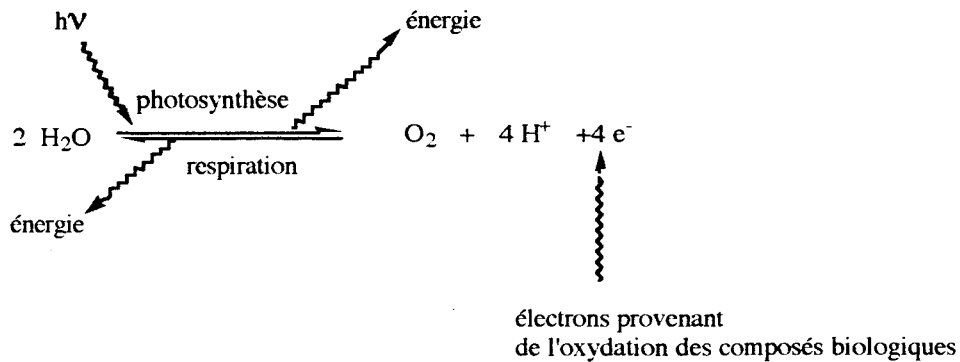


Figure 8 : la production d'énergie mitochondriale par réduction de l'oxygène

Ce phénomène de **respiration** est globalement la contrepartie de la **photosynthèse** :



C'est la réaction 1 Qui est à l'origine des EAO mitochondriales, suite à une réduction incomplète de l'oxygène. Il serait pourtant léger de penser que la production d'EAO correspond uniquement à une "apocalypse" cellulaire. Comme le suggère Williams<sup>32</sup> : "if radicals had been so dangerous, surely during the process of evolution they would had been avoided ; in fact, they had been used by all cells. The risks have always to be measured against the advantages, in evolution , or elsewhere."

La production d'EAO est primordiale dans nombre de processus vitaux.

Déjà chez les plantes, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont de plus en plus reconnus comme des seconds messagers indispensables à la mise en place des défenses anti-infectieuses, de la croissance et du développement du végétal<sup>33</sup>.

Chez la bactérie E. Coli, l'anion superoxyde agit directement sur les protéines contrôlant l'expression d'un gène codant pour la superoxyde dismutase, enzyme de protection contre cette EAO<sup>34</sup>.

Chez l'humain, on a mis en évidence le rôle des EAO, en particulier de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, dans :

- la modulation de la production de second messenger dans la cellule (GMP Cyclique par exemple)<sup>35</sup>
- la modulation de production du monoxyde d'azote NO°, messenger biochimique désormais bien connu<sup>35</sup>
- la modulation de l'expression du facteur de transcription NF-κB, impliqué dans la répllication des V.I.H.<sup>36</sup>
- la synthèse des désoxyribonucléotides
- la synthèse des médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, prostaglandines)<sup>37</sup>

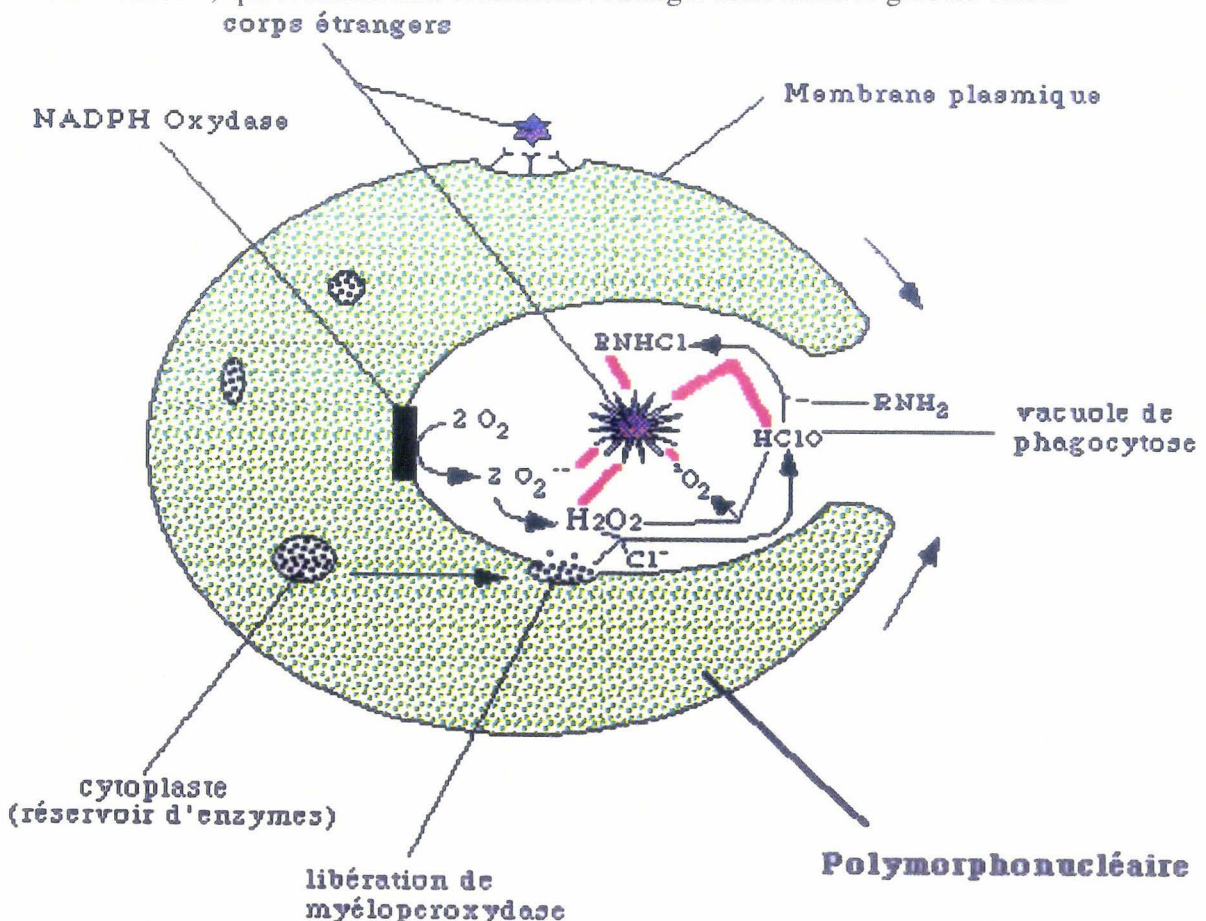
Il est intéressant de s'attarder sur un rôle fondamental des EAO chez l'animal : la défense de l'intégrité de l'organisme contre l'agression bactérienne.



### III-3. La défense de l'organisme contre l'agression bactérienne

Lorsqu'une bactérie attaque l'organisme, les défenses immunitaires font en sorte que l'agresseur est finalement phagocyté par certains globules blancs, les polymorphonucléaires (PMN). Au sein de ces cellules, lors d'une agression, la consommation d'oxygène augmente soudainement : c'est la bouffée respiratoire ("respiratory burst"). L'oxygène est dirigé vers une chaîne de transport d'électrons des PMN, la NADPH Oxydase<sup>38</sup>. L'absence de bouffée respiratoire est à l'origine d'une maladie rare, la granulomatose chronique familiale. Dans cette pathologie, les agresseurs sont correctement phagocytés, mais l'absence d'EAO empêche la lyse de se produire et entraîne l'accumulation de granulômes, à l'origine d'infections pulmonaires et hépatiques très graves.

Dans la membrane, la NADPH Oxydase synthétise  $O_2^{\circ-}$  vers la vacuole, à l'endroit même où le corps étranger a été phagocyté. Un temps de latence existe, jusqu'à la fermeture de la vacuole, empêchant ainsi la libération d'EAO dans l'organisme.  $O_2^{\circ-}$  subit une série de transformations chimiques et enzymatiques en entités particulièrement agressives<sup>39</sup> (Fig. 9). Il en résulte des dégâts considérables (destruction de l'ADN, du collagène, des membranes...) qui touchent non seulement l'étranger mais aussi le globule blanc.



La clé de ce système, la NADPH Oxydase est aussi impliquée dans le fonctionnement des lymphocytes B et T, et son produit semble important dans la régulation de la réponse inflammatoire.

Ce visage positif de l'intervention de l'oxygène et des EAO est souvent occulté par la "face obscure". Celle qui intervient avec les mêmes mécanismes, mais à une échelle beaucoup plus importante...quand les moyens de défense sont dépassés. *Les EAO participent alors à la progression de diverses pathologies plus ou moins graves...*



#### IV- L'oxygène, destructeur de l'organisme

Lors de tout processus pathologique, il existe un déséquilibre entre la concentration en agresseur - ici l'oxygène et les EAO - et les moyens de défense<sup>40</sup>.

Grâce à certains systèmes enzymatiques déjà cités, ainsi qu'à quelques réactions catalysées par des métaux de transition (réaction d'Haber-Weiss ; Fig. 5), les EAO peuvent être présentes en grandes quantités dans l'organisme.

**L'anion superoxyde**, mis en évidence dans un organisme vivant par Mac Cord et Fridovich en 1969<sup>41</sup>, est la clef de voûte de la théorie de la toxicité de l'oxygène encore sujette à polémique<sup>42</sup>. Il est en effet la source de toutes les autres EAO, mais n'entre ou ne sort que difficilement de la cellule du fait de son caractère très polaire. De plus sa réactivité intrinsèque est assez réduite.

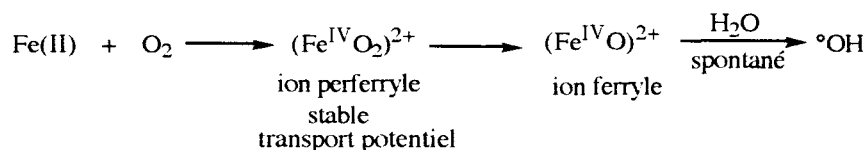
Cependant, il a été démontré que l'anion superoxyde :

- inactive la catalase, la peroxydase et l'hémoglobine par réduction du fer du site actif
- inactive les enzymes sélénées (glutathion peroxydase)
- libère le fer de la ferritine (une de ses protéines de stockage)
- fluidifie de façon importante la membrane des érythrocytes
- détruit les alvéoles pulmonaires
- réagit avec de petites molécules d'importance biologique : bilirubine, épinéphrine,  $\alpha$  tocophérol...

Suzuki<sup>42</sup> a développé un modèle mathématique basé sur des considérations thermodynamiques pour étayer l'hypothèse selon laquelle la réactivité et la toxicité de l'anion superoxyde sont en relation inverse (il nécessite moins de réaction pour être formé, inhibe de nombreuses enzymes...)

**Le radical hydroxyle** est l'EAO radicalaire la plus réactive. Il réagit directement à l'endroit de sa formation et s'attaque à toutes les structures biologiques. Au niveau biologique, °OH se forme par l'intermédiaire de la réaction de Fenton.

Le fer est certainement le métal le plus apte à ce type de réduction. Le potentiel d'oxydoréduction du couple Fe(II) / Fe(III) est tel qu'il peut s'immiscer dans nombre de processus biochimiques déjà cités. Dans le cas des métalloprotéines (de stockage, ou fonctionnelles), le fer est très lié à la structure, ce qui le dévie de la production d'EAO. Cependant un processus pathologique peut entraîner une libération du fer dans l'organisme et ainsi le rendre accessible à l'oxygène<sup>43</sup>. Fontecave<sup>44</sup>, en se basant sur des données thermodynamiques, soumet l'hypothèse que, même le fer(II) complexé (dans l'hémoglobine par exemple) est apte à catalyser la réaction de Fenton. Des travaux de Koppenol<sup>45</sup> montre l'importance du fer(II) pour la réaction et propose même un mécanisme de "transport" potentiel des radicaux hydroxyles :



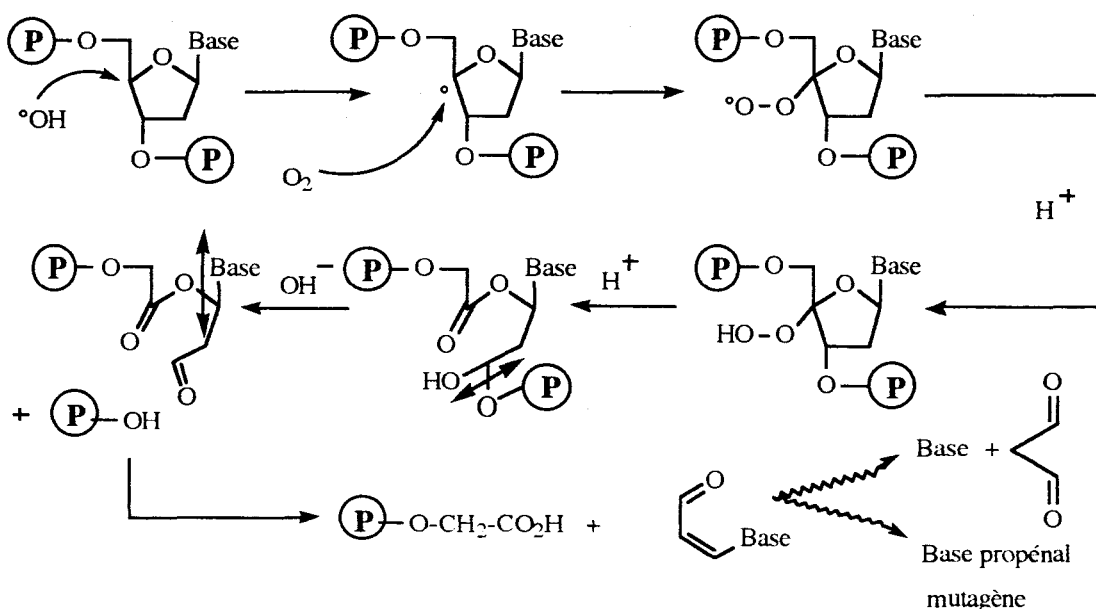
#### IV-1. Les dégâts causés aux structures biochimiques

Toutes les structures biochimiques sont susceptibles d'être endommagées par les EAO.

##### IV-1-1. Les acides nucléiques

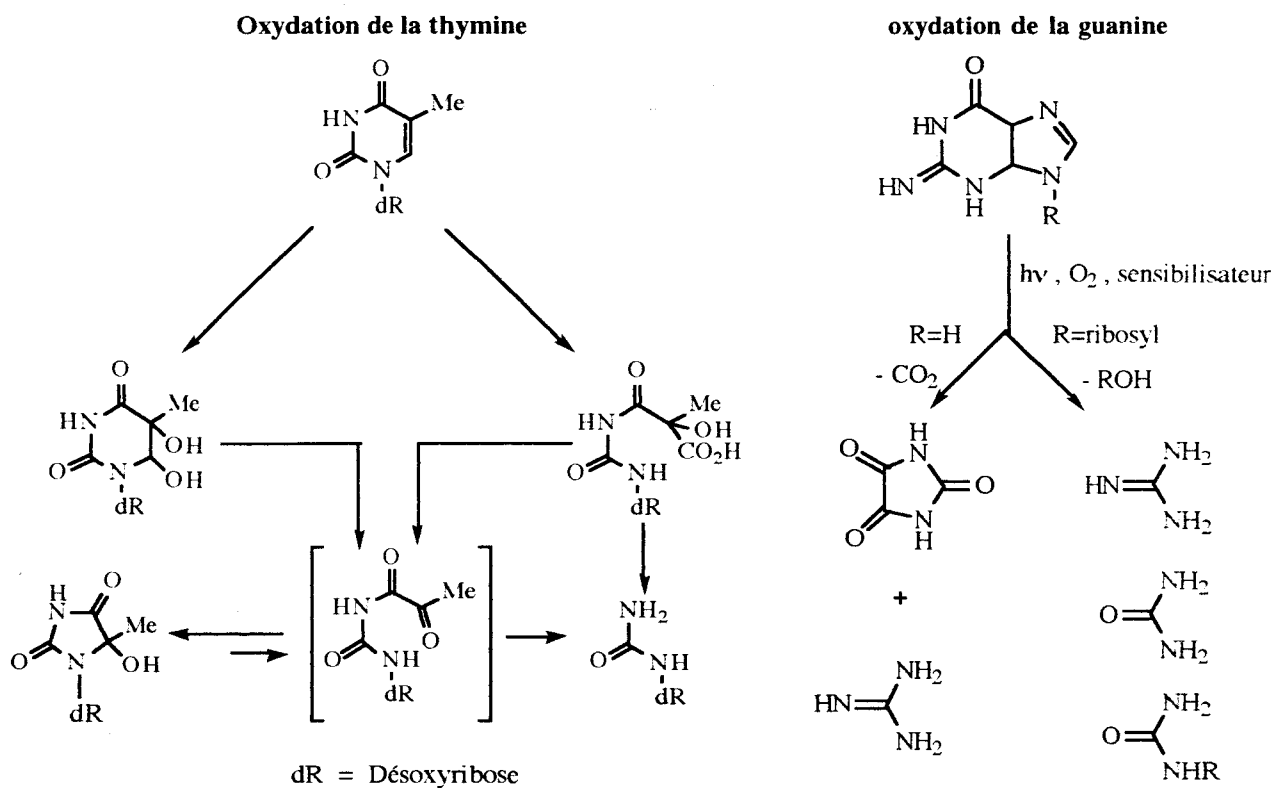
Les acides nucléiques sont très sensibles à l'attaque des EAO, puisque chaque élément peut être touché :

##### le squelette osidique :



Cette dégradation est à la base de coupures importantes au sein de la double hélice. De plus, les bases-propenal formées se sont avérées particulièrement cytotoxiques<sup>46</sup>. Il a été récemment montré que la détoxification de celles-ci est efficacement effectuée *in vitro* par l'intermédiaire des glutathion transférases humaines<sup>47</sup>. Les systèmes de réparation enzymatique sont suffisamment efficaces pour contrer et réparer les dégâts. Lorsqu'ils sont saturés, le phénomène se manifeste à une échelle plus importante par des aberrations ou des ruptures chromosomiques. On peut observer alors des maladies particulièrement graves, comme le syndrome de Bloom, sorte de nanisme monstrueux.

les bases :



Dans ce cas aussi, les systèmes de réparation sont très efficaces, puisqu'on estime que chaque cellule de mammifère perd et tente de remplacer correctement de 5000 à 10000 bases puriques et 200 à 500 pyrimidiques toutes les 20 heures<sup>48</sup>.

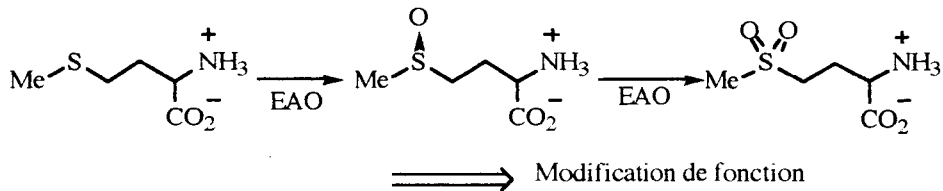
Les EAO semblent aussi agir sur la méthylation des cytosines de l'ADN en inhibant la réaction. Il en résulte une variation très importante de la régulation de l'expression des gènes, avec implication éventuelle dans certains cancers<sup>49</sup>.

#### IV-1-2. Les protéines

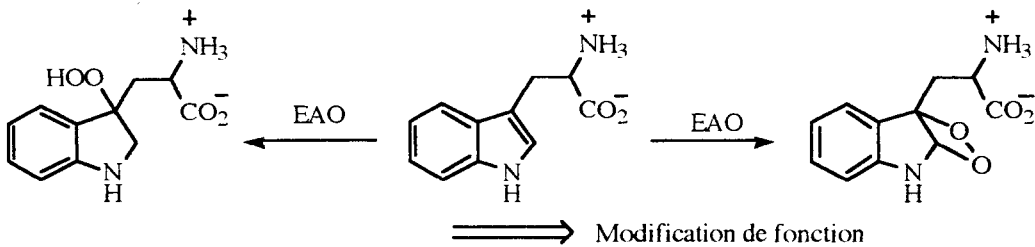
Les protéines sont elles aussi sensibles aux EAO. Les dégâts peuvent aussi bien toucher la structure primaire (enchaînement des acides aminés) que la structure tridimensionnelle de la protéine, en la réticulant ou en coupant les chaînes peptidiques.

La dégradation de la méthionine, du tryptophane et de l'histidine entraîne des dysfonctionnements au niveau des sites enzymatiques :

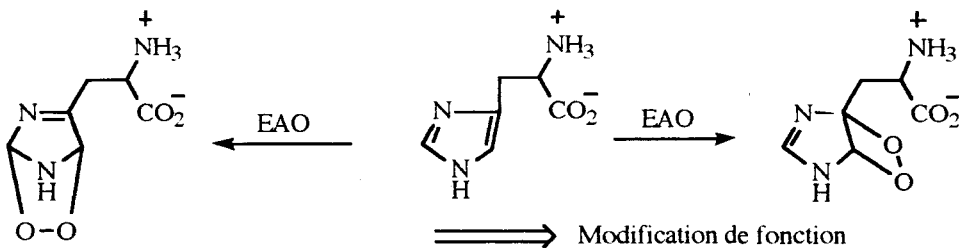
##### Oxydation de la méthionine



##### Oxydation du tryptophane

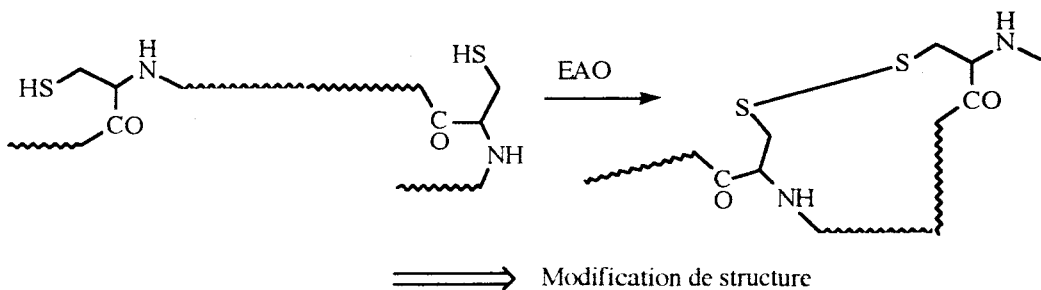


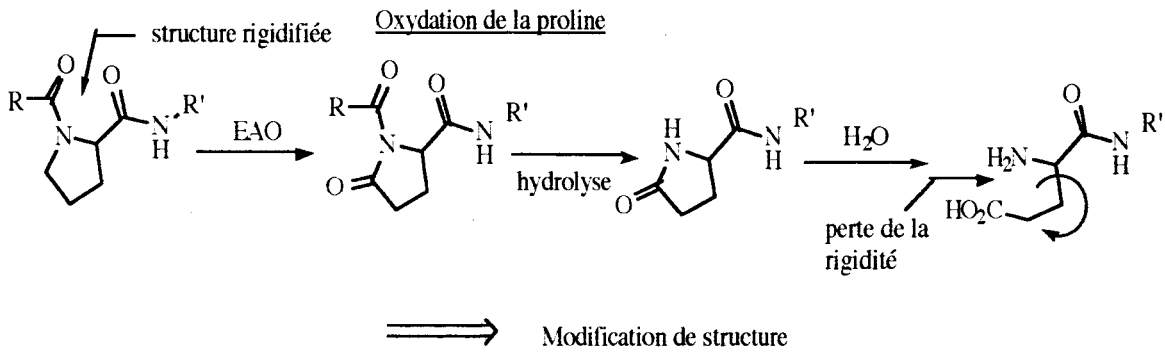
##### Oxydation de l'histidine



L'oxydation de la cystéine et de la proline désagrège les protéines structurales (collagène, kératine) en agissant sur leur structure secondaire.

##### Oxydation de la cystéine



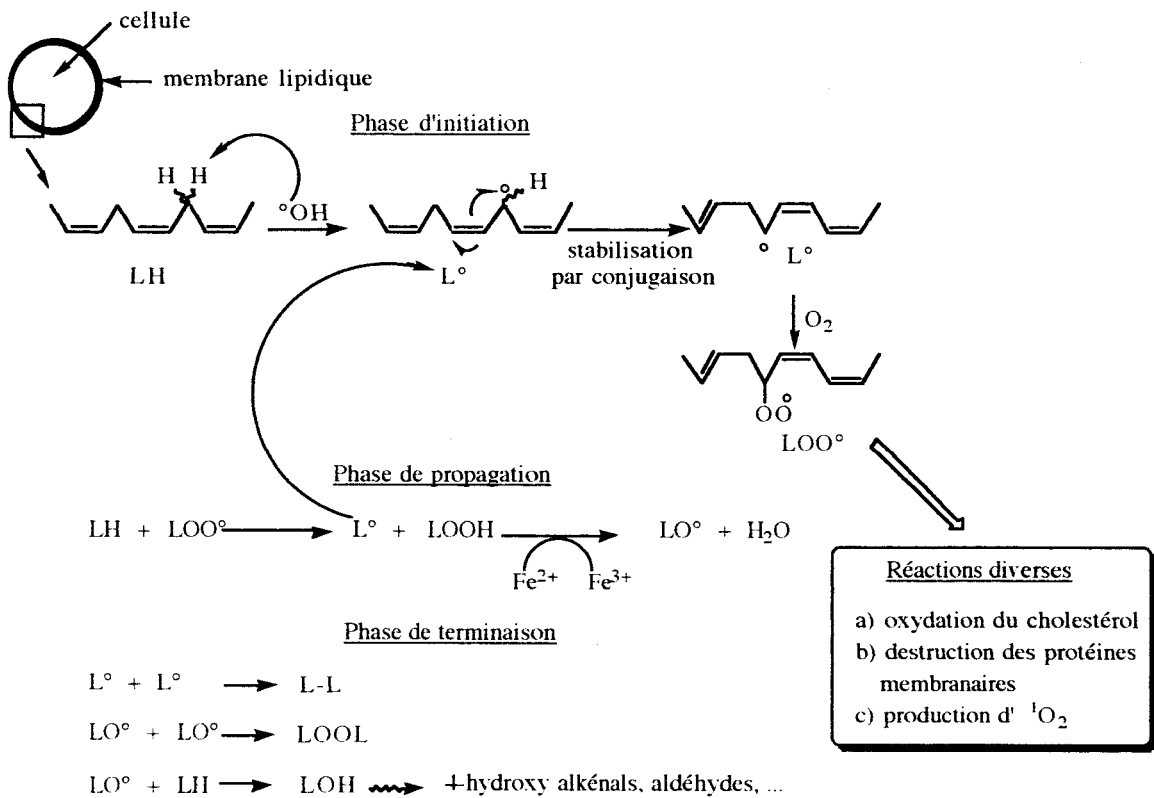


L'étude de l'oxydation métabolique des protéines par les EAO est l'objet d'un regain d'intérêt depuis que l'on s'est rendu compte de l'excellente corrélation qui existe entre le taux de protéines oxydées dans l'organisme et l'âge de celui-ci<sup>50, 51</sup>. Des résultats intéressants pourraient en être tirés pour une meilleure compréhension du vieillissement.

#### IV-1-3. Les lipides

Les lipides sont eux aussi très touchés par les EAO<sup>46, 52</sup>. Les dégâts qui leur sont occasionnés sont de loin les plus spectaculaires car visibles (formation de vésicules sur les membranes cellulaires, déformations impressionnantes, dues en partie à l'oxydation du cholestérol, molécule-clé du maintien de la fluidité membranaire).

L'attaque par les EAO se fait par le processus général suivant :



Les produits provenant de ces attaques ( les hydroxy-alkénals, le malondialdéhyde) sont impliqués dans le processus d'athérogenèse et sont particulièrement mutagènes.

Donc, lorsque **l'équilibre entre formation d'EAO et moyen de défense est rompu, l'organisme réagit en développant diverses pathologies.** Savoir si les EAO sont causes ou "seulement" amplificateurs de ces phénomènes est encore à la base de polémiques.

#### **IV-2. Les EAO. Implications dans des pathologies diverses**

Le déséquilibre entre l'apport, la synthèse d'antioxydants et la production d'EAO entraîne l'organisme dans un état de **Stress oxydatif** . Celui-ci peut souvent être visualisé sous une "forme clinique" particulière. Les EAO semblent par exemple impliquées dans les emphysèmes pulmonaires, la néphrotoxicité des métaux lourds, les lésions hépatiques causées par des xénobiotiques, la porphyrie, la cataracte, la goutte, la polyarthrite rhumatoïde, ...

Il est intéressant de développer le rôle des EAO dans des pathologies intimement liées à la civilisation moderne : **le syndrome d'ischémie-reperfusion** (impliqué dans l'infarctus du myocarde), **l'athérosclérose, le vieillissement, le cancer et le sida** .

##### **IV-2-1. Le syndrome d'ischémie-reperfusion**

Lors d'un infarctus ou d'une transplantation, la circulation sanguine n'irrigue plus l'organetouché : il n'est plus alimenté en oxygène.C'est l'ischémie.

Il est nécessaire, pour éviter la mort cellulaire de réirriguer celui-ci (par l'intermédiaire d'un thrombolytique dans le cas de l'infarctus). Cependant, on sait maintenant que cet apport brutal en oxygène est responsable d'une grande partie des lésions causées : c'est le "paradoxe de l'oxygène". Les différentes oxydases présentes dans les organes sont responsables de la surproduction d'EAO , Dans le cas du coeur, la xanthine oxydase est pressentie comme la principale source <sup>53</sup> (Fig. 10).

Lors de la phase ischémique, l'ATP est dégradé en hypoxanthine tandis que la xanthine déshydrogénase est activée en xanthine oxydase, par l'intermédiaire de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et d'une protéase, la calpaïne.

Lors de la phase de reperfusion, tous les substrats sont présents : hypoxanthine, oxygène en grande quantité. L'hypoxanthine est oxydée en acide urique par la xanthine oxydase, le "déchet" de réaction étant l'anion superoxyde. La brusque augmentation de sa concentration dépasse les systèmes de défense. Les lésions sont mises en place.

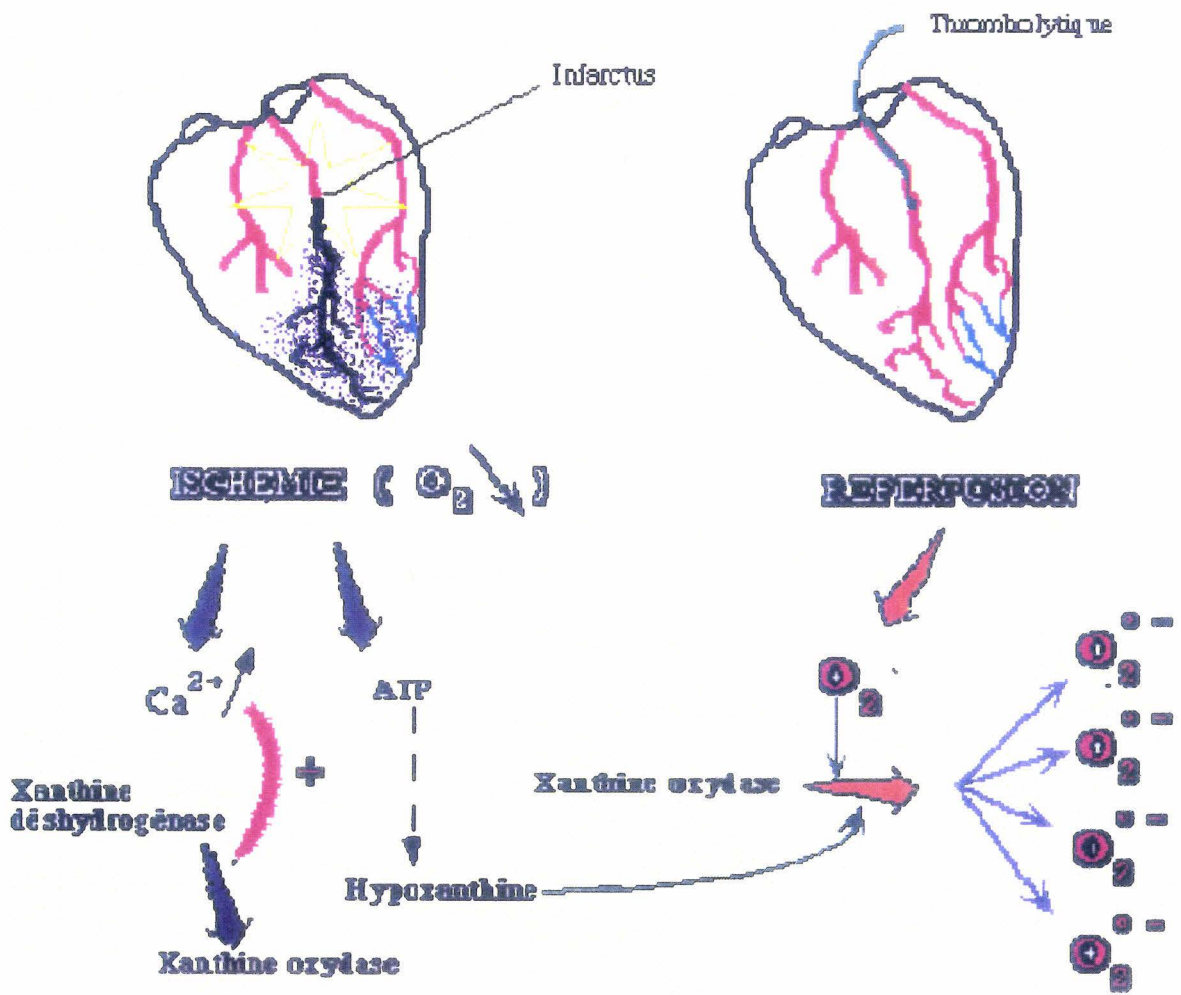


Figure 10 : intervention des EAO dans l'ischémie-reperfusion

#### IV-2-2. L'athérosclérose

L'athérosclérose n'est pas une pathologie en soi, mais elle fait partie d'un processus complexe aboutissant à des dysfonctionnements cérébraux et cardiaques responsables de 50 % de la mortalité dans les pays industrialisés.

Les EAO n'en sont certes pas les seuls acteurs (intervention de nombreux facteurs de croissance, de facteurs de coagulation,...), mais ils semblent responsables de la majorité des dégâts causés<sup>54</sup>.

La figure 11 schématise leur intervention au sein du vaisseau sanguin.

Les vaisseaux sanguins sont perpétuellement exposés aux EAO. Lorsque l'endothélium vasculaire est fragilisé ( présence de xénobiotique, métabolisme "agressif" de la réponse immunitaire,...), les LDL (Low Density Lipoproteins) le traversent en grande quantité( 1)..



Sous l'action des EAO produites par les cellules musculaires lisses (CML) et les cellules endothéliales, les LDL sont oxydés ( 2 ). La dégradation de l'endothélium ainsi que certaines protéines libérées par les CML attirent les monocytes circulants qui pénètrent alors dans l'espace sous-endothélial ( 3 ). Les monocytes et macrophages produisent des EAO qui accentuent considérablement l'oxydation des LDL ( 4 ). Les LDL oxydés sont alors reconnus par les récepteurs "éboueurs" des macrophages qui les phagocytent. A la longue, ils se transforment en cellules spumeuses qui s'accumulent et sont incapables de se déplacer ( 5 ). Ils entraînent par la suite la prolifération de CML et se nécrosent sous l'action des LDL . Cet amas cellulo-lipidique grossit, déforme l'endothélium en activant l'agrégation plaquettaire. La plaque d'athérome se forme, potentiellement thrombogène ( 6 ).

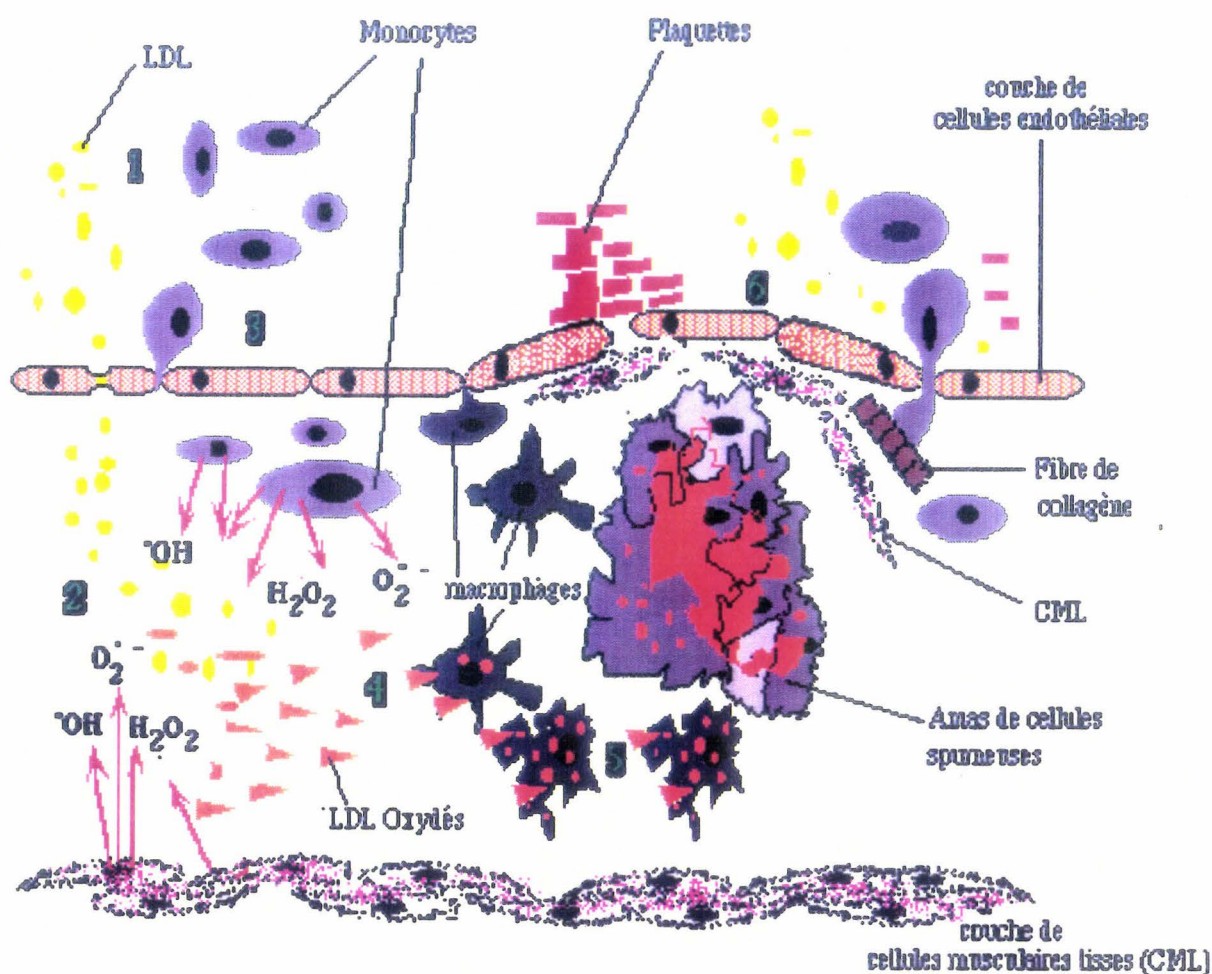


Figure 11 : intervention des EAO dans l'athérosclérose

### **IV-2-3. Le vieillissement**

Le vieillissement correspond à un affaiblissement global du métabolisme. Accumulation des dommages subis au cours de la "jeunesse", maladies, ... Kirkwood a développé une théorie, la "théorie du soma à usage limité" : l'évolution a fait que l'espèce considérée utilise son énergie au maximum pendant une durée de temps fixée. Ceci de manière à protéger d'une part l'organisme contre les agressions diverses du monde extérieur, d'autre part les cellules germinales pour leur donner leur plein potentiel pendant la période de "maturité". Lorsqu'elle arrive à son terme, l'organisme ne possède plus tous ses moyens de défense et commence sa décrépitude : le vieillissement prend le pas<sup>55, 56</sup>. A tout les niveaux, les EAO sont plus actifs chez le sujet âgé: la présence des céroïdes, marqueurs fluorescents provenant d'une augmentation de la peroxydation lipidique<sup>46</sup>, la baisse d'activité des protéases alcalines, enzymes spécialisées dans la dégradation des protéines oxydées<sup>50</sup>, l'augmentation du rapport (superoxyde dismutase/ glutathion peroxydase) entraînant une surconcentration en peroxyde d'hydrogène, ... en sont des preuves flagrantes. Cependant, les travaux à ce sujet n'en sont qu'aux premiers balbutiements. Il a par exemple été montré que l'on peut augmenter la durée de vie de la drosophile en surexprimant les gènes de sa superoxyde dismutase et de sa catalase. La surexpression d'une seule de ces enzymes n'apportant rien à l'animal<sup>57</sup>. Les EAO sont-ils les générateurs ou "uniquement" des acteurs privilégiés du processus de sénescence ?

En relation avec le vieillissement, il est intéressant de noter l'intervention potentiel des EAO dans les phénomènes de neurotoxicité<sup>58</sup> et de maladies neurodégénératives : sclérose amyotrophique<sup>59</sup>, maladie d'Alzheimer. Dans ce dernier cas, il semble que des EAO soient produites à partir d'un peptide-radical dérivé de la fragmentation de la protéine  $\beta$ -amyloïde présente dans les tissus nerveux malades<sup>60</sup>.

### **IV-2-4. Le cancer**

Par les effets destructeurs que peuvent exercer les EAO sur l'ADN ainsi que par les dérégulations de l'expression des gènes qu'elles peuvent induire<sup>49</sup>, elles sont placées en tête de liste des responsables de la cancérogenèse. On sait que de nombreux xénobiotiques sont mutagènes et carcinogènes par l'intermédiaire des radicaux libres qu'ils engendrent à la suite de leur métabolisation<sup>61</sup>.

### **IV-2-5. Le sida**

Il est désormais connu que le sidéen est en déséquilibre métabolique total. En particulier, il se trouve dans un état pro-oxydant. Celui-ci semble être à la base de la grosse perte de

"matériel cellulaire" rencontrée chez les séropositifs<sup>62</sup>. La figure 12 schématise l'effet des EAO dans l'infection par le virus du sida.

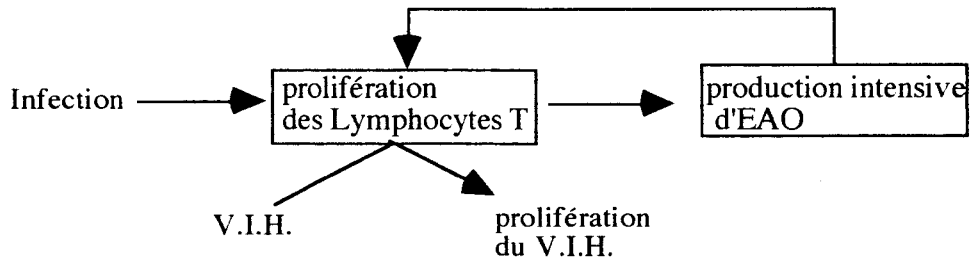


Figure 12 : intervention des EAO dans la prolifération du V.I.H.

Les sources d'EAO chez le séropositif sont multiples ( activité des PMN, inflammations chroniques comme le syndrome de Kaposi, la peroxydation lipidique exagérée, l'action des mycoplasmes, considérés comme le cofacteur biologique de l'infection... Cet état est amplifié par une déficience impressionnante en glutathion, molécule de défense antioxydante bien connu. L'activation de NF- $\kappa$ B<sup>36</sup> par les EAO est elle aussi impliquée.



L'incapacité de l'organisme à répondre à l'agression oxydante est donc le point commun de nombreuses maladies. Trouver une voie de remplacement implique de *connaître les moyens antioxydants* que possède l'organisme pour mieux les compléter, voire les remplacer.

## V- Les moyens de défense de l'organisme contre les EAO

### V-1. Les enzymes

Lorsque les conditions d'équilibre sont respectées, il existe une balance entre trois grandes familles d'enzymes : les superoxyde dismutases (SOD) les catalases et les peroxydases ( Fig. 13). Elles sont supplémentées par des protéines de stockage de métaux (Fe, Cu) telles que la céruléoplasmine et la ferritine. Le taux de métaux libres susceptibles de catalyser les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss est ainsi très diminué dans la circulation.

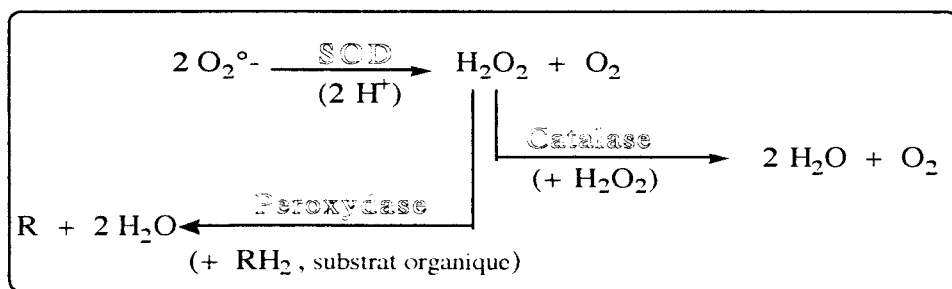


Figure 13 : le système enzymatique de destruction des EAO

Cet équilibre symbiotique entre les enzymes du système de défense a été démontré chez *E. Coli* <sup>63</sup> : si l'on augmente spécifiquement par mutation la quantité de SOD en conservant la concentration naturelle des autres enzymes du système, les bactéries mutées meurent beaucoup plus vite, preuve de la nécessité d'une balance entre chaque élément.

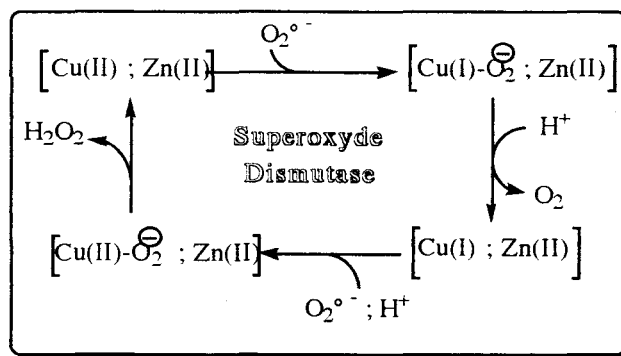
Les mécanismes d'action commencent à être bien connus mais leur description déborde le cadre de ce mémoire. On consultera avec profit l'ouvrage d'Halliwell et Gutteridge <sup>64</sup> et (44). Le site actif de ces enzymes contient un métal de transition dont les propriétés d'oxydo-réduction sont essentielles pour la dégradation des EAO.

### V-1-1. Les superoxydes dismutases (SOD)

On connaît à l'heure actuelle trois grandes familles de SOD :

- les SOD (Cu ; Zn) des eucaryotes
- les SOD (Mn) des procaryotes et des mitochondries
- les SOD (Fe) des procaryotes

L'enzyme est dimérique, a une masse de 35000 et des études radiocristallographiques ont permis de déduire le mode d'action du site actif, qui fonctionne sur le cycle d'oxydo-réduction du cuivre (Fig.14)



**Figure 14 :** cycle redox du cuivre dans la SOD (Cu ; Zn). Le zinc joue plus un rôle structural et d'assistance. Son degré d'oxydation ne varie pas.

