

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE CHIMIE



THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline : Chimie Organique et Macromoléculaire

présentée et soutenue publiquement

par

Vincent ZOETE

Le 15 septembre 1999

Titre :

**Design, synthèse et étude des propriétés antioxydantes de
4-mercaptoprimidazoles dérivés des ovothiols**

Directeur de thèse :

Professeur Jean-Luc BERNIER

JURY

M. le Professeur Jean-Pierre CATTEAU	, Président
M. le Professeur René BENSASSON	, Rapporteur
Dr. Norbert DEREU	, Rapporteur
M. le Professeur Jean Luc BERNIER	, Examineur
M. le Professeur Gérard VERGOTEN	, Examineur
Dr. Patrice TALAGA	, Examineur

A ma famille,
A Francesca,

« **Bombardier** : Les carabes bombardiers (*Brachynus creptians*) sont nantis d'un "fusil organique". S'ils sont attaqués, ils dégagent une fumée suivie d'une détonation. L'insecte la produit en associant deux substances chimiques émanant de deux glandes distinctes. La première libère une solution contenant 25% d'eau oxygénée et 10% d'hydroquinone. La seconde fabrique une enzyme, la peroxydase. En se mêlant dans une chambre de combustion, ces jus atteignent la température de l'eau bouillante, 100°C, d'où la fumée, puis un jet de vapeur d'acide nitrique, d'où la détonation. »

Le Jour des Fourmis
1992 - Bernard WERBER

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

- Monsieur le Professeur **Alain Lablache-Combier**, Directeur du Laboratoire de Chimie Organique Physique, pour m'avoir accueilli au sein de son unité.

- Monsieur le Maître de Conférences **Fabrice Bailly**, pour ses conseils, son aide, sa totale disponibilité et la formation pratique qu'il m'a prodigués.

- Messieurs les Professeurs **Jean-Luc Bernier** et **Jean-Pierre Catteau**, pour m'avoir fait confiance et avoir défini et orienté le présent travail, ainsi que pour leurs nombreuses suggestions.

- Le Docteur **Hervé Vezin**, pour ses multiples apports constructifs au développement du sujet.

- Le Docteur **Elisabeth Teissier** et Monsieur le Professeur **Patrick Duriez** pour avoir effectué les tests d'inhibition de la peroxydation lipidique.

- Monsieur le Professeur **Gérard Vergoten** et son équipe, pour m'avoir donné accès au Centre de Recherche et d'Etude en Simulation et Modélisation Moléculaire, et avoir jugé ce travail.

- Je suis très honoré de la présence de Monsieur le Professeur **R.V. Bensasson**, Directeur de Recherche Emérite du Laboratoire de Chimie Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, UMR 8646, de Monsieur **N. Dereu** de Rhône Poulenc Rohrer et de Monsieur **P. Talaga** d'UCB Pharma, qui ont bien voulu juger ce travail.

- Monsieur l'Ingénieur d'Etude **Marc Bria**, pour avoir réalisé les spectres de RMN ^1H des molécules synthétisées.

- **Eric Lamour**, pour son amitié.

- Et enfin tout le personnel, permanents et stagiaires, du Laboratoire de Chimie Organique Physique, pour le bon accueil et la camaraderie dont ils ont fait preuve.

TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
INTRODUCTION	12
1. RADICAUX LIBRES ET MALADIES HUMAINES.	13
1.1. La chimie de l'oxygène.	13
1.1.1. L'état triplet ou état fondamental.	14
1.1.2. L'état singulet.	15
1.1.3. Le radical superoxyde.	15
1.1.4. Le peroxyde d'hydrogène.	16
1.1.5. Le radical hydroxyle.	17
1.1.6. Dérivés du monoxyde d'azote.	17
1.1.6.1. Activité de $\text{NO}^\bullet$ et de N_2O_3 .	18
1.1.6.2. Le peroxydinitrite.	18
1.1.6.3. Réaction du peroxydinitrite avec le dioxyde de carbone.	19
1.2. Formation des dérivés actifs de l'oxygène <i>in vivo</i> .	21
1.2.1. Formation de l'oxygène singulet.	21
1.2.2. Formation de l'anion superoxyde.	21
1.2.2.1. Dans les mitochondries.	21
1.2.2.2. Formation de l'anion superoxyde lors de la phagocytose.	23
1.2.2.3. Autres lieux de formation de l'anion superoxyde.	24
1.2.3. Formation de l'eau oxygénée.	24
1.2.4. Formation du radical hydroxyle.	24
1.2.5. Formation de l'oxyde nitrique et de ses dérivés.	26
1.3. Les dommages causés par les dérivés actifs de l'oxygène.	28
1.3.1. Le stress oxydatif.	28
1.3.2. La peroxydation lipidique.	28
1.3.3. Dégâts causés à l'ADN.	30
1.3.4. Dégâts causés aux protéines.	33
1.3.5. Dégradation des sucres.	37