La SOD est l'enzyme la plus intéressante puisqu'elle s'attaque à la base de la toxicité de l'oxygène, l'anion superoxyde<sup>65</sup>. Cependant, une enzyme n'a qu'une durée de vie très limitée et de ce fait n'est pas très pratique dans le cadre d'une utilisation thérapeutique prolongée. On peut néanmoins noter l'emploi de SOD lors de syndrome ischémique et de SOD modifiée par couplage avec du polyéthylène glycol pour limiter la formation de la plaque d'athérome. Les résultats sont contradictoires, mais la voie reste ouverte<sup>66,67</sup>. La chimie thérapeutique s'attache à produire des substituts organométalliques dont les propriétés sont analogues à celles de la SOD, mais beaucoup moins fragiles que les

enzymes. Strothkamp & coll. ont mis au point des complexes imidazolés intéressants <sup>68</sup> (Fig. 15).

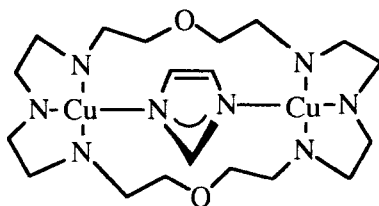
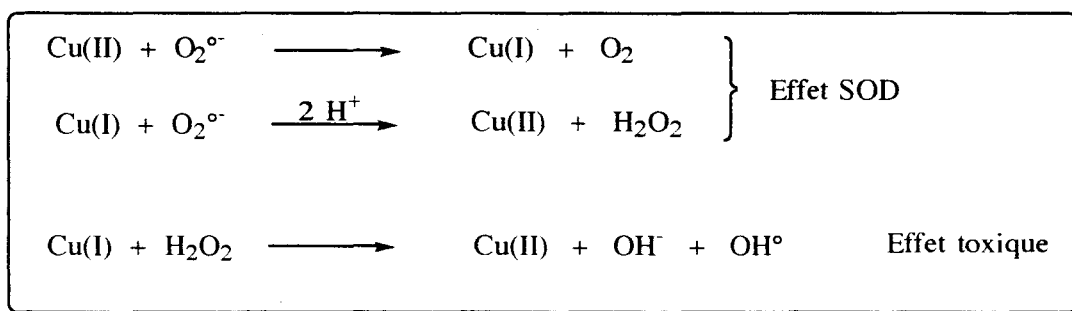


Figure 15 : Complexe de cuivre à activité SOD<sup>68</sup>

Il faut cependant tenir compte d'un effet secondaire important de certains types de ces complexes (exemple : cuivre / phénantroline) qui ont une tendance à contrecarrer l'effet SOD en favorisant la réaction de Fenton <sup>69</sup> :



### V-1-2. La catalase

La catalase<sup>70</sup> est une protéine composée de 4 sous-unités, chacune contenant un noyau héminique à fer. On la trouve dans le foie (au sein des peroxysomes) et dans les globules rouges. Sa présence n'est pas indispensable, car lorsque son gène est déficient, son activité est partiellement compensée par celle de la glutathion peroxydase (peroxydase à sélénium). Son cycle catalytique est schématisé sur la figure 16 <sup>44</sup>.

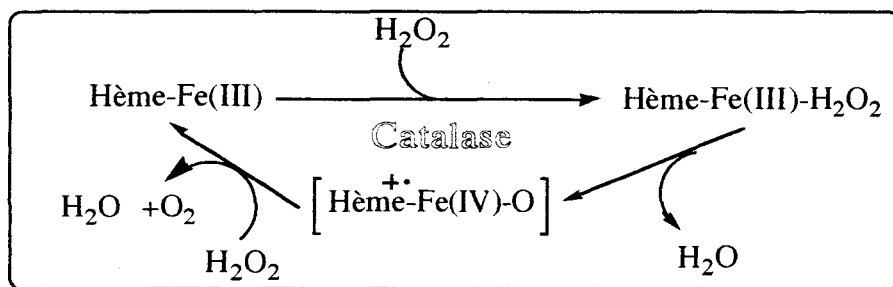


Figure 16 : Cycle d'oxydoréduction du fer du site actif de la catalase

Des modèles organiques basés sur des structures hémiques à fer(III) <sup>71</sup> présentent des propriétés catalytiques analogues à celles de la catalase (Fig. 17)

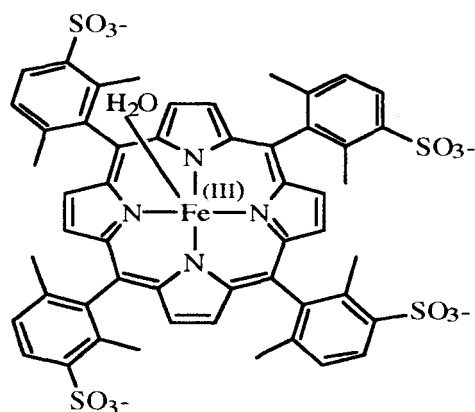


Figure 17 : complexe de fer à activité catalase

### V-1-3. Les peroxydases

Deux grandes familles de peroxydases sont rencontrées : les peroxydases héminiques à fer et les peroxydases à sélénium, spécifiques des eucaryotes. Les peroxydases à fer (Fig.18) sont importantes dans le monde végétal par leur intervention dans la formation de la lignine <sup>72</sup>.

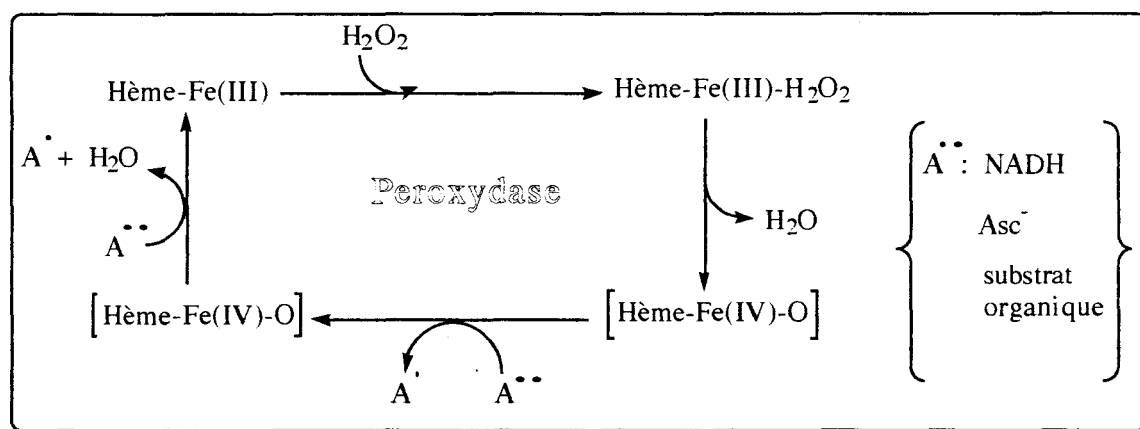


Figure 18 : Cycle d'oxydoréduction du fer(III) dans le site acif de la peroxydase à fer

La glutathion peroxydase comporte un acide aminé particulier, la sélénocystéine dont l'atome de sélénium est impliqué dans le cycle catalytique <sup>44,48</sup> (Fig.19). Elle est très impliquée dans la protection du cristallin contre les EAO (pathologie associée : cataracte).

Au niveau des analogues synthétiques, citons la mise au point de l'Ebselen qui allie à une activité glutathion peroxydase importante, un pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et un effet inhibiteur de la lipoxygénase<sup>48</sup> & réf. citées(Fig.20)

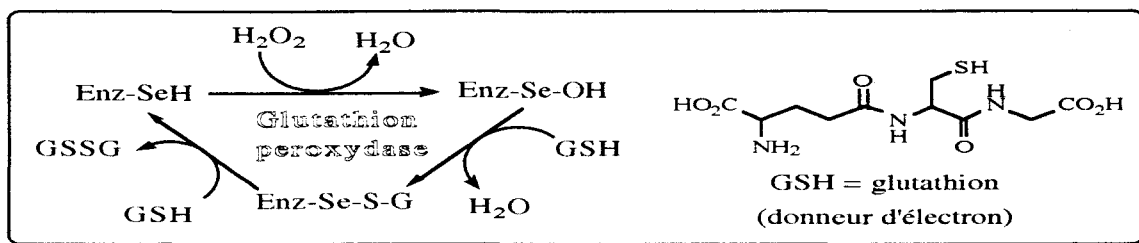


Figure 19 : le cycle catalytique de la glutathion peroxydase

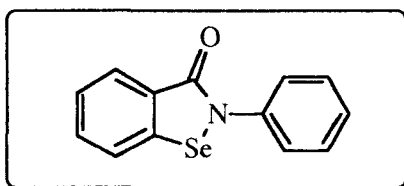
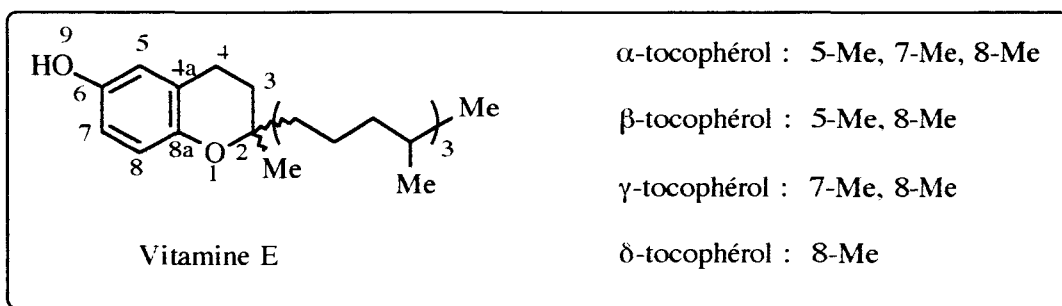


Figure 20 : l'Ebselen, structure à activité glutathion peroxydase

## V-2. Les antioxydants non enzymatiques : les piègeurs d' EAO.

L'organisme possède aussi des défenses non enzymatiques plus abordables à l'étude et à la modélisation car moins fragiles et plus simples, dont les plus importantes sont le tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique(vitamine C), l'acide urique et les flavonoïdes. Elles sont le support d'études mécanistiques très précises et permettront vraisemblablement la mise au point de structures antioxydantes particulièrement efficaces.

### V-2-1. Le tocophérol (vitamine E)



La vitamine E inhibe fortement l'oxydation des molécules organiques et, présente dans les membranes lipidiques où elle s'intègre parfaitement grâce à sa chaîne phytyle, elle empêche la peroxydation lipidique de se produire. Les travaux accomplis par les équipes de Burton<sup>24</sup> et Mukai<sup>73</sup> ont permis de montrer, par l'application de spectroscopie ENDOR, photoélectronique et par calculs que les facteurs principaux qui contribuent à l'activité antioxydante sont le recouvrement de l'orbitale 2p de l'oxygène hétérocyclique avec le

nuage  $\pi$  du cycle aromatique, mais surtout la facilité de transfert électronique (suivi d'un transfert de proton) entre le tocophérol TocH et le radical peroxy  $\text{LOO}^\circ$  (Fig.21). En utilisant des substituants capables de bloquer la configuration de la molécule et de faciliter l'approche de  $\text{LOO}^\circ$  et TocH pour augmenter la probabilité des transferts de charge (ce qui revient à diminuer la barrière d'énergie de la réaction), les auteurs tentent d'améliorer les propriétés de la vitamine E.

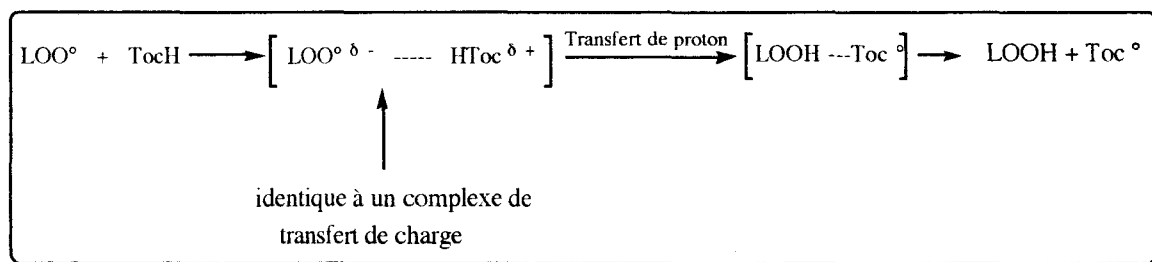
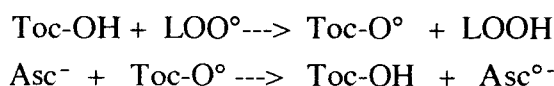
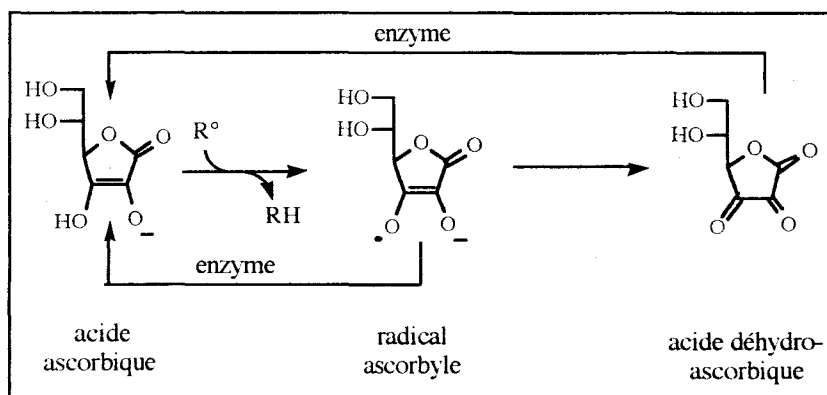


Figure 21 : les transferts électroniques et protoniques impliquant les tocophérols

### V-2-2. L'acide ascorbique (la vitamine C)

L'acide ascorbique<sup>74</sup>, actif en milieu aqueux, présente des caractéristiques exceptionnelles : il est universellement distribué dans l'organisme après absorption, son potentiel rédox lui permet d'être aussi bien un "capteur" de radicaux hydroxyles et superoxydes qu'un régénérateur, en particulier de la vitamine E :

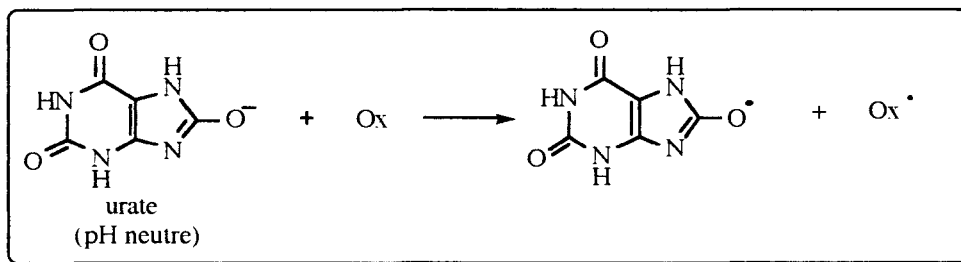


Le radical ascorbyle ainsi formé, très délocalisé sur le cycle, se régénère par disproportion en formant l'acide déhydro-ascorbique. Cependant, cette forme semble impliquée dans une certaine toxicité de la vitamine C au niveau de l'oeil.



Les études purement physico-chimiques sont rares et ne permettent pas d'expliquer le mécanisme d'action de la vitamine C.

#### IV-2-3. L'acide urique



Les études effectuées par radiolyse pulsée montrent que le radical est très stabilisé par résonance. La propriété d'inactivation des radicaux peroxydes ( $UH_2^- + ROO^\bullet \rightarrow ROO^- + {}^\bullet UH^- + H^+$ ), de captation des radicaux hydroxyles, de piègeur d'oxygène singulet et sa capacité à être régénéré par l'acide ascorbique font de l'acide urique un excellent antioxydant dont le rôle dans l'organisme semble primordial<sup>75</sup>.

#### V-2-4. Les antioxydants synthétiques

L'implication des radicaux libres dans des pathologies très courantes fait de la course aux nouveaux antioxydants une compétition de premier ordre. Les données mécanistiques n'étant pas très nombreuses (à l'exception du cas de la vitamine E), la méthode empirique est souvent utilisée : on évalue les propriétés d'un grand nombre de molécules pour sélectionner celles qui possèdent les meilleures caractéristiques<sup>76</sup>.

Un antioxydant synthétique doit s'acquitter de plusieurs tâches, dont les principales sont résumées dans la figure 22<sup>44, 77</sup>.

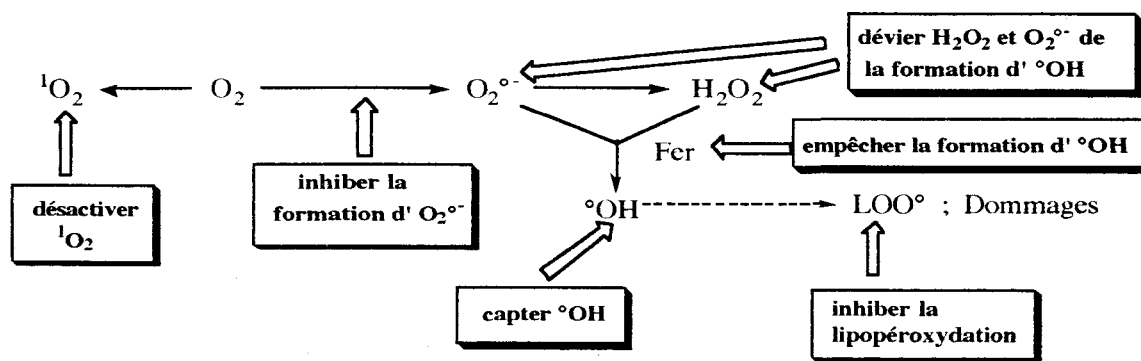


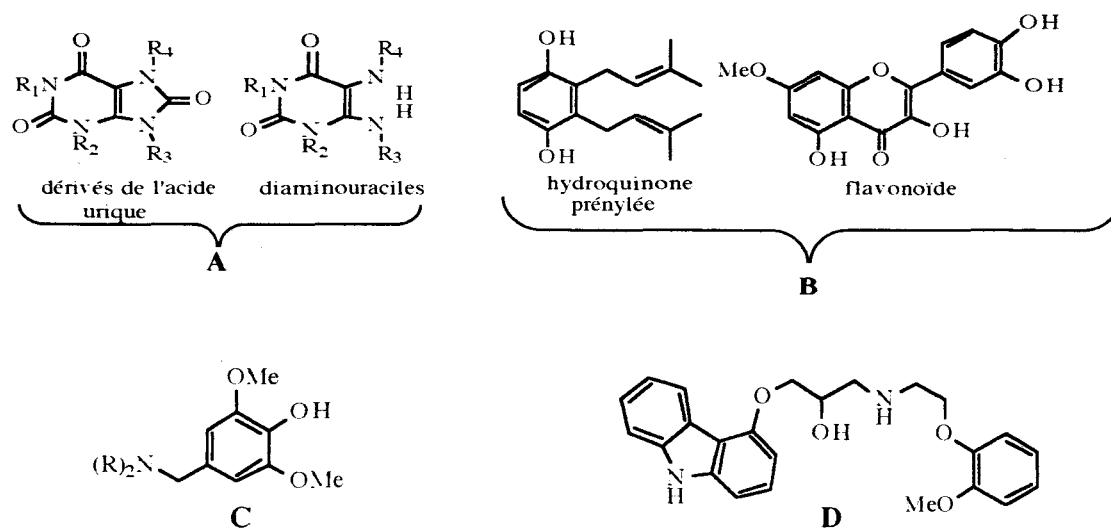
Figure 22 : les stratégies de lutte contre les EAO

Un antioxydant doit être :

- distribué correctement vers l'organe-cible
- capable de réagir avec les radicaux oxygénés les plus divers

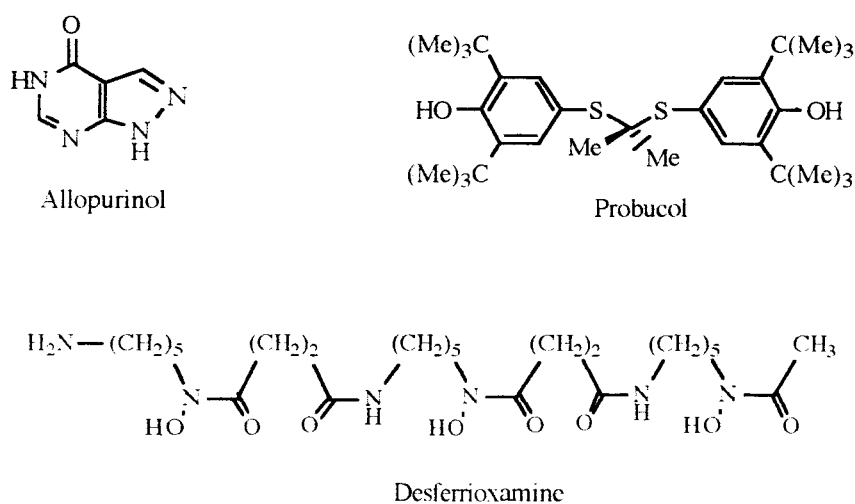
- régénérable et peu toxique ( lui ou ses métabolites)

Avant cette étape biochimique, il est nécessaire de mettre les molécules au point. De dérivés de l'acide urique<sup>78</sup> (A) en dérivés polyphénoliques<sup>25, 79</sup> (B) et benzylamines<sup>80</sup> (C), en passant par des molécules dont le rôle thérapeutique premier n'est pas antioxydant (cardévilol<sup>81</sup>(D)), les structures moléculaires testées sont pléthores ( Fig. 23).



**Figure 23** : quelques structures à activité antioxydante

Les antioxydants utilisés en clinique le sont à la suite d'études purement empiriques. On peut citer de manière non exhaustive l' allopurinol ( inhibiteur de la xanthine oxydase, enzyme productrice d'anions superoxydes) dans le cas de la goutte, et du syndrome d'ischémie reperfusion<sup>53</sup> , le probucol contre l'oxydation des LDL ( lors de la mise en place de la plaque d'athérôme), la desferrioxamine comme capteur de fer (dans le cas de surcharge en fer)<sup>67</sup>. (Fig.24)..



**Figure 24** : quelques antioxydants utilisés en clinique

Un rationnel de mise au point développé au moyen des calculs et de la physico-chimie à partir d'études telles que celles menées sur la vitamine E serait le bienvenu...

○○○○○○○○

## Références Bibliographiques

### I- Les sources d'oxygène

- 1 - S. Weinberg, "Les trois premières minutes de l' univers" , Points-Sciences (1978)
- 2 - H. Reeves, "Patience dans l'azur", Points-Sciences (1981)
- 3 - V.M. Canuto, J.S. Levine, T.R.R. Augustsson, C.L. Imhoff & M.S. Giampapa , "The young sun and the atmosphere and the photochemistry of the early Earth", *Nature*, **305**, 281-286 (1983)
- 4 - A. Danchin, "L' origine de la vie", *La Recherche*, **19**, 878-886 (1988)
- 5 - Colloque interdisciplinaire du C.N.R.S., "Frontiers of life", Frontière éd. (1991)
- 6 - J.J.R. Frausto, "The biological chemistry of the elements", Oxford University Press (1993)
- 7 - J.D. Bernal, "The origins of life", Weidenfeld & Nicolson (1967)
- 8 - C.R. Sommerville, "Les photosynthèses des plantes" , *La Recherche*, **15**, 490-501 (1984)
- 9 - L. Stryer, "La photosynthèse " dans "BIOCHIMIE", Flammarion, 3<sup>ème</sup> éd. (1992)
- 10 - P. Joliot, "Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II", *Photochem. Photobiol.*, **10**, 309-329 (1969)
- 11 - G.W. Brudvig, "Probing the mechanism of water oxidation in photosystem II", *Acc. Chem. Res.* , **24**, 311-316 (1991)
- 12 - P. Mathis & A.W. Rutherford, "La production d'oxygène par les plantes" , *La Recherche*, **25**, 46-54 (1994)
- 13 - C. Philouze, G. Blondin, S. Ménage, N. Auger, J.J. Girerd, D. Vigner, M. Lance & M. Nierlich, "A new type of Mn-O cluster with a Mn<sub>4</sub> chain unit. Relevance to the photosynthetic oxygen evolving center" , *Angew. Chem., int. ed.* , **31**, 1629-1631 (1992)
- 14 - H.A. Chu, A.P. Nguyen & R.J. Debus , "Site directed PS II mutants with perturbed oxygen evolving properties" , *Biochemistry*, **33**, 6137-6157 (1994).

### II- Les propriétés physico-chimiques fondamentales de l'oxygène

- 15 - M. Bernard, "L'oxygène" dans "Cours de chimie générale", Dunod, 2<sup>ème</sup> éd. (1994)
- 16 - a) R.V. Bensasson, "Activated forms of oxygen", 102-141, dans "excited states and free radicals in biology and medicine", Oxford University Press (1993)  
b) D.T. Sawyer, "The chemistry of dioxygen species (O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>o-</sup>, HOO<sup>o</sup> and HOOH) and their activation by transition metals", *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **31**, 109-130 (1990)

- 17 - K. Hyland, H Banoun. & C. Auclair , "Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system", *Anal. Biochem.* , **135**, 280-287 (1983)
- 18 - P.A. King, V.E. Anderson, J.O. Edwards, G. Gustafson, R.C. Plumb & J.W. Suggs, "A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions : reaction with proteins and nucleic acid", *J.Amer. Chem. Soc.*, **114**, 5430-5432 (1992)
- 19 - T.F. Slater, "Overview of methods used for detecting lipid peroxidation", *Methods in enzymol.* , **105**, 283-293 (1984)
- 20 - R. Poupko & I. Rosenthal, "Electron transfer interactions between superoxide ion and organic compounds", *J. Phys. Chem.*, **77**, 1722-1724 (1973)
- 21 - M.J. Turner III & G.M. Rosen, "Spin trapping of superoxide & hydroxyl radicals with substituted pyrroline 1-oxides", *J. Med. Chem.*, **29**, 2439-2444 (1986)
- 22 - I. B. Afanas'ev, "Superoxide ion : chemistry and biological implications", Vol. I, CRC Press (1989)
- 23 - G.V. Buxton, C.L. Greenstock, W.P. Helman & A.B. Ross, "Critical review of rate constants of reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solutions", *J. Phys.Chem. Ref. Data* , **17**, 513-886 (1988)
- 24 - G.W.Burton, T. Doba, E.J. Gabe, L. Hugues, F.L.F. Lee, L. Prasad & K.U. Ingold , "Autoxidation of biological molecules. 4 . Maximizing the antioxidant activity of phenols", *J. Amer. Chem. Soc.*, **107**, 7053-7065 (1985)
- 25 - S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic & M.G. Simic, "Flavonoïds as antioxidants", *ibid.* , 116, 4846-4851 (1994)

### **III- L'oxygène, bienfaiteur de l'organisme**

- 26 - B. Max, "This and that : hair pigments, the hypoxic basis of life and thevirgilian journey of the spermatozoon", *Trends Pharm. Sci.* , **13**, 272-276 (1992)
- 27 - B.N. Ames, M.K. Shigenaga & T.M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922 (1993)
- 28 - A. Toulmond & J-P Truchot, "Les transporteurs d'oxygène", *La recherche*, **24**, 562-570 (1993)
- 29 - L. Vaska, "Dioxygen-metal complexes : toward a unified view", *Acc. Chem. Res.*, 175-183 (1976)
- 30 - M.A. Fox, "Electron transfer : a critical link between subdisciplines in chemistry" dans "Metal-dioxygen complexes", *Chem. Rev.* , **94**, 567-856 (1994)
- 31 - J-L Martin & J-C Lambry, "Les séismes moléculaires de l'hémoglobine", *La recherche*, **254**, 572-575 (1993)
- 32 - G. Barja, "Oxygen radicals, a failure or a success of evolution ?", *Free Rad. Res. Comms.*, **18**, 63-70 (1993)
- 33 - A.M. Jones."Surprising signals in plant cells", *Science* , **263**, 183-184 (1994)

- 34 - G. Storz, "Free radicals, peroxides and the control of gene expression", *Chem. Biol.*, **introductory issue**, XVI-XVII (1994)
- 35- Collectif, "Biological signalling using superoxide and nitric oxide radicals", *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **373**, 735-746 (1992)
- 36- H. Schenk, M. Klein, W. Erdbrügger, W. Dröge & K.S. Osthoff, "Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1672-1676 (1994)
- 37- B. Samuelsson, "From studies of biochemical mechanism to novel biological mediators : prostaglandin endoperoxides, thromboxanes and leukotrienes (Nobel lecture)", *Angew. Chem. int. ed.*, **22**, 805-8 (1983)
- 38- A.W. Segal & A. Abo, "The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes", *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 43-47 (1993)
- 39- C. Deby, "La biochimie de l'oxygène", *La recherche*, **228**, 56-64 (1991)

#### **IV-L'oxygène, destructeur de l'organisme**

- 40- A. Albert, "The behaviour of foreign substances in the human body", *Trends Pharm. Sci.*, **8**, 258-261 (1987)
- 41- J.M. Mac Cord & I. Fridovich, "Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte", *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969)
- 42- a) I. Fridovich, "Biological effects of the superoxide ion", *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1-11 (1988)  
 b) Y.J. Suzuki & G.D. Ford, "Mathematical model supporting the superoxide theory of oxygen toxicity", *Free Radical Biol. Med.*, **16**, 63-72 (1994)
- 43- S. Singh, "Design and development of therapeutically useful iron chelators", dans "*antioxidants, free radicals and polyunsaturated fatty acids in biology and medicine*", International Food Science Center ed., 83-103 (1993)
- 44- M. Fontecave & J-L Pierre, "Activité et toxicité de l'oxygène. Principes des thérapeutiques antioxydantes", *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **128**, 505-520 (1991)
- 45- W.H. Koppenol & J-F Liebman, "The oxidizing nature of the hydroxyl radical. A comparison with the ferryl ion  $FeO^{2+}$ ", *J. Phys. Chem.*, **88**, 99-104 (1984)
- 46- J. Pré, "La lipoperoxydation", *Path. Biol.*, **39**, 716-736 (1991)
- 47- K. Behrane, M. Widersten, A. Engstrom, J.W. Kozarich & B. Mannervik, "Detoxication of base propenals and other  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1480-1484 (1994)
- 48- H. Sies, "Biochemistry of oxidative stress", *Angew. Chem. int. ed.*, **25**, 1058-1071 (1986)
- 49- S.A. Weitzman, P.W. Turk, D.H. Milkowski & K. Koslowski, "Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1261-1264 (1994)
- 50- E.R. Stadtman, "Protein oxidation and aging", *Science*, **257**, 1220-1224 (1992)

- 51- R.T. Dean, "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins", *Trends Biochem.Sci.* , **18**, 437-441 (1993)
- 52- L.R.C. Barclay, "1992 Syntex Award Lecture. Model biomembranes : quantitative studies of peroxidation, antioxidant action, partitionning, and oxidative stress", *Can. J. Chem.*, **71**, 1-16 (1993)
- 53- S.W.Werns & B.R. Lucchesi , "Free radicals and ischemic tissue injury", *Trends Pharmaceutic. Sci.*, **11**, 161-166 (1990)
- 54- R. Ross, "The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s", *Nature* , **362**, 801-809 (1993)
- 55- R. rusting, "Les causes du vieillissement", *Pour la science*, **184**, 54-62 (1993)
- 56- H.R. Warner. R.N. Butler, R.L.Sprott, & E.L. Schneider. "Modern biological theories of aging", Raven press (1987)
- 57- W.C. Orr & R.S. Sohal, "Extension of lifespan by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *drosophila Melanogaster* ", *Science* , **263**, 1128-1130 (1994)
- 58- T.D. Oury , S.Y. Ho, C.A. Piantadosi & J.D. Crapo, "Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system toxicity". *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* , **89**, 9715-9719 (1992)
- 59- H.X. Deng, A. Hentati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.Y. Hung, E.D. Getzhoff, P. Hu & B. Herzfeldt , "Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase", *Science*, **261**, 1047-1050 (1993)
- 60- K. Hensley , J.M. Carney, M.P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J.F. Wu, R.A. Floyd & D.A. Butterfield, "A model for  $\beta$ -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide : relevance to Alzheimer disease", *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* , **91**, 3270-3274 (1994)
- 61- C. Nagata, M. Kodoma, T. Kimura, T. Yamaguchi, "Free radicals produced from chemical carcinogens and their significance in carcinogenesis", dans "*Free radicals and cancer*", R.A. Floyd éd., Dekker, 1-58 (1982)
- 62- R. Olivier, "Stress oxydatif et SIDA", *Actual. Innov. Méd.*, **9**, 43-44 (1994)

#### **V- Les moyens de défense de l'organisme contre les EAO**

- 63- M.D. Scott , "SOD rich bacteria", *J. Biol. Chem.* , **262**, 3640-3645 (1987)
- 64- B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge, "Free radicals in biology and medicine", Oxford University Press (1989)
- 65- F. Rotilio, "Superoxide and superoxide dismutase in chemistry, biology and medicine, Elsevier (1986)
- 66- L. Kõnya, V. Kekesi, S. Juhasz-Nagy & J. Feher, "Lack of effect of antioxidant therapy during renal ischemia and reperfusion in dogs", *Experientia*, **49**, 235-237 (1993)

- 67- C. A. Rice Evans & A.T. Diplock "Current status of antioxidant therapy", *Free Radical Biol. Med.*, **15**, 77-96 (1993)
- 68- K.G. Strothkamp & S.J. Lippard, "Chemistry of the imidazolate bridged bimetallic center in the copper-zinc superoxide dismutase and its model compounds", *Acc. Chem. Res.*, **15**, 318-326 (1982)
- 69- S. Goldstein & C. Szapski, "Mechanism and reaction products of the oxidation of copper(I) phenantroline by hydrogen peroxide", *Free Radical Biol. Med.*, **1**, 373-380 (1985)
- 70- J. Pelmont, "La catalase", dans "Les enzymes", 522-530, Presse Universitaire de Grenoble (1993)
- 71- M.F. Zippies, W.A. Lee & T.C. Bruice, "Influence of hydrogen ion activity and general acid-base catalysis on the rate of decomposition of hydrogen peroxide by a novel non aggregating water soluble iron(III) tetraphenyl porphyrin derivative", *J. Amer. Chem. Soc.*, **108**, 4433-4445 (1986)
- 72- J. Bruneton, "Composés polyphénoliques, acétates et shikimates" dans "éléments de phytochimie et de pharmacognosie", Techniques et Documentation Lavoisier, 123-185 (1987)
- 73- a) S. Nagaoka, K. Mukai, T. Itoh & S. Katsumata, "Mechanism of antioxidant reaction of vitamin E. 2. photoelectron spectroscopy and ab initio calculation", *J. Phys. Chem.*, **96**, 8184-8187 (1992)  
b) K. Mukai, Y. Uemoto, M. Fukuhara, S. Nagaoka & K. Ishizu, "ENDOR study of the cation radicals of vitamin E derivatives. Relation between antioxidant activity and molecular structure", *Bull. Soc. Chim. Jpn.*, **65**, 2016-2020 (1992)
- 74- R.C. Rose & A.M. Bode, "Biology of free radical scavengers : an evaluation of ascorbate", *FASEB J.*, **7**, 1135-1142 (1993)
- 75- M.G. Simic & S.V. Jovanovic, "Antioxidation mechanisms of uric acid", *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5778-5782 (1989)
- 76- M. Santrůček & J. Krepelka., "Antioxidants-potential chemotherapeutic agents", *Drugs fut.*, **13**, 974-996 (1988)
- 77- H. Sies, "Strategies of antioxidant defense", *Eur. J. Biochem.*, **215**, 213-219 (1993)
- 78- L. Fraisse, J.B. Verlhac, B. Roche, M.C. Rasclé, A. Rabion & J-L Seris, "Long-chain substituted uric acid and 5, 6-diaminouracil derivatives as novel agents against free radical processes : synthesis and *in vitro* activity", *J. Med. Chem.*, **36**, 1465-1473 (1993)
- 79- N. Cotelle, S. Moreau, P. Cotelle, J-P Catteau & J-P Hénichart, "Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *aplidium californicum*", *Free Radical Biol. Med.*, **11**, 63-68 (1991)
- 80- M.J. Yu, J.R. McGowan, L.A. Phebus, R.D. Towner, P.P.K. Ho, P.T. Keith, C.A. Luttmann, R.D. Saunders & K.J. Ruterbaries, "Benzylamine antioxidants : relationships between structure, peroxy radical, scavenging, lipid peroxidation inhibition, and cytoprotection". *J. Med. Chem.*, **36**, 1262-1271 (1993)
- 81- T.L. Yue, "Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger", *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **263**, 92-98 (1992)



*Stratégie de recherche*  
*Choix du modèle d'étude*

## VI. Définition et propriétés des acides caféiques

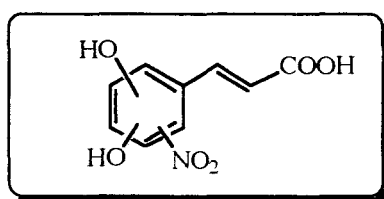
La recherche de nouveaux antioxydants n'obéit donc pas à des règles strictes.

L'hypothèse développée ici est basée sur la conjugaison, au sein d'une même entité, de fonctions organiques à propriétés antagonistes :

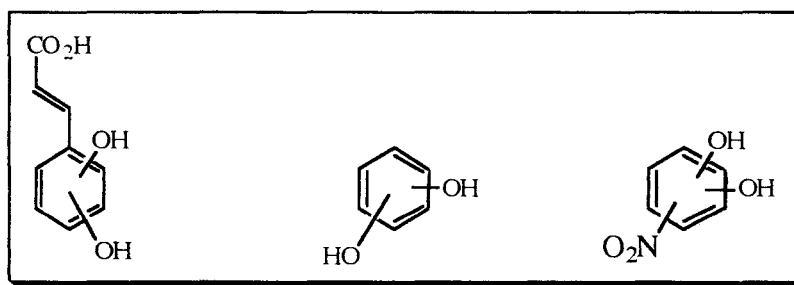
- une fonction aisément oxydable
- une fonction aisément réductible

A partir de ce schéma, il était raisonnable de penser que les molécules pouvaient subir une sorte de "régénération" des fonctions, l'une agissant sur l'autre suivant les conditions expérimentales choisies.

Les modèles choisis ont pour formule générale :



dont les propriétés sont à comparer à celles de structures nues ou moins fonctionnalisées :

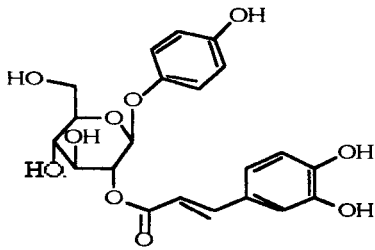


La démarche choisie provient des observations suivantes.

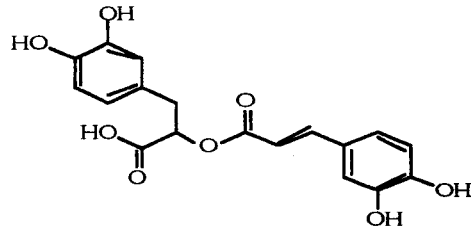
L'acide caféique est d'une importance capitale dans le monde végétal puisqu'il intervient, après métabolisation, aussi bien au niveau structural que fonctionnel. Il provient du métabolisme d'un acide aminé, le tryptophane, et peut engendrer :

- des lignines, composants fondamentaux du "squelette" végétal, par polymérisation
- des toxines (aflatoxine tumorigène de l'*Aspergillus* )
- des coumarines et flavonoïdes (antifongiques et antibactériens)

L'acide caféique n'est jamais trouvé libre dans le végétal. Il est conjugué à diverses structures polyosidiques ou polyphénoliques. Le caféylarbutoside et l'acide rosmarinique sont des exemples de choix<sup>1</sup>.



caféylarbutoside



acide rosmarinique

Sous forme polymérisée (lignines), l'acide caféique présente des propriétés intéressantes. Il est capable de stimuler fortement les défenses antivirales et antibactériennes en agissant directement sur la production de lymphocytes<sup>2</sup>. De plus, certaines lignines sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération du V.I.H. Des expériences d'hydrolyse ont montré que la partie diphenolique est primordiale pour l'activité<sup>3</sup>.

Quelques études sur le monomère lui-même - l'acide caféique - ont été entreprises dans le domaine antioxydant. Kim<sup>4</sup> évoque d'excellentes propriétés d'inhibition de radicaux, confirmées par Barrerra<sup>5</sup>, aussi bien en phase aqueuse qu'en phase lipidique.

Le choix de la **fonction cinnamique** semble aussi justifié par les travaux de Marina<sup>6</sup>. Dans des conditions d'oxydation lipidique drastique ( $T > 100^{\circ}\text{C}$ ), la protection est bien mieux assurée par les acides cinnamiques polyphénoliques que par les dérivés benzoïques correspondants. La présence de la chaîne alcénique supplémentaire introduit des changements d'hydrophobicité (meilleure pénétration en phase lipidique) directement sur la structure. De plus la faculté de polymérisation de l'acide caféique dans ces conditions peut engendrer des structures polycondensées très conjuguées qui peuvent à leur tour être antioxydantes.

L'utilisation d'un **dérivé diphenolique** est, elle aussi, empirique. Il est connu que les diphenols sont de puissants capteurs et destructeurs de radicaux libres. Capelle<sup>7</sup> reporte les résultats suivants quant à la destruction du radical hydroxyle :

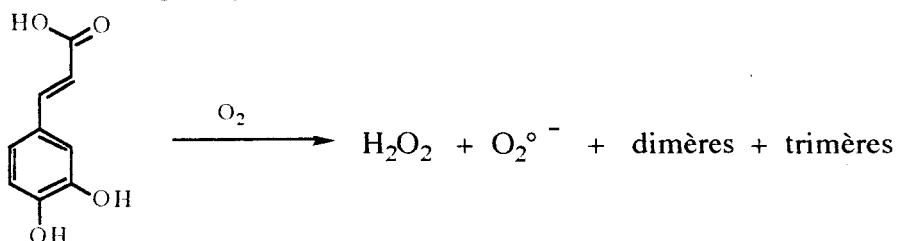
<b>composé</b>					
<b>IC 50 (µM)</b>	115	66	66	0.32	0,01

Plus petite est la valeur d' IC 50, meilleure est le piégeage des radicaux hydroxyles. Les acides diphenoliques sont actifs, avec cependant un net avantage pour le dérivé 3,4

dihydroxylé. Une fonction ortho-diphénol "isolée" semble donc primordiale à la bonne activité du produit. Ceci est confirmé par les travaux de Cuvelier <sup>8</sup> qui montre en supplément que dans le cas des acides phénols, l'activité antioxydante n'est pas augmentée si on ajoute sur le noyau benzénique un groupe électrodonneur (OMe par exemple), alors que ceci est vrai dans le cas des phénols simples : l'acide caféique est meilleur antioxydant que l'acide férulique (acide 3-méthoxy-4-hydroxy-cinnamique), déjà largement utilisé en cosmétologie et en agro-alimentaire<sup>9</sup>.

Enfin, l'utilisation de dérivés ortho-diphénoliques est intéressante par le biais de la complexation d'ions métalliques ( $Fe^{2+}$ )<sup>10,11</sup> et donc d'une inhibition potentielle des réactions de type Fenton.

Le squelette des acides cinnamiques diphénoliques semble donc être un bon modèle d'étude antioxydante. Il faut cependant émettre quelques réserves. En effet, il a été montré qu'à pH proche du pH physiologique (pH = 8), l'acide caféique subit une autoxydation avec formation de peroxyde d'hydrogène et d'anions superoxydes :



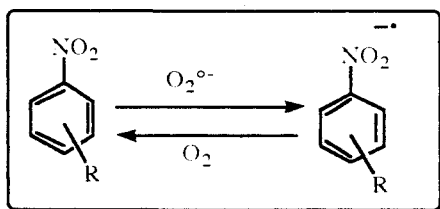
Ce mécanisme, de première importance pour la défense anti-infectieuse des végétaux, est gênant car dans certaines conditions, il transforme une molécule à activité antioxydante en entité pro-oxydante.

Le modèle pourrait donc être optimisé si l'on pouvait éviter cette réaction d'autoxydation, tout en préservant la fonction diphénolique. Ceci pourrait être obtenu en **substituant le cycle au moyen d'une fonction réagissant aisément avec les EAO**. La fonction diphénolique sera ainsi protégée de l'agression de l'oxygène

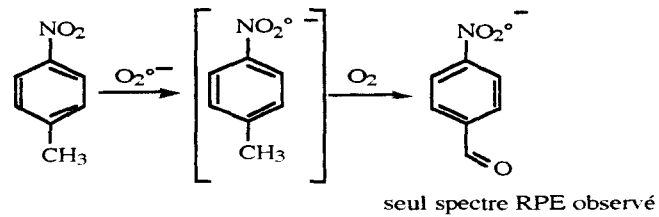
La fonction organique choisie est la **fonction nitro**.

### VII- Réactivité de la fonction nitro en présence d'oxygène ou d'EAO

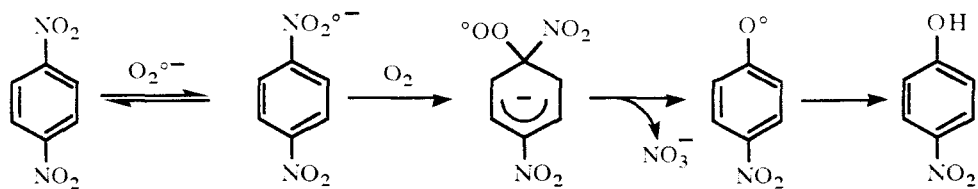
Le groupement nitro  $-NO_2$  est peu rencontré dans la nature mais présente, vis-à-vis du radical superoxyde une réactivité intéressante. Si les potentiels rédox et la structure géométrique du dérivé nitroaromatique sont compatibles avec la réaction, on peut observer l'équilibre



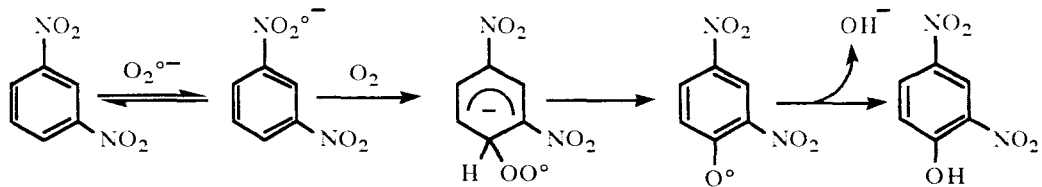
Il fait partie intégrante d'un processus primordial dans la radiothérapie anticancéreuse .  
 Le radical-anion est très bien mis en évidence au moyen de la spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE). Les travaux pionniers de Poupko et Rosenthal<sup>12</sup> dans ce domaine ont permis de prouver que ce type de réaction se fait par l'intermédiaire d'un transfert électronique avec réaction potentielle d'oxydation subséquente :



ou encore, après un processus d'addition élimination<sup>13</sup> :



et

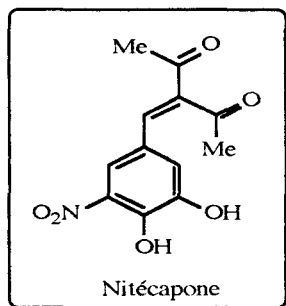


Sridhar<sup>14</sup>, dans une tentative d'explication de la neurotoxicité des nitroaromatiques, note aussi l'augmentation de la vitesse d'autoxydation de catécholamines et de la quantité d'oxygène absorbée lorsqu'elles sont mises en présence de dérivés nitroaromatiques. Les dérivés quinoniques qui en résultent sont particulièrement toxiques et combinent leur action à celle de la déplétion en oxygène et de la génération de radicaux hydroxyles, superoxydes et des radicaux-anions provenant de la réduction des nitroaromatiques.

Il existe donc bien une interaction entre les fonctions antagonistes que sont la fonction catéchol (oxydable) d'une part et la fonction nitro (réductible) d'autre part.