1.3.6. Dégâts entraînés par NO [•] et ses dérivés.	38
1.3.7. Systèmes de réparation.	38
1.4. Les défenses cellulaires contre le stress oxydatif.	40
1.4.1. La complexation des métaux.	40
1.4.1.1. La transferrine.	40
1.4.1.2. La lactoferrine.	40
1.4.1.3. La ferritine, l'hémosidérine et la céruloplasmine.	40
1.4.2. Les enzymes.	41
1.4.2.1. Les superoxydes dismutases.	41
1.4.2.2. Les catalases.	43
1.4.2.3. La glutathion peroxydase.	43
1.4.2.4. La DT diaphorase.	45
1.4.3. Interception des espèces actives.	45
1.4.3.1. La vitamine E.	45
1.4.3.2. La vitamine C.	45
1.4.3.3. Le β-carotène.	46
1.4.3.4. Le coenzyme Q.	46
1.4.3.5. La bilirubine.	47
1.4.3.6. L'acide urique.	47
1.4.3.7. La mélatonine.	47
1.4.3.8. Antioxydants alimentaires.	48
1.4.4. Pouvoir antioxydant de NO [•] .	49
1.5. Dérivés actifs de l'oxygène et pathologies humaines.	51
1.5.1. L'ischémie reperfusion.	52
1.5.2. L'athérosclérose.	54
1.5.3. SIDA et stress oxydatif.	55
1.5.3.1. Stress oxydatif chez les patients infectés par le VIH.	55
1.5.3.2. Stress oxydatif et développement du SIDA.	56
1.5.4. Les maladies neurodégénératives.	57
1.5.4.1. La Sclérose Latérale Amiotrophique.	58
1.5.4.2. La maladie de Parkinson.	58
1.5.4.3. La maladie d'Alzheimer.	58
1.6. La thérapie antioxydante.	60
1.6.1. Principes.	60
1.6.2. Exemples.	60
1.6.2.1. Désactivation de l'oxygène singulet.	60
1.6.2.2. Inhibition de la formation du radical superoxyde.	60
1.6.2.3. Ecarter O ₂ ^{••} et H ₂ O ₂ de la formation de HO [•] .	61
1.6.2.4. Inhibition de la formation de HO [•] .	63
1.6.2.5. Piégeage de HO [•] .	64

1.6.2.5.1. Le captopril.	64
1.6.2.5.2. Le probucol.	64
1.6.2.5.3. La N-(2-mercaptopropionyl)-glycine.	64
1.6.2.5.4. La N-acétylcystéine.	64
1.6.2.6. Les lazaroides.	65
Bibliographie du chapitre 1.	66
2. PRESENTATION DU SUJET.	71
2.1. Les ovothiols.	71
2.1.1. Fertilisation, explosion oxydative et enveloppe de protection.	71
2.1.1.1. L'enveloppe de fertilisation des œufs d'oursins de mer.	71
2.1.1.2. L'explosion oxydative.	72
2.1.1.3. Découverte des ovothiols.	72
2.1.2. Biosynthèse et synthèse totale des ovothiols.	75
2.1.3. Propriétés physico-chimiques.	75
2.1.3.1. Constantes d'acidité.	75
2.1.3.2. Sensibilité à l'oxydation.	76
2.1.3.3. Equilibres rédox.	77
2.1.3.4. Réactivité vis à vis des radicaux.	78
2.1.4. Rôle biologique de l'ovothiol.	79
2.2. But de l'étude.	81
2.2.1. La stabilisation des radicaux libres.	81
2.2.1.1. L'hyperconjugaison.	81
2.2.1.2. Stabilisation par mésomérie.	82
2.2.1.3. Action de l'hybridation.	82
2.2.1.4. Stabilisation cinétique.	82
2.2.1.5. Effet capto-datif.	83
2.2.2. Le sujet de l'étude.	85
2.3. Les stratégies de synthèse.	87
2.3.1. Utilisation d'un cycle imidazolique préexistant.	87
2.3.2. Condensation d'imines et d' α -oxothioamides.	87
2.3.3. Addition sur un isothiocyanate.	88
2.3.4. Cyclisation de thioacétamides.	88
Bibliographie du chapitre 2.	90
3. RESULTATS EXPERIMENTAUX.	93
3.1. La synthèse.	93
3.1.1. Première étape : synthèse de cyanométhylamines.	93
3.1.2. Deuxième étape.	94
3.1.2.1. La formylation.	94
3.1.2.2. Réaction avec un chlorure d'acide ou un anhydride d'acide.	94