Enfin, alors que le projet entrait dans sa première phase, un article de Suzuki & coll.<sup>15</sup> concernant une approche antioxydante au moyen d'un inhibiteur de catéchol-O-

méthyltransférase (une enzyme importante dans le catabolisme des catécholamines neurotransmettrices), la nitécapone, a conforté l'approche envisagée.



Les résultats de l'étude *in vitro* indiquent que la nitécapone est un bon capteur de radicaux peroxydes aussi bien en phase aqueuse qu'en phase lipidique, un bon inhibiteur de la xanthine oxydase - une enzyme impliquée dans la synthèse d'anions superoxydes - et un capteur de radicaux hydroxyles et superoxydes. De plus, sa capacité à complexer le fer fait de la nitécapone un antioxydant à sites d'action multiples.

La nitécapone a aussi montré une action particulièrement convaincante dans un modèle *in vitro* de syndrome d'ischémie-reperfusion. Non seulement le coeur retrouve sa fonction mécanique dans de meilleures conditions, mais les systèmes de défense antioxydante (ascorbate) sont aussi protégés.

Dérivés de la nitécapone, **les acides dihydroxy-nitrocinnamiques peuvent donc être considérés comme un bon modèle d'étude de l'influence de la fonction nitro sur les propriétés antioxydantes d'un système polyphénolique.**

o o o o o o o o o o

### VIII- Synthèse : partie théorique

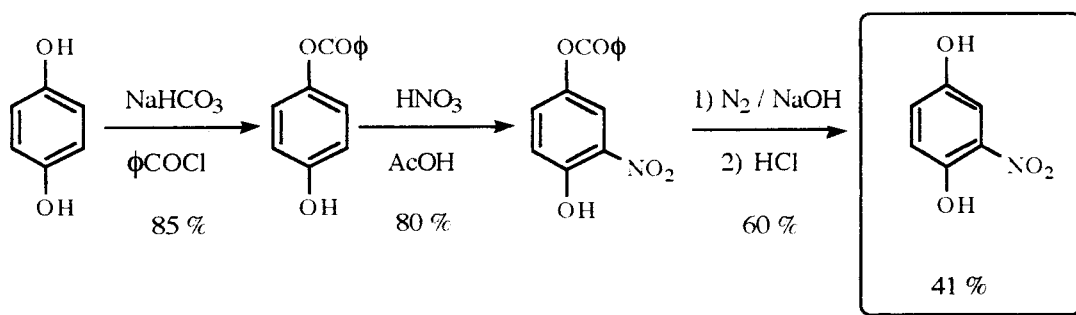
La synthèse des molécules désirées, malgré une apparente simplicité structurale, posa un certain nombre de problèmes. La nécessité d'obtention de produits parfaitement purs pour l'étude RPE a parfois nécessité des traitements longs et lourds.

La nitration aromatique est une réaction désormais bien connue. Elle peut cependant être à la source de nombreux problèmes : polynitration, obtention d'isomères de position, voire oxydation<sup>16</sup>. Les substrats que nous avons utilisés, dérivés aromatiques polyhydroxylés y sont particulièrement sensibles et nous ont amenés à utiliser dans certains cas divers groupements protecteurs.

#### VIII-1. Synthèse des dihydroxynitrobenzènes

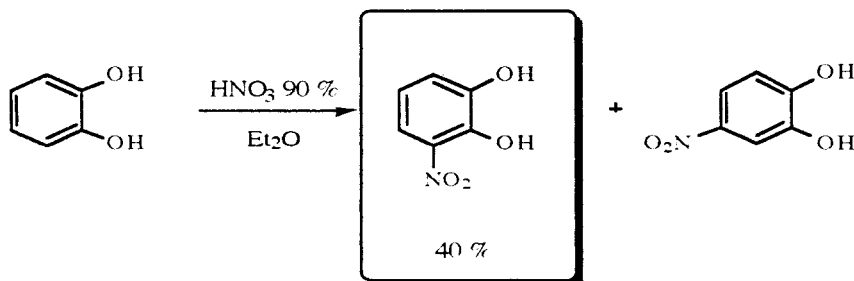
##### VIII-1-1. Synthèse de la 2-nitrohydroquinone

Cette synthèse est ancienne<sup>17</sup>. Il est impératif de tenir compte de paramètres tels que la vitesse d'addition de l'agent nitrant et de la température de réaction, sous peine de voir apparaître un résidu polymérisé brun, intraitable. Dans les conditions idéales, le rendement globale de la réaction est de 41 %. Le produit pur est obtenu sous forme de beaux cristaux orange vif après chromatographie puis sublimation<sup>18</sup>.



##### VIII-1-2. Synthèse du 3-nitrocatéchol

Des précautions identiques doivent être prises. L'action de l'acide nitrique sur le pyrocatéchol dans l'éther éthylique conduit à un mélange à peu près équimolaire de 3-nitrocatéchol et de 4-nitrocatéchol<sup>19</sup>.



La purification totale du 3-nitrocatéchol nécessite une chromatographie sur colonne, suivie d'une sublimation<sup>20</sup>. La R.M.N. montrant encore des traces de pyrocatéchol après ce traitement, une recrystallisation dans l'éther de pétrole est effectuée. Le rendement en produit pur est de 40 %. Le produit - de belles aiguilles jaune d'or - est conservé à l'abri de la lumière. Sa dégradation photochimique est caractérisée par l'apparition d'une couleur jaune orangée

Le **4-nitrocatéchol** est identique au produit commercial, et est aussi bien utilisé dans les manipulations ultérieures.

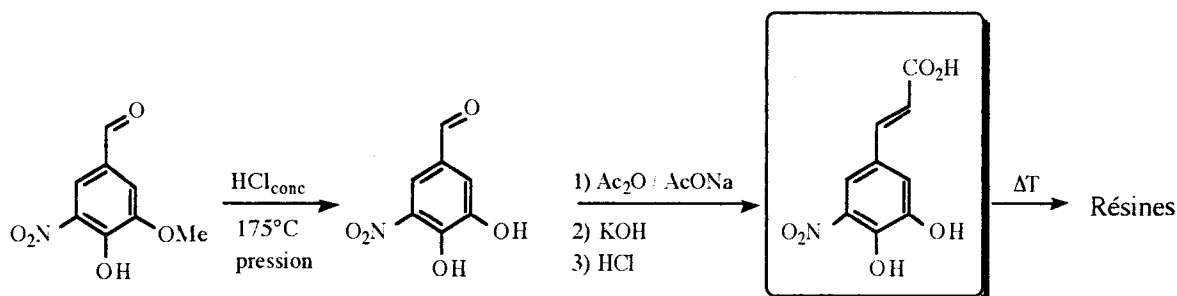
Ces molécules, après exposition à l'air, n'y semblent pas sensibles de façon perceptible (masse, R.M.N.), que ce soit sous forme solide ou en solution.



## VIII-2. Synthèse des acides dihydroxy-nitro-cinnamiques

### VIII-2-1. Les acides 3, 4-dihydroxy-2-, 5-, et 6- nitrocinnamiques (acides nitrocaféiques)

La seule référence concernant ce type de produit date de 1935. Kurschner<sup>21</sup> synthétise l'acide 5-nitrocaféique, présent dans certaines lignines du bois, par le procédé suivant :

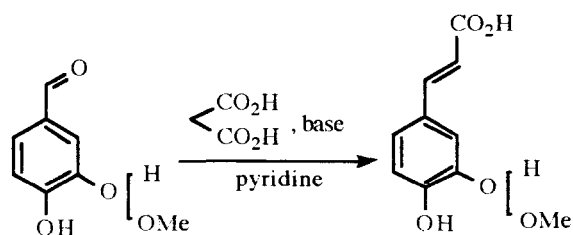


Les conditions drastiques employées par l'auteur sont à l'origine du faible rendement observé (< 20 %).

Une autre approche était donc nécessaire.

La voie utilisée dérive de la synthèse de l'acide 3,4-dihydroxycinnamique (acide caféique). La procédure de Knoevenagel permet l'obtention des acides caféique (R = H) et férulique (R=OMe) avec un rendement de 85 %, résultat similaire à celui recensé par Johnson<sup>22</sup>. Deux équivalents d'acide malonique sont utilisés. La base est la pipéridine, en quantité catalytique.



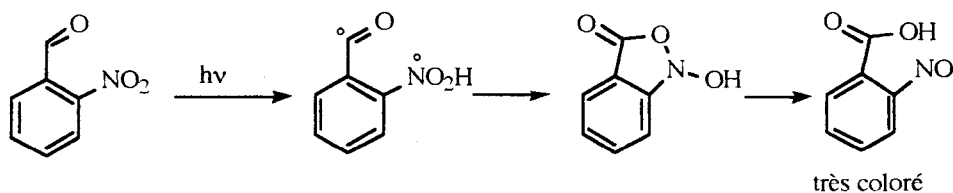


Rdt > 80 %

L'acide caféique commercial est ultramajoritairement de forme E. La forme E est plus intéressante au vue de sa stabilité. La condensation de Knoevenagel de l'acide malonique sur les aldéhydes aromatiques conduit exclusivement aux isomères E<sup>23</sup>. La comparaison entre le produit commercial et le produit synthétisé ne montre aucune différence. Le reste des manipulations fut donc effectué avec l'acide caféique commercial.

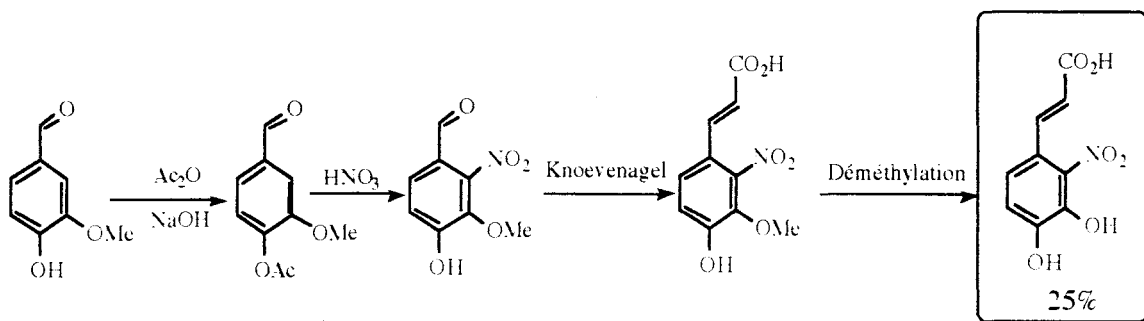
Avant d'aborder la synthèse des acides cinnamiques, il faut accéder spécifiquement à chacun des aldéhydes correspondants. Ceci implique l'utilisation de groupements protecteurs et orienteurs différents.

Il est aussi impératif de protéger les aldéhydes nitrés en ortho, qui sont particulièrement sensibles à la dégradation photochimique, suivant un processus du type<sup>24</sup> :



Toutes les synthèses en série 3, 4-dihydroxy- sont élaborées à partir de la vanilline (3-méthoxy-4-hydroxy-benzaldéhyde). Le groupement méthyle semble être, à la base, un bon groupement protecteur.

#### VIII-2-1-1. L'acide 2-nitrocaféique



L'acétylation se fait aisément à froid, dans un système biphasique éther / soude aqueuse avec un rendement de 80 %.

**La nitration est effectuée à - 20°C.** Encore une fois, si la température remonte au dessus de -10°C, on observe un dégagement de dioxyde d'azote et polymérisation du milieu. La désacétylation est effectuée immédiatement en jetant le précipité dans de la soude aqueuse<sup>23</sup>. Le rendement est de 75 %.

Après séchage, **la condensation de Knoevenagel** est effectuée. Les conditions optimales sont obtenues de façon empirique. Après de nombreux essais, il est apparu qu' en laissant **le mélange acide malonique / pyridine / pipéridine 2 jours à 50°C puis 3 heures à 100°C**, le rendement atteint 80 %. Mac Donald<sup>25</sup> traite le milieu réactionnel en évaporant *in vacuo* la pyridine et la pipéridine et cristallise le résidu par un mélange acétone / eau. En utilisant ce procédé, nous n'avons pas obtenu le produit désiré.

La réaction de déméthylation fut pour toutes les synthèses la plus délicate.

Les méthodes employées sont très diverses. Pérez<sup>26</sup> cite pour l'obtention des 2,3 et 3,4-dihydroxy-nitrobenzaldéhydes les méthodes suivantes :

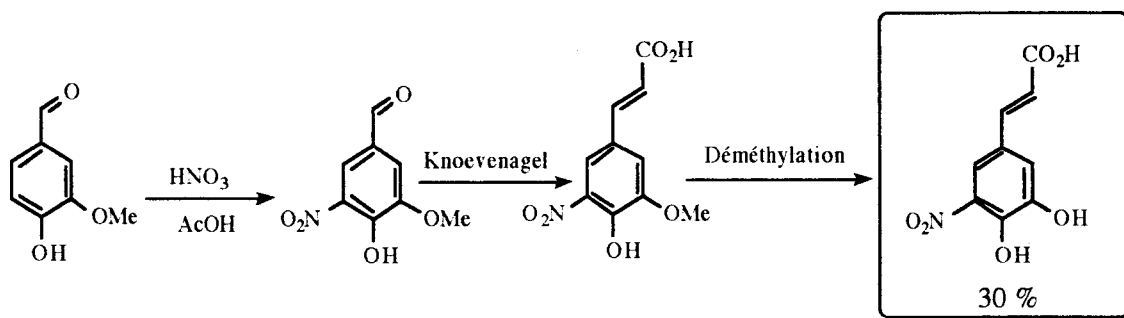
- (1)  $\text{AlCl}_3$  / pyridine /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + (2)  $\text{HCl}$  /  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>27</sup>
- $\text{HBr}$  /  $\text{AcOH}$  / 150°C<sup>28</sup>
- $\text{BBr}_3$  /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ <sup>29</sup>

On peut aussi citer l'utilisation de l'iodure de triméthylsilane  $\text{ISiMe}_3$ <sup>30</sup>, qui peut apporter des résultats intéressants. Dans notre cas, même à très basse température, le résidu réactionnel est une pâte brune ne présentant plus les couplages caractéristiques de 16 Hz correspondants aux protons de la double liaison E.

Le but de l'approche synthétique étant de développer un chemin univoque de synthèse, toutes ces méthodes furent essayées et la déméthylation au moyen du tribromure de bore s'est avérée la plus prometteuse. Les rendements sont en effet, du moins en série 3, 4-dihydroxy -, bien meilleurs et le traitement du milieu réactionnel plus aisé que pour les méthodes alternatives, dans lesquelles de grands volumes de lavage et un grand nombre d'opérations sont nécessaires, même pour une petite quantité de produit.

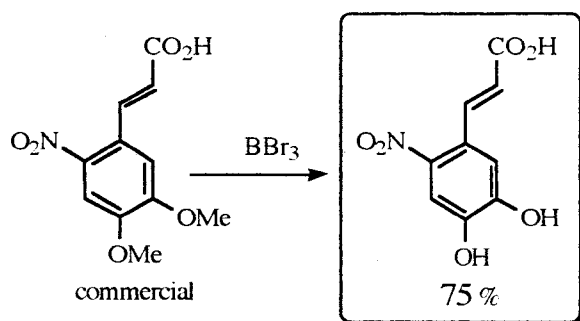
Dans cette série, **la déméthylation par  $\text{BBr}_3$  en large excès** (10 équivalents, alors que Mc Omie<sup>29</sup> préconise l'emploi d'un équivalent par groupement méthoxy plus un équivalent par groupement potentiellement complexant (CHO, CN, COOH) **au reflux du dichlorométhane et sous azote** permet l'obtention, après traitement au noir animal, filtration sur Célite et reprécipitation dans un mélange acétone / eau, d'un rendement de 50 à 60 % en produit pur. Toutes les tentatives de recristallisation ont échoué, ne laissant à disposition qu'un matériau pulvérulent mais pur.

### VIII-2-1-2. L'acide 5-nitrocaféique



Le dérivé méthoxylé est synthétisé suivant le mode opératoire préconisé par Pearl<sup>31</sup>. La **nitration** est effectuée à  $T < 10^\circ\text{C}$ , la **condensation de Knoevenagel** en **6 jours à température ambiante puis 2 heures à  $100^\circ\text{C}$** , la **déméthylation** au  $\text{BBr}_3$  en **une nuit, au reflux de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sous azote**. Le rendement global en produit pur est de 30 %.

### VIII-2-1-3. L'acide 6-nitrocaféique

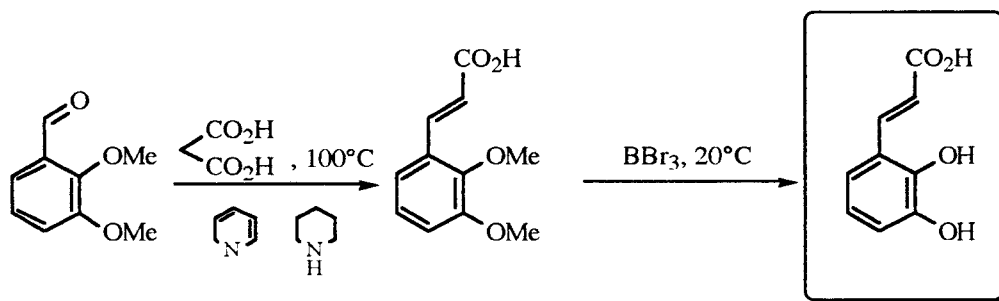


La **déméthylation** est effectuée en **une nuit, au reflux de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sous azote**. Le rendement est de 75 % en produit pur.

### VIII-2-2 Les acides 2, 3-dihydroxy- 4-, 5- et 6- nitrocinnamiques (acides nitro-anthénobiliques)

Ces synthèses n'ont guère abouti aux produits finaux. Il est cependant relativement aisé d'arriver aux aldéhydes dihydroxylés correspondants par l'action du tribromure de bore à reflux. Les rendements globaux ne dépassent que rarement 25 % à ce niveau. L'utilisation de divers groupes protecteurs fut tentée.

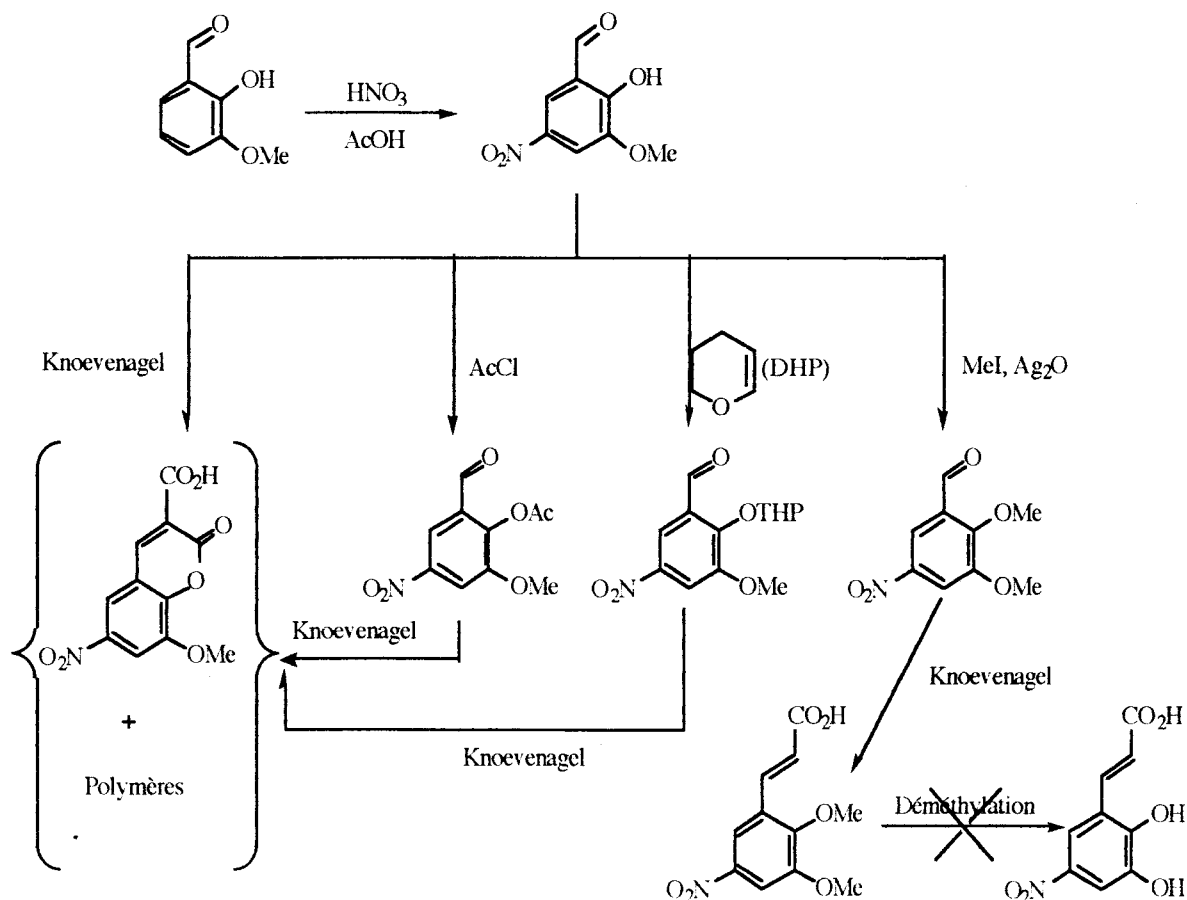
En préambule, la synthèse de l'acide 2, 3-dihydroxycinnamique a été effectuée :



La condensation de Knoevenagel se fait avec un rendement de 95 %. La déméthylation, après 2 semaines de réaction et 20 équivalents de  $\text{BBr}_3$  donne un résidu brut contenant plusieurs espèces; on observe une isomérisation de la double liaison (doublet couplé à 8 Hz à proximité des doublets couplés à 16 Hz des protons de la double liaison E). De plus une quantité importante de produit semble dissoute dans la phase aqueuse (coloration brune foncée; on pourrait supposer qu'il existe une polymérisation importante). Finalement, on obtient un rendement d'à peine 15 % en produit désiré.

#### VIII-2-2-1. L'acide 5-nitroanthénoblique

Les premières séquences réactionnelles exploitées sont illustrées sur le schéma suivant.

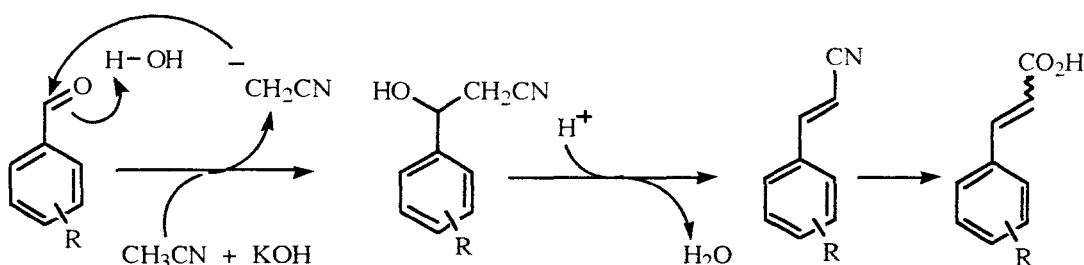


La synthèse du 2-hydroxy- 3-méthoxy- 5 nitrobenzaldéhyde<sup>32</sup> se fait avec un rendement de 80 %.

Ensuite, à l'instar des données recueillies par Jones<sup>33</sup>, si la fonction phénol située en ortho de l'aldéhyde n'est pas protégée ou protégée par un groupement trop labile dans les conditions de la condensation, on observe la formation de dérivés d'acide coumarine-3-carboxylique. L'ouverture du cycle et la décarboxylation n'ont pu être obtenus.

La méthylation du phénol libre se fait avec un rendement de 75 %. La condensation se fait alors avec un rendement de 80 %, mais la déméthylation est inobservable. Les tentatives de Dey<sup>34</sup> en présence d'AlCl<sub>3</sub> ou d'HBr sont donc confirmées, même si on utilise BBr<sub>3</sub>. Cependant, avec ce réactif et au reflux du dichlorométhane, après 10 jours de réaction, on n'obtient plus qu'un résidu brun résineux inexploitable. Toutes les tentatives pour trouver le "juste milieu" ont échoué.

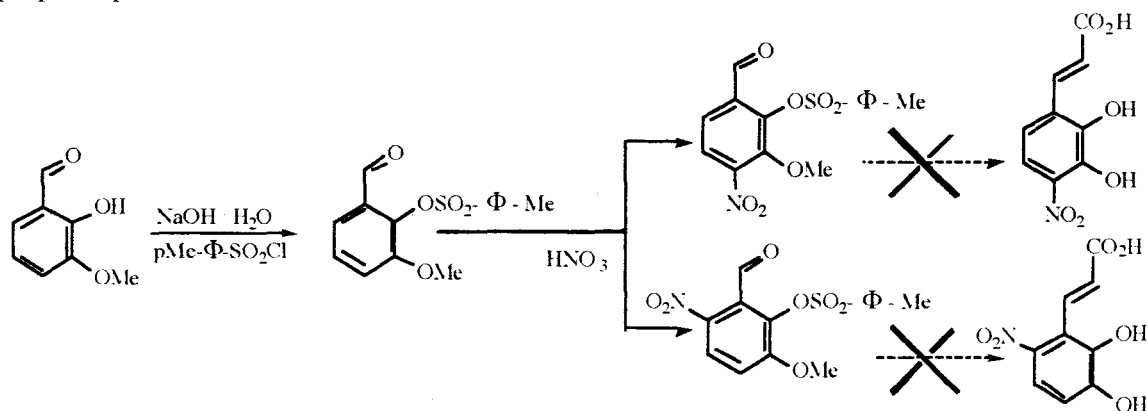
Une alternative est possible : en utilisant une fonction dérivée d'acide mais non réagissante avec les groupements phénoliques, il serait possible d'effectuer la condensation. La réaction utilisée est la suivante<sup>35</sup> :



Cependant, les mélanges obtenus contiennent en proportions similaires les formes E et Z du cinnamoyl nitrile. De plus, les rendements à ce niveau ne dépassent guère les 50 %. Enfin, les conditions drastiques nécessaires à l'hydrolyse du nitrile en acide carboxylique font chuter de façon catastrophique les rendements globaux.

#### VIII-2-2-2. Les acides 4- et 6- nitroanthénobiliques

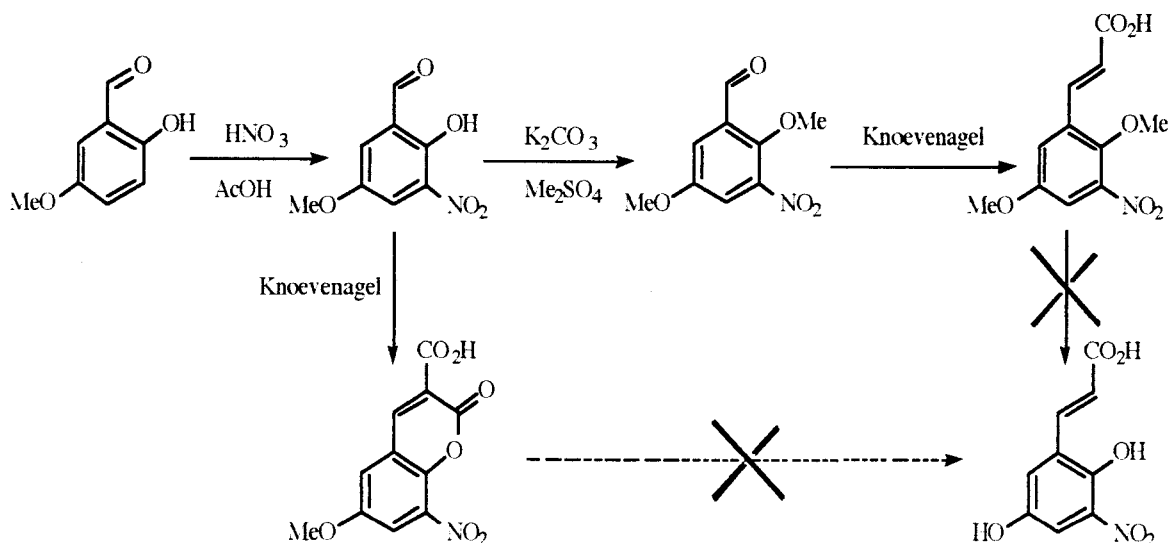
Les résultats sont analogues avec les dérivés 4-nitro- et 6-nitro-, dont les aldéhydes furent préparés par des méthodes connues<sup>23, 26</sup>:



VIII-2-3. Les acides 2, 5-dihydroxy-3-, 4- et 6-nitrocinnamiques (acides 3-, 4-, 6-nitrogrévilliques)

Des manipulations similaires ont rencontré les mêmes problèmes que ceux observés dans la série 2, 3- dihydroxy-. Les acides cinnamiques méthoxylés sont accessibles avec des rendements globaux d'environ 50 %, au moyen des protocoles suivants.

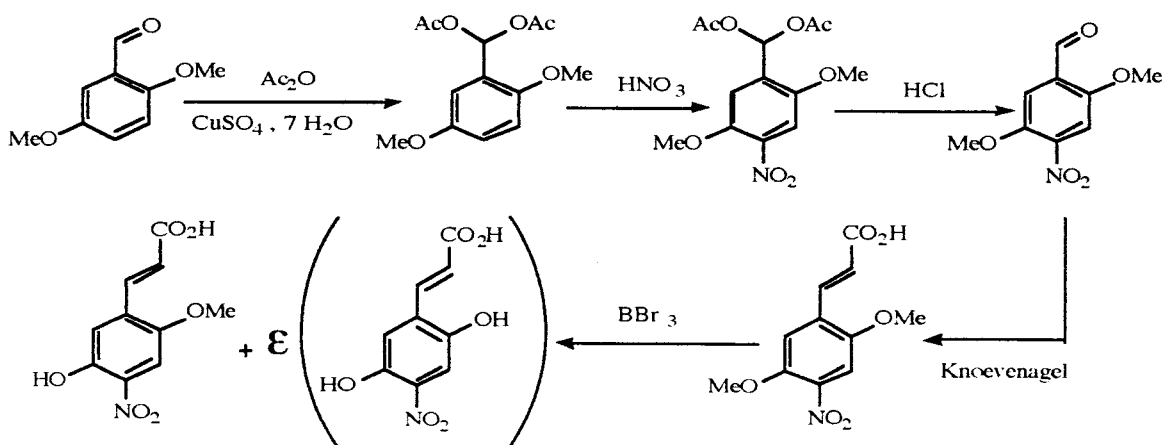
VIII-2-3-1. L'acide 3-nitrogrévillique<sup>36</sup> :



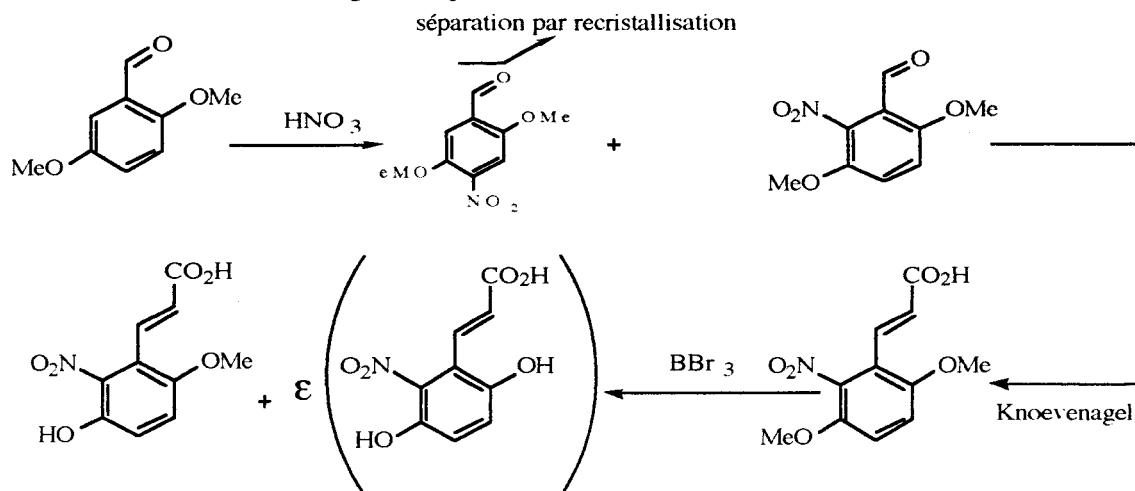
La condensation de Knoevenagel est effectuée à 100°C pendant une nuit. Le rendement est de 80 %.

Quelles que soient les conditions de déméthylation utilisées, le dérivé déméthylé n'est jamais obtenu : à température ambiante, pendant 3 semaines de réaction en présence de 10 équivalents de  $\text{BBr}_3$ , on retrouve une majorité de produit méthylé, en présence d'une trace de produit monométhylé. Si la température est augmentée, la résinification est irrémédiable.

VIII-2-3-2. L'acide 4-nitrogrévillique<sup>37</sup>



### VIII-2-3-3. L'acide 6-nitrogrévillique<sup>38</sup>



Les acides cinnamiques méthoxylés sont obtenus de façon analogue à la synthèse précédente.

Il est intéressant de noter que la déméthylation par  $\text{BBr}_3$  à température ambiante pendant une durée de 3 semaines - et ceci est aussi valable pour le dérivé 6-nitro - conduit à la formation du dérivé monométhylé en présence du dérivé déméthylé. Une étude de RMN par irradiation et effet NOE du groupement méthyle restant montre un accroissement du pic du proton de la double liaison extracyclique. Le groupement méthyle restant est donc celui de la position 2. En augmentant légèrement la température et en abandonnant la réaction plus longtemps, il est impossible d'obtenir le dérivé déméthylé pur. Une augmentation plus importante de la température est néfaste. La chromatographie, la recristallisation, l'entraînement à la vapeur se sont avérés complètement inefficaces dans le cadre d'une séparation.

Il a donc été décidé de stopper les recherches concernant la synthèse en série 2,3-dihydroxy- et 2,5-dihydroxy- pour mieux se consacrer aux **études physicochimiques concernant les dérivés nitrés de l'acide caféique**

o o o o o o o o o

## Références bibliographiques

### VI-VII - Stratégie de recherche. Elaboration du projet

- 1 - J. Bruneton, "Composés polyphénoliques, acétates et shikimates" dans "*éléments de phytochimie et de pharmacognosie*", Techniques et Documentation Lavoisier, 123-185 (1987)
- 2 - H. Sakagami, T. Ohhara, K.H. Kohda & Y. Kawazoe, "Lignified materials as a potential medicinal resource. IV.déhydrogenation polymers of some phenylpropenoids and their capacity to stimulate PMN cell iodination", *Chem. Pharm.Bull.*, **39**, 950-955 (1991)
- 3 - H. Nakashima, T. Murakami, N. Yamamoto, T. Naoe, Y. Kawazoe, K. Konno & H. Sakagami, "Lignified materials as a potential medicinal resource. V . anti-H.I.V. activity of some synthetic lignins, *ibid.*, **40**, 2102-2105 (1993)
- 4 - D. H. Kim & M.H. Jung, "Antioxidant activity of mixed tocopherols, caffeic acid, ferulic acid and rosemary extract", *Nonglim Nonjip*, **30**, 113-124 (1990) < CA 117 : 211042m >
- 5 - D. Barrerra-Arellano & W. Esteves, "Antioxidant activity of phenolic substances in aqueous and lipid system", *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **9**, 107-114 (1989) < CA 112 : 137701e >
- 6 - E.M. Marinova, "Inhibited oxidation of lipid. II . comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acid", *Fett. Wiss Technol.*, **94**, 428-432 (1992)
- 7 - S. Capelle, B. Planckaert, P. Cotelle, J-P Catteau, "Hydroxyl radical scavenging activity of salicylic acid and its hydroxylated metabolites. An ESR study", *J. Chim. Phys.*, **89**, 561-566 (1992)
- 8 - M.E. Cuvelier, H. Richard & C. Berset, "Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure-activity relationships", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 324-325 (1992)
- 9 - E. Graf, "Antioxidant potential of ferulic acid", *Free Radical Biol. Med.*, **13**, 435-448 (1992)
- 10 - H. Iwahashi, T. Ishii, R. Sugata & R. Kido, "The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride and hydrogen peroxide", *Arch. Biochem. Biophys.*, **276**, 242-247 (1990)
- 11 - G.J. Kontoghiorghes, "In vitro screening of iron chelators using models of free radicals damage", *Free Rad. Res. Comms.*, **2**, 115-124 (1986)
- 12 - R. Poupko & I. Rosenthal, "Electron transfer interactions between superoxide ion and organic compounds", *J. Phys. Chem.*, **77**, 1722-1724 (1973)
- 13 - A. Frimer & I. Rosenthal, "Nucleophilic radical aromatic substitution with superoxide ion", *Tetrahedron Letters*, 2809-2812 (1976)



- 14- R. Shridhar, "Accelerated oxygen consumption by catecholamines in the presence of aromatic nitro and nitroso compounds. Implications for neurotoxicity of nitro compounds", dans "*Oxygen and oxy-radicals in chemistry and biology*", Academic press, 363-370 (1981)
- 15- Y. J. Suzuki, M. Tsuchiya, Y. Shindo & L. Packer, "Antioxidant properties of nitecapone (OR-462)", *Free Radical Biol. Med.*, **13**, 517-525 (1992)

### **VIII - Synthèse. Partie Théorique**

- 16- W.M. Weaver, "Introduction of the nitro group into aromatic systems", dans "*The chemistry of the nitro and nitroso groups*", H. Feuer ed., Wiley Interscience, 1-49 (1970)
- 17- F. Kehrmann, M. Sandoz & R. Monnier, "Nitro derivatives of Quinol", *Helv. Chim. Act.*, **4**, 941-952 (1921)
- 18- V. Polgatti, J.A. Valderrama & R.A. Tapia, "Studies on quinones XIX : improved synthesis of 2-nitro-1,4-benzoquinone and its reaction with nucleophiles", *Synth. Comms.*, **20**, 1085-1090 (1990)
- 19- D.H. Rosenblatt, J. Epstein & M. Levitch, "Some nuclearly substituted catechols and their acid dissociation constants", *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3277-3278 (1953)
- 20- I.M. Tatakis & P.M. Hadjimihalakis, "Influence of the heterocyclic side ring on orientation during nitrations of 1,2-alkylenedioxy-annulated benzenes and their mononitro derivatives", *J. Heterocycl. Chem.*, **28**, 625-634 (1990)
- 21- K. Kürschner & R. Peikert, "Nitro and amino lignins", *Zellstoff-Faser*, **32**, 19, 1935 < CA, **29**, 5442<sup>1</sup> (1935) >
- 22- J.R. Johnson, "The Perkin reaction and related reactions", dans "*Organic reactions*", Adams ed., Wiley, **I**, 210-265 (1942)
- 23- M. Julia, P. Manoury & J. Voillaume, "Recherches en série indolique. XIV : sur des méthoxy-5 hydroxy-4, méthoxy-5 hydroxy-6 et méthoxy-7 hydroxy-6 tryptamines", *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1417-1423 (1965)
- 24- Y.L. Show, "Photochemistry of nitro and nitroso compounds", dans "*The chemistry of the nitro and nitroso groups*", H. Feuer ed., Wiley Interscience, 181-290 (1970)
- 25- E. Mc Donald & A. Suksamram, "Design of the substrate for oxidative phenol coupling. An efficient synthesis of the c-homoerythrinan skeleton", *J.C.S. Perk. Trans I*, 440-446 (1978)
- 26- R.A. Pérez, E. Fernandez-Alvarez, O. Nieto & F.J. Piedrafita, "Dihydroxynitrobenzaldehydes and hydroxymethoxy-nitrobenzaldehydes : synthesis and biological activity as catechol-O-methyltransferase inhibitors", *J. Med. Chem.*, **35**, 4584-4588 (1992)
- 27- F.G.H. Lee, D.E. Dickson, J. Suzuki, A. Zirnig & A.A. Manian, "Synthesis of 5, 7- and 6, 7 - disubstituted tryptamines and analogs (1)", *J. Heterocycl. Chem.*, **10**, 649-654 (1973)
- 28- M.V. Bhatt & S.U. Kulkarni, "Cleavage of ethers", *Synthesis*, 249-282 (1983)

- 29- J.F.W. Mc Omie M.L. Watts & D.E. West , "Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide", *Tetrahedron* , **24**, 2289-2292 (1968)
- 30- M.E. Jung, "Quantitative dealkylation of alkyl ethers via treatment with trimethyl silyl iodide : a new method for ether hydrolysis", *J. Org. Chem.* , **42**, 3761-3764 (1977)
- 31- I.A. Pearl & D.L. Beyer , "Reactions of vanillin and its derived compounds. XI. cinnamic acids derived from vanillin and its related compounds", *J. Org. Chem.*, **15**, 216-221 (1950)
- 32- J. Davies, "Substitution in vicinal trisubstituted benzene derivatives", *J. Chem. Soc.*, 1583-1593 (1923)
- 33- G. Jones, "The Knoevenagel condensation", dans "*Organic reactions*", Adams ed., Wiley , **15** , 204-599 (1967)
- 34- B.B. Dey & V. Ammalu-Kutti , "Nitration and halogenation of 8-methoxy and 8-hydroxycoumarins", *Proc. Natl. Inst. Sci. India*, **6**, 641-669 (1940)
- 35- S.A. Dibiase, B.A. Lipisko, A. Haag, R.A. Wolak & G.W. Gokel , "Direct synthesis of  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated nitriles from acetonitrile and carbonyl compounds : survey, crown effects, and experimental conditions", *J. Org. Chem.* , **44**, 4640-4649 ( 1979)
- 36- R. Baker & J-L Castro , "Total synthesis of Macbecin I", *J.C.S. Perk. Trans I*, 47-65 (1990)
- 37- P. Cotellet & J-P Catteau , "Selective synthesis of 2, 5-dimethoxy-4-nitro-benzaldehyde", *Synth. Comms.* , **22**, 2071-207 (1992)
- 38- L. Rubenstein, "Substitution in derivatives of quinol ethers", *J. Chem. Soc.*, 1998-2004 (1925)

○○○○○○○○

*Etude physico-chimique*

## Généralités

Les spectres UV ont été enregistrés au moyen d'un appareil à double faisceau PERKIN-ELMER LAMBDA 15 en utilisant des cuves en quartz de trajet  $L = 1$  cm.

Les spectres de RPE ont été obtenus sur un appareil VARIAN E 109, fonctionnant en bande X, équipé d'un système à température variable et d'une cavité E 238 opérant dans le mode TM.

Les paramètres utilisés sont les suivants

- champ magnétique centré sur 3350 G
- constante de temps : 0,25 s
- fréquence de modulation : 100 KHz
- fréquence micro-ondes : 9,44 GHz
- puissance micro-ondes : 10 mW

Le programme de simulation de spectres a été inspiré de la publication suivante :

U.W. Oehler & E.G. Janssen, "Simulation of isotropic electron spin resonance spectra : a transportable basic program", *Can. J. Chem.*, **60**, 1542-1548 (1982)  
et a été adapté par M. B. Planckaert.

Le programme de calcul Mac Lachlan a, quant à lui été directement inspiré de :

A.D. Mc Lachlan, *Mol. Phys.*, **3**, 233 (1960).

L'appareillage utilisé pour l'enregistrement des voltammogrammes est constitué d'un pilote TACUSSEL TPPRT commandé par le logiciel "Voltammétrie cyclique" édité par la même firme.

L'électrode de travail est une électrode de platine fixe TACUSSEL de diamètre 1 mm.

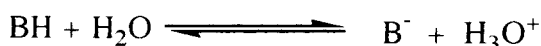
○○○○○○○○

## IX- Détermination des pKa en milieu aqueux par Spectrométrie UV

### IX-1. Principe de la méthode

Le comportement des molécules polyphénoliques<sup>1</sup> et polyphénoliques nitrées<sup>2</sup> vis-à-vis de l'oxygène et des radicaux libres oxygénés est particulièrement sensible aux conditions de pH. Il semble donc nécessaire de déterminer ces constantes de manière à cibler plus précisément les espèces chimiques sur lesquelles les manipulations sont effectuées. Dans le cas des composés étudiés, la méthode potentiométrique n'a pas donné de résultats exploitables. En effet, de manière à éviter des variations volumiques trop importantes, il est nécessaire, dans les zones de pH extrêmes, d'utiliser de la soude en poudre ou de l'acide chlorhydrique concentré. Le tracé des courbes  $\text{pH} = f(V)$  se trouve donc faussé par cette manoeuvre et empêche toute reproductibilité des manipulations. L'alternative spectrophotométrique exploitant l'équation de Henderson-Hasselbach<sup>3,4</sup> lui a donc été préférée.

Un équilibre acido-basique est généralement décrit par :



La concentration totale en soluté est  $C_0 = C_{\text{B}^-} + C_{\text{BH}}$  (1)

La constante d'équilibre est donnée par  $K_a = \frac{C_{\text{B}^-}(\text{H}_3\text{O}^+)}{C_{\text{BH}}}$  (2)

et l'absorbance mesurée par

$$A_{\text{exp}} = A_{\text{BH}} + A_{\text{B}^-} = (\epsilon_{\text{BH}}C_{\text{BH}} + \epsilon_{\text{B}^-}C_{\text{B}^-})d$$

La longueur de cuve est de  $d = 1 \text{ cm}$  dans notre cas

On en déduit

$$A_{\text{exp}} = A_{\text{BH}} + A_{\text{B}^-} = \epsilon_{\text{BH}}C_{\text{BH}} + \epsilon_{\text{B}^-}C_{\text{B}^-} \quad (3)$$

En combinant (1) et (3) on obtient

$$C_{\text{B}^-} = \frac{A_{\text{exp}} - \epsilon_{\text{BH}}C_0}{\epsilon_{\text{B}^-} - \epsilon_{\text{BH}}} \quad \text{et} \quad C_{\text{BH}} = \frac{A_{\text{exp}} - \epsilon_{\text{B}^-}C_0}{\epsilon_{\text{BH}} - \epsilon_{\text{B}^-}}$$

En appliquant ces 2 égalités à (2) on obtient

$$K_a = \frac{A_{\text{exp}} - \epsilon_{\text{BH}}C_0}{\epsilon_{\text{B}^-}C_0 - A_{\text{exp}}} (\text{H}_3\text{O}^+) \quad \text{si}$$

$\epsilon_{\text{BH}}C_0$  représente l'absorbance de la solution en milieu acide (forme protonée) et

$\epsilon_{\text{B}^-}C_0$  l'absorbance de la solution en milieu basique (forme déprotonée) on a

$$\epsilon_{\text{BH}}C_0 = A_{\text{BH}} \quad \text{et} \quad \epsilon_{\text{B}^-}C_0 = A_{\text{B}^-} \quad \text{d'où} \quad K_a = \frac{A_{\text{exp}} - A_{\text{BH}}}{A_{\text{B}^-} - A_{\text{exp}}} (\text{H}_3\text{O}^+) \quad \text{soit}$$

$$\log \frac{(A_{BH} - A)}{(A - A_{B-})} = pH - pK_a$$

- où  $A_{BH}$  représente l'absorbance du soluté à un pH acide (forme protonée)  
 $A$  représente l'absorbance du soluté au pH de l'expérience  
 $A_{B-}$  représente l'absorbance du soluté à un pH basique (forme déprotonée)

Le traitement des solutés en phase aqueuse ( $C_0 = 10^{-4}$  M) au moyen d'une solution de soude 1N dispensée à la micropipette permet de s'affranchir de la variation de volume (en général, la quantité de soude ajoutée n'excède pas 2 ml, en utilisant à chaque essai moins de 50  $\mu$ l pour un total de 100 ml).

La conservation des points isobestiques tout au long de l'expérience nous indique d'ailleurs que cette variation de volume est négligeable.

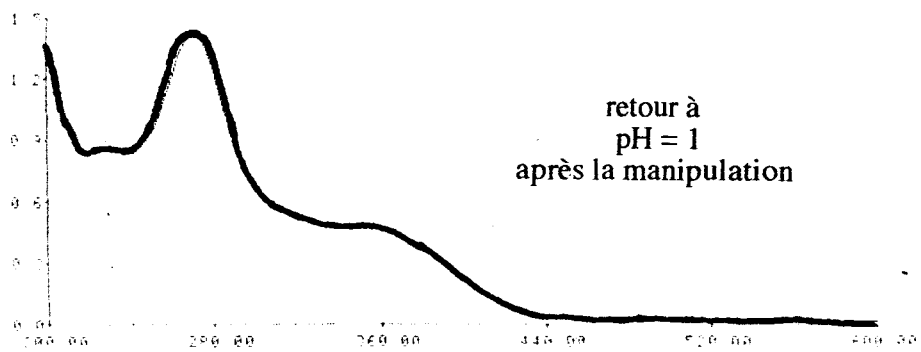
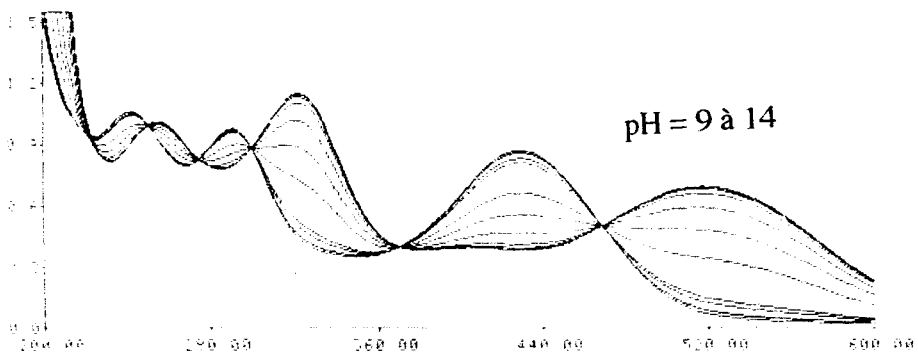
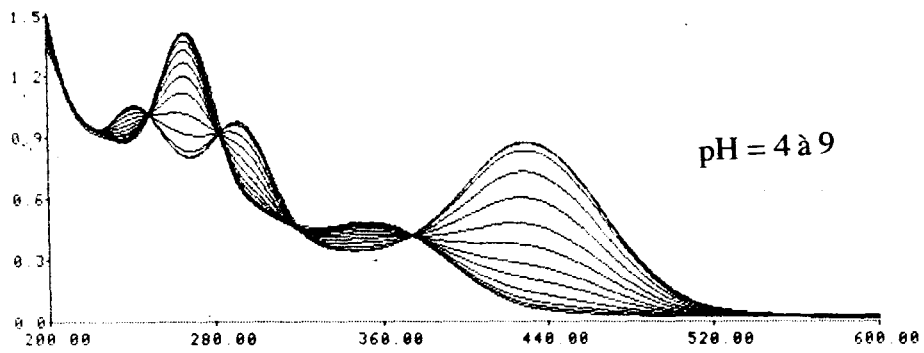
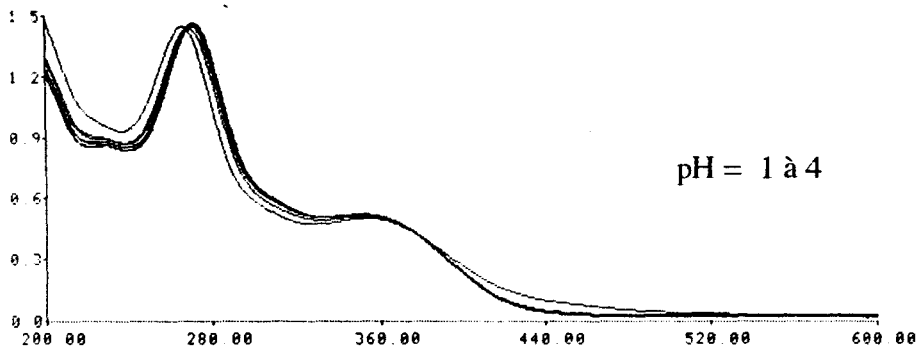
Dans le cas de polyacides, ces manipulations nécessitent des variations de pH faibles de manière à bien appréhender les valeurs minimales et maximales de l'absorbance entre chaque espèce. Entre chaque détermination de constante, les valeurs de  $A_{BH}$  et  $A_{B-}$  sont modifiées.

Dans la plupart des manipulations, les mesures sont faites à la longueur d'onde présentant la plus grande variation d'absorption au cours de l'équilibre envisagé. Par exemple, sur les tracés correspondants à l'étude de l'acide 6-nitrocaféique, la mesure de  $pK_{11}$  est effectuée à 266 nm, celle de  $pK_{12}$  à 430 nm.

Concernant la mesure de la première acidité ( $pK_{10}$ , mesure à 266 nm), il faut signaler l'absence de point isobestique. Ceci est aussi valable pour les autres acides caféiques ( $pK_1$ ,  $pK_4$  et  $pK_7$ ). La bande observée à 260 nm correspond à un amalgame de la bande d'absorption forte du chromophore carbonyle  $\alpha, \beta$  insaturé et de la bande faible due à une transition interdite du noyau benzénique (vibration de la molécule impliquant une distorsion du groupe de symétrie). Le passage de la forme  $COOH$  à la forme  $COO^-$  n'entraîne que peu de modification au niveau électronique. De ce fait, les spectres sont très semblables, sans apparition de point isobestique<sup>5</sup>. Tout au plus observe-t-on un déplacement hypsochrome de la bande couplée à une légère variation d'absorption dont on se sert pour calculer le  $pK$  de l'équilibre.

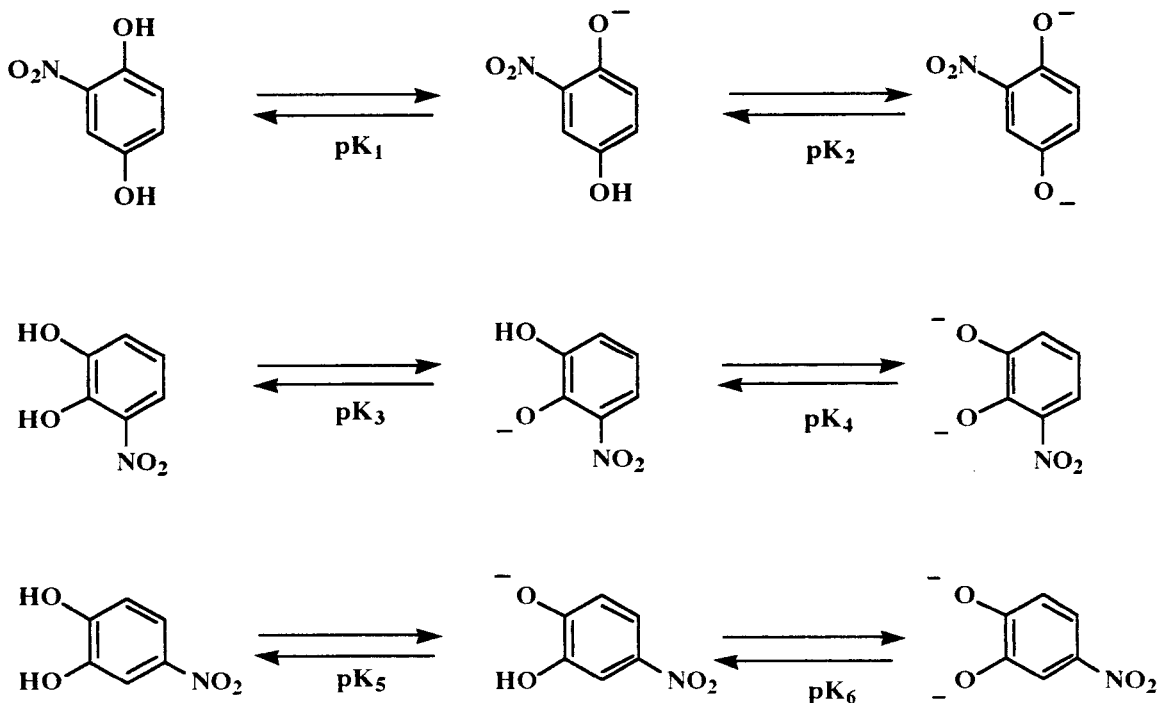
La page suivante illustre les variations d'absorbance en fonction du pH observées dans le cas de l'acide 6-nitrocaféique.

Les manipulations sont effectuées à 25°C sous atmosphère inerte dans de l'eau saturée en azote par bullage. On minimise ainsi l'autoxydation potentielle en milieu basique. On vérifie que la dégradation des produits est minimale en réacidifiant le milieu réactionnel à la fin de l'expérience et en comparant le spectre obtenu avec celui d'une solution fraîche du composé dans HCl 1N.



Evolution du spectre UV de l'acide 6-nitrocaféique  
en fonction du pH ( $C = 10^{-4}$  M)

IX-2. pKa des nitrodihydroxybenzènes



	pKa mesuré	$\lambda$ mesure (nm)	points isobestiques (nm)	maxima d'absorption (nm)
<b>pK1</b>	7,71	455	266 ; 321 ; 408	280 ; 390 455
<b>pK2</b>	11,35	532	372 ; 497	230 ; 458 ; 532
<b>pK3</b>	6,27	298	268 ; 320	230 ; 298 ; 420
<b>pK4</b>	13,07	355	244 ; 320	296 ; 432
<b>pK5</b>	6,73	425	252 ; 280 ; 370	240 ; 346 ; 422
<b>pK6</b>	12,1	425	378 ; 463	261 ; 385 ; 510



D'après la littérature, seuls les 3- et 4-nitrocatéchol furent soumis à une étude attentive quant à leur comportement acido-basique. Rosenblatt & coll.<sup>6</sup> ont déterminé les constantes  $pK_3$  et  $pK_5$  par une méthode similaire pour aboutir aux valeurs suivantes :

$$pK_3 = 6,66$$

$$pK_5 = 6,89$$

tandis que Nothnagel & coll.<sup>2</sup> reportent les données suivantes :

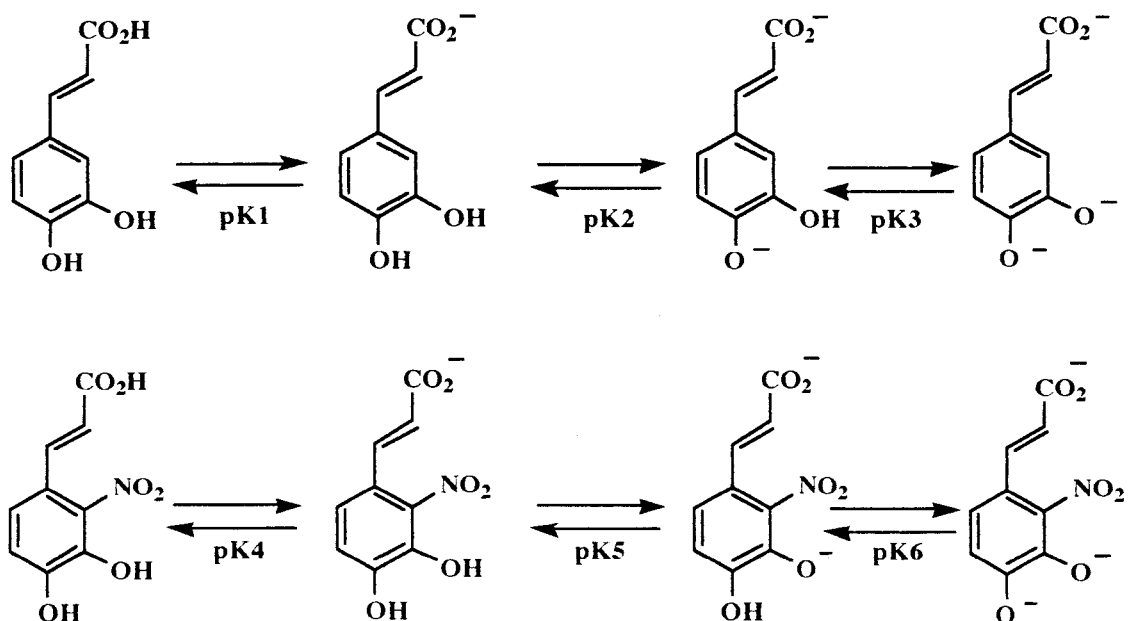
$$pK_5 = 7,19$$

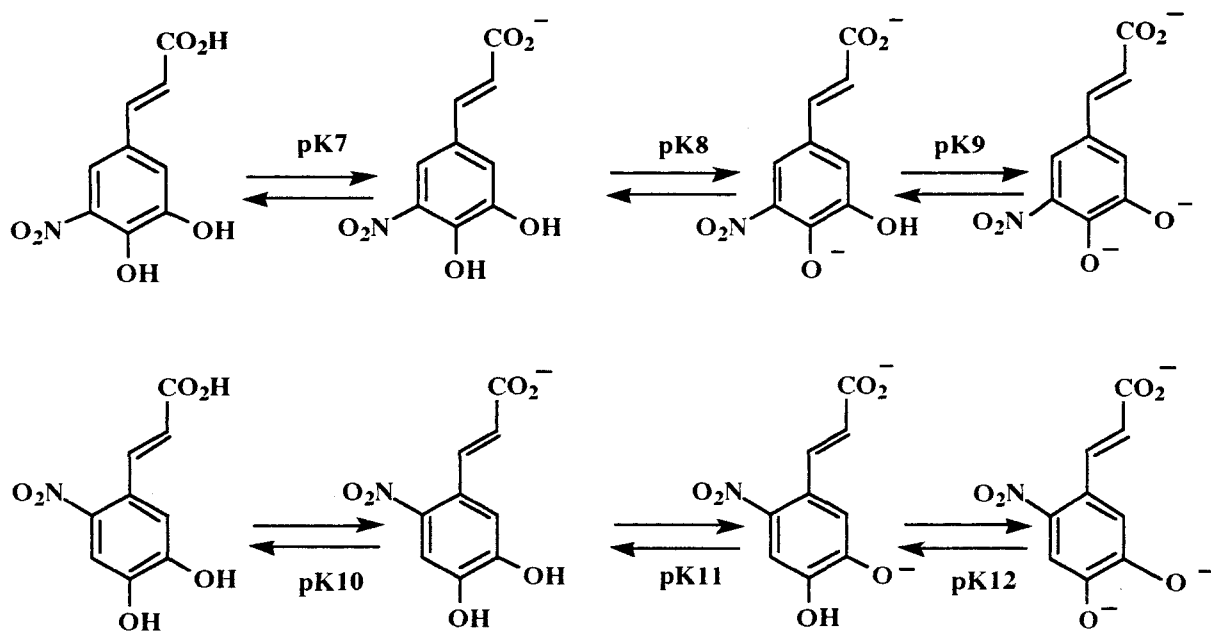
$$pK_6 = 11,29$$

Ces auteurs justifient l'équilibre postulé dans le cas du 4-nitrocatéchol par une étude des spectres Raman . La première déprotonation entraîne une migration de la densité électronique vers le groupement nitro et modifie fortement les modes de vibration de ce dernier alors que la seconde déprotonation qui se produit à un pH supérieur à 11 pousse l'excès d'électron vers le noyau aromatique et n'a que peu d'influence sur les modes de vibration de la molécule. Le "stress " acido-basique entraîne de considérables modifications aux niveaux électronique et vibrationnel sur ce type de composé. On peut penser qu'il en est de même pour le reste des solutés soumis à cette étude.

Les valeurs expérimentales, similaires sur deux ou trois manipulations sont en bon accord avec celles de la littérature (différence de 0, 2 à 0, 3 unité de pH), et on peut estimer que la méthode est applicable aux acides cinnamiques parents. En effet la différence de pH nécessaire entre deux dissociations pour que la méthode soit fiable doit atteindre 1,5 à 2 unités de pH<sup>4</sup>. En partant de l'hypothèse que le  $pK_a$  de la fonction acide carboxylique est compris entre 2 et 4 (acide cinnamique : 4,44 / acide 2-nitrobenzoïque : 2,16), nous nous retrouvons dans le bon cas de figure.

### IX-3. $pK_a$ des acides caféique et nitrocaféiques





	pKa mesuré	λ. mesure (nm)	points isobestiques (nm)	maxima d'absorption (nm)
<b>pK1</b>	3,89	312		212 ; 282 ; 312
<b>pK2</b>	8,37	339	233 ; 259 ; 317	339
<b>pK3</b>	12,25	339	282	339
<b>pK4</b>	1,53	209		209 ; 296
<b>pK5</b>	6,72	235	221 ; 261 ; 313	208 ; 235 ; 285 325
<b>pK6</b>	11,97	255	216 ; 254 ; 280 329	255 ; 361
<b>pk7</b>	2,3	217		217 ; 291
<b>pK8</b>	5,52	315	325	315
<b>pK9</b>	13,15	315	266 ; 325	315 ; 334
<b>pK10</b>	2,58	266		266
<b>pK11</b>	7,03	266	249 ; 285 ; 322 374	266 ; 430
<b>pK12</b>	12,24	430	251 ; 275 ; 299 369 ; 468	322 ; 430 ; 517

En 1994, au moyen de la même méthode, mais en utilisant un grand nombre de manipulations et un traitement informatique des données, Jovanovic<sup>7</sup> trouve les résultats suivants pour **l'acide caféique**

<b>pK1</b>	4,44
<b>pK2</b>	7,6
<b>pK3</b>	11,74

Les traitements statistiques particulièrement sophistiqués que l'auteur utilise réduisent vraisemblablement la marge d'erreur dans l'ensemble de ses manipulations et explique sûrement la différence avec les résultats relatés ici.

A titre de comparaison, les pKa des acides nitrocinnamiques ont été déterminés et placés en vis-à-vis des pKa des acides chlorocinnamiques recueillis dans la littérature <sup>8, 9</sup>.

	<b>pKa mesuré</b>	<b>λ mesure (nm)</b>		<b>pKa (littérature <sup>8, 9</sup>)</b>
<b>acide 2-nitro cinnamique</b>	3,03	242	<b>acide 2-chloro cinnamique</b>	4,23
<b>acide 3-nitro cinnamique</b>	4,17	263	<b>acide 3-chloro cinnamique</b>	4,29
<b>acide 4-nitro cinnamique</b>	3,89	311	<b>acide 4-chloro cinnamique</b>	4,41
<b>acide cinnamique (E)</b>				4,44

Les différences observées entre les acides nitrés et chlorés - en particulier au niveau des dérivés méta et para - sont explicables si l'on tient compte des phénomènes de désactivation électronique du cycle par la fonction nitro, particulièrement importants pour ce groupement puisqu'ils combinent un effet résonant puissant à un effet inducteur très important. La densité électronique au point d'ancrage de la chaîne alkylée est de ce fait moins importante pour les dérivés 2- et 4-nitro que pour le dérivé 3-. Par analogie, on retrouve le même phénomène chez les acides benzoïques :

	pKa (littérature <sup>8,9</sup> )		pKa (littérature <sup>8,9</sup> )
acide 2-nitro benzoïque	2,16	acide 2-chloro benzoïque	2,92
acide 3-nitro benzoïque	3,47	acide 3-chloro benzoïque	3,83
acide 4-nitro benzoïque	3,41	acide 4-chloro benzoïque	3,97
acide benzoïque			4,19

**NB** : les valeurs reportées dans ces tableaux sont les moyennes des résultats obtenues sur trois expériences consécutives. Pour un même composé, l' écart entre la valeur la plus faible et la valeur la plus élevée n'exède jamais 0.25 unité de pH .



#### IX-4. Conclusion

L' étude physico-chimique d'un composé présentant plusieurs équilibres de dissociation nécessite la connaissance des pKa correspondants. En effet, les variations de densité électronique au niveau des atomes de la molécule en fonction du pH peuvent avoir des conséquences structurales et réactionnelles importantes. La méthode spectrophotométrique est une méthode de choix pour la détermination des constantes d'acidité . Les résultats obtenus sont cohérents et reproductibles. Cependant, il est nécessaire de faire attention à l'écart entre les différentes acidités (les valeurs des pK doivent être au moins distantes de deux unités). La présence de plusieurs formes différemment protonées entraînerait des résultats faux. Une étude théorique préalable, au moyen des lois de Hammett ou par comparaison avec des molécules voisines connues, est donc nécessaire. De plus, il est recommandé d' effectuer un grand nombre de mesures pour obtenir des résultats précis, ce qui implique des manipulations longues et répétitives.

**Dans notre cas, à pH physiologique, les dérivés dihydroxy-nitro-benzéniques sont mono-dissociés, et les acides dihydroxy-nitro-cinnamiques sont deux fois dissociés, au niveau de la fonction acide et sur une des fonctions phénoliques. Cette dissociation est primordiale pour la solubilité des molécules considérées en milieu aqueux.**



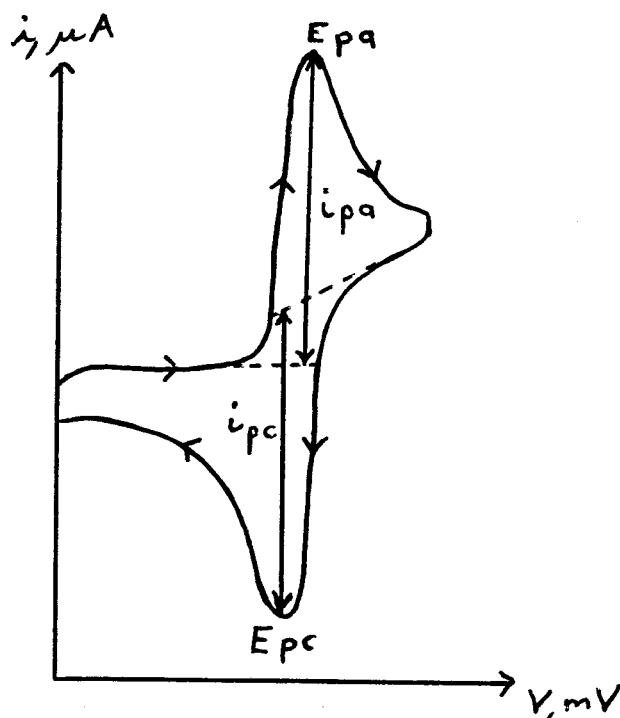
## X- Voltammétrie cyclique

Dans le but de connaître la réactivité des molécules étudiées vis-à-vis de l'oxygène, il semble important de déterminer les principaux paramètres électrochimiques les caractérisant : potentiels d'oxydation et de réduction, réversibilité des transferts électroniques. Dans ce but, la voltammétrie cyclique est une méthode de choix, puisqu'elle permet, après optimisation des paramètres de mesure, d'obtenir ces données sur un seul tracé.

### X-1. Principe de la mesure

Par l'intermédiaire d'un signal électrique en dent de scie appliqué à une électrode de travail, le potentiel de celle-ci est modifié linéairement en fonction du temps. En partant d'un potentiel pour lequel aucune réaction ne procède, on le modifie de manière à atteindre les zones où les réactions ont lieu. Lorsqu'elles sont mises en évidence, on inverse le sens du balayage pour aboutir à la zone où les réactions "opposées" se déclenchent. Le relevé des valeurs de l'intensité du courant en fonction du potentiel  $i = f(E)$  fournit le **Voltammogramme**<sup>10</sup>.

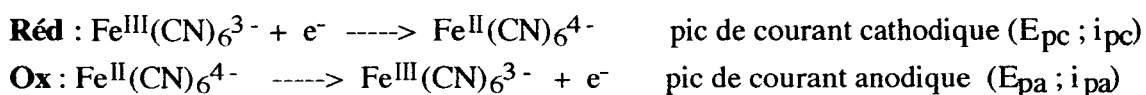
Dans le cas d'une simple réaction électrochimique réversible, on obtient le type de tracé suivant :



#### système réversible

- $i_{pa} / i_{pc} = 1$
- indépendant de la vitesse de balayage
- $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$  et  
 $\Delta E_p = 2, 3 RT / n$   
 $= 0, 06 / n$   
n étant le nombre d'électrons échangés lors du processus.

Dans ce cas , il n'existe qu'un transfert monoélectronique simple, d'un sens comme de l'autre. C'est ce que l'on observe par exemple lors des réactions de complexes du type :



Ce cas de figure très simple est peu souvent rencontré lors de l'étude de composés organiques multifonctionnels. En effet, les processus électrochimiques sont très souvent couplés à des réactions chimiques et rendent les diagrammes plus ou moins complexes. De plus, les effets de solvatation sont très importants, ainsi que les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la force ionique du milieu<sup>11</sup>...



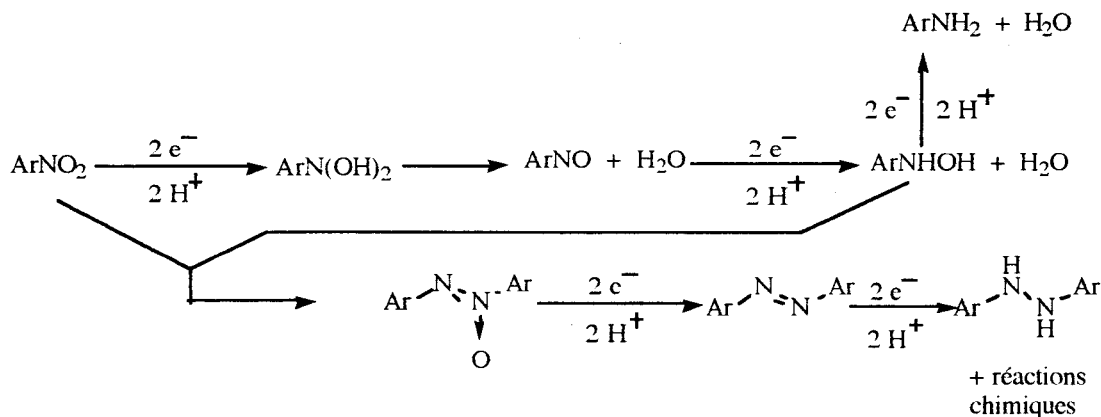
### X-2. Voltammétrie des composés phénoliques et nitroaromatiques

Les fonctions présentes dans les molécules étudiées ici (nitro et diphenol) sont dotées d'une électrochimie particulièrement riche.

Brièvement, dans le cas de la fonction phénol, on observe une influence drastique du pH et de la nature des substituants<sup>12</sup> :

- $E_{1/2}$  décroît de façon importante quand le pH augmente
- $E_{1/2}$  est déplacé vers les valeurs inférieures lorsque le phénol est substitué par des groupements électrodonneurs (OH, OMe,  $\text{NR}_2$ , R). L'effet est maximal lorsque la substitution prend place en ortho ou para de la fonction phénol. Le phénol est ainsi plus facilement oxydé. Inversement, **le phénol est moins facilement oxydé si les substituants qu'il porte sont électroattracteurs ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_2\text{R}$ , COR, halogène).**

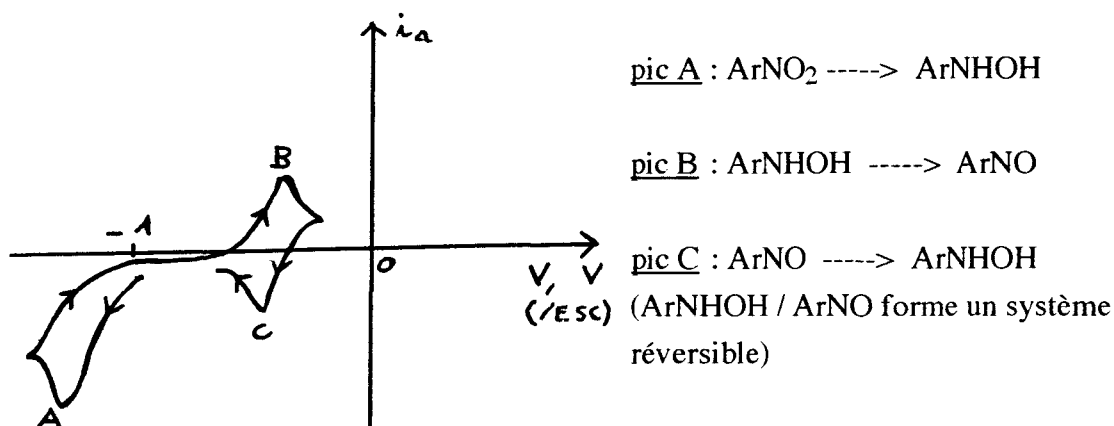
Concernant la fonction nitro, les études sont beaucoup plus complexes vu le nombre de réactions subséquentes à la réaction de réduction de la fonction nitro, en particulier en milieu aqueux<sup>13</sup> :



Dans ce cas, les réactions électrochimiques étant "souillées" par des réactions chimiques, les potentiels standards de réduction à un électron de la fonction nitro ne sont que très

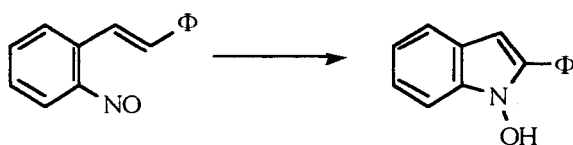
difficilement déterminables. La radiolyse pulsée sera dans ce cas d'un intérêt et d'une précision beaucoup plus grands<sup>14</sup>.

La réduction d'un nitrobenzène en milieu aqueux et acide est généralement schématisée par un voltammogramme qui a l'allure suivante :

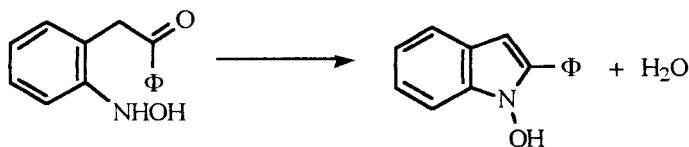


Suivant les substituants, on peut voir disparaître certains pics :

- dans le cas de l'o-nitrostilbène, le nitroso formé se cyclise pour donner un indole non électroactif : le pic C disparaît



- dans le cas de l'o-nitrophénylacétophénone, l'hydroxylamine évolue très vite pour se cycliser . Le pic B et *a fortiori* le pic C disparaissent



### X-3. Etude expérimentale. Voltammétrie en milieu aqueux en fonction du pH

L'application de la voltammétrie cyclique aux molécules diphenoliques nitrées fut menée dans différentes conditions.

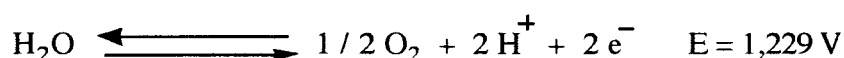
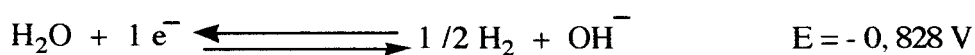
La vitesse de balayage a finalement été fixée à  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Le diamètre de l'électrode de travail en platine est de 1 mm

Les potentiels sont mesurés par rapport à l'électrode standard au calomel.

Les mesures sont effectuées sous atmosphère inerte pour éviter l'oxydation éventuelle des produits par l'oxygène de l'air.

L'existence de différentes formes protonées pour chacune des molécules testées a incité une étude voltammétrique en fonction du pH. Elle est effectuée dans l'eau, en présence de KCl 0,1 M. Les différents pH étudiés sont obtenus par addition de soude ou d'acide chlorhydrique. Notons que pour l'eau, les potentiels applicables limites sont donnés par les demi-couples suivants<sup>8</sup> :



Les bornes fixées seront donc - 800 mV et 1, 2 V.

### X-3-1. Etude des 3 et 4-nitrocatechols

Alors que le voltammogramme du catéchol exhibe un caractère de réversibilité ( $E_{1/2} = 414 \text{ mV}$  ;  $i_{pa} / i_{pc} = 0,85$ ), la fonction diphénolique des nitrocatechols semble passée sous silence en milieu aqueux. Quel que soient le pH et le sens de balayage initial, il est quasiment impossible d'oxyder leur fonction catéchol dans ces conditions. Ceci va dans le sens de l'effet attracteur du groupement nitro qui empêche la libération de l'électron. Cependant, dans le cas du 3-nitrocatechol uniquement, on peut tout de même observer qu'à pH acide, lors d'un balayage anodique suivi d'un cathodique, la fonction catéchol est oxydée en faible proportion et de façon irréversible ( $E_{1/2} = 510 \text{ mV}$ ).

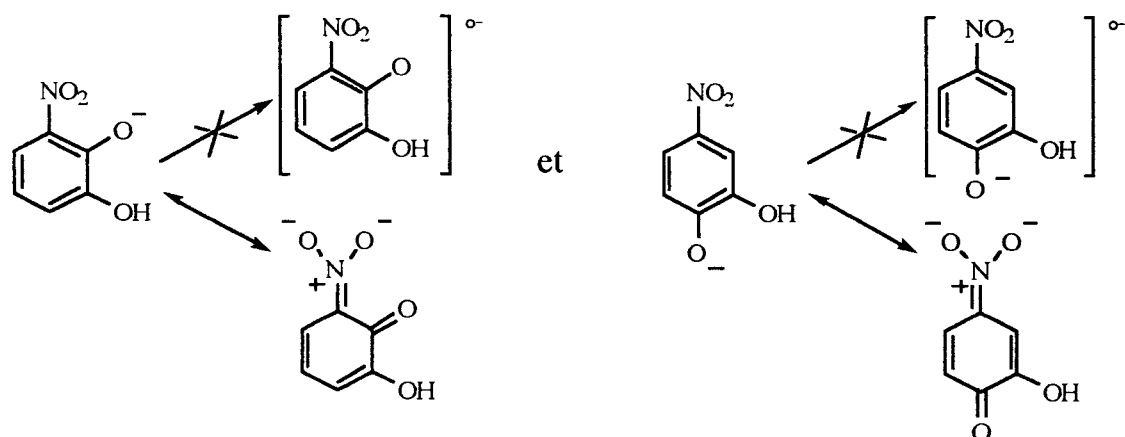
Le comportement de la fonction nitro est plus intéressant. Pour une valeur de pH donnée, l'intensité du pic de réduction diminue au fur et à mesure des cycles et il n'existe pratiquement pas de pic d'oxydation associé.

En passant d'un pH basique à un pH acide, on observe les variations suivantes de paramètres :

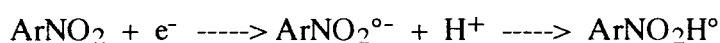
	3-nitrocatechol		4-nitrocatechol	
pH	E <sub>pc</sub> (mV)	i <sub>pc</sub> (μA)	E <sub>pc</sub> (mV)	i <sub>pc</sub> (μA)
0,95	- 560	6,1	- 580	19,8
7,4				
13,44	- 376	2,18	- 390	5,75



Les formes mono-anioniques observées à pH = 7, 4 ne présentent pas de pic de réduction. On peut expliquer ce fait par la stabilisation au moyen de la mésomérie suivante :



L'augmentation importante du courant cathodique lorsque l'on passe d'un pH basique à un pH acide peut être expliquée par le schéma suivant :



En milieu très acide, le radical-anion se comporte comme une base qui ne demande qu'à être protonée. Par exemple, Neta & coll. ont mesuré quelques pKa de radicaux-anions nitrés, qui se situent en général entre 2 et 3 (acide o-nitrobenzoïque : 2, 6 / p-dinitrobenzène : 2, 1 / acide 2, 4, 6 trinitrobenzoïque : 2)<sup>15</sup>.

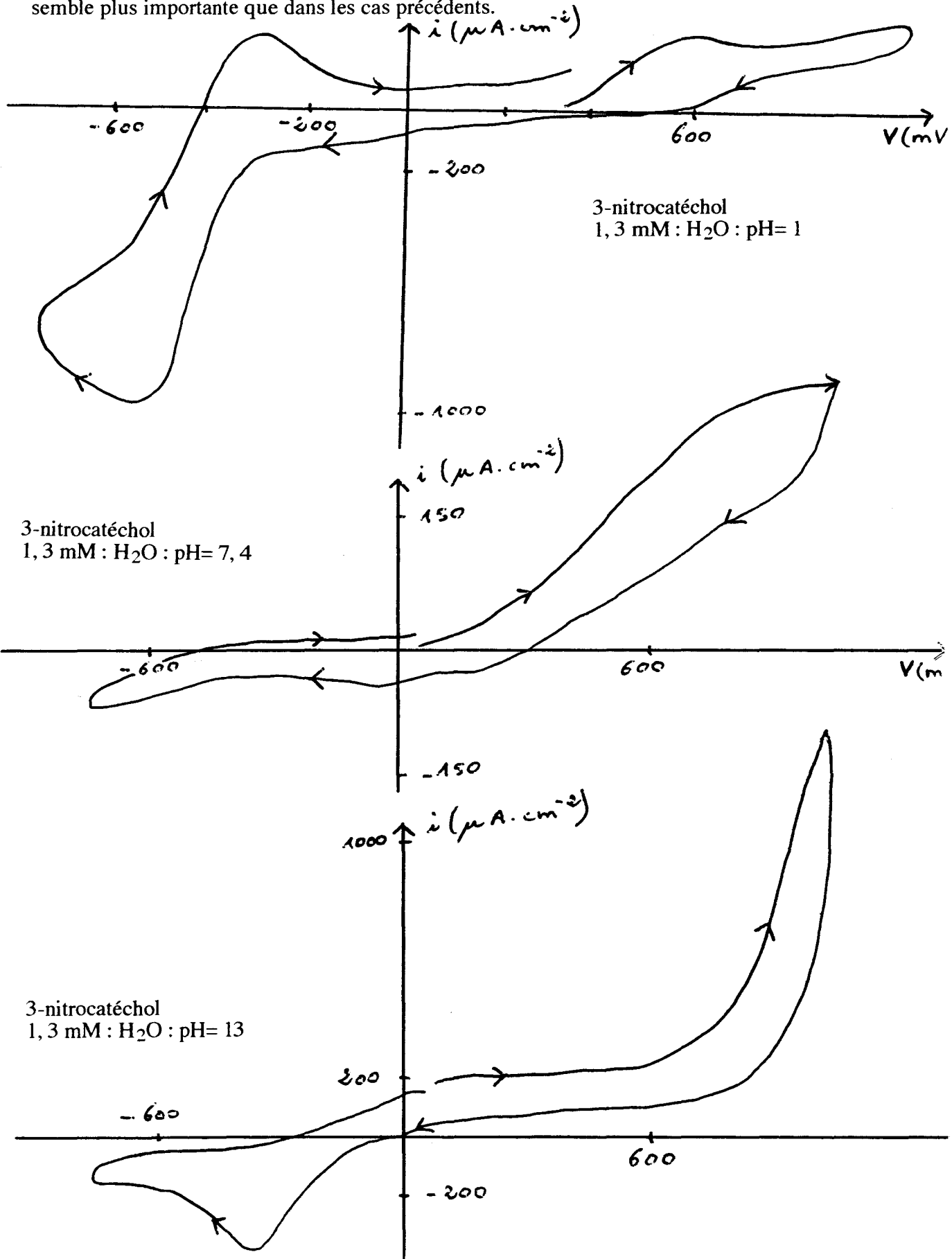
L'espèce protonée ainsi formée est stable électrochimiquement et peut en plus être fortement liée au solvant, empêchant ainsi la réversibilité du système.  $\text{ArNO}_2\text{H}^\circ$  s'accumule dans le milieu et le pic cathodique diminue au fur et à mesure des cycles. Après la réaction, dans chacun des cas, l'addition de soude au milieu réactionnel et la voltammétrie du mélange résultant conduit à un diagramme identique à ceux obtenus à pH = 7, 4. De plus, les spectres RMN des produits organiques extraits des milieux correspondent presque exclusivement à ceux des 3- et 4-nitrocatechols, respectivement.

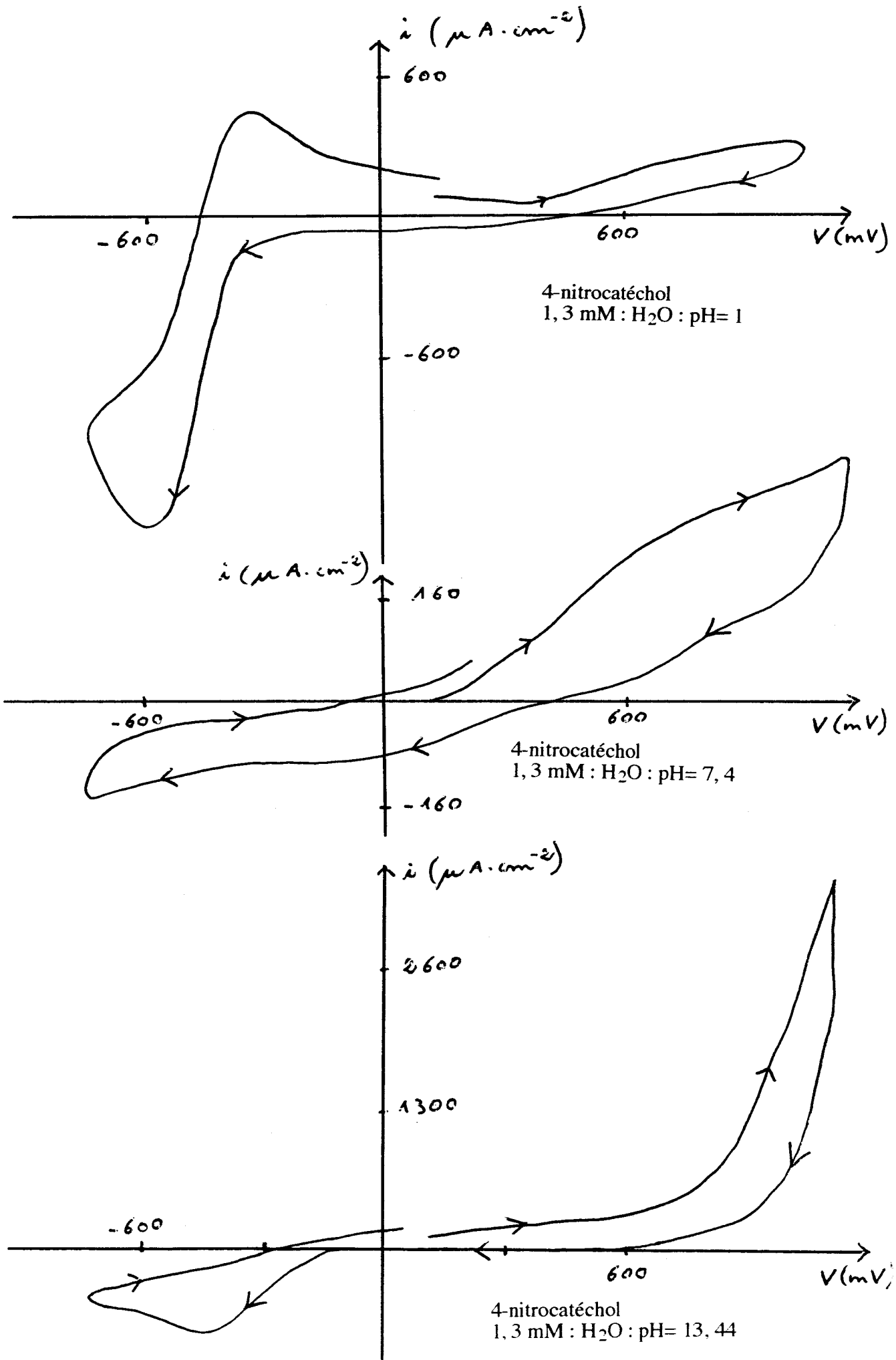
Les voltammogrammes sont collectés sur les pages suivantes.

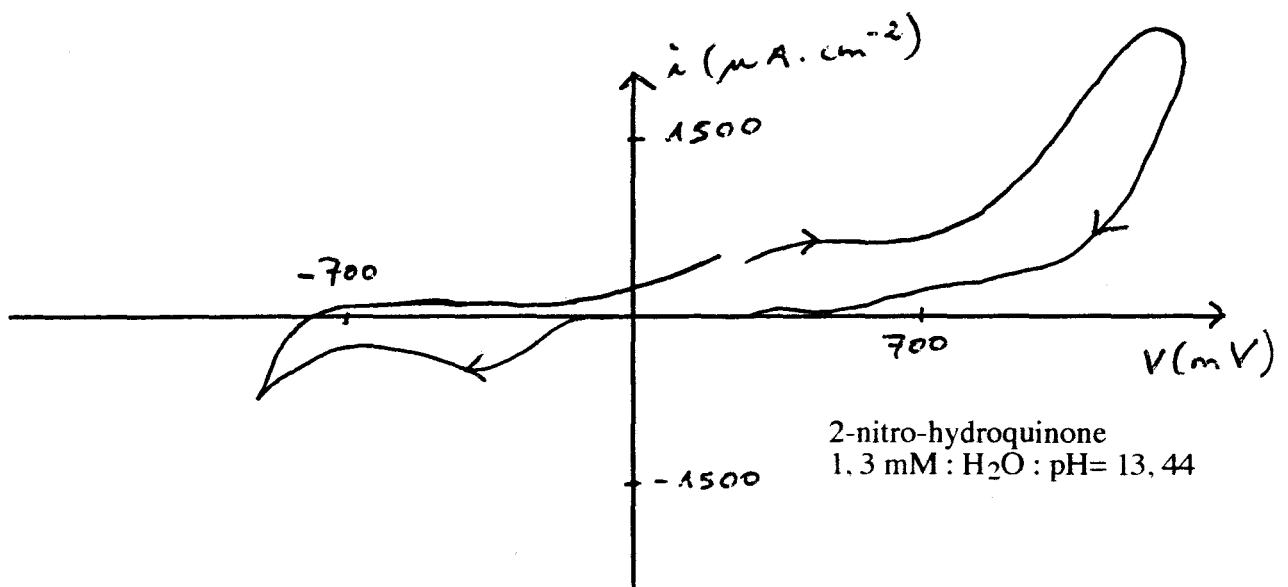
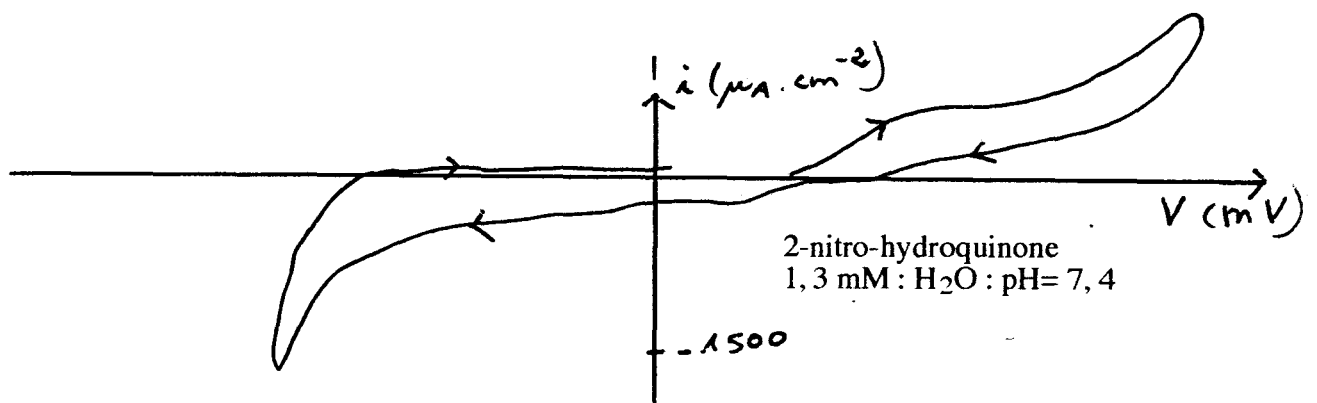
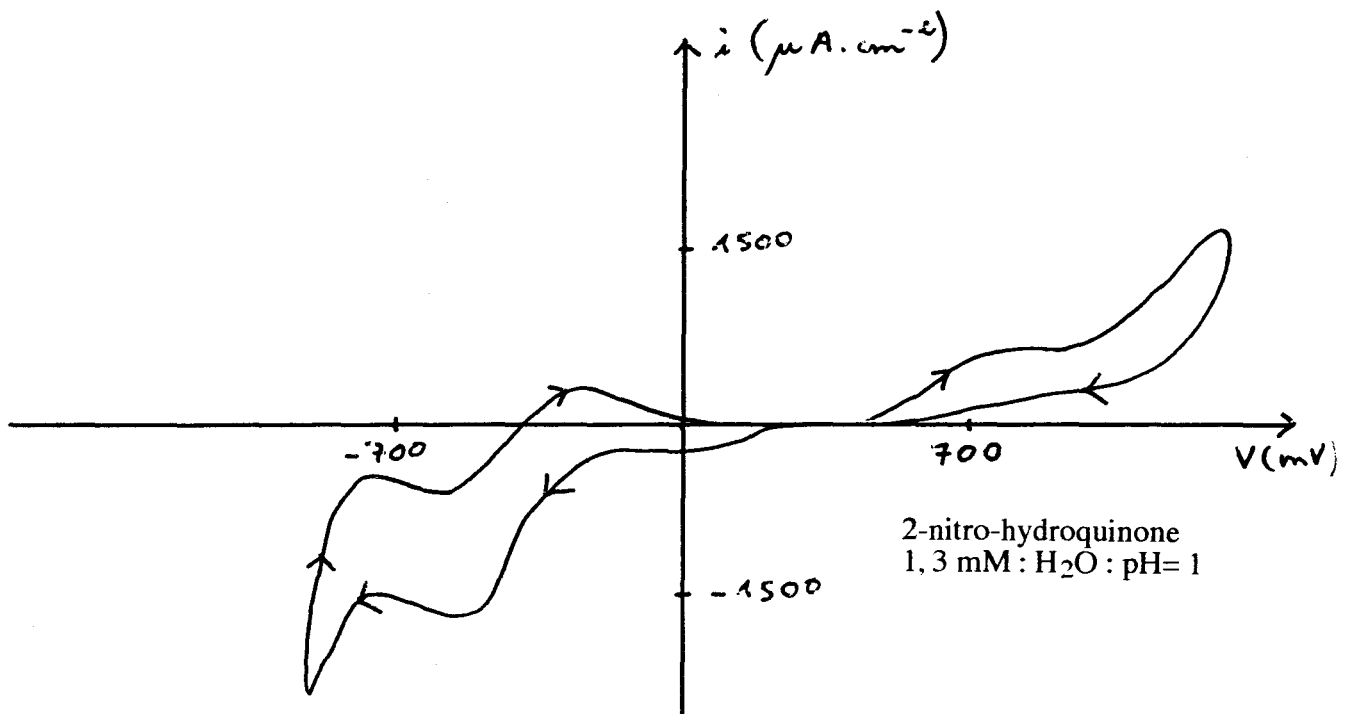
### XI-3-2. Etude de la 2-nitrohydroquinone

	2-nitrohydroquinone	
pH	$E_{pc}$ (mV)	$i_{pc}$ ( $\mu\text{A}$ )
0,95	-541	9,73
13,44	-373	3,8

Les remarques faites pour les nitrocatechols sont applicables à la nitrohydroquinone. On peut cependant remarquer qu'à pH acide, la réversibilité de la réduction du groupe nitro semble plus importante que dans les cas précédents.

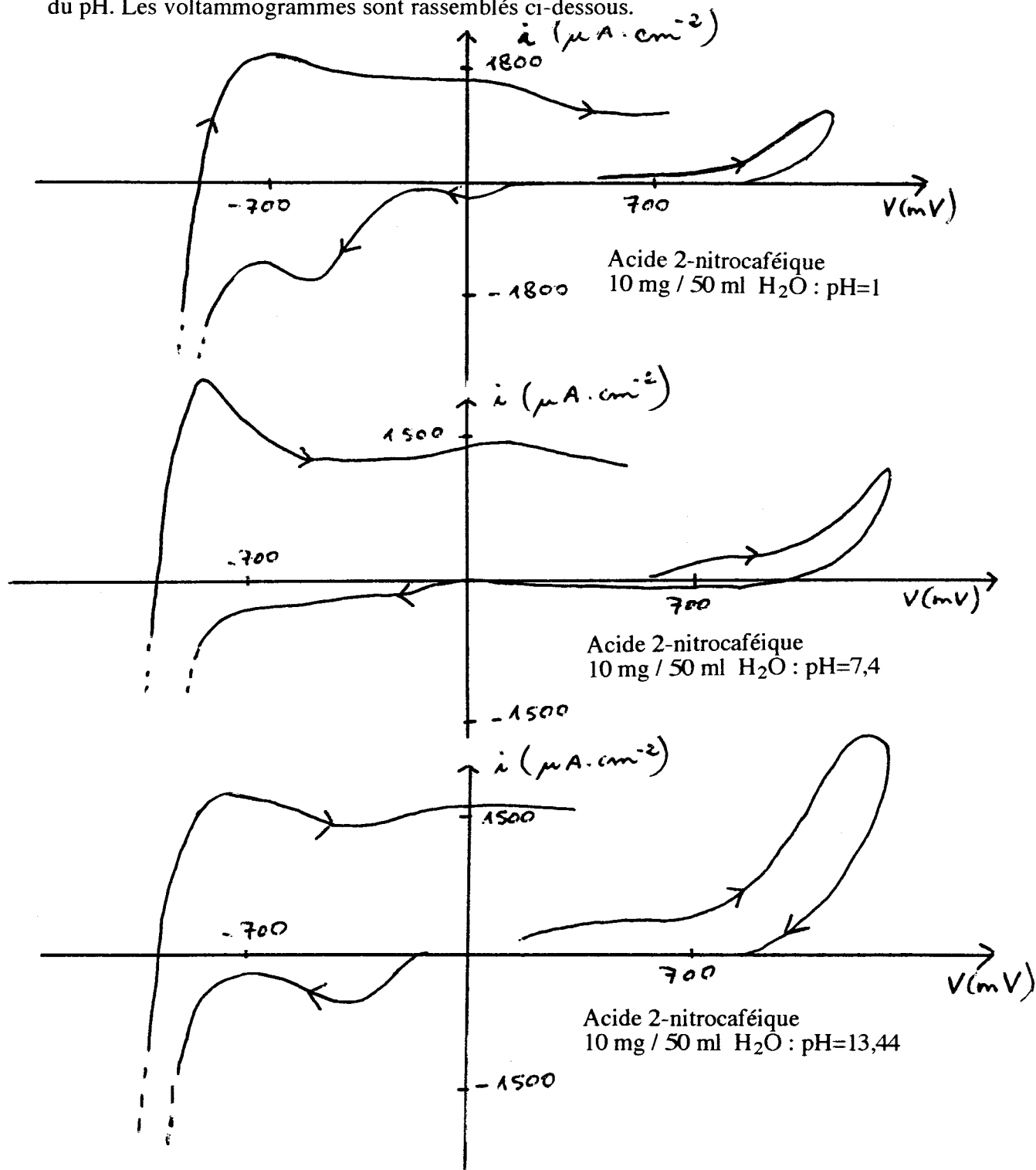


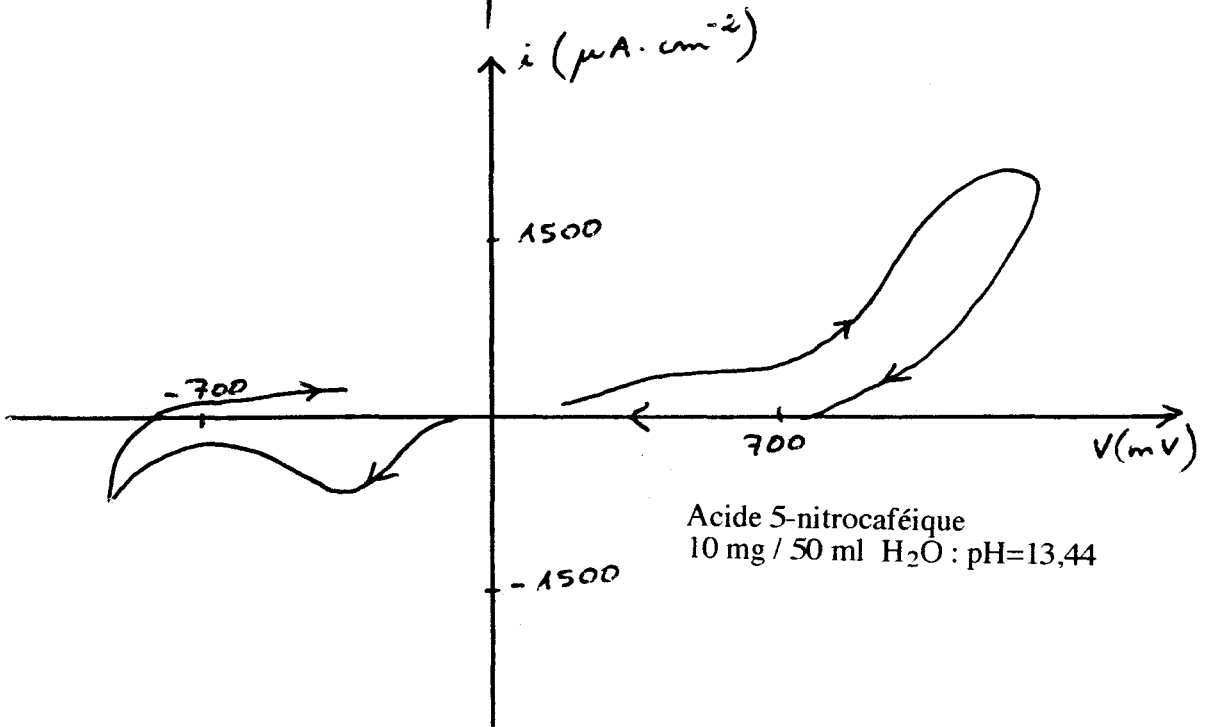
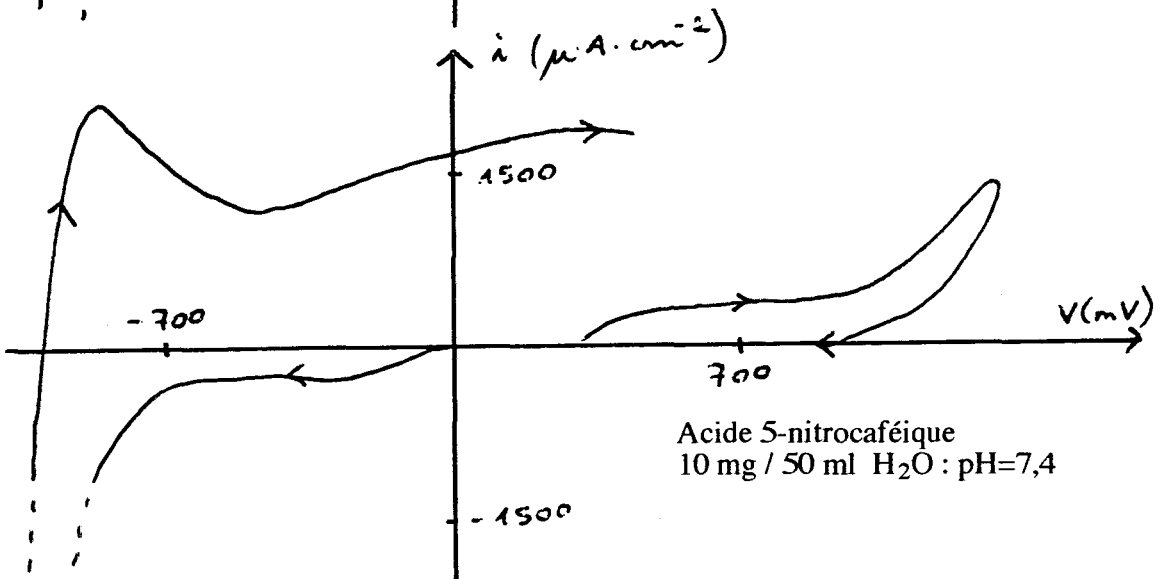
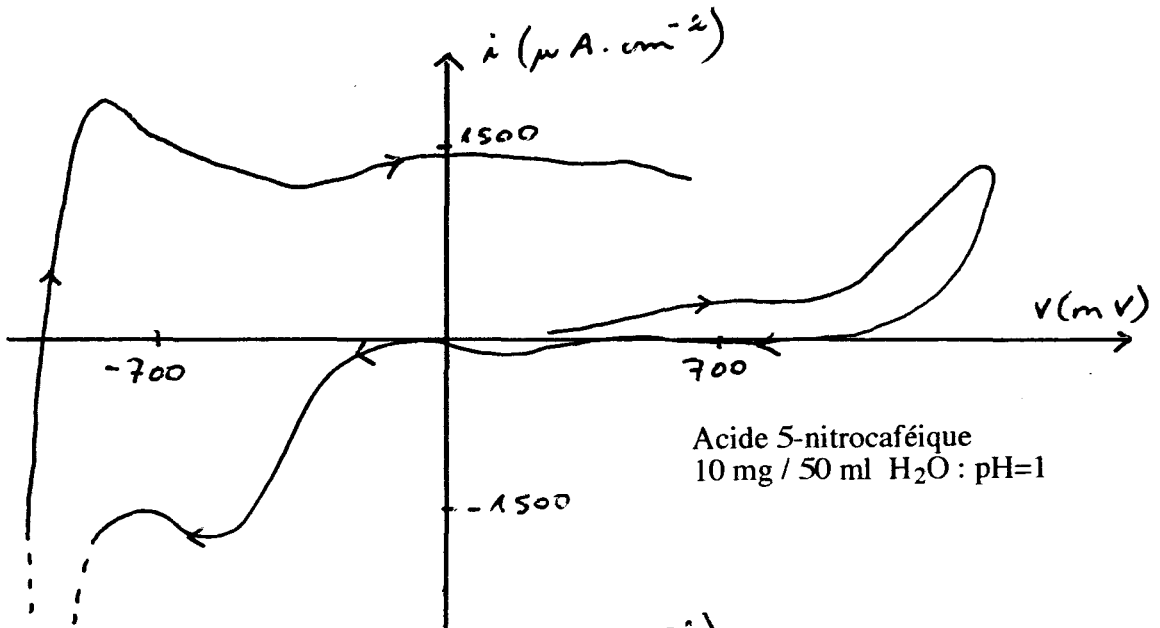


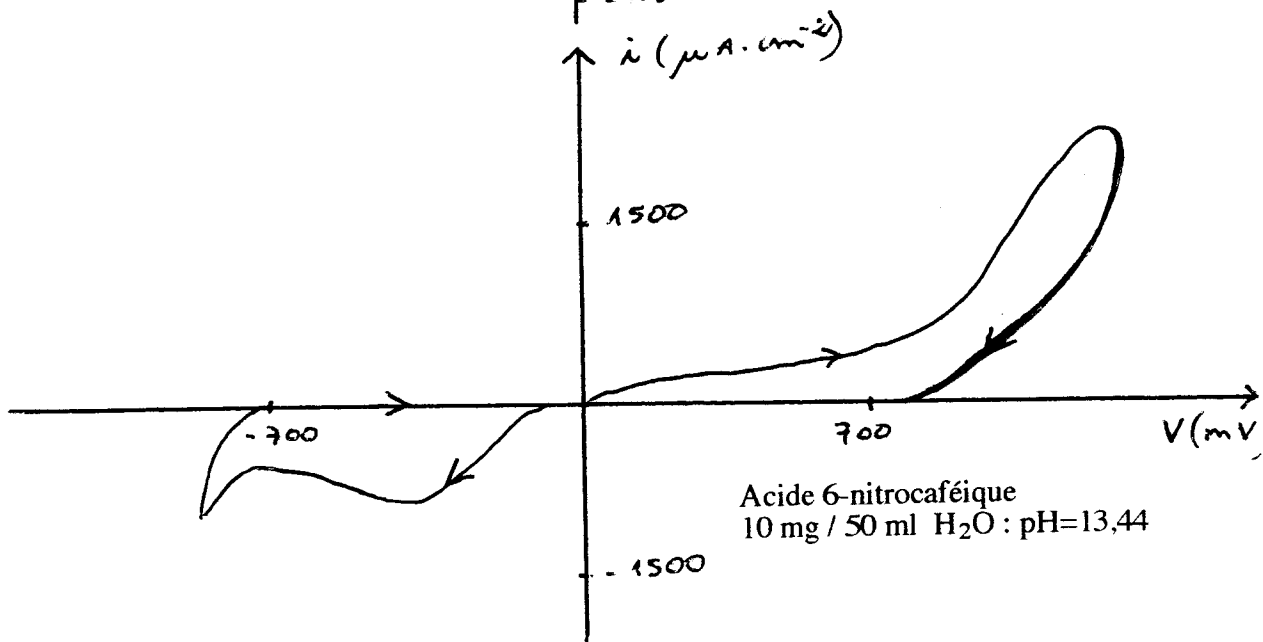
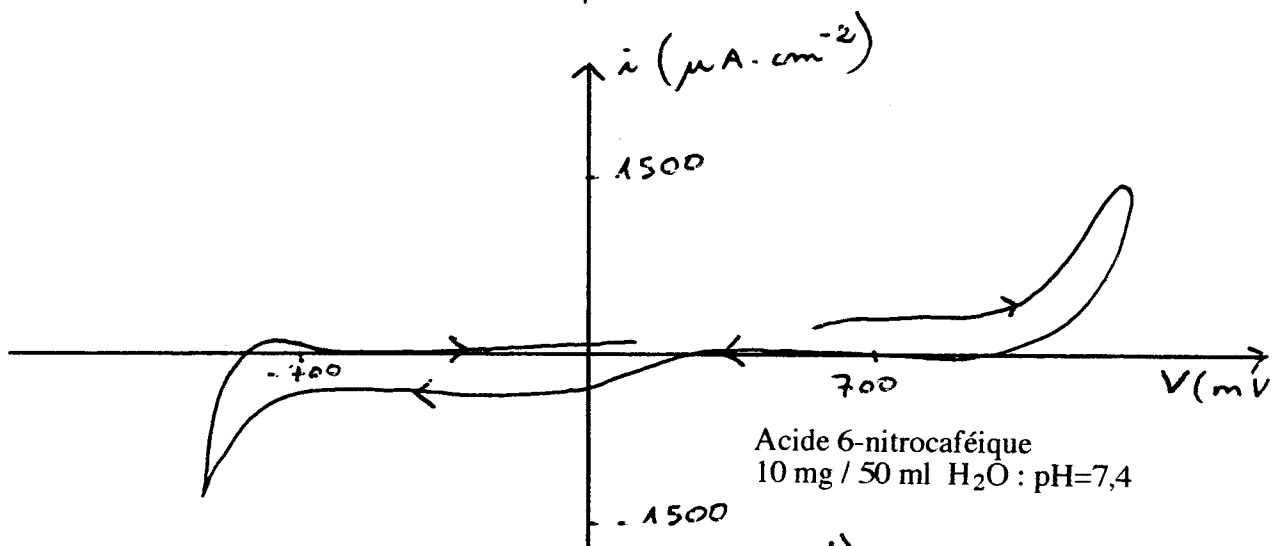
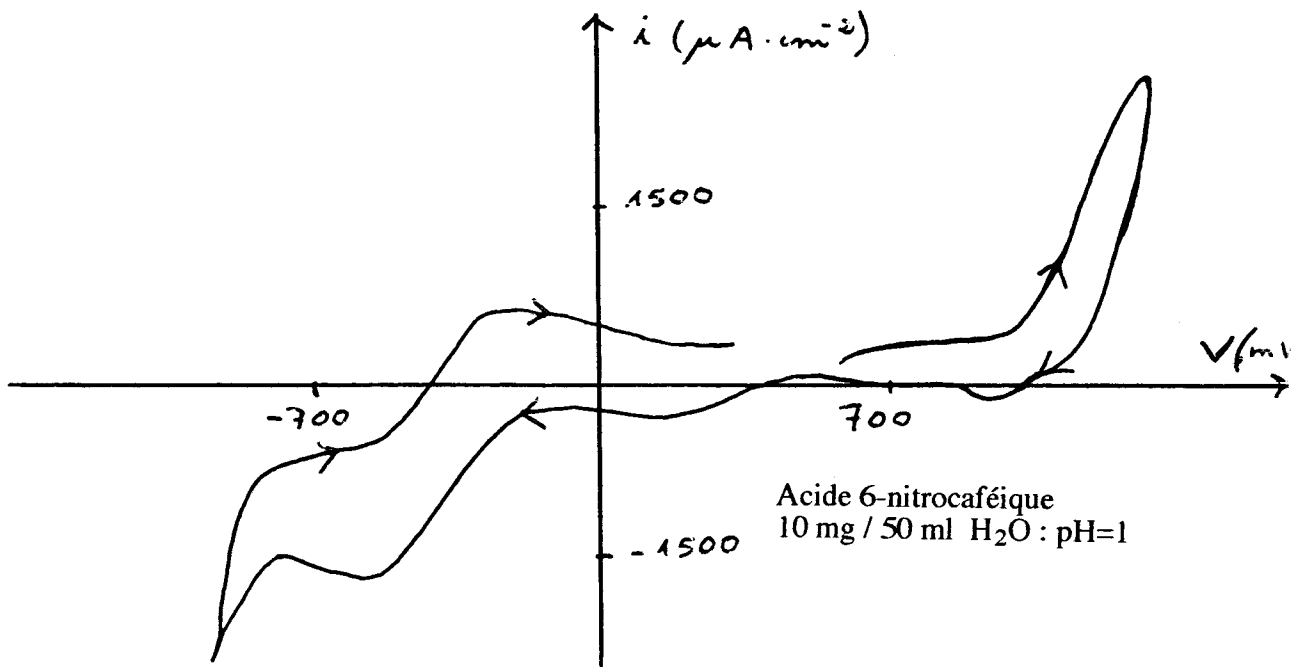


### X-3-3. Etude des acides caféiques

Malgré les efforts déployés, les informations obtenues sont difficilement exploitables. Les potentiels de la première vague de réduction ont cependant pu être déterminés en fonction du pH. Les voltammogrammes sont rassemblés ci-dessous.







#### X-4. Conclusion

La voltammétrie cyclique est un outil intéressant qui permet la détermination des paramètres d'oxydoréduction d'une molécule. **Dans le cas des molécules diphénoliques nitrées, il semble que chaque groupe fonctionnel joue un rôle protecteur sur l'autre.** En effet, l'observation du passage de la forme diphénolique à la forme quinonique est difficile. De plus, la fonction nitro ne semble pas subir de réduction totale : la spectroscopie infrarouge montre toujours, après réaction, les fréquences de vibration des liaisons du groupe fonctionnel NO<sub>2</sub>.

En milieu aqueux, il est intéressant de noter que les molécules sont comme **rendues inerte** par la solvataion qu'elles subissent : elles ne présentent en effet aucune des petites bosses que l'on relève sur les voltammogrammes obtenus dans le DMF

Malgré tout, la détermination des potentiels de réduction s'avère plus difficile que prévue et nécessiterait le recours à la radiolyse pulsée.

En définitive, on peut conclure que **la présence du groupement nitro sur des dérivés polyphénoliques est une excellente protection contre l'oxydation** de ceux-ci, malgré une difficulté d'introduction non négligeable lors de la synthèse des molécules.

Dans le tableau ci-dessous sont rassemblés les potentiels des premiers pics de réduction en phase aqueuse des divers composés diphénoliques nitrés étudiés :

$E_{pc}$	pH = 0,95	pH = 13,44
2-nitrohydroquinone	- 541	- 373
3-nitrocatechol	- 560	- 376
4-nitrocatechol	- 580	- 390
acide 2-nitrocaféique	- 590	- 382
acide 5-nitrocaféique	- 570	- 366
acide 6-nitrocaféique	- 580	- 396

o o o o o o o o o



## XI- Etude par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

Les dérivés synthétisés présentent deux fonctions aux propriétés antagonistes très prononcées :

- une fonction oxydable (diphénol)
- une fonction réductible (nitro)

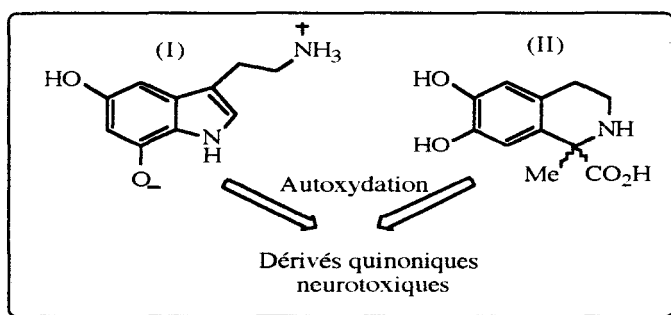
Comme présentées précédemment dans les parties VI et VII, les propriétés antioxydantes peuvent résulter du piégeage d' EAO sur le cycle phénolique ou par action sur la fonction nitro, potentiellement réductible par l'anion superoxyde, entraînant ainsi la destruction de la base de la toxicité de l'oxygène.

L'étude des radicaux obtenus dans le cadre d'une réduction ou d'une oxydation de nos composés peut être une source d'information pour l'étude du devenir des molécules après action des EAO et pour l'élucidation de leur conformation en solution.

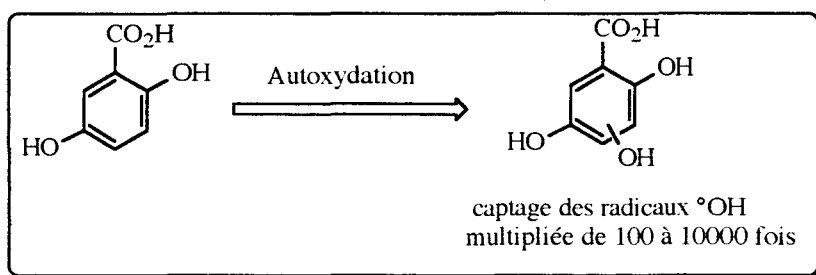
La RPE est la méthode de choix pour ce type de manipulation.

### XI-1. Oxydation des dérivés nitrés diphénoliques en milieu alcalin

Les dérivés nitrés polyphénoliques peuvent subir une réduction de la fonction nitro et une oxydation de la fonction diphénolique. Il est connu que les dérivés aromatiques polyhydroxylés peuvent, si leurs potentiels d'oxydation le permettent, subir une oxydation par l'oxygène de l'air, sans l'aide apparente d'un catalyseur. C'est l'autoxydation . D'une part elle serait la cause de la neurotoxicité des produits de dégradation de divers neurotransmetteurs (5, 7-dihydroxytryptamine (I)<sup>16</sup>) ou d'alcaloïdes endogènes présents chez les alcooliques (acide salsolinol-1-carboxylique (II)<sup>17</sup>) :



D'autre part, elle peut donner naissance à des produits oxydés dont les propriétés antioxydantes sont meilleures que celles du produit de départ, comme l'a montré Capelle<sup>18</sup> dans le cas de l'acide gentisique :



Le rôle de l'autoxydation - et de l'oxydation en général - est donc ambivalent. Il semblait donc intéressant de l'étudier sur les dérivés nitrés diphénoliques.

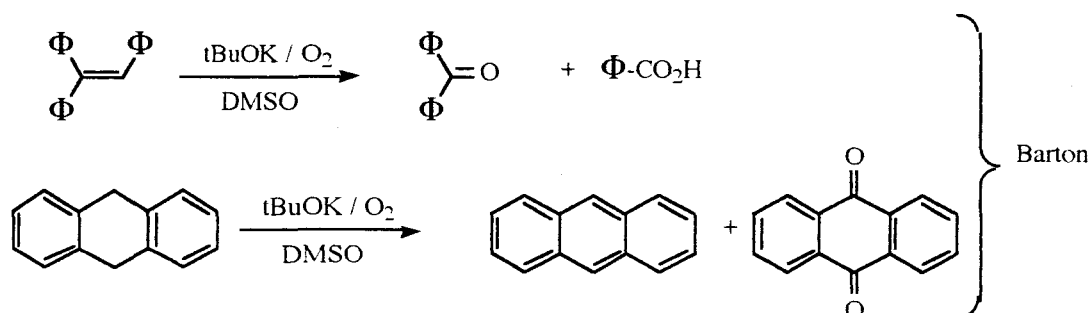
Lors de l'étude voltammétrique, il s'est avéré qu'aucun pic net d'oxydation n'était observé. L'étude RPE nous a incités à utiliser plusieurs méthodes. En effet, Lorsque la manipulation est effectuée de façon statique - mélange de la soude (pH 10 à 13) avec une concentration finale de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  M en produit à analyser- aucun signal n'est observé. De la même façon, la technique de l'écoulement (flow) à vitesse plus ou moins rapide (1 à 140 ml / heure) n'apporte aucun indice.

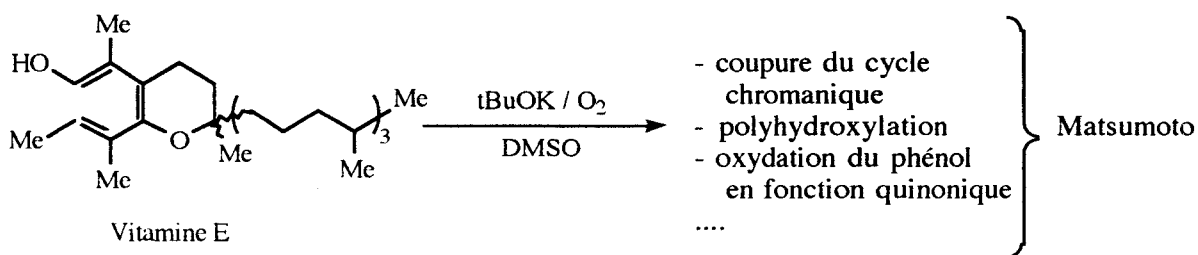
Les différents types de bases utilisées, ainsi que la modification des paramètres expérimentaux classiques (température, concentration, temps de réaction), n'ont pas permis la mise en évidence de radicaux semi-quinoniques, argumentant l'impossibilité d'observer un pic d'oxydation en voltammétrie.

## XI-2.- Action du tertiobutoxyde de potassium (tBuOK) dans le DMSO

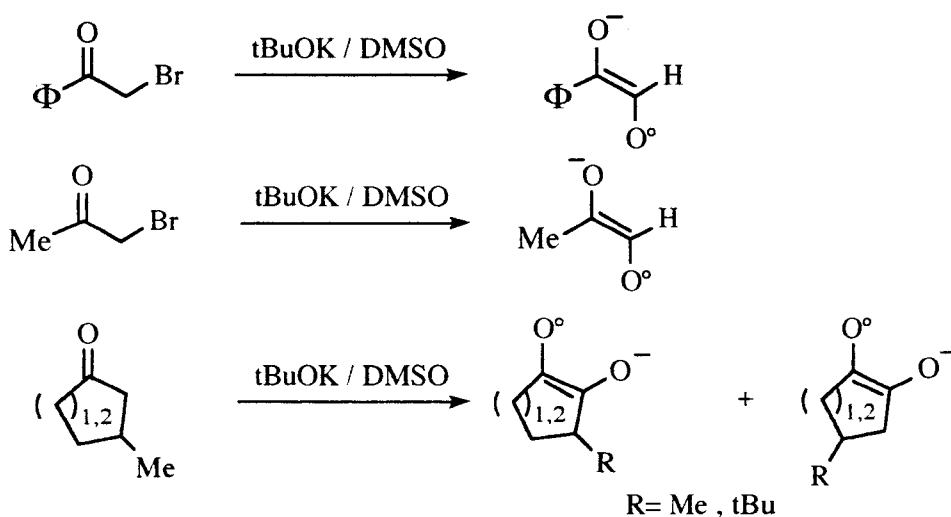
### XI-2-1. Aspect théorique

Dans le but d'étudier les radicaux semi-quinoniques potentiels dérivant des molécules synthétisées, il était important de trouver une méthode simple, chimique de production des radicaux. L'oxydation par le Cerium (IV) ou le Fer(III) n'ayant donné aucun résultat, les travaux de Barton<sup>19</sup> d'une part, et de Matsumoto<sup>20</sup>. d'autre part nous ont incité à utiliser le tertiobutoxyde de potassium dans le DMSO:

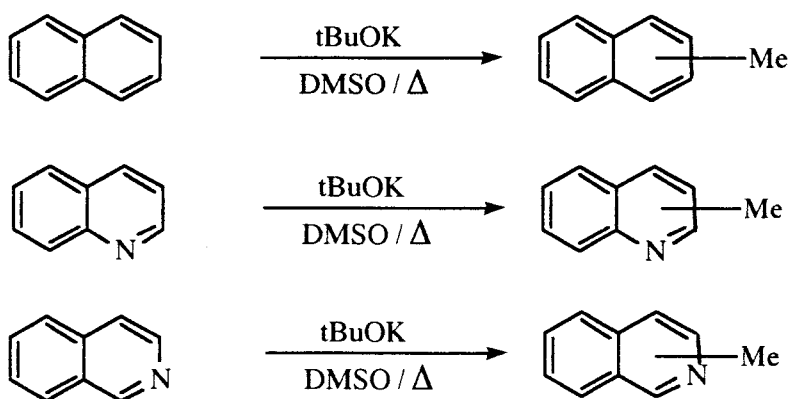


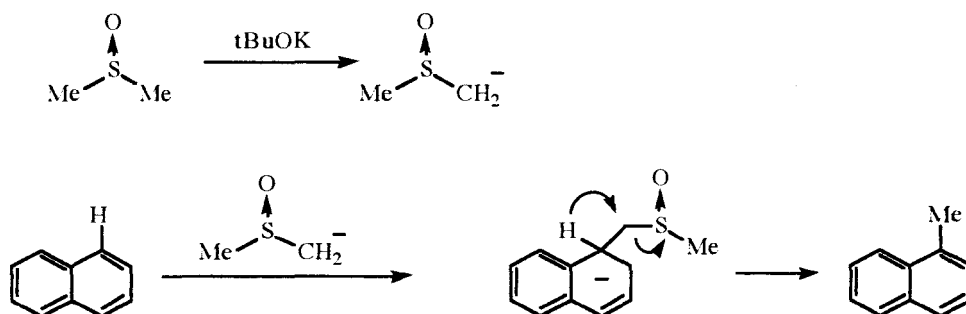


C'est en fait Russel<sup>21</sup> qui entreprend l'étude systématique de l'utilisation de tBuOK / DMSO pour la production de radicaux semi-quinoniques :



Ces schémas montrent qu'il existe une réaction chimique de substitution en supplément de la formation du radical. Ce dernier n'est donc pas directement corrélé à la structure de départ. En poursuivant ces investigations, il met en évidence l'intervention du solvant dans une réaction secondaire <sup>22</sup> :



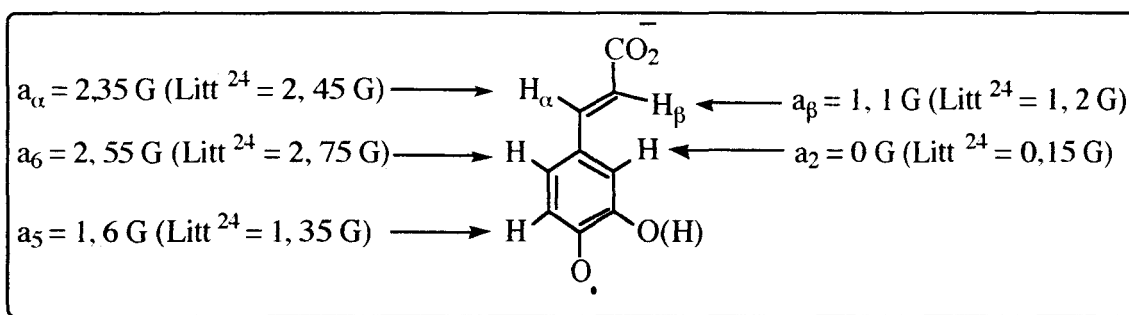


Ce moyen de production n'est donc pas une source "pure" de radicaux.

### XI-2-2. Approche expérimentale

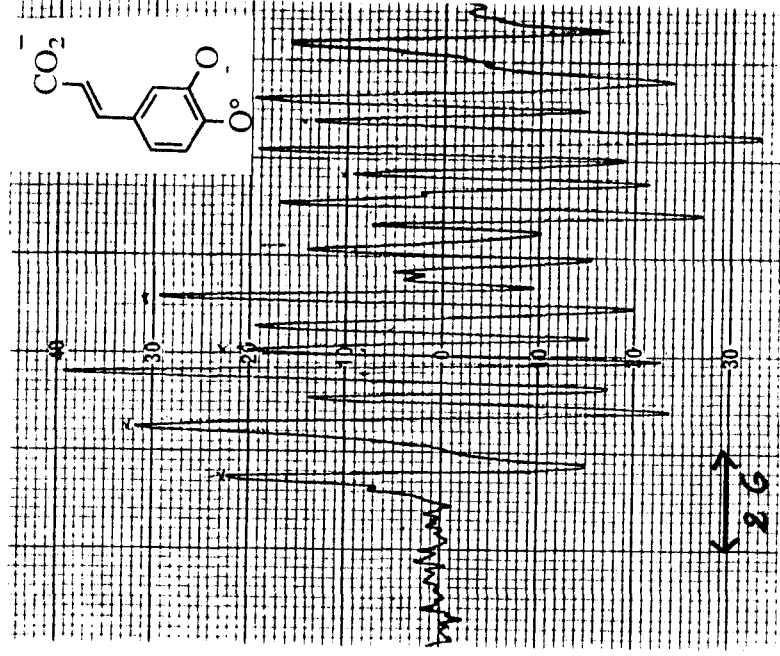
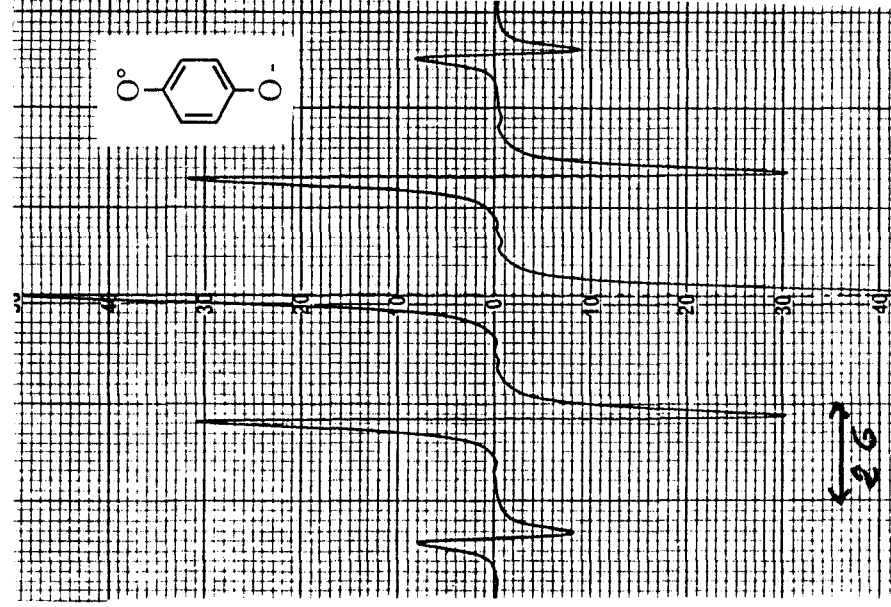
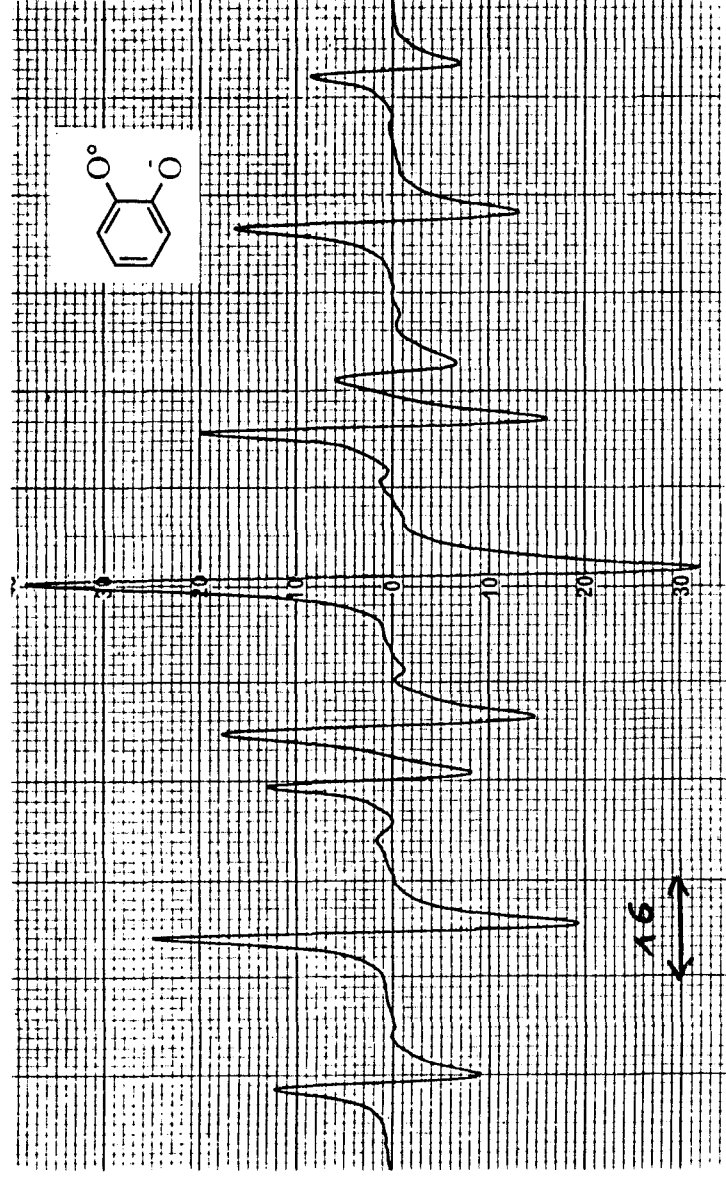
Cependant, en traitant le catéchol, l'hydroquinone et l'acide caféique par le tertio-butoxyde de potassium, on obtient bien les spectres des radicaux semi-quinoniques décrits dans la littérature (cf page suivante).

Le catéchol et l'hydroquinone présentent leurs spectres caractéristiques<sup>23</sup> (respectivement un triple triplet avec  $a_1 = 1,5 \text{ G}$  et  $a_2 = 3,5 \text{ G}$  et un quintuplet 1/4/6/4/1 avec  $a = 2,4 \text{ G}$ ) et les constantes hyperfines obtenues pour l'acide caféique sont analogues à celles obtenues par Dixon par autoxydation en milieu alcalin<sup>24</sup>.

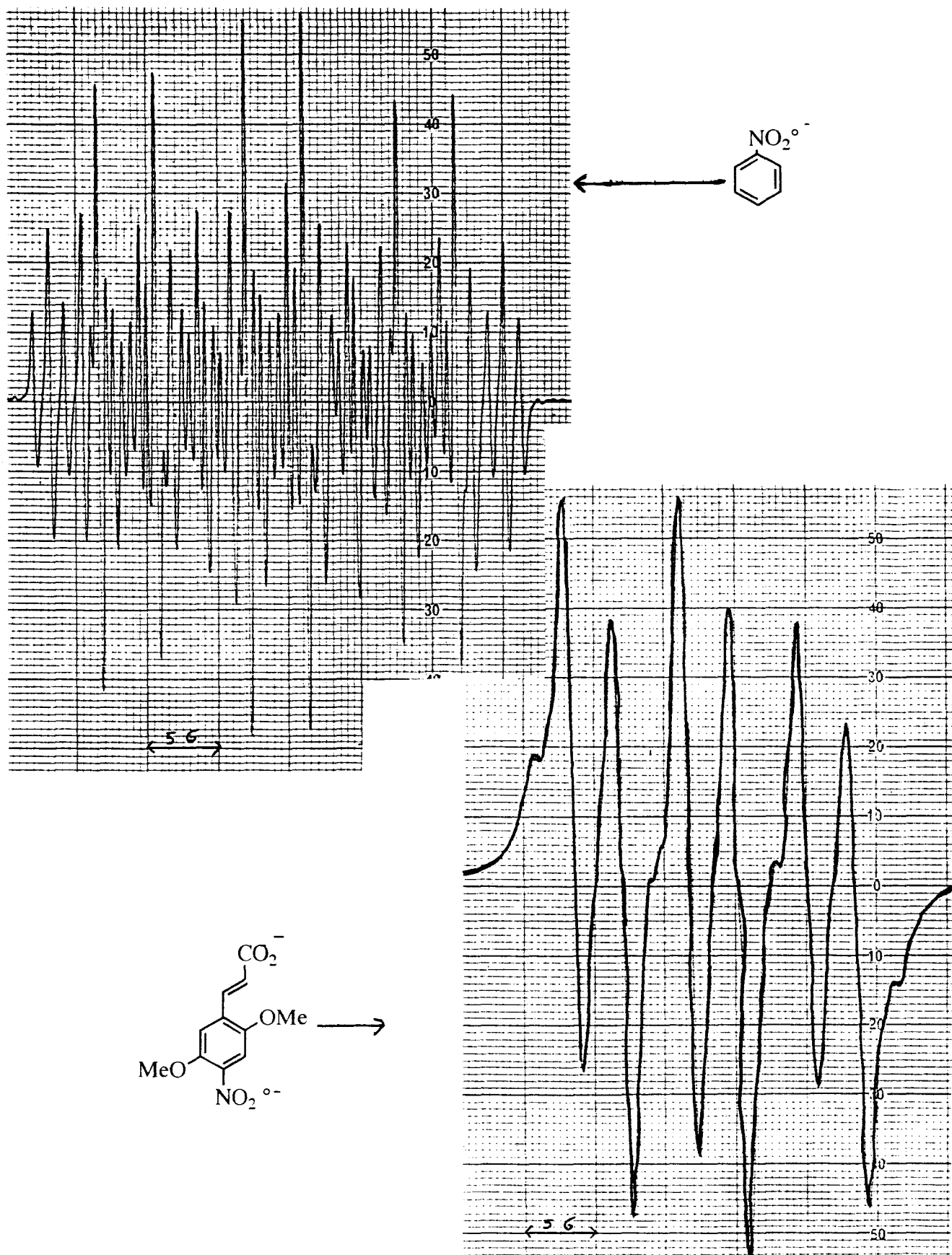


Cependant, dès que le cycle diphenolique est substitué par le groupe nitro-, aucun signal correspondant à un radical semi-quinonique n'est observé dans les mêmes conditions. L'observation de la réaction par spectrométrie UV ne montre pas de variation du spectre par rapport à celui de la molécule testée.

**La fonction nitro exerce donc une protection de la fonction diphenol en inhibant l'oxydation de celle-ci.**

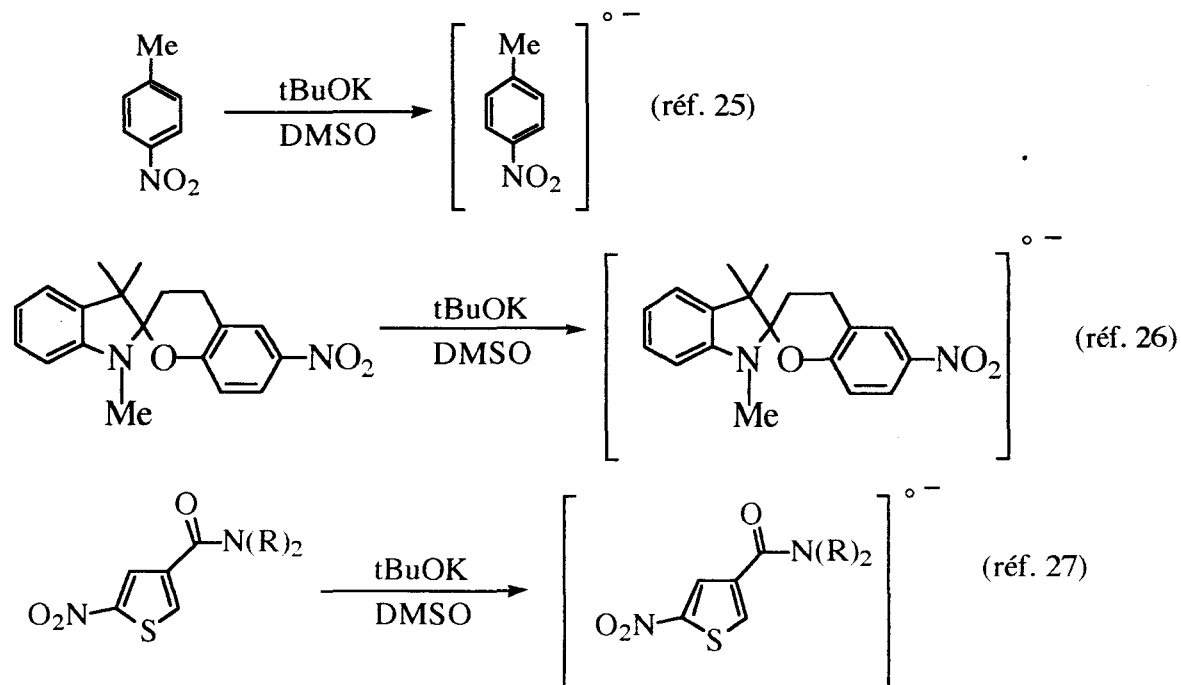


Spectres de dérivés diphenoliques classiques obtenus par l'action du tertiobutoxyde de potassium dans le DMSO



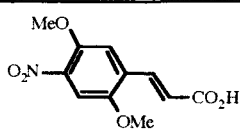
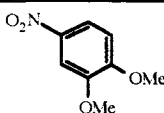
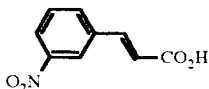
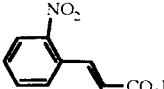
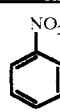
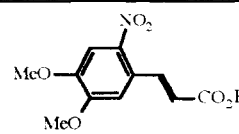
Spectres de dérivés nitroaromatiques obtenus par l'action du tertio-butoxyde de potassium dans le DMSO

Au cours ses travaux, Russel s'est rendu compte de la facilité de production des radicaux-anions nitrés en faisant agir tBuOK sur les nitrotoluènes dans le DMSO <sup>25</sup>. Cette technique est désormais couramment utilisée pour produire les radicaux-anions de dérivés nitroaromatiques très divers <sup>26, 27</sup> :



En soumettant les nitrodiphénols synthétisés à l'action de tBuOK dans le DMSO, aucun signal provenant de radical-anion nitré n'est observé. La fonction diphénolique semble donc protéger la réduction du groupe nitro par le tertiobutoxyde de potassium. Pour vérifier cette assertion, certains dérivés méthoxylés nitrés ont été soumis à l'action de tBuOK.

On obtient effectivement les radicaux-anions (cf page suivante) dont les constantes de couplage relatives à l'azote sont collectées dans le tableau ci-dessous :

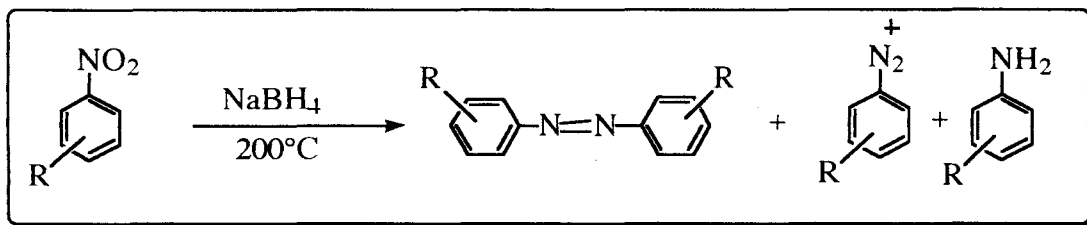
Molécule	$a_N$ (DMSO)	Molécule	$a_N$ (DMSO)
	8,5 G		11,25 G
	10,5 G		12,2 G
	11 G		13 G

La variation de constante de couplage est due à des facteurs géométriques, en particulier la rotation du groupement nitro par rapport au plan du noyau aromatique<sup>28</sup>. Cette étude sera approfondie dans le paragraphe suivant .

L'action ambivalente du tertibutoxyde de potassium dans le DMSO sur les dérivés nitrés diphénoliques ne permet pas d'obtenir de renseignement sur la structure des radicaux. Cependant, on peut affirmer que **la fonction diphénolique protège dans une certaine mesure le groupe nitro de la réduction.**

De plus, il semble que la production des radicaux semi-quinoniques à partir de ce type de structure soit largement contrariée par la présence du groupement nitré.

Il est nécessaire de trouver une façon simple, chimique de produire les radicaux-anions de ce genre de molécule pour en étudier la structure. Les essais utilisant le dithionite<sup>29</sup> pour réduire la fonction nitro n'ont donné aucun signal. Les travaux de Nose<sup>28</sup> concernant la réduction des nitroaromatiques par le borohydrure de sodium sans solvant :



nous ont incités à utiliser cet hydrure comme réducteur en milieu aqueux.

### XI-3. Action du borohydrure de sodium dans l'eau

#### XI-3-1. Approche expérimentale

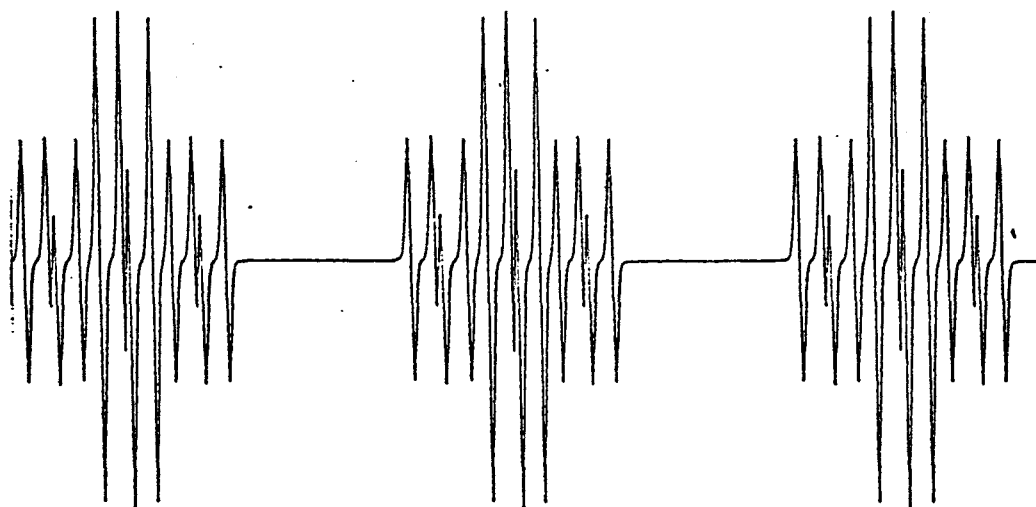
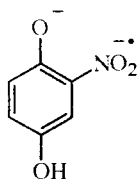
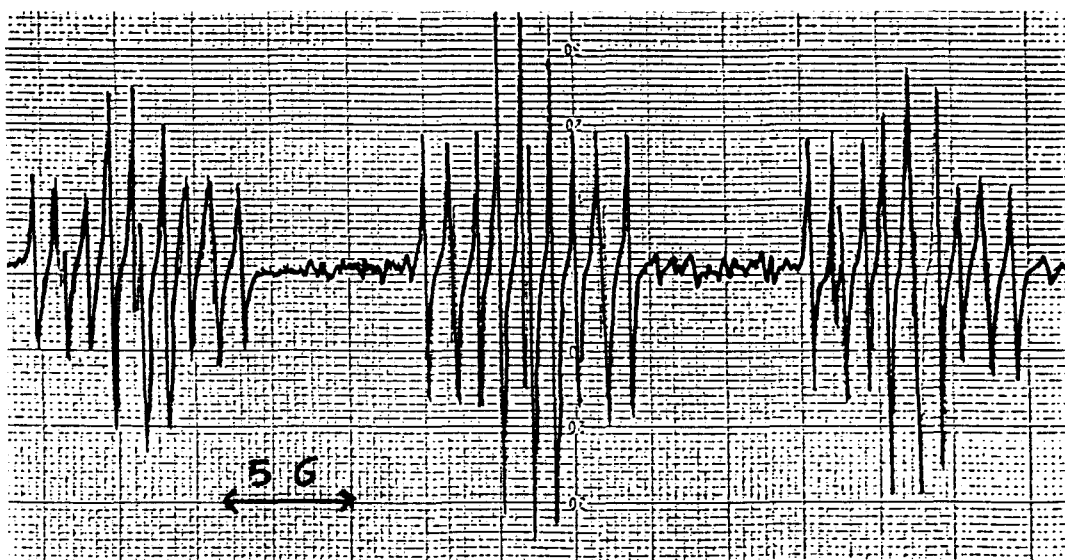
Les dérivés nitrés diphénoliques en solution à  $10^{-3}$  M dans l'eau subissent, lorsqu'ils sont mis en présence d'un excès de  $\text{NaBH}_4$  sublimé versé directement dans le tube de réaction, la réduction exclusive en radical-anion. Le pH final de la solution est de 8,5 - 8,8. C'est à notre connaissance la première fois que le borohydrure de sodium est utilisé dans ce sens<sup>31</sup>.

Les radicaux sont stables pendant plusieurs minutes et **le signal n'est pas affecté par un bullage intense d'oxygène au sein de la solution.**

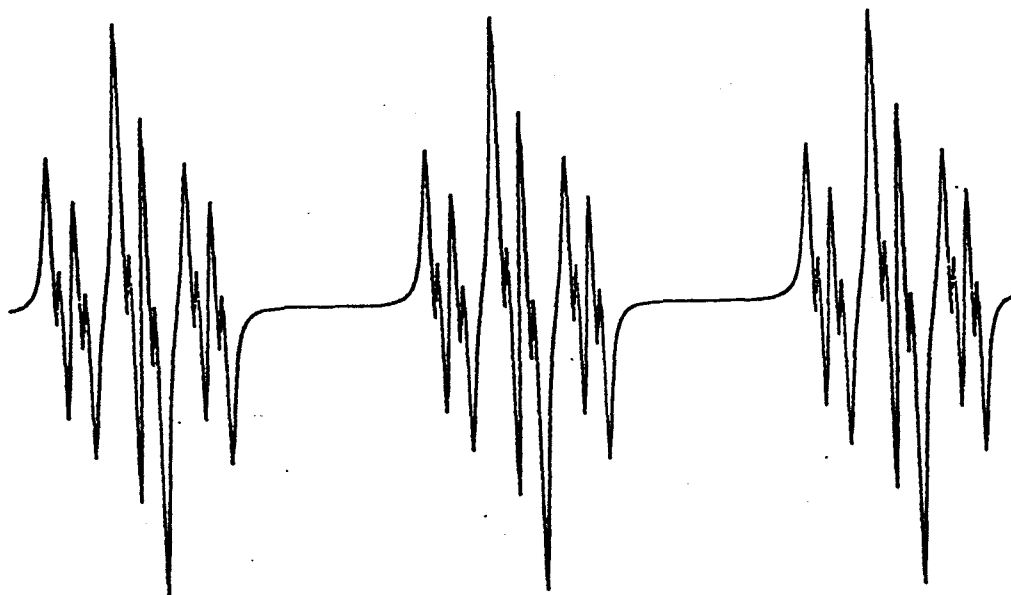
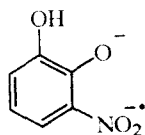
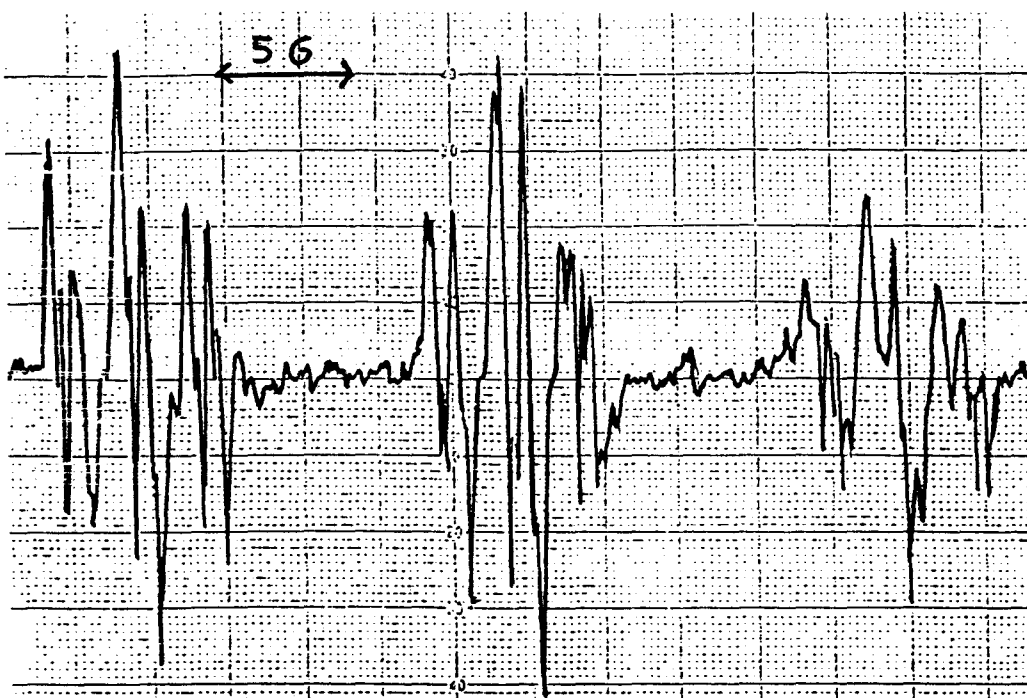
De plus, des manipulations effectuées à une échelle plus large permettent d'affirmer que les formes de réduction plus prononcées de la fonction nitro (nitroso, hydroxylamine et amine) ne sont pas engendrées.

Les spectres obtenus sont présentés sur les pages suivantes accompagnés de leur simulation

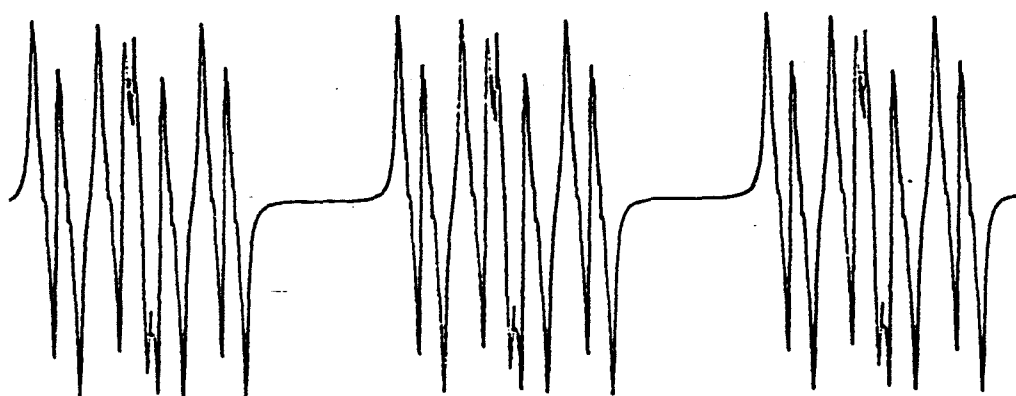
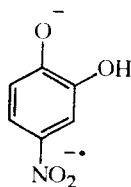
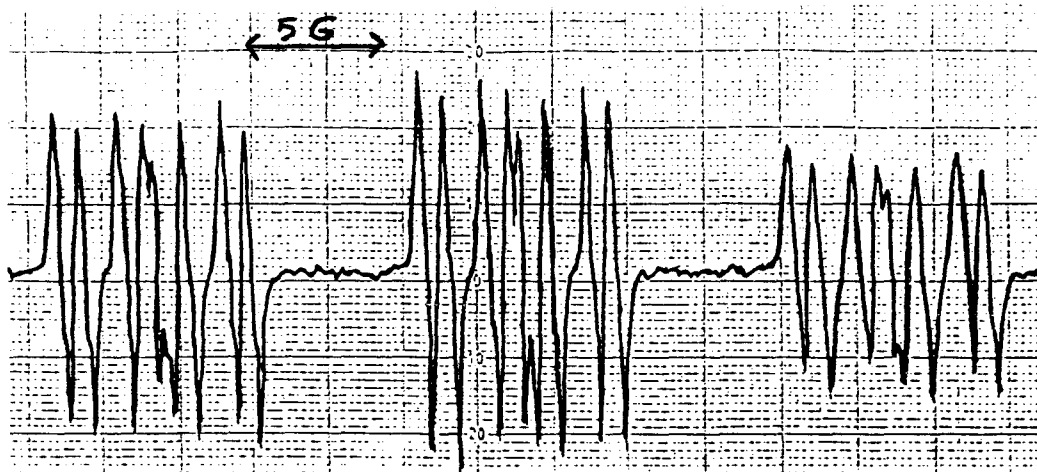




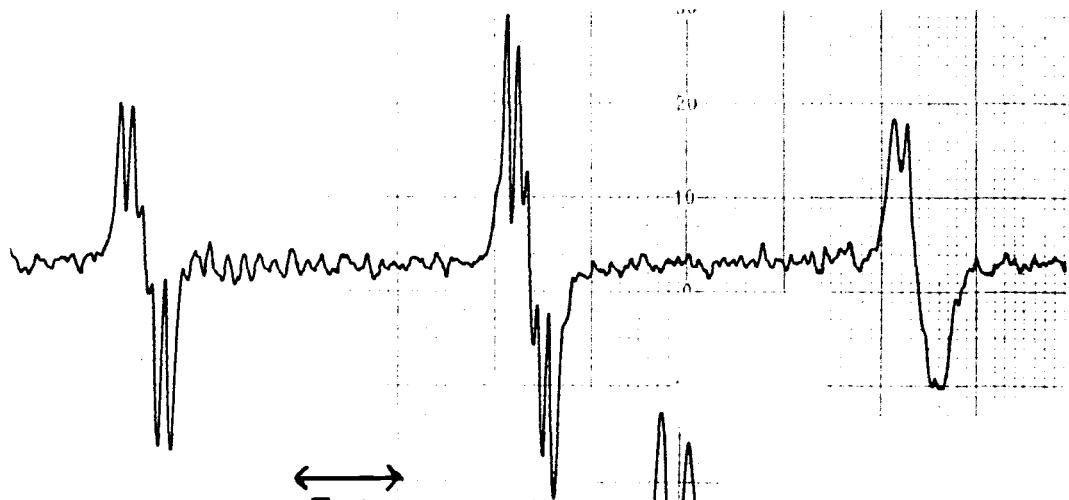
Action du Borohydrure de sodium dans l'eau  
sur  
la 2-nitrohydroquinone



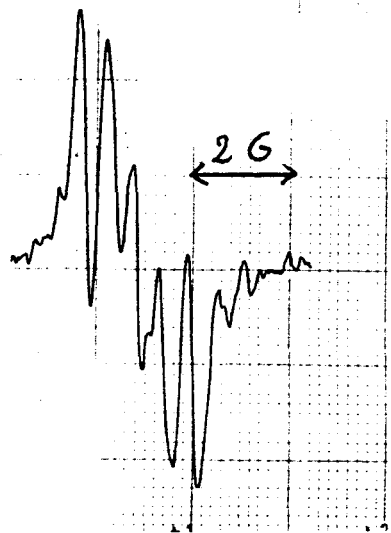
Action du Borohydrure de sodium dans l'eau  
sur  
le 3-nitrocatechol



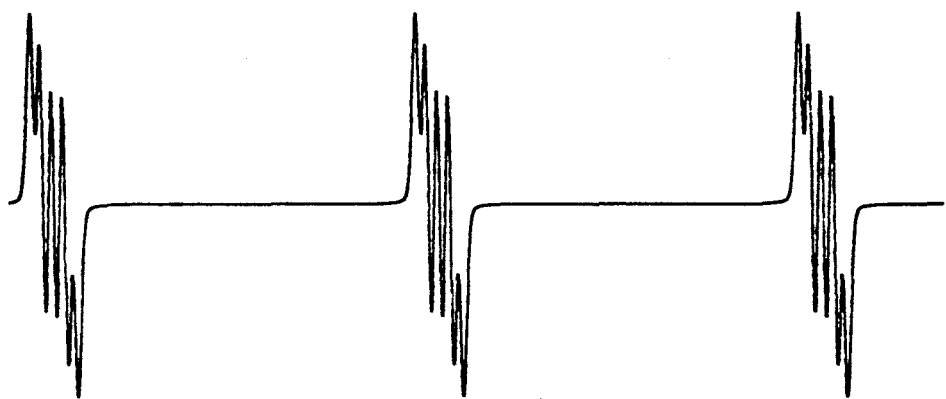
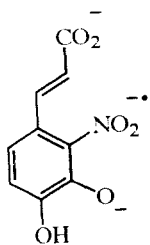
Action du Borohydrure de sodium dans l'eau  
sur  
le 4-nitrocatechol



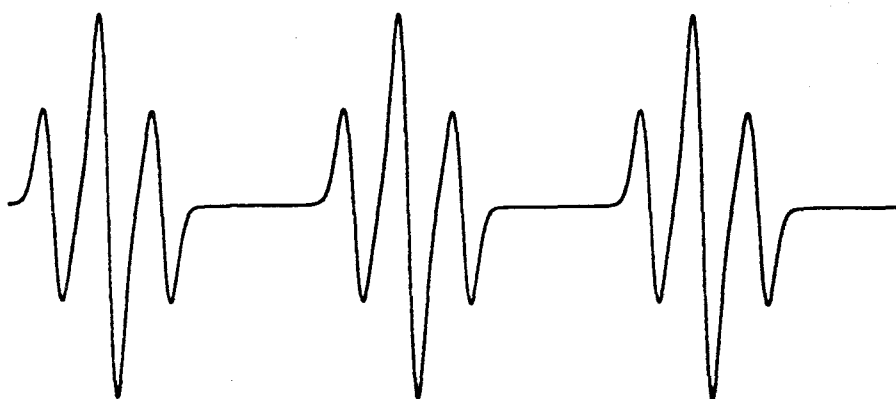
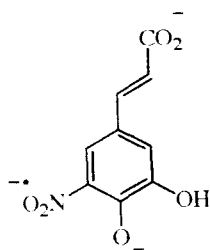
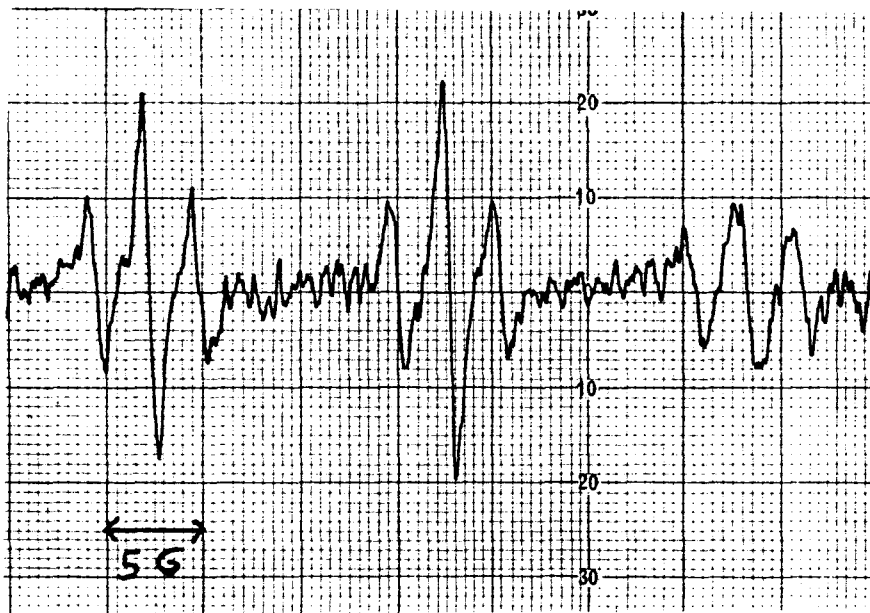
↔  
56



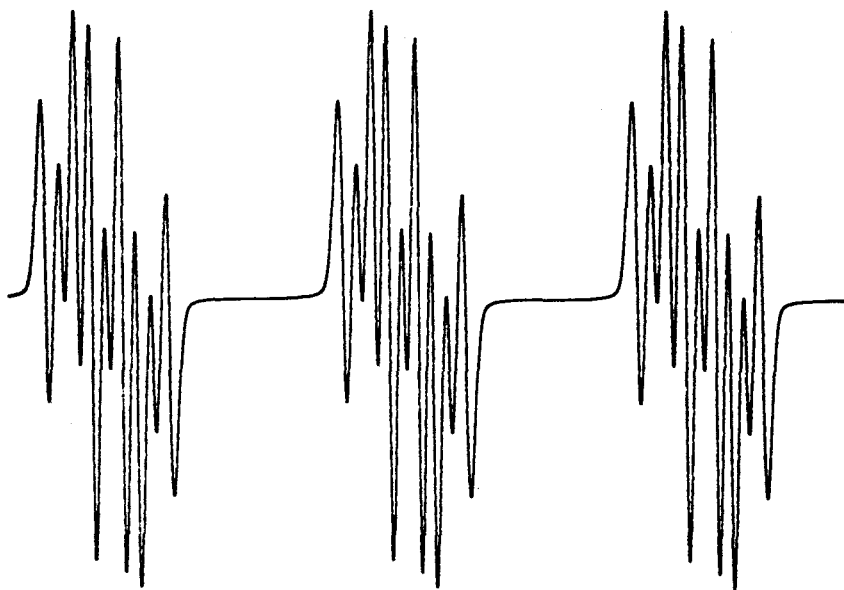
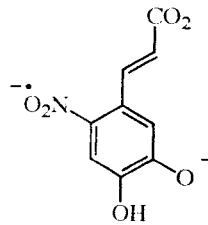
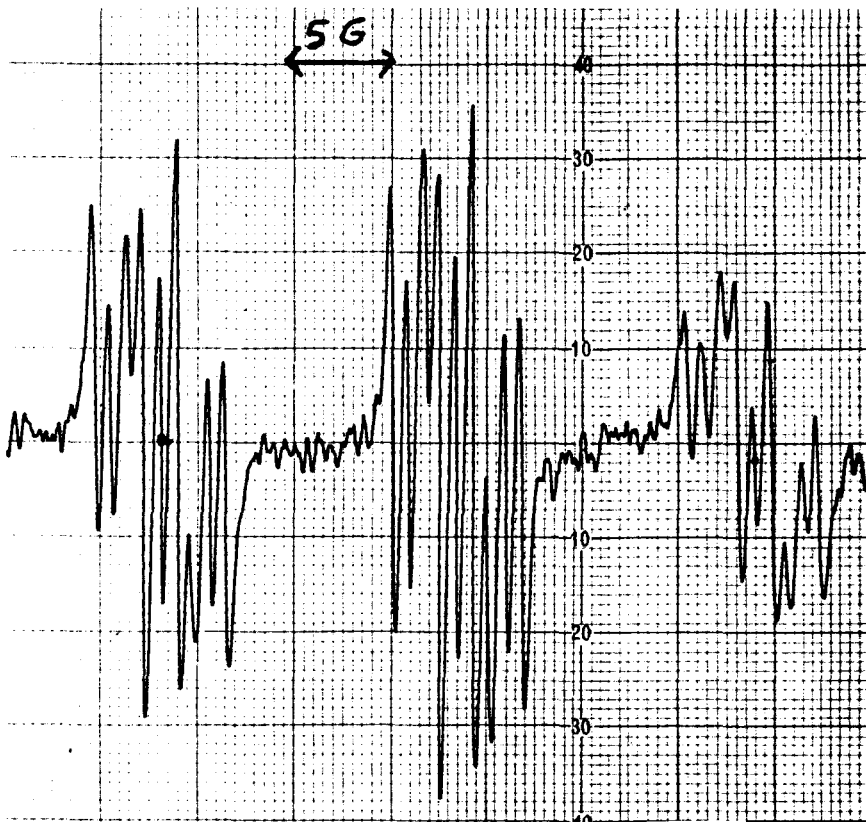
↔  
26



Action du Borohydrure de sodium dans l'eau  
sur  
l'acide 2-nitrocaféique



Action du Borohydrure de sodium dans l'eau  
sur  
l'acide 5-nitrocaféique



Action du Borohydrure de sodium dans l'eau  
sur  
l'acide 6-nitrocaféique

### XI-3-2. Etude des spectres : données structurales

La capacité de résistance aux phénomènes d'oxydation et de réduction des dihydroxynitrobenzènes et des acides nitrocaféiques nous a incités à étudier les caractéristiques électroniques de ces molécules au moyen de la méthode de Mac Lachlan<sup>32</sup> qui correspond à une amélioration de la méthode de Hückel, et qui entre donc dans le cadre des théories C.L.O.A. (Combinaisons linéaires des orbitales atomiques).

Dans le déterminant séculaire obtenu classiquement par cette méthode, les intégrales de Coulomb  $\alpha$  et les intégrales de résonance  $\beta$  doivent être modifiées pour prendre en compte la présence des hétéroatomes. Les paramètres utilisés sont identiques à ceux préconisés par Rieger & coll.<sup>33</sup> d'une part et Campredon & coll.<sup>26</sup> d'autre part :

$\alpha_x = \alpha_c + h_x \beta$	$\beta_{c-x} = k_{c-x} \beta$
$h_{N(NO_2)} = 2, 2$	$k_{C-N(NO_2)} = 1, 2$
$h_{O(NO_2)} = 1, 4$	$k_{N-O(NO_2)} = 1, 67$
$h_{O(OH / O^-)} = 1, 47$	$k_{C-O(OH / O^-)} = 1, 37$
	$k_{C-C (C=C)} = 1, 4$
	$k_{C-C (C-C)} = 0, 8$
$h_{O(CO)} = 1, 5$	$k_{CO(CO)} = 1, 6$
	$k_{CC'} (C'CO) = 0, 9$

La constante de couplage de l'azote est calculée au moyen de la relation utilisée par les mêmes auteurs :

$$a(N) = 99\rho_{(N\pi)} - 2(35, 89 \rho_{(O\pi)})$$

où  $\rho_{(N\pi)}$  et  $\rho_{(O\pi)}$  sont respectivement les densités de spin sur l'azote et l'oxygène.

De même, pour l'hydrogène, on utilise la relation de Mac Connell :

$$a(H) = Q_{CH} \rho(C)$$

dans laquelle  $Q_{CH}$  représente la constante de Mac Connell que l'on prend égale à 25 G<sup>33</sup> et  $\rho(C)$  la densité de spin sur le carbone portant l'hydrogène.

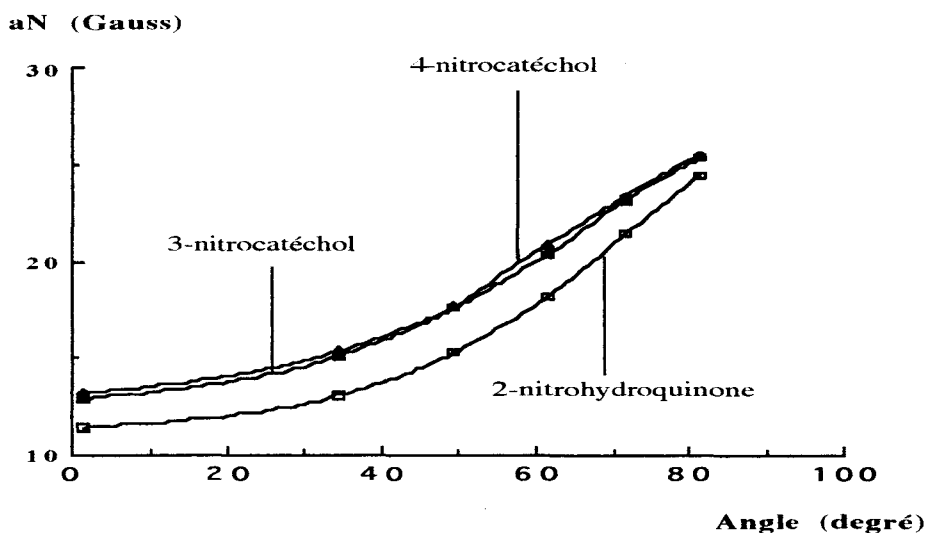
La structure cristallographique de l'acide caféique est connue et montre que le bras alkylé présente un angle de rotation de 20° par rapport au cycle aromatique<sup>34</sup>. Mais Dixon<sup>24</sup>, en utilisant des calculs de type Mac Lachlan dans le cadre de l'attribution des constantes de couplage sur les radicaux semi-quinoniques produits lors de l'oxydation d'analogues de l'acide caféique en milieu aqueux, obtient les meilleurs résultats pour un angle dièdre de 30°. Nous utiliserons donc celui-ci de façon systématique dans les calculs. A partir de cette

structure, on fait subir une rotation à la liaison C-N de 0° à 90°. Dans ce cas, si on appelle  $\Theta$  l'angle de rotation autour de la liaison C-N, on a  $k_{C-N(NO_2)} = 1, 2 \cos \Theta$ . L'angle de 90° correspond à une structure pour laquelle la densité électronique est complètement localisée sur l'azote, comme dans le nitrométhane  $CH_3NO_2$  par exemple. Dans ce cas, la constante hyperfine de l'azote a une valeur proche de 25 G.

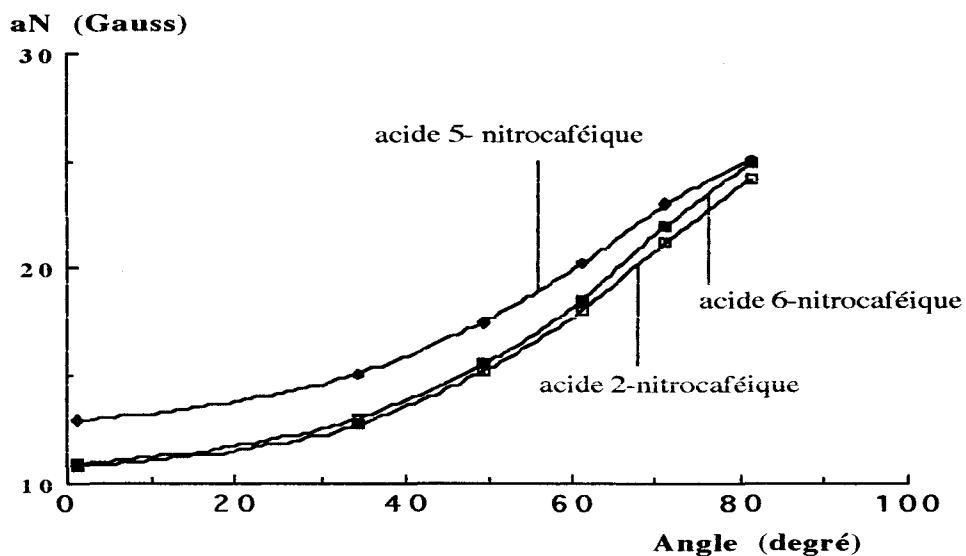
Les constantes hyperfines de l'azote recueillies sur les spectres précédents sont les suivantes :

molécule	$a_{N(NO_2)}$ (Gauss)
2-nitrohydroquinone	15, 8
3-nitrocatechol	15, 5
4-nitrocatechol	15, 25
acide 2-nitrocaféique	19, 62
acide 5-nitrocaféique	15, 25
acide 6-nitrocaféique	15, 15

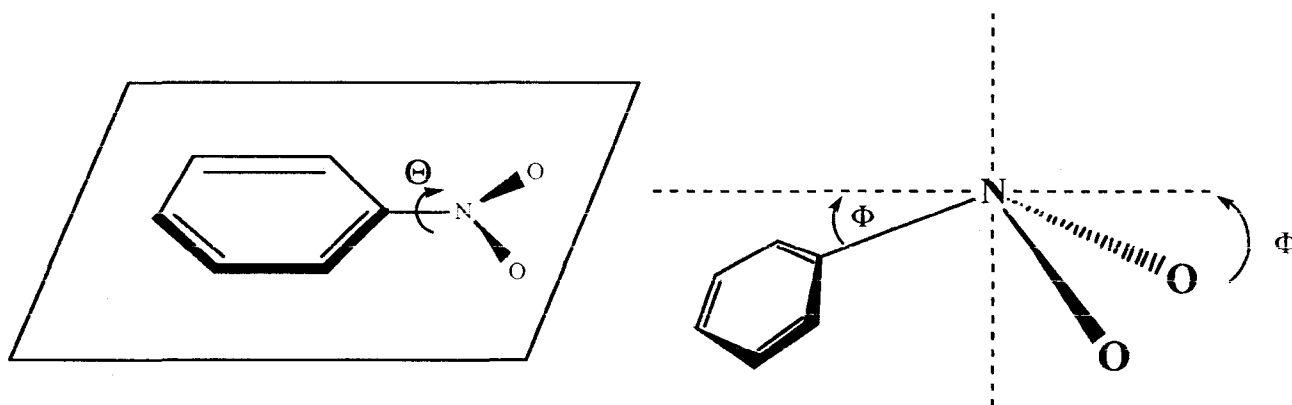
Au moyen des densités de spin obtenues par le calcul, il est possible de tracer les courbes  $a_N = f(\text{angle de rotation})$ . On obtient les graphes suivants .







Ces courbes, analogues à celles de l'étude de Gilbert & coll. sur des dérivés du nitrobenzène<sup>28</sup>, permettent de déduire l'angle de torsion existant entre le cycle aromatique et le plan moyen qui inclut les trois atomes de la fonction nitro. Notons que l'on considère le plan moyen car le radical-anion centré sur l'azote de la fonction nitro adopte une structure "pyramidale" dont l'angle au sommet  $\Phi$  est d'environ 5 à 10° :

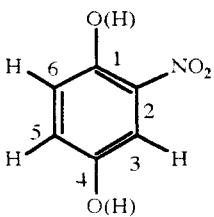
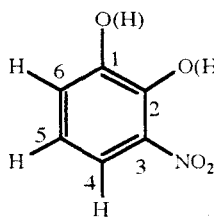
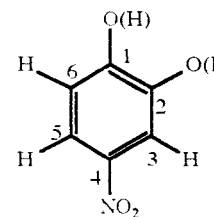


Les angles déduits des courbes précédentes sont les suivants :

molécule	angle $\Theta$ (degré)
2-nitrohydroquinone	52
3-nitrocatechol	36
4-nitrocatechol	34
acide 2-nitrocaféique	65
acide 5-nitrocaféique	35
acide 6-nitrocaféique	42

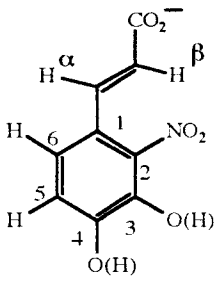
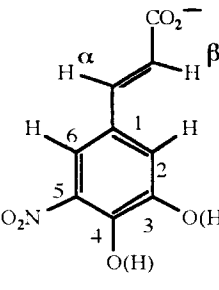
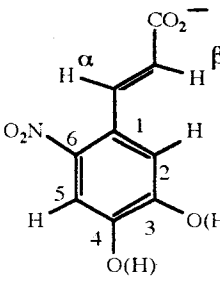
La littérature ne fournit aucune donnée structurale sur des molécules analogues. La seule référence intéressante concerne les calculs effectués sur un nitrobenzène très encombré, le 2, 3, 5, 6 tétraméthyl-nitrobenzène, pour lequel Gilbert <sup>28</sup> propose un angle de rotation  $\Theta = 75^\circ$ . En comparant ce résultat avec celui obtenu pour l'acide 2-nitrocaféique pour lequel l'encombrement stérique autour du groupe nitro est très important, on peut estimer que les angles calculés correspondent à une bonne approximation de la structure des produits en solution aqueuse.

Les constantes hyperfines expérimentales de l'hydrogène des dihydroxy-nitrobenzènes sont rassemblées ci-dessous. Les valeurs entre parenthèses sont celles obtenues par la relation de Mac ~~D~~onnell. L'attribution, bien que très probable, ne présente pas de caractère définitif.

			
$a_1$ (G)	0,95	0	0,37
$a_2$ (G)	15,8 (15,8)	0,38	0,18
$a_3$ (G)	3,05 (2,77)	15,5 (15,5)	2,7 (1,98)
$a_4$ (G)	0	2,85 (3)	15,12 (15,12)
$a_5$ (G)	3,05 (2,97)	1 (1,75)	4,2 (2,55)
$a_6$ (G)	1,25 (1,05)	2,75 (2,15)	1,02 (0,1)

Les données du tableau précédent montrent qu'il existe une corrélation importante entre les résultats expérimentaux et les calculs théoriques.

Dans le cadre des acides nitrocaféiques, les spectres obtenus sont moins bien définis et ne donnent pas accès à toutes les constantes hyperfines de l'hydrogène. On obtient les résultats collectés sur la page suivante.

			
$a_\alpha$ (G)	0 (0,15)	0 (0,025)	0,85 (0,18)
$a_\beta$ (G)	0,55 (0,675)	0 (0,175)	1,65 (0,975)
$a_2$ (G)	19,62 (19,62)	non déterminée (1,87)	1,6 (0,625)
$a_5$ (G)	1,1 (0,75)	15,25 (15,25)	2,25 (1,96)
$a_6$ (G)	0,4 (0,475)	2,75 (3,15)	15,15 (15,15)

La corrélation entre valeurs calculées et valeurs théoriques est acceptable, bien que moins bonne que dans le cas des dihydroxynitrobenzènes. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le facteur stérique dû à la chaîne alkylée est beaucoup plus important dans les acides nitrocaféiques. Or les méthodes LCAO n'en tiennent pas forcément compte. Elles permettent cependant l'attribution des constantes de couplage avec une relativement bonne précision.

○○○○○○○○

#### XI-4. Conclusion

Les données structurales tirées de l'étude RPE permettent de déterminer la géométrie des radicaux-anions nitrés diphenoliques. La rotation du groupe nitro par rapport au cycle aromatique diminue la délocalisation de la densité électronique sur le cycle. **De ce fait, on se retrouve plutôt -surtout dans le cas de l'acide 2-nitrocaféique- face à deux entités distinctes : une fonction nitro et une fonction diphenolique sur un même cycle aromatique.** Or Gilbert <sup>28</sup> rappelle que la structure du radical-anion est une version "exagérée" de la fonction nitro neutre. On peut en déduire que la molécule neutre présente des caractéristiques analogues. La fonction nitro dans les dihydroxybenzènes et les acides nitrocaféiques semble donc bien "individualisée" par rapport au reste de la molécule. Elle exerce sa fonction de protection sur le groupe diphenolique sans pour autant être en contact direct avec elle.

La durée de vie importante des radicaux-anions peut aussi être attribuée à cette rotation. En effet, Meot-Ner & coll.<sup>35</sup> ont montré que la vitesse de transfert électronique est d'autant

moins importante que la fonction nitro est individualisée . En effet, si la densité électronique est concentrée sur la fonction nitro, la surface impliquée dans le choc entre le radical-anion et la molécule acceptrice est beaucoup moins importante. La vitesse de transfert électronique en est donc très diminuée.

○○○○○○○○

## Références Bibliographiques

### IX - Détermination des pKa par spectroscopie UV

- 1 - S. Capelle, "Autoxydation de l'acide gentisique. Propriétés antioxydantes", Thèse Lille (1992)
- 2 - E. A. Nothnagel & R.N. Zitter, "pH dependence of the ultraviolet and visible absorption and the resonance Raman spectra of 4-nitro-1, 2-benzenediol in aqueous solution", *J. Phys. Chem.*, **80**, 722-727 (1976)
- 3 - L. J. Henderson, "Blut, seine Pathologie und Physiologie", Steinkopff, Dresden (1932)
- 4 - H. H. Perkampus, "UV-VIS spectroscopy and its applications", 131-164, Springer laboratory (1992)
- 5 - C. N. R. Rao, "Ultraviolet and visible spectroscopy. Chemical applications", 36-75, Butterworths (1967)
- 6 - D.H. Rosenblatt, J. Epstein & M. Levitch, "Some nuclearly substituted catechols and their acid dissociation constants", *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 3277-3278 (1953)
- 7 - S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic & M.G. Simic, "Flavonoïds as antioxidants", *ibid.*, **116**, 4846-4851 (1994)
- 8 - HANDBOOK of chemistry & physics, "Dissociation constants of organic acids in aqueous solution", D161-D163, 66<sup>th</sup> edition, CRC Press (1985-1986)
- 9 - G.B. Barlin & D.D. Perrin, "Prediction of the strengths of organic acids", *Quarterly Rev.*, **XX**, 75-102 (1966)

### X - Voltammétrie cyclique

- 10 - P.T. Kissinger & W.R. Heineman, "Cyclic voltammetry", *J. Chem. Educ.*, **60**, 702-706 (1983)
- 11 - A. Tallec, "Les facteurs expérimentaux" dans "*Electrochimie organique : synthèses et mécanismes*", Masson éd., 23-39 (1985)
- 12 - "Electrochemistry of phenolic compounds" dans "*Encyclopedia of electrochemistry, organic section*", Marcel Dekker Ed., **12** (1979)
- 13 - "Electrochemistry of nitro compounds" dans "*Encyclopedia of electrochemistry, organic section*", Marcel Dekker Ed., **13**, 78-126 (1979)
- 14 - D. Meisel & G. Szapski, "One-electron transfer equilibria and redox potentials of radicals studied by pulse radiolysis", *J. Phys. Chem.*, **79**, 1503-1509 (1975)

- 15- P. Neta, M.G. Simic & M.Z. Hoffman, "Pulse radiolysis and electron spin resonance studies of nitroaromatic radical anions. Optical absorption spectra, kinetics and one electron redox potentials", *J. Phys.Chem.*, **80**, 2018-2023 (1976)

### XI - Etude par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

- 16- T. Tabatabaie & G. Dryhurst, "Autoxidation of the serotonergic neurotoxin 5, 7-dihydroxytryptamine", *J. Med. Chem.* , **33**, 667-672 (1990)
- 17- F. Zhang & G. Dryhurst , "Oxidation chemistry of the endogenous central nervous system alkaloid salsolinol-1-carboxylic acid", *ibid.* , **36**, 11-20 (1993)
- 18- S. Capelle, N. Cotelle, P. Cotelle, J-L Bernier & J-P Catteau, "Antioxidant activities of dihydroxylated salicylic acid derivatives", *Redox report*, **1**, 131-137 (1994)
- 19- D.H.R. Barton & D.W. Jones, "Autoxidation in basic media. IV. Hydrocarbon autoxidation", *J. Chem. Soc.* , 3653-3670 (1965)
- 20- S. Matsumoto, Y. Iitaka, S. Nakano, M. Matsuo, "Potassium tert-butoxide-catalysed oxygenations of vitamin E and its model compound 2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-ol", *J.C.S. Per. Trans. I* , 2727-2735 (1993)
- 21- a) G.A. Russel, R.D. Stephens & E.R. Talaty, "Reaction of resonance stabilized carbanions. XVII. Application of ESR spectroscopy to problem of structure and conformation. 3. New method for preparation of radical-anions of diketones", *Tetrahedron Letters*, 1139-1144 (1965)  
b) G.A. Russel, P.R. Whittle & R.G. Keske, "ESR Spectroscopy on aliphatic semidiones. XVI. Semidiones derived from the bicyclo (n-1 ; 1) alkenes", *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 1467-1470 (1971)
- 22- G.A. Russel & S.A. Weiner, "Methylation of aromatic hydrocarbons by dimethylsulfoxide in the presence of base", *J. Org. Chem*, **31**, 248-251 (1966)
- 23- J.A. Pedersen, "*CRC Handbook of EPR spectra from quinones and quinols*", CRC Press (1983)
- 24- W.T. Dixon, M. Moghimi & D. Murphy , "Electron spin resonance study of the stereochemistry of radicals related to cinnamic acid", *J.C.S. Per. Trans.II*, 1189-1191 (1975)
- 25- a) G.A. Russel, E.G. Janzen & E.T. Strom, "Reaction of resonance stabilized anions. III. Spontaneous formation of radical-anions from nitroaromatics in basic solution", *J. Amer. Chem. Soc.* , **84**, 4153-4154 (1962)  
b) G.A. Russel, A.J. Moye & K.L. Nagpal, "Reaction of resonance stabilized anions. IV. Effect of structure on the rate of reaction of carbanion with molecular oxygen", *ibid*, **84**, 4154-4155 (1962)
- 26- M. Campredon, R. Guglielmetti, A. Samat, G. Gronchi & A. Alberti , "Radical-anions from some photochromic nitrocompounds. An electron paramagnetic resonance and electrochemical study". *Res. Chem. Intermed.* . **19**, 307-318 (1993)
- 27- M. Lucarini, G.F. Pedulli, D. Spinelli & S. Frascari, " An EPR study of the radicals from 5-nitrothiophene-carboxamides : a novel group of direct acting mutagens", *Tetrahedron* , **49**, 7317-7324 (1993)

- 28- B.C. Gilbert & M. Trenwith, "The structure of nitro-anion-radicals. An investigation employing electron spin resonance spectroscopy and INDO (intermediate neglect of differential overlap) molecular orbital calculation", *J.C.S. Perk. Trans. II*, 2010-2015 (1973)
- 29- P.L. Kolker & W.A. Waters, "The radical-anions of para-substituted aromatic nitro-compounds", *J. Chem. Soc.*, 1136-1141 (1964)
- 30- A. Nose, "Reduction of nitroaromatic compounds with sodium borohydride", *Yakugaku Zasshi*, **97**, 116-120 (1977) <CA : 86 : 170979 u>
- 31- J-L Grenier, P. Cotelle, N. Cotelle & J-P Catteau, "An EPR study of the radicals issued from nitrocatechols and nitrohydroquinone : a new method of production of nitroaromatic anion radicals", *J.Chim.Phys.*, **92**, 97-103 (1995)
- 32- a) B. Bigot & F. Volatron, "Parlez-vous chimie théorique ?", *Actu. Chim.*, 43-51 (1984)  
b) A. Streitwieser Jr, "Molecular Orbital theory for organic chemists", Wiley & Sons Ed.(1962)
- 33- P.H. Rieger & G.K. Fraenkel, "Analysis of the electron spin resonance spectra of aromatic nitrosubstituted anion radicals", *J. Phys. Chem.*, **39**, 609-629 (1963)
- 34- S. Garcia-Granda, G. Beurskens, P.T. Beurskens, T.S.R. Krishna & G.R. Desiraju, "Structure of 3, 4 dihydroxy-*trans*- cinnamic acid (caffeic acid) and its lack of solid state topochemical reactivity", *Acta Cryst.*, **C43**, 683-685 (1987)
- 35- M. Meot-Ner & P. Neta, "kinetics of electron transfer from nitroaromatic radical anions in aqueous solutions. Effects of temperature and steric configuration", *J. Phys. Chem.*, **90**, 4648-4650 (1986)

○○○○○○○○

*Propriétés antioxydantes*



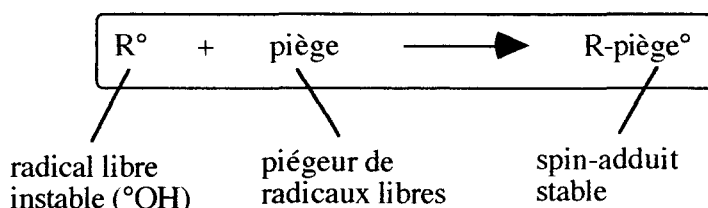
## XII- Piégeage des radicaux libres .

### XII-1. Généralités

La technique de prédilection pour l'étude des radicaux libres est la résonance paramagnétique électronique.

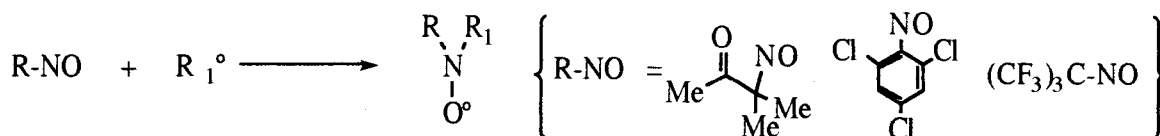
Le piégeage des radicaux libres est une forme de protection contre l'agression par les formes activées de l'oxygène. Le radical hydroxyle en étant la forme la plus agressive, de nombreux auteurs considèrent ce paramètre comme primordial dans l'ensemble des propriétés antioxydantes et tentent de mettre au point non seulement des molécules pièges de plus en plus efficaces, mais aussi des outils performants permettant une mesure quantitative de cette faculté de piégeage.

Il est nécessaire, dans ce but, de concevoir des molécules qui, d'une part réagissent rapidement avec le radical hydroxyle et d'autre part forment un produit plus stable que le radical étudié, de manière à pouvoir le quantifier. C'est le principe de la méthode de "spin trapping"<sup>1</sup> :

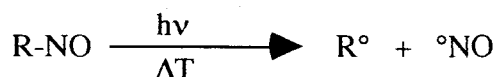


Les piègeurs les plus rencontrés sont les dérivés nitrosés et les nitrones.

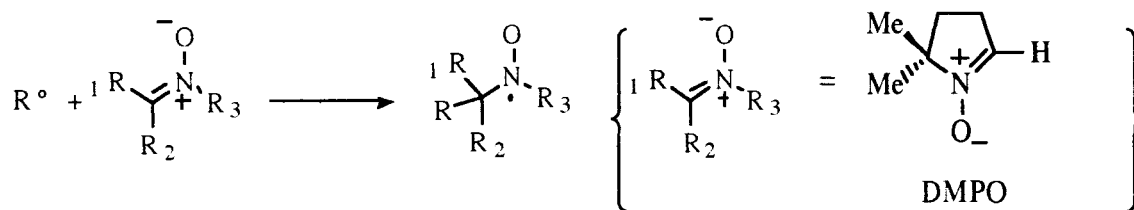
L'utilisation des dérivés nitrosés<sup>2</sup> peut sembler *a priori* plus intéressante car plus riche en informations :



Le radical à identifier vient en effet se fixer directement sur le groupement nitroxyde, induisant ainsi un couplage hyperfin avec l'azote. L'identification n'en devient que plus aisée. L'inconvénient de ces dérivés nitrosés est qu'ils se décomposent aisément à la lumière et à la chaleur :



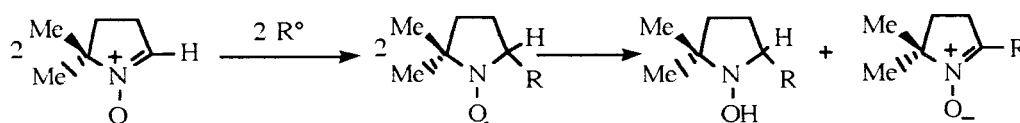
Ils ont de plus une certaine tendance à se dimériser, ce qui inactive la réaction de piégeage. On leur préfère donc l'utilisation des nitrones<sup>3</sup> :



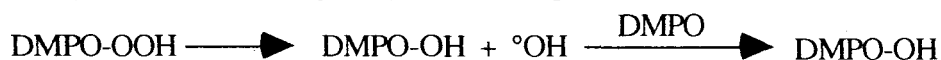
Les informations obtenues avec ce genre de composé sont moins riches, mais permettent quand même l'identification des produits lorsqu'on travaille avec des radicaux aussi simples que  $^\bullet\text{OH}$  ou  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Le 5, 5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DMPO) est de loin le piège le plus couramment utilisé. Cependant Breuer<sup>3</sup> et Turner<sup>4</sup> rappellent les limites des nitrones :

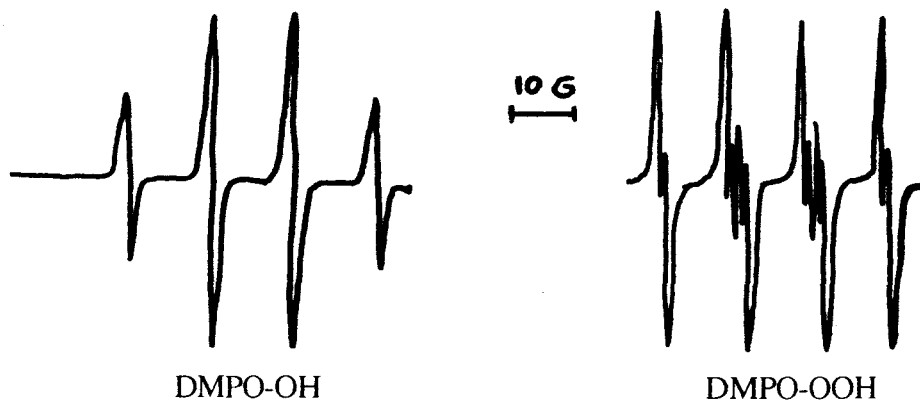
- ils réagissent aisément avec les nucléophiles
- les spin-adduits peuvent réagir entre eux et se disproportionner :



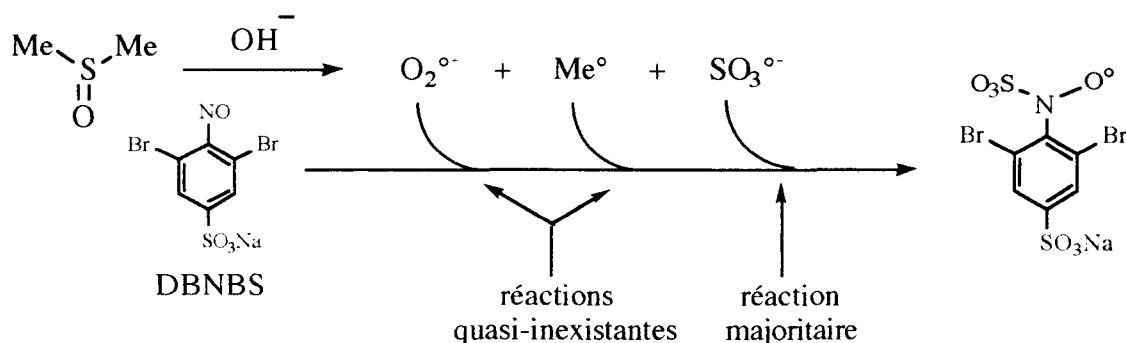
- la durée de vie de certaines espèces est très limitée. Par exemple, l'adduit du DMPO et de l'anion superoxyde a un temps de vie de 8 mn :



Les spin-adduits obtenus avec les deux principaux radicaux libres provenant de l'oxygène ( $^\bullet\text{OH} \longrightarrow \text{DMPO-OH}$  et  $\text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{DMPO-OOH}$ ) présentent des profils assez caractéristiques pour être identifiés :



Cependant, il faut noter l'influence extrême du solvant. En effet, par l'intermédiaire des interactions qui existent entre le solvant et le spin-adduit, il se produit des déplacements de densité électronique (par l'intermédiaire de variation de configuration ou de formation /disparition de liaisons hydrogène intra /extramoléculaires). Ceci induit une variation des constantes de couplage hyperfines observées sur le spectre RPE. En général, une hausse de la polarité du solvant entraîne une augmentation de la constante liée à l'azote  $a_N$  <sup>5</sup>. De plus, il est nécessaire de tenir compte des phénomènes parasites dues à la réaction potentielle du solvant avec certains éléments du mélange que l'on étudie. Un exemple intéressant est celui décrit lors de l'observation de l'adduit de l'anion superoxyde sur le DBNBS<sup>6</sup>. En fait, on observe les évènements suivants :



Bien que le système DMSO alcalin soit souvent utilisé comme producteur d'anions superoxydes lorsque la production biochimique (xanthine / xanthine oxydase) n'est pas satisfaisante ( inhibition de l'enzyme par les produits testés par exemple), il est évident qu'une extrême prudence est nécessaire quant au choix du piègeur - qui peut ne pas réagir avec l'espèce radicalaire voulue - et du solvant. Ce travail fut effectué sur un dérivé nitrosé. Ces résultats sont-ils applicables aux nitrones ?

Pour terminer ce préambule sur le piégeage des radicaux libres, il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de conditions standards pour la détermination des propriétés de piégeage par des molécules qui pourrait potentiellement être utilisées en thérapeutique. Concernant le radical hydroxyle par exemple, le milieu peut aussi bien être un tampon phosphate qu'un mélange aqueux très dilué de pyridine et d'acide chlorhydrique (de manière à faciliter la solubilisation des substances organiques)<sup>8</sup>... Les modes de production des radicaux peuvent eux aussi différer :  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4$  en proportions variées, Xanthine /xanthine oxydase +  $\text{Fe(III)}$  <sup>4</sup>.

Il en résulte qu'il n'est parfois guère aisé - vue la dépendance de l'allure du spectre par rapport au conditions expérimentales- de comparer les activités de piégeage des produits étudiés par une personne par rapport à d'autres dont les caractéristiques sont tirées de la littérature.

Un effort de standardisation est donc nécessaire. L'exemple a été donné par Kaneko<sup>9</sup> pour le piégeage des anions superoxydes.

A titre indicatif, voici les paramètres préconisés par l'auteur :

**Standardisation de la méthode de spin trapping**  
**pour les anions superoxydes**

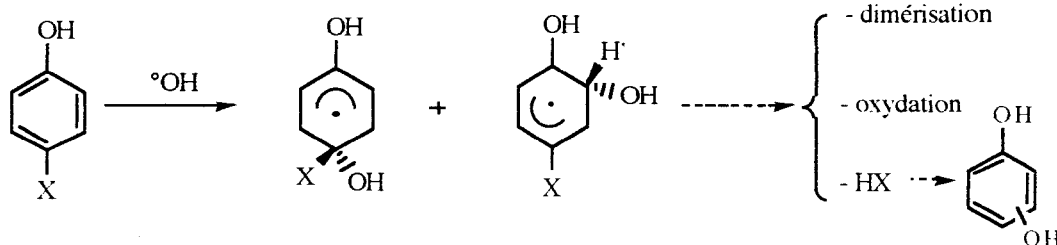
Tampon utilisé :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100mM pH = 7, 8  
 50  $\mu\text{l}$  hypoxanthine 2 mM  
 35  $\mu\text{l}$  DETAPAC 5, 5 mM  
 50  $\mu\text{l}$  tampon (avec ou sans des concentrations variées en produit testé)  
 15  $\mu\text{l}$  DMPO  
 le mélange est vortexé 30 s.  
 On ajoute 50  $\mu\text{l}$  de xanthine oxydase  $0,3 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( l'enzyme est conservée à  $0^\circ\text{C}$ )  
 4 mn après l'addition, on prend le spectre



## XII-2. Piégeage des radicaux hydroxyles

### XII-2-1. Aspect théorique

Le piégeage des radicaux hydroxyles par les noyaux aromatiques se fait par attaque électrophile sur le cycle, avec passage par un intermédiaire hydroxy-cyclohexadiényle<sup>10, 11</sup>. Le calcul des densités électroniques permet de déterminer les sites d'attaques préférentiels :



Le principe de la méthode est simple : à un milieu réactionnel constant contenant une source de radicaux hydroxyles, on ajoute des quantités croissantes de produit à tester en conservant la concentration de DMPO constante. L'intensité du signal du spin-adduit peut se comporter de deux façons :

- l'intensité peut s'accroître par rapport à celle du témoin. La molécule testée engendre  $^{\circ}\text{OH}$  ou dope le système de production. Elle est **pro-oxydante**.
- l'intensité peu décroître par rapport à celle du témoin. La molécule testée piège les  $^{\circ}\text{OH}$  et entre en compétition avec le DMPO. Elle est **antioxydante**.

### XII-2-2. Aspect expérimental

Le tampon est un tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $10^{-1}$  M (pH = 7,4 ajusté par l'addition de KOH). Les solutions sont préparées à partir de ce dernier.

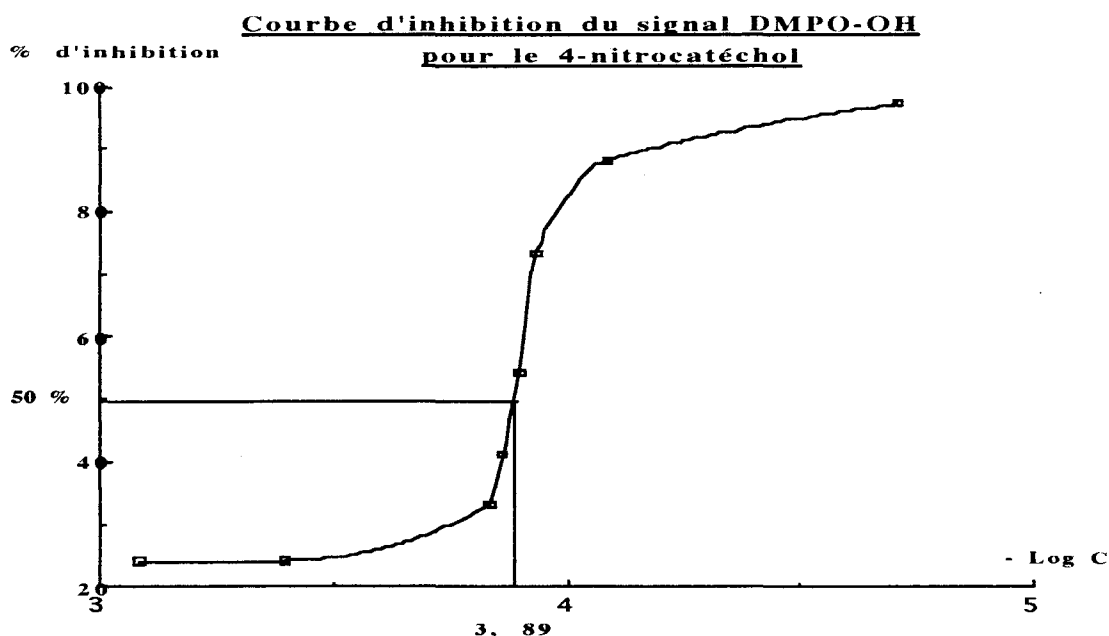
On mélange :

- une solution de sulfate de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $10^{-2}$  M) : 100  $\mu\text{l}$
- la solution du produit à tester à différentes concentrations : 100  $\mu\text{l}$
- une solution de DMPO ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) : 200  $\mu\text{l}$

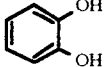
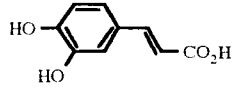
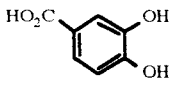
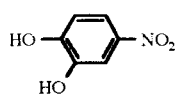
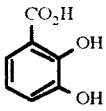
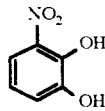
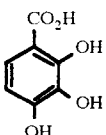
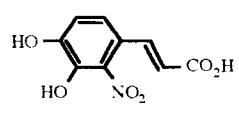
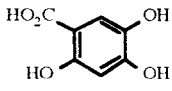
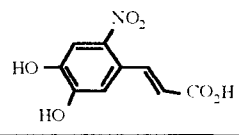
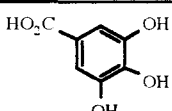
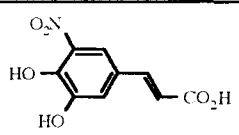
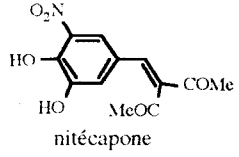
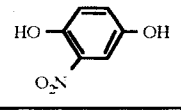
La réaction est déclenchée par addition d'une solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \cdot 10^{-2}$  M) : 200  $\mu\text{l}$

Après 2 mn, le spectre est tracé. En prenant comme référence d'intensité de pic  $I = 100\%$  le résultat obtenu pour une concentration nulle de produit à tester et en traçant  $I = f(-\log C)$ , on peut déterminer  $\text{IC}_{50}$ , valeur corrélée à la concentration d'antioxydant nécessaire pour diminuer l'intensité du signal de 50 %.

On obtient le genre de courbe suivant :



Dans le tableau suivant, les résultats obtenus pour les dérivés nitrés diphenoliques sont reportés et comparés à ceux décrits par Capelle<sup>7</sup> pour les acides di- et tri-hydroxybenzoïques et Suzuki pour la nitécapone<sup>12</sup>.

Produit testé	C ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub>	Produit testé	C ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub>
	0,01	8		0,5	6,3
	0,316	6,5		130	3,89
	66,1	4,1		180	3,72
	0,115	6,9		426	3,37
	1,9	5,7		251	3,6
	11,7	4,9		398	3,4
			 nitécapone	300	3,52
				83	4,07

Comme il était logiquement attendu, les dérivés nitrés sont de bien piètres capteurs de radicaux hydroxyles par rapport aux benzènes et acides benzoïques polyhydroxylés. En effet, la fonction nitro est très électroattractrice et de ce fait, la densité électronique sur le cycle aromatique est bien moindre que sur les cycles non nitrés. La réaction de type électrophile nécessaire pour le piégeage du radical hydroxyle n'est donc pas facilitée. Il faut aussi ajouter qu'au pH de l'étude (pH = 7,4), les dérivés nitrés possèdent une fonction phénol ionisée, en ortho ou para, ce qui n'est pas vrai pour les acides polyhydroxylés "nus" (ex : acide 2,5-dihydroxybenzoïque:  $pK_{\text{CO}_2\text{H}} = 2,73$  ;  $pK_{\text{OH}_5} = 10$

;  $pK_{OH2} = 12,74$ ). La délocalisation qui en résulte tend à maintenir la densité électronique sur la molécule.

**Les propriétés antioxydantes potentielles des dérivés nitrés polyphénoliques ne proviendront pas du piégeage des radicaux hydroxyles.**



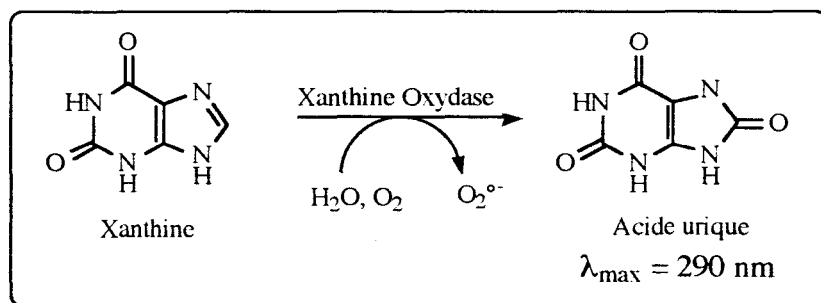
### XII-3. Piégeage des radicaux superoxydes

#### XII-3-1. Situation du problème

Les radicaux superoxydes étant les précurseurs de la toxicité de l'oxygène, il est naturel de chercher à les piéger pour éviter les dégâts ultérieurs. La méthode de RPE mettant en action le DMPO semblait intéressante, mais de nombreux problèmes furent rencontrés. En effet, le système de production d' $O_2^{\circ-}$  le plus couramment utilisé dans ce genre de manipulation est le couple xanthine / xanthine oxydase. Cependant, il est bien connu que les dérivés nitrés sont généralement de bons inhibiteurs d'enzymes<sup>13</sup>. Nous avons donc voulu vérifier cette assertion sur la xanthine oxydase.

#### XII-3-2. Inhibition de la xanthine oxydase

La procédure classique de mesure de la formation d'acide urique par spectrophotométrie UV (à 290 nm) fut utilisée. Elle est dépendante de la réaction enzymatique suivante :

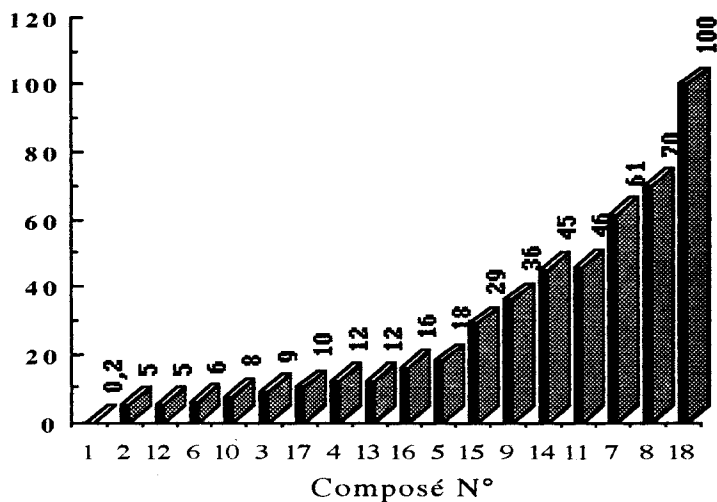


Lorsque la xanthine est mise en présence de xanthine oxydase, il y a formation d'acide urique. Si l'on rajoute au milieu réactionnel un inhibiteur de l'enzyme, la concentration d'acide urique dans le milieu sera diminuée par rapport à celle du témoin. On en déduira dans notre cas le pourcentage d'inhibition obtenu pour une concentration en inhibiteur égal à 100  $\mu\text{M}$ . Le DMSO est pris comme témoin négatif ( aucun pouvoir inhibiteur), et l'allopurinol ( $N^{\circ}18$ ) comme témoin positif ( 100% d'inhibition).

Les résultats obtenus sont résumés dans le schéma de la page suivante.

Il n'est évidemment pas possible de tirer de relations structure-activité à partir d'un si petit nombre de produits. On peut cependant remarquer que la présence de nombreux substituants sur le cycle est nécessaire (acides cinnamiques > catéchols). La position des fonctions phénoliques en ortho en présence d'un groupe nitro voisin (composé 7 et 8) donne la meilleure activité. La conception des acides 2, 3- et 2, 5-diphénoliques aurait été d'un grand intérêt vus les résultats obtenus pour leurs dérivés méthoxylés. Suzuki a affiné son étude sur la nitécapone en lui démontrant un pouvoir d'inhibiteur compétitif<sup>12</sup>.

% Inhibition XO



N°	Formule	N°	Formule	N°	Formule
1		7		13	
2		8		14	
3		9		15	
4		10		16	
5		11		17	
6		12		18	



Les résultats d'inhibition de l'enzyme ont entraîné la tentative de mise au point d'une nouvelle méthode de mesure de captage de l'anion superoxyde.

### XII-3-2. Aspect expérimental du piégeage des anions $O_2^{\circ-}$

L'utilisation de  $KO_2$  / éther-couronne en présence de DMPO par spectroscopie RPE n'a donné aucun résultat exploitable. En effet, nous n'avons jamais obtenu l'adduit attendu. Des résultats aussi peu encourageants furent observés lors de l'utilisation du mélange DMSO / KOH. dans un tampon à pH= 8, 6. Dans ce cas, on observe des variations de l'intensité du signal qui n'ont aucun rapport avec les concentrations de produits utilisés.

La spectrophotométrie UV a donc été envisagée.

Les deux méthodes préconisées pour cette étude consistent en l'observation de la réduction du cytochrome c à 550 nm<sup>12</sup> ou celle du NBT (nitroblue tetrazolium) en formazan à 560 nm<sup>14</sup>. C'est cette dernière qui a été employée, le cytochrome c étant parfois réduit par les composés à structure catécholique. La méthode décrite par Farrera & coll.<sup>14</sup> utilise le système xanthine / xanthine oxydase comme source d'anions superoxydes. Cependant, les molécules nitrées diphénoliques présentent des propriétés d'inhibition de l'enzyme assez importante pour fausser les mesures. Une source utilisant le DMSO et la soude a donc été utilisée. Il est cependant difficile d'évaluer la quantité d'anions superoxydes produits dans ce cas. De plus, il n'est pas aisé de faire la part entre l'augmentation d'absorbance due à une réaction entre l'anion superoxyde et la molécule testée (transfert électronique pour former un radical très absorbant par exemple). Aucune conclusion n'a donc pu être obtenue concernant le piégeage des radicaux superoxydes.

La détermination de la production d' $H_2O_2$  par la méthode à l'iode ou à la catalase souffre elle aussi du problème de l'absorption importante des molécules étudiées aux longueurs d'ondes utilisées pour les manipulations<sup>15</sup>.

Pour établir s'il existe une réaction entre les dérivés étudiés et l'anion superoxyde. Par l'intermédiaire de la RPE, et en utilisant la méthode préconisée par Kitagawa<sup>16</sup>, en mélangeant une solution contenant  $KO_2$  et 18-C-6 d'une part et le produit à tester d'autre part (en proportions respectives 0,5 / 5 / 1) on met très bien en évidence les radicaux semi-quinoniques correspondant au catéchol et à l'hydroquinone. L'acide caféique ne permet d'observer qu'un léger changement de couleur, sans signal RPE. La manipulation effectuée sur les dérivés nitrés diphénoliques induit un changement de couleur important (jaune, orange -----> rouge), sans signal RPE. Enfin, les acides nitrocaféiques permettent l'observation d'un changement de couleur identique accompagné d'un dégagement gazeux immédiat. Le même genre de manipulation effectuée à l'échelle du décigramme en absence d'éther-couronne dans le toluène sec<sup>17</sup> montre un changement de couleur important à l'interface solide liquide ( il existe donc une réaction). En présence d'éther-couronne dans

le DMSO, on fait les mêmes observations que lors de l'étude RPE. Cependant, la RMN, l'infrarouge et la spectrométrie de masse ne permettent pas la mise en évidence de produit de réaction autre que la molécule de départ.

Sans résultats expérimentaux plus probants, on pourrait penser à une réoxydation d'  $O_2^{\circ-}$  en oxygène, mais cette hypothèse demande à être étayée plus solidement. La mise au point d'une méthode d'évaluation de la consommation d'anions superoxydes peut être suivie par RPE à 77 K ou par voltammétrie cyclique dans le DMF<sup>18</sup>. Cependant, la délicatesse de ces manipulations ne nous a pas encore permis la mise en évidence d'une quelconque action des dérivés nitrés diphénoliques sur  $O_2^{\circ-}$ . Ces manipulations sont toujours en cours de perfectionnement.

#### **XII-4. Conclusion**

Alors que les dérivés diphénoliques simples présentent des capacités de piégeage des radicaux hydroxyles et superoxydes très importantes, **la présence de la fonction nitro inhibe cette capacité de piégeage des radicaux hydroxyles**. Le mécanisme mettant en jeu une addition sur le cycle aromatique, l'inhibition est vraisemblablement due à la chute de densité électronique sur le cycle causée par la fonction nitro.

Cette fonction présente cependant un intérêt non négligeable au niveau de l'inhibition enzymatique. En effet, **la xanthine oxydase semble très sensible aux dérivés nitrés de l'acide caféique** et confère aux produits étudiés un certain intérêt.

○○○○○○○○

## Références bibliographiques

### XII- Piégeage des radicaux libres

- 1 - E. G. Janzen, "Spin trapping", dans "*Free radicals in biology* ", W.A. Pryor ed., Academic press, **4**, 116-154 (1980)
- 2 - H.G. Aurich, "Nitroxides", dans "*The chemistry of amino, nitroso and nitro compounds and their derivatives*", S. Patai ed., Interscience, 565-622 (1982)
- 3 - E. Breuer, "Nitrones and nitronic acid derivatives : their structure and their roles in synthesis", *ibid.* , 459-564
- 4 - M.J. Turner III & G.M. Rosen, "Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals with substituted pyrroline 1-oxides", *J. Med. Chem.* , **29**, 2439-2444 (1986)
- 5 - P. Ludwig, T. Layloff & R.N. Adams , "Solvent effects on hyperfine coupling constants in electron paramagnetic resonance spectra", *J. Amer. Chem. Soc.* , **86**, 4568-4573 (1964)
- 6 - K. Stolze, D.R. Duling & R.P. Mason , "Spin trapping artifacts in DMSO", *Biochem. Biophys. Res. Comms.* , **143**, 941-946 (1987)
- 7 - S. Capelle, B. Planckaert, P. Cotelle & J-P Catteau, "Hydroxyl radical scavenging activity of salicylic acid and its hydroxylated metabolites. An ESR study", *J. Chim. Phys.* , 89, 561-566 (1992)
- 8 - R.F. Haseloff, I.E. Blasig, H. Meffert & B. Ebert, "Hydroxyl radical scavenging and antipsoriatic activity of benzoic acid derivatives", *Free. Radical Biol.Med.* , **9** , 111-115 (1990)
- 9 - M. Kaneko, S. Kanda, Y. Takebayashi, O Otsumi, T. Horikawa, T. Doi, E. Kaneda & K. Kaneko , "Reevaluation of ESR spin trapping method on superoxide anion radicals", *Higashi nippon Shigaku Zasshi*, **12**, 165-174 (1993) (CA : 121 : 2677 s)
- 10 - L.M. Dorfman, I.A. Taub & R.E. Buehler, "Pulse radiolysis studies. I. Transient spectra and reaction rate constants in irradiated aqueous solution of benzene", *J. Chem. Phys.* , **36**, 3051-3061 (1962)
- 11 - W.T. Dixon & R.O.C. Norman, "Electron spin resonance studies of oxidation. IV. Some benzenoid compounds", *J. Chem. Soc.*, 4857-4860 (1964)
- 12 - Y. J. Suzuki, M. Tsuchiya, Y. Shindo & L. Packer, "Antioxidant properties of nitecapone (OR-462)", *Free. Radical Biol.Med.* , **13**, 517-525 (1992)
- 13 - T.A. Alston, "Enzyme inhibition by nitro and nitroso compounds", *Acc. Chem. Res.*, 418-424 (1983)
- 14 - J.A. Farrerra, "The antioxidant role of bile pigments evaluated by chemical tests", *Biorg. Med. Chem.*, **2**, 181-185 (1994)
- 15 - A.O. Allen., "Decomposition of water and aqueous solution under mixed fast neutron and gamma radiations", *J. Phys. Chem.*, **56**, 575-586 (1952)

- 16- S. Kitagawa, H. Fujisawa & H. Sakurai, "Scavenging activities of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry", *Chem. Pharm.Bull.*, **40**, 304-307 (1992)
- 17- D. Vidril-Robert, M.T. Maurette, E. Oliveros, M. Hocquaux & B. Jacquet, "Exemple de réaction à l'interface solide-liquide : oxydation du naphthalènediol par le superoxyde de potassium", *Tetrahedron Letters.*, **25**, 529-532 (1983)
- 18- K. Kano, T. Mabuchi, B. Uno, Y. Esaka, T. Tanaka & M. Iinuma, "Superoxide anionradical-induced dioxygenolysis of quercetin as a mimic of quercetinase, *J. Chem.Soc.,Chem. Commun.*, 593-594 (1994)

○○○○○○○○

*Synthèse*  
*aspect expérimental*

## Généralités

Les spectres de RMN du proton et du carbone ont été réalisés sur un appareil BRUKER AM 300 (en utilisant le tétraméthylsilane comme référence interne).

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre RIBER 10-10.

Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil PERKIN 881.

La silice MERCK, KIESELGEL 60, 70-230 mesh a été utilisée pour les chromatographies sur colonne.

Les points de fusion ont été déterminés, suivant les cas, au moyen d'un microscope REICHERT THERMOPAN ou d'un banc Köpfler REICHERT.

Le centre de microanalyse du C.N.R.S. a réalisé les analyses élémentaires des composés nouveaux.

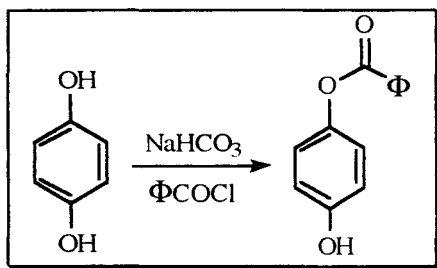
Les abréviations suivantes ont été employées : (s) singulet, (d) doublet, (dd) double doublet

Dans ce chapitre, DMSO est employé pour désigner le DMSO six fois deutérés ( $\text{DMSO}_6$ ).

○○○○○○○○

### XIII- Synthèse de la 2-nitro-hydroquinone

#### XIII-1. Monobenzoyl-hydroquinone

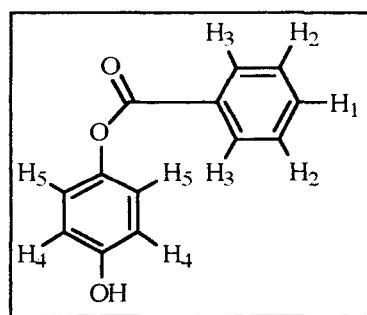


10 g (90 mmoles) d'hydroquinone sont dissous dans un solution aqueuse de 15, 2 g de bicarbonate de soude. On additionne 12, 7 g de chlorure de benzoyle (90mmoles) sous forte agitation. Après une heure de réaction, on agite le précipité avec une solution de bicarbonate de soude saturée à froid, filtre, lave à l'eau froide et recristallise de l'eau bouillante.

rendement : 85 % (16, 5 g)

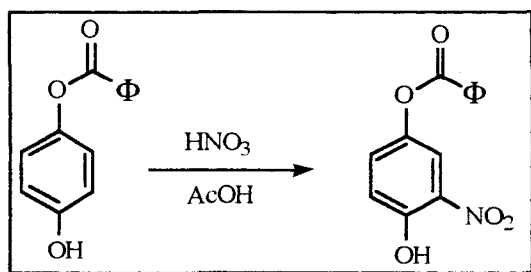
fusion : 163°C (déc.) : (Lit.<sup>1</sup> : 164°C - déc.)

Masse ; m/z	attribution; %
214	M; 5
109	M-ΦCO ; 100



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m, J (Hz)	attribution
7, 25	4 H, massif complexe	H <sub>2</sub> + H <sub>5</sub>
7, 5	1 H, multiplet	H <sub>1</sub>
7, 8	2H, multiplet	H <sub>4</sub>
8	2 H, multiplet	H <sub>3</sub>

XIII-2. 4-benzoyl-2-nitro-hydroquinone

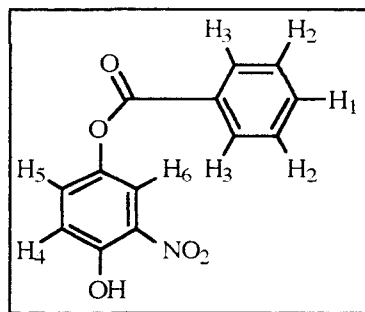


10 g (46 mmoles) de benzoyl-hydroquinone sont dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial. On ajoute 2 ml d'acide nitrique ( $d=1,42$ ) et on abandonne dans un endroit frais. après 48 heures de réaction, le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau glacée.. Le précipité est filtré, lavé à l'eau froide et recristallisé de l'alcool.

rendement : 67 % (7,7 g)

fusion : 96°C (Lit.<sup>1</sup> : 96°C)

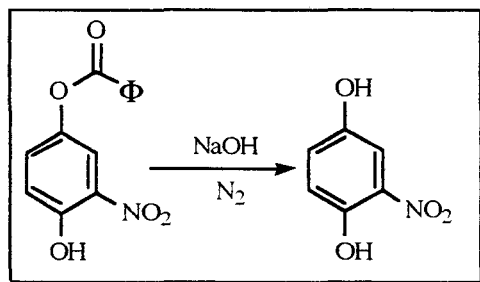
Masse (m/z)	attribution; %
259	M ; 6
154	M- $\Phi$ CO ; 100



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm)(CDCl <sub>3</sub> )	m, J (Hz)	attribution
7,2	1 H, d( $J_{ortho}=9,1$ )	H <sub>4</sub>
7,5	3 H, massif complexe	H <sub>2</sub> + H <sub>5</sub>
7,7	1 H, multiplet	H <sub>1</sub>
8	1 H, d ( $J_{méta}=2,7$ )	H <sub>6</sub>
8,2	2 H, multiplet	H <sub>3</sub>
10,5	1H, s	O-H



XIII-3. 2-nitrohydroquinone

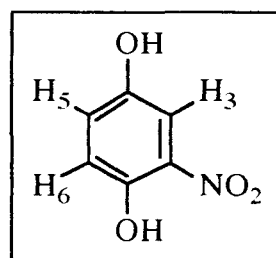


5 g (19,3 mmoles) de 4-benzoyl-2-nitro- hydroquinone sont dissous sous azote dans 50 ml de soude à 10 %. On agite vigoureusement pendant une heure. La solution est refroidie, acidifiée par HCl concentré et évaporée sous pression réduite. Après chromatographie sur gel de silice du résidu (éluant : dichlorométhane) et sublimation sous vide à 100°C, on obtient la 2-nitro-hydroquinone pure.

rendement : 50 % (1,5 g)

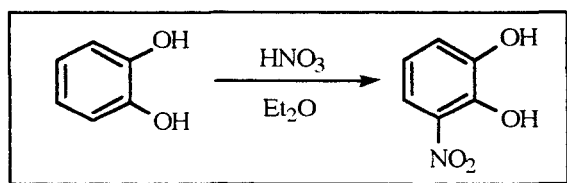
fusion : 134°C (Lit.<sup>1</sup> : 134°C)

Masse (m/z)	attribution, %
155	M ; 100
109	M-NO <sub>2</sub> ; 23,5



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm) (DMSO)	m, J (Hz)	attribution
6,97	1 H, d(J <sub>ortho</sub> =8,98)	H <sub>6</sub>
7,03	1H, dd(J <sub>ortho</sub> =8,98 ; J <sub>méta</sub> =2,8)	H <sub>5</sub>
7,24	1 H, d(J <sub>méta</sub> =2,8)	H <sub>3</sub>

#### XIV- Synthèse du 3-nitrocatéchol

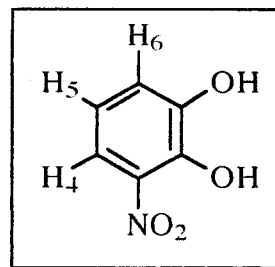


10 g (9 mmoles) de pyrocatechol sont dissous dans 500 ml d'éther éthylique. 4 ml d'acide nitrique fumant sont alors ajoutés goutte-à-goutte en 1 heure. La température du milieu ne doit pas excéder 15-20°C. Le solvant est évaporé sous pression atmosphérique. Le résidu brun est soumis à une chromatographie sur gel de silice (éluant : chloroforme / acétate d'éthyle : 3/1), une sublimation puis une recristallisation de l'éther de pétrole.

rendement : 45 %

fusion : 86°C (Lit.<sup>2</sup> : 86°C)

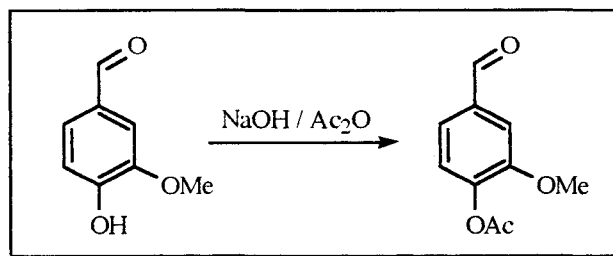
masse (m/z)	attribution; %
155	M ; 100
109	M-NO <sub>2</sub> ; 30



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm) (DMSO)	m, J (Hz)	attribution
6,79	1H, t (J <sub>ortho</sub> =7,8)	H <sub>5</sub>
7,07	1H, dd (J <sub>ortho</sub> =7,8 J <sub>méta</sub> =1,6)	H <sub>6</sub>
7,3	1H, dd (J <sub>ortho</sub> =7,8 J <sub>méta</sub> =1,6)	H <sub>4</sub>

## XV- Synthèse de l'acide 2-nitrocaféique (E)

### XV-1. Acétate de vanilline

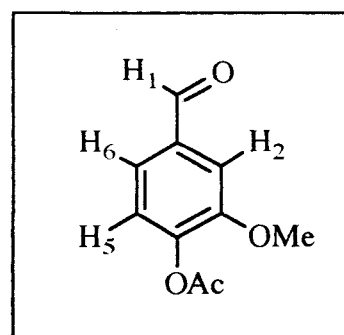


40 g (263 mmoles) de vanilline sont dissous dans une solution à 10,8 g (270 mmoles) de soude dans 200 ml d'eau. Une solution de 27,2 ml d'anhydride acétique dans 240 ml d'éther éthylique est alors ajoutée goutte-à-goutte et sous forte agitation. Après une heure de réaction, la phase organique est lavée par 5 x 100 ml d'eau pour éliminer l'excès d'anhydride acétique, séchée sur  $MgSO_4$ , puis évaporée.

rendement : 85 % (43,4 g)

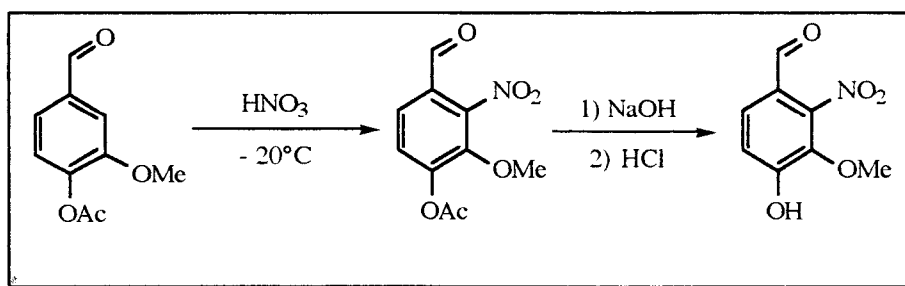
fusion : 77°C (Lit.<sup>3</sup> : 77°C)

Masse (m/z)	Attribution ; %
194	M ; 10,8
152	M-COCH <sub>3</sub> ; 100



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m, J (Hz)	attribution
2,31	3 H, s	COCH <sub>3</sub>
3,87	3 H, s	OCH <sub>3</sub>
7,19	1 H, d (Jortho = 7,8)	H <sub>5</sub>
7,45	2 H, d+dd (Jméta = 1,8 Jortho = 7,8)	H <sub>2</sub> + H <sub>6</sub>
9,92	1 H, s	H <sub>1</sub>

XV-2. 2-nitrovanilline



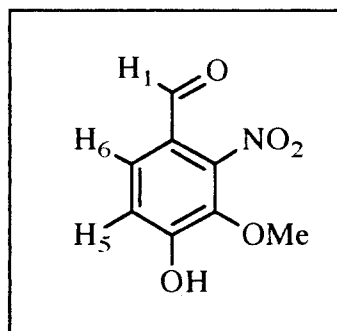
120 ml d'acide nitrique fumant ( $d = 1,5$ ) sont refroidis à  $-20^{\circ}\text{C}$ . 25 g (129mmoles) d'acétate de vanilline finement pulvérisés sont alors ajoutés par petites portions, de manière à conserver la température à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A la fin de l'addition, le milieu réactionnel est jeté sur 500 g de glace pilée. Le précipité est filtré puis lavé à l'eau.

Le solide résultant est dissous dans 200 ml de soude à 5 %. Après 15 minutes d'agitation, la solution est acidifiée par HCl 4 N. Le précipité est rincé à l'eau, séché et conservé à l'abri de la lumière.

rendement : 75 % (19 g)

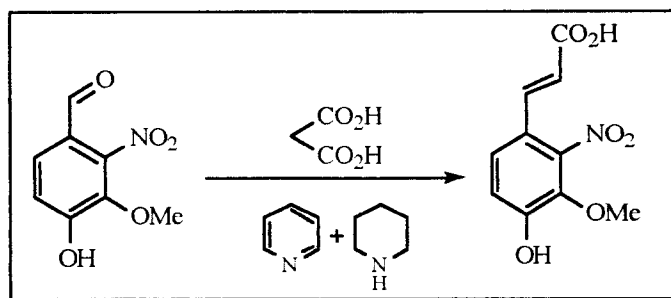
fusion :  $137^{\circ}\text{C}$  (Lit. <sup>3</sup>:  $137^{\circ}\text{C}$ )

Masse, m/z	attribution ; %
196	M-H ; 100



R.M.N. $^1\text{H}$ (ppm) (DMSO)	m, J (Hz)	attribution
3,83	3 H, s	$\text{OCH}_3$
7,22	1 H, d ( $J_{\text{ortho}} = 8,5$ )	$\text{H}_5$
7,71	1 H, d ( $J_{\text{ortho}} = 8,5$ )	$\text{H}_6$
9,72	1 H, s	$\text{H}_1$

XV-3. Acide 4-hydroxy-3-méthoxy-2-nitro- cinnamique (E)



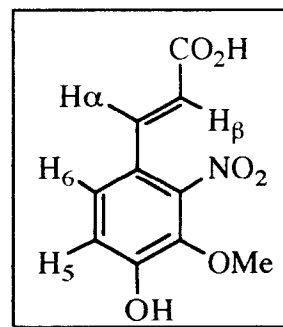
3 g (15, 2 mmoles) de 2-nitrovanilline sont dissous dans 15 ml de pyridine anhydre contenant 8 gouttes de pipéridine, ajoutées au milieu en tant que catalyseur. 3, 14 g d'acide malonique (30, 2 mmoles) sont additionnés à ce mélange. Le récipient est muni d'un tube de garde rempli de chlorure de calcium. Après dissolution, le mélange est abandonné 6 jours à température ambiante puis porté à 100°C pendant 4 heures.

On laisse refroidir, jette la solution sur un mélange de glace pilée et d'HCl concentré (200g / 100 ml). Le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau glacée, essoré et séché sous vide en présence de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

rendement : 77 % (2, 8 g)

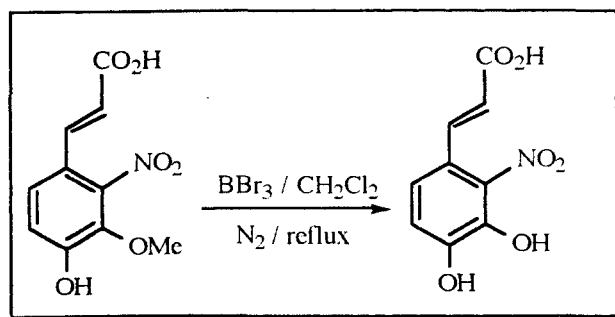
fusion : 200-205°C (déc)

Masse , m/z	attribution ; %
239	M ; 31
193	M-NO <sub>2</sub> ; 90
65	M-174 ; 100



R.M.N. <sup>1</sup> H , ppm (DMSO)	m , J (Hz)	attribution
3, 82	3 H , s	OCH <sub>3</sub>
6, 48	1 H , d (J = 15,7)	H <sub>β</sub>
7, 12	1 H , d (J = 15,7)	H <sub>α</sub>
7, 14	1 H , d (J <sub>ortho</sub> = 8,7)	H <sub>6</sub>
7, 64	1 H , d (J <sub>ortho</sub> = 8,7)	H <sub>5</sub>

#### XV-4. Acide 2-nitrocaféique (E)



1 g (3,95 mmoles) d'acide 4-hydroxy-3-méthoxy-2-nitro-cinnamique finement broyé est mis en suspension dans 50 ml de dichlorométhane. On ajoute goutte-à-goutte, sous azote et à température ambiante 20 ml d'une solution de  $\text{BBr}_3$  dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (solution 1M, 20 mmoles). Le mélange est porté à reflux une nuit. Après refroidissement, le milieu réactionnel est hydrolysé par addition de 200ml d'eau. On laisse sous agitation une heure, sépare la phase organique et extrait la phase aqueuse par 5 x 50 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, traitées une demi-heure avec du noir animal au reflux du solvant. La suspension est filtrée sur Célite, séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . Après évaporation des solvants, le résidu est reprecipité dans un mélange acétone/eau.

rendement : 80 % (711 mg)

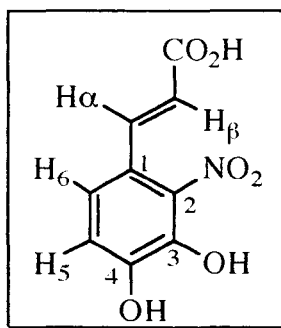
fusion : 220°C (déc.)

Les résultats d'analyses sont reportés sur la page suivante.

masse (m/z)	attribution ; %
225	M ; 68, 8
179	M-NO <sub>2</sub> ; 56
51	M-174 ; 100

C13 (ppm)	attribution
116, 3	C <sub>6</sub>
117, 2	C <sub>5</sub>
120	C <sub>β</sub>
122, 8	C <sub>1</sub>
138, 1	C <sub>2</sub>
141, 6	C <sub>α</sub>
144, 2	C <sub>3</sub>
146, 5	C <sub>4</sub>
167, 3	C=O

Analyse	calculé, %	trouvé, %
C	48, 01	48, 14
H	3, 13	3, 21
O	42, 64	42, 31
N	6, 22	6, 34

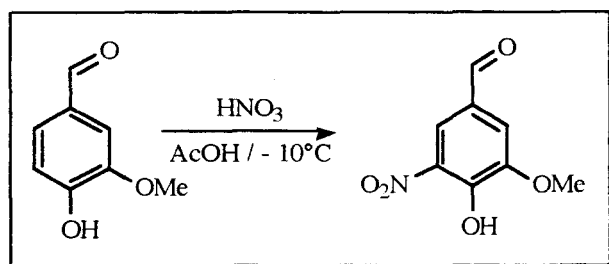


Infrarouge (cm <sup>-1</sup> )	attribution
3520	ν OH intramol.
3400	ν OH phénol
1710	ν C=O
1630	ν C=C
1500	ν NO <sub>2</sub>
1470	ν CH cycle
1280	ν OH phénol

RMN <sup>1</sup> H, ppm (DMSO)	m ; J (Hz)	attribution
6, 41	d ; J = 15, 5	H <sub>β</sub>
6, 97	d ; Jortho = 8	H <sub>6</sub>
7, 15	d ; J = 15, 5	H <sub>α</sub>
7, 33	d ; Jortho = 8	H <sub>5</sub>

## XVI- Synthèse de l'acide 5-nitrocaféique (E)

### XVI-1. 5-nitrovanilline



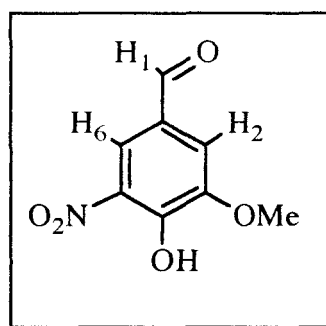
25 g de vanilline sont dissous dans 50 ml d'acide acétique glacial. La température est conservée au dessous de 15°C par un bain d'eau froide. 4 ml d'acide nitrique fumant sont ajoutés goutte-à-goutte en 10 minutes, en veillant au maintien de la température. Après addition, le précipité est filtré, lavé par 5 x 20 ml de méthanol froid, puis séché à l'air.

La 5-nitrovanilline est conservé au froid.

rendement : 98 % (32 g)

fusion : 176°C (Lit.<sup>+</sup> : 176°C)

Masse, m/z	attribution; %
197	M ; 100
151	M-NO <sub>2</sub> ; 38



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m, J (Hz)	attribution
3,95	3 H, s	OCH <sub>3</sub>
7,61	1 H, d, (J <sub>méta</sub> =1,7)	H <sub>2</sub>
8,09	1 H, d, (J <sub>méta</sub> =1,7)	H <sub>6</sub>
9,85	1 H, s	H <sub>1</sub>



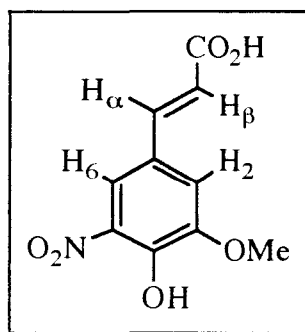
XVI-2. Acide 4-hydroxy-3-méthoxy- 5-nitrocinnamique (E)

Le protocole opératoire et le rendement sont identiques à ceux utilisés et obtenus pour la synthèse de l'acide 4-hydroxy-3-méthoxy-2-nitro- cinnamique.

rendement : 75 %

fusion : 245°C (déc.)(Lit. + 149°C)

Masse (m/z)	attribution; %
239	M ; 96
51	M-188 ;100



R.M.N. <sup>1</sup> H (ppm) (DMSO)	m , J (Hz)	attribution
3,92	3 H , s	OCH <sub>3</sub>
6,64	1 H , d (J = 16)	H <sub>β</sub>
7,54	1 H , d (J = 16)	H <sub>α</sub>
7,62	1 H, d (J <sub>méta</sub> =1,7)	H <sub>2</sub>
7,75	1 H, d (J <sub>méta</sub> =1,7)	H <sub>6</sub>

XVI-3. Acide 5-nitrocaféique (E)

Le protocole de déméthylation est identique à celui utilisé pour l'acide 2-nitrocaféique.

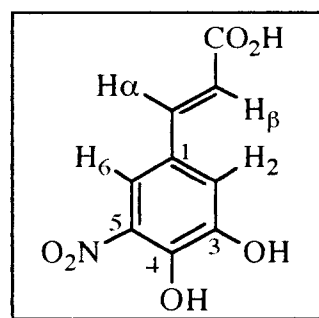
rendement : 80 % (711 mg)

fusion : 210°C (déc.)

masse (m/z)	attribution ; %
225	M ; 90, 5
179	M-NO <sub>2</sub> ; 17
51	M-174 ; 100

C13 (ppm)	attribution
115	C <sub>6</sub>
117	C <sub>2</sub>
118	C <sub>β</sub>
124, 9	C <sub>1</sub>
137	C <sub>5</sub>
142	C <sub>α</sub>
143, 8	C <sub>4</sub>
147	C <sub>3</sub>
167	C=O

Analyse	calculé, %	trouvé, %
C	48, 01	48, 08
H	3, 13	3, 15
O	42, 64	42, 7
N	6, 22	6, 07



Infrarouge (cm <sup>-1</sup> )	attribution
3400	ν OH phénol
1710	ν C=O
1640	ν C=C
1550	ν NO <sub>2</sub>
1490	ν CH cycle
1280	ν OH phénol

H1 (ppm)(DMSO)	m ; J (Hz)	attribution
6, 33	d ; J = 16	H <sub>β</sub>
7, 34	d ; J <sub>méta</sub> = 2	H <sub>6</sub>
7, 48	d ; J = 16	H <sub>α</sub>
7, 66	d ; J <sub>méta</sub> = 2	H <sub>2</sub>

### XVII- Synthèse de l'acide 6-nitrocaféique(E)

Le protocole de déméthylation est analogue à celui utilisé pour l'acide 2-nitrocaféique.

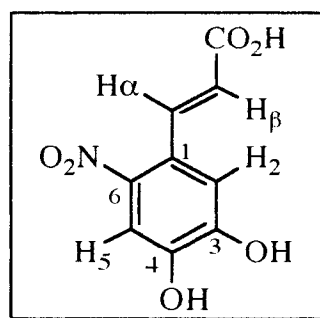
rendement : 85 % (800 mg)

fusion : 240°C(déc.)

masse (m/z)	attribution ; %
225	M ; 11
208	M-OH ; 6
179	M-NO <sub>2</sub> ; 100

C13 (ppm)	attribution
111	C <sub>2</sub>
114,5	C <sub>5</sub>
121	C <sub>β</sub>
123	C <sub>1</sub>
139,6	C <sub>6</sub>
140,2	C <sub>α</sub>
146,9	C <sub>4</sub>
151,3	C <sub>3</sub>
167,1	C=O

Analyse	calculé, %	trouvé, %
C	48,01	48
H	3,13	3,18
O	42,64	42,41
N	6,22	6,41

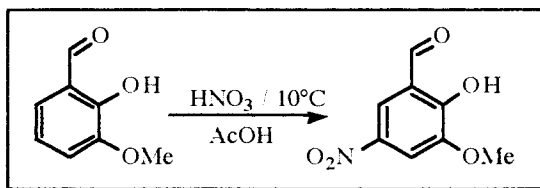


Infrarouge (cm <sup>-1</sup> )	attribution
3500	ν OH phénol
1710	ν C=O
1640	ν C=C
1500	ν NO <sub>2</sub>
1450	ν CH cycle
1300	ν OH phénol

H1 (ppm)(DMSO)	m ; J (Hz)	attribution
6,22	1 H ; d ; J = 15,7	H <sub>β</sub>
7,09	1 H ; s	H <sub>2</sub>
7,51	1 H ; s	H <sub>5</sub>
7,93	1 H ; d ; J = 15,7	H <sub>α</sub>

## XVIII- Synthèse de l'acide 2, 3-diméthoxy-5-nitrocinnamique (E)

### XVIII-1. 2-hydroxy-3-méthoxy-5-nitrobenzaldéhyde

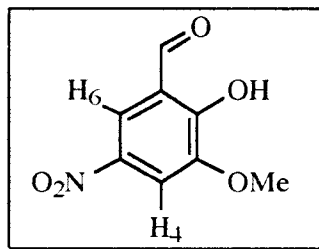


15, 2 g de 2-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde sont dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial. Le mélange est refroidi par un bain d'eau froide, et on ajoute 5 ml d'acide nitrique ( $d=1,42$ ) dilué dans 20 ml d'acide acétique, goutte à goutte, de manière à maintenir la température inférieure à  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le mélange résultant de la réaction est abandonné une nuit, puis le précipité est collecté, lavé à l'eau glacée. La dilution du liquide de réaction par de l'eau glacée permet de récupérer une autre portion de produit. Le produit est séché à l'air

rendement : 87 % (17g)

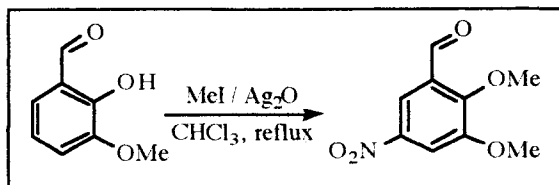
fusion :  $141^{\circ}\text{C}$  (Lit. 5 :  $142^{\circ}\text{C}$ )

masse (m/z)	attribution ; %
197	M ; 42
169	M-CO ; 100



H1(ppm) ( $\text{CDCl}_3$ )	m ; J (Hz)	attribution
4,02	3 H ; s	OCH3
7,93	1 H ; d ; J=2, 5	H4
8,22	1 H ; d ; J=2, 5	H6
9,99	1 H ; s	CHO
11,74	1 H ; s	OH

XVIII-2. 2,3-diméthoxy-5-nitrobenzaldéhyde

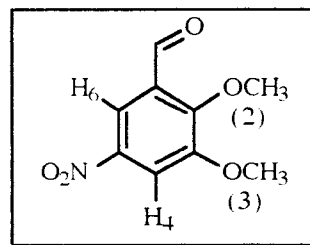


A 3, 94 g de 2-hydroxy-3-méthoxy-5-nitrobenzaldéhyde(20 mmoles) dissous dans 20 ml de chloroforme sont additionnés 3, 5 g d'oxyde d'argent finement pulvérisé et 2,5 ml d'iodure de méthyle. Le mélange est porté à reflux pendant 3 heures. Après refroidissement le mélange est filtré pour éliminer la matière inorganique et le solvant évaporé.

rendement : 99 % (4,17 g)

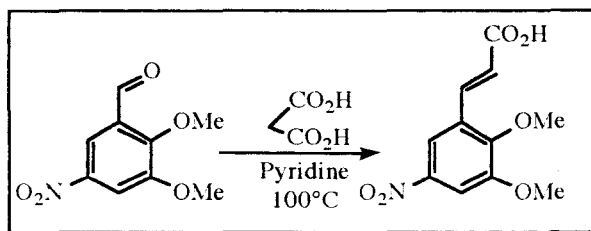
fusion : 115°C (Lit.<sup>5</sup> : 115°C)

masse (m/z)	attribution ; %
211	M ; 58
166	M-45 ; 100



H1(ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
4, 01	3 H ; s	OCH3 (3)
4, 08	3 H ; s	OCH3 (2)
7, 91	1 H ; d ; J=2, 5	H4
8, 2	1 H ; d ; J=2, 5	H6
10	1 H ; s	CHO

XVIII-3. Acide 2,3-diméthoxy-5-nitrocinnamique (E)

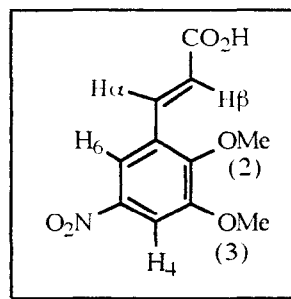


Un mélange de 4,2 g de 2,3-diméthoxy-5-nitrobenzaldéhyde (20 mmoles) et de 4,2 g d'acide malonique (40 mmoles) dissous dans 15 ml de pyridine additionnée de 8 gouttes de pipéridine est porté à 100° pendant 8 heures. Après refroidissement, le mélange est versé sur de la glace pilée (50 g) acidifiée par de l'acide chlorhydrique concentré (20 ml). Le précipité est filtré et séché à l'air.

rendement : 80 % (4,1 g)

fusion : 225°C (Lit. 6 : 228°C)

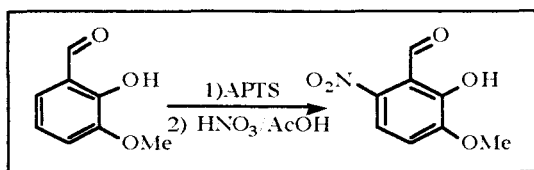
masse (m/z)	attribution %
253	M ; 33
207	M- NO <sub>2</sub> ; 100



H1(ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3,95	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (3)
4,01	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
6,67	1 H ; d ; J=17	Hβ
7,75	1 H ; d ; J=2, 5	H <sub>4</sub>
7,79	1 H ; d ; J=17	Hα
8,15	1 H ; d ; J=2, 5	H <sub>6</sub>

## XIX- Synthèse de l'acide 2,3-diméthoxy-6-nitrocinnamique (E)

### XIX-1. 2-hydroxy-3méthoxy-6-nitro-benzaldéhyde



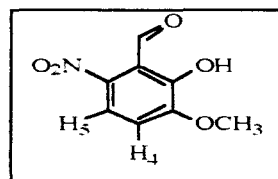
3 g de 2-hydroxy-3-méthoxy-benzaldéhyde (20 mmoles) sont dissous dans 15 ml d'eau additionnée de 1 g d'hydroxyde de sodium. On ajoute alors goutte à goutte et sous forte agitation une solution de 4,5 g de chlorure d'acide paratoluènesulfonique dans 20 ml de dichlorométhane. On laisse agiter 24 heures et sépare les phases. La phase organique est lavée successivement par de l'acide chlorhydrique 6N (2 x 10 ml), une solution saturée de bicarbonate de soude (20 ml) et de la saumure (10ml). On rassemble les phases aqueuses et les extrait par 5 x 25 ml de dichlorométhane. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées.

Le dérivé tosylé brut précédemment obtenu est finement pulvérisé et rapidement versé dans 50 ml d'acide nitrique (d=1,5) refroidi à -10°C et vigoureusement agité. Après 30 mn d'agitation, le mélange est jeté sur un mélange glace-eau. Le précipité est filtré et lavé à l'eau froide. Ce brut de réaction est dissous dans 50 ml de méthanol et porté à reflux pendant 15 mn. On ajoute alors une solution de 3 g d'hydroxyde de potassium dans (10 ml d'eau + 20 ml de méthanol), en maintenant une agitation vigoureuse. La solution est laissée au reflux pendant 0,5 heure. Le précipité est filtré, dissous dans l'eau bouillante et acidifié par de l'acide chlorhydrique concentré. Le produit désiré précipite.

rendement : 90% (1,4g)

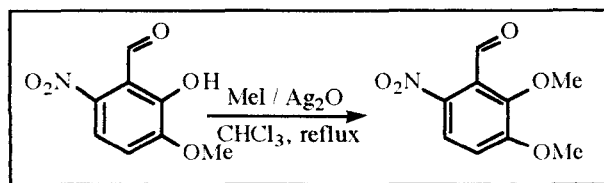
fusion : 101°C (Lit.<sup>3</sup> : 103°C)

masse (m/z)	attribution ; %
197	M ; 15
151	M-NO <sub>2</sub> ; 100



H1 (ppm)(CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3,96	3 H ; s	OCH <sub>3</sub>
7,04	1 H ; d ; J=9	H <sub>4</sub>
7,95	1 H ; d ; J=9	H <sub>5</sub>
10,34	1 H ; s	CHO

XIX-2. 2,3-diméthoxy-6-nitro-benzaldéhyde

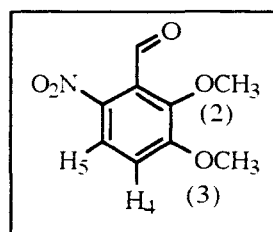


Le protocole utilisé est identique à celui préconisé pour la synthèse du 2,3-diméthoxy-5-nitro-benzaldéhyde.

rendement : 98 %

fusion : 111°C (Lit.<sup>6</sup> : 110°C)

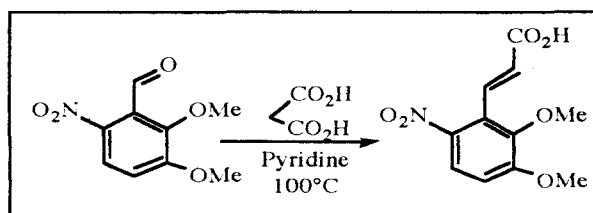
masse (m/z)	attribution ; %
211	M ; 64
166	M-45 ; 100



H1 (ppm)(CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3,87	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
3,99	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (3)
7,3	1 H ; d ; J=9	H4
7,9	1 H ; d ; J=9	H5
10,3	1 H ; s	CHO



XIX-3. Acide 2, 3-diméthoxy-6-nitro-cinnamique (E)

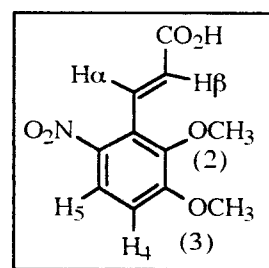


Le protocole utilisé est identique à celui préconisé pour la synthèse de l'acide 2,3-diméthoxy-5-nitro-cinnamique.

rendement : 80 %

fusion : 218°C (Lit. <sup>6</sup> : 220°C)

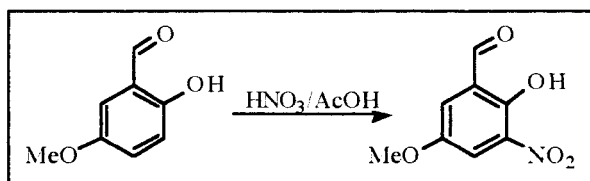
masse (m/z)	attribution ; %
253	M ; 3
207	M-NO <sub>2</sub> ; 100



H1 (ppm)(CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3, 71	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
3, 95	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (3)
6, 25	1 H ; d ; J=16	Hβ
7, 27	1 H ; d ; J=9	H5
7, 6	1 H ; d ; J=16	Hα
7, 9	1 H ; d ; J=9	H4

**XX- Synthèse de l'acide 2, 5-diméthoxy-3-nitro-cinnamique(E)**

**XX-1. 2-hydroxy-5-méthoxy-3-nitrobenzaldéhyde**



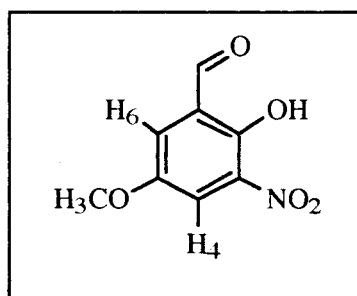
5 g de 2-hydroxy-5-méthoxy-benzaldéhyde commercial (32, 7 mmoles) sont dissous dans 25 ml d'acide acétique. La solution est placée dans un bain d'eau froide (15°C). 3, 1 ml d'acide nitrique à 70 % (49 mmoles) sont alors ajoutés goutte à goutte de manière à maintenir la température du mélange inférieure à 15°C.

Après 30 minutes d'agitation, on ajoute 100ml d'eau froide. Le solide est filtré puis recristallisé de l'acide acétique.

rendement : 69 % (4,5 g)

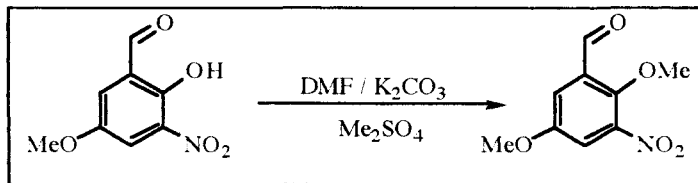
fusion : 132°C (Lit. <sup>7</sup> 133°C)

masse (m/z)	attribution %
197	M ; 100



H1 (ppm)	m ; J (Hz)	attribution
3, 87	3 H ; s	OCH <sub>3</sub>
7, 7	1 H ; d ; J=3, 3	H <sub>6</sub>
7, 84	1 H ; d ; J=3, 3	H <sub>4</sub>
10, 44	1 H ; s	CHO
10, 88	1 H ; s	OH

XX-2. 2, 5-diméthoxy-3-nitrobenzaldéhyde

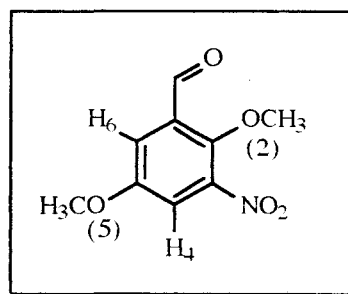


3, 6 g de 2-hydroxy-5-méthoxy-3-nitrobenzaldéhyde (18,1 mmoles) sont dissous dans 40 ml de DMF sec. On ajoute alors successivement 5 g de carbonate de potassium (36, 3 mmoles) et 3, 8 ml de diméthylsulfate (40 mmoles). Le mélange est agité 16 heures à température ambiante. On ajoute alors 2, 5 ml de diméthylsulfate. On agite de nouveau 3 heures, additionne encore 1,5 ml de diméthylsulfate et agite finalement 2, 5 heures. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu versé dans 100 ml d'eau. On extrait par 8 x 20 ml de dichlorométhane, sèche sur MgSO<sub>4</sub> et évapore. Le solide est recristallisé du chloroforme.

rendement : 3, 75 g (99%)

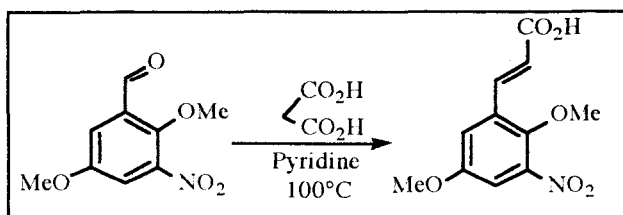
fusion : 114°C (Lit.<sup>7</sup> : 115°C)

masse (m/z)	attribution %
211	M ; 100



H1 (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3, 87	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (5)
4, 02	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
7, 56	1 H ; d ; J=3,3	H <sub>6</sub>
7, 62	1 H ; d ; J=3,3	H <sub>4</sub>
10, 36	1 H ; s	CHO

XX-3. Acide 2, 5-diméthoxy-3-nitrocinnamique (E)

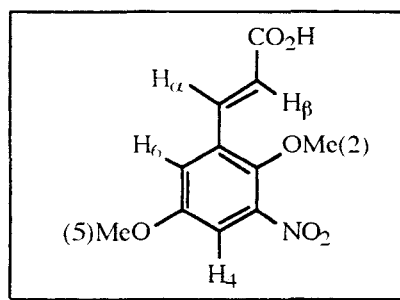


Un mélange de 2, 5 g de 2, 5-diméthoxy-3-nitro-benzaldéhyde (12 mmoles) et de 2, 5 g d'acide malonique (24 mmoles) dans 15 ml de pyridine anhydre additionnée de 8 gouttes de pipéridine est porté à 100°C pendant une nuit. Après refroidissement, le mélange est jeté sur de la glace pilée (50g) acidifiée par 20 ml d'HCl concentré. On filtre et sèche à l'air.

rendement : 80 % (2, 4 g)

fusion : 225°C (déc)

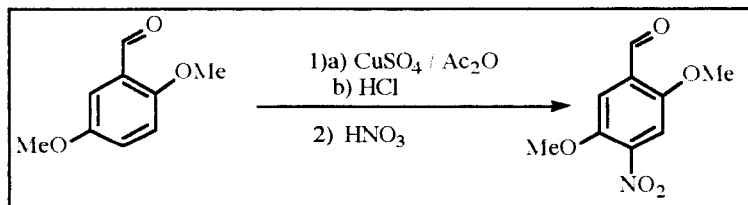
masse (m/z)	attribution ; %
253	M ; 52
147	M-106 ; 100



H1 (ppm)(CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3, 78	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
3, 84	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (5)
6, 77	1 H ; d; J=16	H <sub>β</sub>
7, 53	1 H ; d; J=3	H <sub>4</sub>
7, 68	1 H + 1H ; d + d; J=3 + J=16	H <sub>6</sub> +H <sub>α</sub>

## XXI- Synthèse de l'acide 2, 5-diméthoxy-4-nitrocinnamique (E)

### XXI-1. 2, 5-diméthoxy- 4- nitrobenzaldéhyde

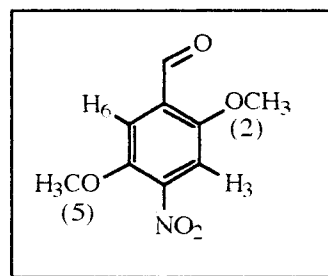


8,3 g de 2, 5- diméthoxy-benzaldéhyde (50 mmoles) sont dissous dans 100 ml d'anhydride acétique en présence de 100 mg de sulfate de cuivre. Le mélange est laissé au repos pendant 24 heures. On filtre pour éliminer le sulfate de cuivre en excès. La solution de diacétal est alors refroidie par un bain d'eau froide. On additionne alors 40 ml d'acide nitrique à 70 % goutte à goutte de manière à éviter toute hausse de température. On laisse agiter une heure , ajoute 500ml d'acide chlorhydrique 1N et agite vigoureusement pendant deux heures. Le mélange est extrait par 3 x 100ml d'éther éthylique, en faisant attention à bien dégazer lors de l'agitation des phases.

rendement : 50 % (4, 86g)

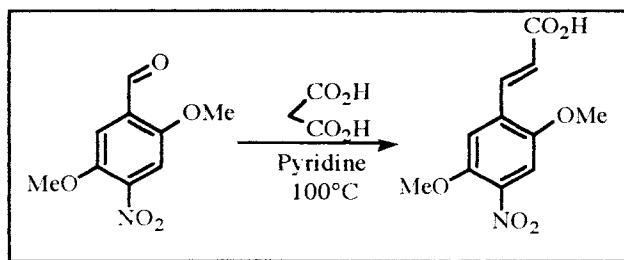
fusion : 153°C(Lit. 8 : 153°C)

masse (m/z)	attribution ; %
211	M ; 100
151	M- (2 Me); 98



H1 (ppm) (CDCl3)	m ; J (Hz)	attribution
3, 97	2 x (3 H) ; 2 s	OCH3 (2)+ OCH3(5)
7, 43	1 H	H <sub>6</sub>
7, 53	1 H	H <sub>3</sub>
10, 46	1 H	CHO

XXI-2. Acide 2, 5-diméthoxy-4-nitrocinnamique (E)

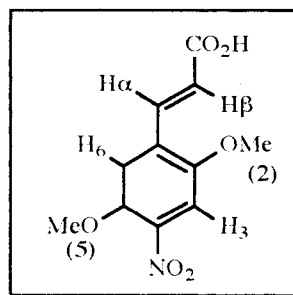


Le mode opératoire est identique à celui développé pour l'acide 2, 5-diméthoxy- 3-nitrocinnamique.

rendement : 75 %

fusion l: 230°C ( déc.)

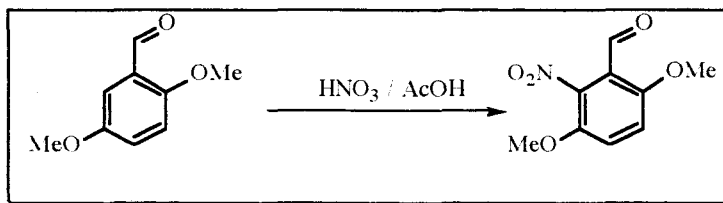
masse (m/z)	attribution ; %
253	M ; 100



H1 (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3,87	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
3,92	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (5)
6,8	1 H ; d ; J=16	H $\beta$
7,58	1 H ; s	H <sub>6</sub>
7,66	1 H ; s	H <sub>3</sub>
7,77	1 H ; d ; J=16	H $\alpha$

## XXII- Synthèse de l'acide 2, 5-diméthoxy-6-nitrocinnamique

### XXII-1. 2, 5-diméthoxy-6-nitrobenzaldéhyde

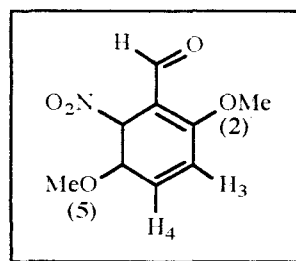


3 g de 2, 5-diméthoxybenzaldéhyde (18 mmoles) finement pulvérisés sont ajoutés par petites portions dans 15 ml d'acide nitrique refroidis à  $-15^\circ\text{C}$  sous agitation. La température ne doit pas dépasser  $-10^\circ\text{C}$ . On laisse reposer le mélange 4 heures puis dilue avec 100 ml d'eau. Après deux ou trois recristallisations de l'alcool éthylique, on obtient le produit pur.

rendement : 65 % (2, 5 g)

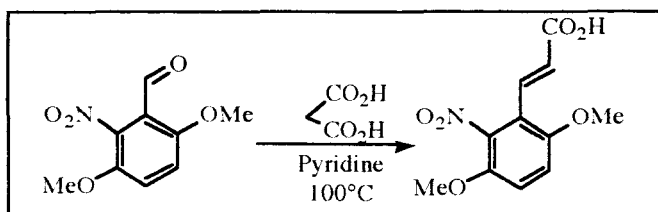
fusion :  $158^\circ\text{C}$  (Lit. <sup>9</sup> :  $159^\circ\text{C}$ )

masse (m/z)	attribution ; %
211	M ; 100
151	M - (2 Me); 98



H1 (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3, 84	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
3, 94	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (5)
7, 1	1 H ; d ; J=9	H <sub>4</sub>
7, 25	1 H ; d ; J=9	H <sub>3</sub>
10, 35	1 H	CHO

XXII-2. Acide 2, 5- diméthoxy-6-nitrocinnamique

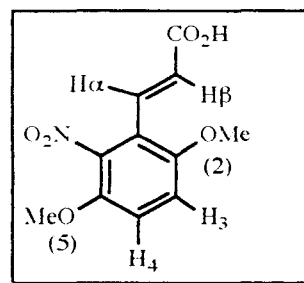


Le mode opératoire est identique à celui développé pour l'acide 2, 5-diméthoxy- 3-nitrocinnamique.

rendement : 75 %

fusion l: 240°C ( déc.)

masse (m/z)	attribution ; %
253	M ; 19
207	M-NO <sub>2</sub> ; 100



H1 (ppm) (CDCl <sub>3</sub> )	m ; J (Hz)	attribution
3, 84	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (2)
3, 87	3 H ; s	OCH <sub>3</sub> (5)
6, 5	1 H ; d ; J=16	Hβ
7, 25	1 H ; d ; J=16	Hα
7, 5	1 H ; d ; J=9	H <sub>4</sub>
7, 7	1 H ; d ; J=9	H <sub>3</sub>



## Références bibliographiques

### XVIII- Synthèse - aspect expérimental

- 1 - F. Kehrmann, M. Sandoz & R. Monnier , "Nitro derivatives of Quinol ", *Helv. Chim. Act.*, **4**, 941-952 (1921)
- 2 - D.H. Rosenblatt, J. Epstein & M. Levitch, "Some nuclearly substituted catechols and their acid dissociation constants", *J. Am. Chem. Soc.* , **75**, 3277-3278 (1953)
- 3 - M. Julia, P. Manoury & . Voillaume, "Recherches en série indolique. XIV : sur des méthoxy-5 hydroxy-4,méthoxy-5 hydroxy-6 et méthoxy-7 hydroxy-6 tryptamines", *Bull. Soc. Chim. Fr*, 1417-1423 (1965)
- 4 - I.A.Pearl & D.L. Beyer , "Reactions of vanillin and its derived compounds. XI. cinnamic acids derived from vanillin and its related compounds", *J.Org.Chem.*, **15**, 216-221 (1950)
- 5- J. Davies, "Substitution in vicinal trisubstituted benzene derivatives", *J. Chem. Soc.* , 1583-1593 (1923)
- 6 - B.B. Dey & V. Ammalu-Kutti , "Nitration and halogenation of 8-methoxy and 8-hydroxycoumarins", *Proc. Natl. Inst. Sci. India*, **6**, 641-669 (1940)
- 7 - R. Baker & J-L Castro , "Total synthesis of Macbecin I", *J.C.S. Perk. Trans I*, 47-65 (1990)
- 8 - P. Cotelle & J-P Catteau , "Selective synthesis of 2, 5-dimethoxy-4-nitro-benzaldehyde", *Synth. Comms.* , **22**, 2071-207 (1992)
- 9 - L. Rubenstein. "Substitution in derivatives of quinol ethers", *J. Chem. Soc.*, 1998-2004 (1925)

o o o O O o o o

## *Conclusion générale*

Dans le cadre d'une recherche sur la mise au point de nouveaux antioxydants, nous avons été amenés à étudier l'influence de la fonction nitro sur des dérivés diphenoliques.

Le catéchol, l'hydroquinone, l'acide caféique s'oxydent facilement à l'air pour engendrer des dérivés quinoniques ou des polymères.

**La synthèse** des nitrocatechols et de nitrohydroquinone totalement purs nécessite des phases de purification intense, coûteuses en temps. Cette remarque est applicable à la synthèse des acides dihydroxy-nitro-cinnamiques qui inclut une phase normalement triviale de déméthylation. Elle est dans notre cas bien difficile à réaliser et des pertes importantes ne sont pas rares. Ainsi, les séries 2, 3 dihydroxy-nitro- et 2,5 dihydroxy-nitro- n'ont pu être obtenues. A ce niveau, la mise au point de conditions douces de synthèse permettant l'introduction de la fonction nitro directement sur les composés diphenoliques ou sur des dérivés portant des groupes protecteurs et directeurs très labiles serait la bienvenue. L'utilisation directe du monoxyde d'azote peut-être envisagée, comme l'ont montré Ducrocq & coll. en nitrant des catécholamines au moyen de NO préparé *in situ*<sup>1</sup>.

Les molécules synthétisées présentent des propriétés physico-chimiques intéressantes.

**La fonction cinnamique- acide faible - et une des fonctions phénoliques sont ionisées à pH physiologique**, ce qui n'est pas vrai pour l'acide caféique et le catéchol. Cette ionisation permet une meilleure solubilité du système en milieu aqueux, tout en "profitant" de la qualité hydrophobe du groupe nitro.

La voltammétrie cyclique, confirmée par la RPE, a permis de mettre en évidence **l'important déplacement vers les potentiels élevés du potentiel d'oxydation du diphenol, du à l'introduction du groupe nitro** sur le cycle aromatique.

A l'opposé, l'étude de la réduction de la fonction nitro en milieu aérobie et anaérobie n'a pas permis la mise en évidence des stades ultimes de réduction (hydroxylamines et amines). Le désir d'étudier plus précisément la réduction à un électron des nitroaromatiques a permis la mise au point d'une **méthode facile d'obtention des radicaux-anions nitrés en phase aqueuse**, qui consiste en l'**adjonction de borohydrure de sodium en excès à une solution aqueuse de la molécule à étudier**. Cette méthode a permis l'élucidation de la structure des radicaux-anions. Elle correspond à une version "exagérée" de celle des nitroaromatiques précurseurs. Il découle des observations et des calculs effectués que **le groupement nitro est électroniquement isolé du cycle aromatique par une rotation de la liaison C-N variant de 30 à 60°**. En clair, les effets inductifs sont toujours présents, alors que les effets de délocalisation électronique sont amoindris.

**Les deux fonctions antagonistes semblent donc, tout en étant isolées l'une de l'autre, se protéger mutuellement face aux phénomènes d'oxydo-réduction.**

Les conclusions concernant les propriétés antioxydantes sont plus mitigées. Certes, l'intégration du groupe nitro sur les diphénols permet une augmentation importante de l'inhibition d'une enzyme génératrice d'anions superoxydes, la xanthine oxydase. On peut d'ailleurs observer dans la série caféique une corrélation qualitative entre le pKa correspondant à l'ionisation de la première fonction phénol et l'inhibition de la xanthine oxydase.

Acide	pKa	Inhibition
caféique	8,37	18
6NO <sub>2</sub> caféique	7,03	36
2NO <sub>2</sub> caféique	6,72	61
5NO <sub>2</sub> caféique	5,52	70

Ajoutons que la présence de la fonction cinnamique, lipophile de part la présence de la chène alkylée, est indispensable à un inhibition correcte. C'est donc à **un équilibre subtil entre la lipophilie et l'ionisation de la molécule que l'on doit l'inhibition de la xanthine oxydase.**

Cependant, la présence de la fonction nitro sur le cycle diphénolique fait chuter de façon drastique la propriété de piégeage des radicaux hydroxydes. **Elle est en effet inférieure de plusieurs unités logarithmiques à celle des dérivés di- ou triphénoliques.**

De façon assez grossière, on peut aussi affirmer que moins la molécule est ionisée, meilleure est la capacité de piégeage.

Il reste cependant un doute concernant la réactivité des nitroaromatiques avec l'anion superoxyde. On sait cependant que la réduction à un électron des nitroaromatiques permet l'obtention de radicaux-anions très stables, même en présence d'oxygène. Il serait intéressant de compléter cette étude en utilisant un système biochimique de production des radicaux-anions (NADPH-cytochrome P 450 oxydase) et d'observer leur évolution en milieux aérobies et anaérobies<sup>2</sup>.

Une approche voltammétrique est aussi à envisager : on produit l'anion superoxyde dans le DMF de façon électrochimique et on observe la perturbation du cycle électrochimique du superoxyde en présence de la molécule testée<sup>3</sup>.

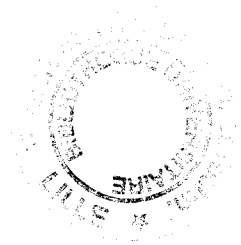
Ces manipulations pourrait permettre de conclure si les dérivés nitrés diphénoliques sont de bons capteurs ou inhibiteurs d'entités activées de l'oxygène.

En supplément des résultats intéressants obtenus pour l'inhibition de la xanthine oxydase, on pourrait alors conclure à une utilisation potentielle de ces nitroaromatiques comme antioxydants.

## Repères bibliographiques

- 1- M-L de la Bretèche, C. Sevry, M. Lenfant & C. Ducrocq, "Nitration of catecholamines with nitrogen oxides in mild conditions", *Tetrahedron Letters*, **35**, 7231-7232 (1994)
- 2- A. Berson, C. Wolf, C. Chachaty, D. Fau & D. Pessayre, "Interest of ESR in determining the mechanisms of drug toxicity : application to the antiandrogen nilutamide", *J. Chim. Phys.*, **91**, 1809-1819 (1994)
- 3- K. Kano, T. Mabuchi, B. Uno, Y. Esaka, T. Tanaka & M. Inuma, " Superoxide anion radical-induced dioxygenolysis of quercetin as a mimic of quercetinase", *J. Chem. Soc. Commun.*, 593-594 (1994)

○○○○○○○○



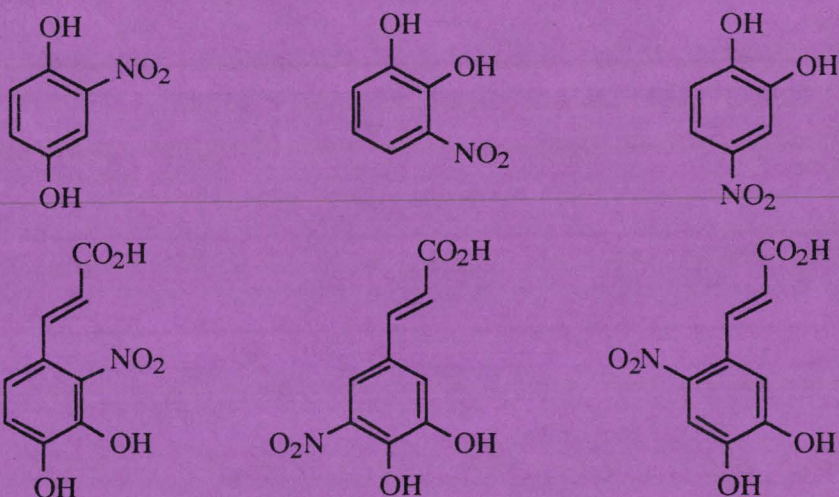
L'oxygène est un facteur primordial du métabolisme des êtres vivants. Après une approche bibliographique tentant de cerner son rôle, il semblait intéressant de fournir de nouvelles fonctions organiques à la panoplie déjà importante des molécules à propriétés antioxydantes.

Il est bien connu que les dérivés polyphénoliques présentent des propriétés de ce type. De plus, dans certaines conditions, la fonction nitro- peut interagir avec certaines espèces activées de l'oxygène (EAO) et l'oxygène lui-même.

Le travail expérimental présenté dans ce mémoire a porté sur l'examen des propriétés de molécules couplant ces deux types de fonctions :

- un diphénol oxydable
- une fonction nitroaromatique réductible

Les modèles choisis sont les suivants :



Une approche physico-chimique a été entreprise dans le but de déterminer divers paramètres primordiaux (constantes d'acidité, potentiels rédox), qu'on a tenté de corrélérer avec les propriétés antioxydantes déterminées par spin-trapping au moyen de la résonance paramagnétique électronique (RPE).

Dans le but d'affiner la relation structure-réactivité des molécules synthétisées, la structure des radicaux qu'elles engendrent par oxydation ou par réduction a été étudiée par RPE et a permis la mise au point d'une nouvelle méthode très facile d'accès de génération de radicaux-anions nitrés en milieu aqueux.

**MOTS-CLES :** ANTIOXYDANTS, ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE (EAO), NITRATION, OXYGENE, RADICAUX-ANIONS NITROAROMATIQUES