3.1.3. Troisième étape: traitement par le disulfure d'hydrogène.	95
3.1.4. Dernière étape : la cyclisation.	96
3.1.5. Conservation des produits synthétisés.	97
3.2. Mesure des différentes constantes d'acidité.	98
3.2.1. But et méthode.	98
3.2.2. Mode opératoire.	103
3.2.2.1. Solubilisation des 4-mercaptoimidazoles.	104
3.2.2.2. Mesure de l'absorbance en fonction du pH.	104
3.2.3. Les résultats.	104
3.3. Evaluation de l'activité "piégeur de radicaux libres".	106
3.3.1. Le test du DPPH.	106
3.3.1.1. La méthode.	106
3.3.1.2. Mode opératoire.	106
3.3.1.3. Les résultats.	108
3.3.2. Le test du sel de Fremy.	109
3.3.2.1. But et méthode.	109
3.3.2.2. Synthèse du sel de Fremy.	110
3.3.2.3. Mode opératoire du test.	111
3.3.2.4. Résultats.	112
3.3.2.5. Etude de la cinétique de piégeage du sel de Fremy.	114
3.4. Piégeage des dérivés actifs de l'oxygène.	120
3.4.1. Piégeage du peroxyde d'hydrogène.	120
3.4.1.1. Réaction de l'ovothiol avec le peroxyde d'hydrogène.	120
3.4.1.2. Mode opératoire.	120
3.4.1.3. Etude de la cinétique de réaction des composés avec H ₂ O ₂ .	120
3.4.1.4. Résultats.	124
3.4.2. Piégeage de l'hypochlorite.	125
3.4.2.1. Objectif et principe.	125
3.4.2.2. Mode opératoire.	126
3.4.2.3. Résultats.	126
3.4.3. Piégeage du radical hydroxyle.	127
3.5. Etude des composés par voltammétrie cyclique.	128
3.5.1. But et principe.	128
3.5.1.1 La voltammétrie linéaire.	128
3.5.1.2. La voltammétrie cyclique.	130
3.5.3. Mode opératoire.	132
3.5.4. Les résultats.	133
3.6. Complexation du cuivre par les 4-mercaptoimidazoles.	140
3.6.1. Intérêt de la complexation du cuivre.	140
3.6.2. Etude de la complexation par spectrophotométrie d'absorption UV.	140

3.6.2.1. Mode opératoire.	140
3.6.2.2. Résultats.	140
3.6.3. Etude par RPE de la complexation de Cu^{2+} par les 4-mercaptoimidazoles.	142
3.6.4. Mise en évidence des complexes de Cu^{2+} spectrométrie de masse.	142
3.6.5. Degré d'oxydation du cuivre.	143
3.6.6. Modélisation moléculaire du complexe Cu^{2+} / 4-mercaptoimidazole.	144
3.7. Utilisation de la Résonance Paramagnétique Electronique.	145
3.7.1. Principe de la RPE.	145
3.7.1.1. Propriétés magnétiques de l'électron.	145
3.7.1.1.1. Origine du moment magnétique de l'électron.	145
3.7.1.1.2. L'effet Zeeman.	147
3.7.1.1.3. Le moment magnétique de spin.	147
3.7.1.1.4. Atome à plusieurs électrons. Le couplage spin-orbite.	148
3.7.1.1.5. Le couplage hyperfin.	149
3.7.1.2.6. L'hamiltonien général.	149
3.7.1.2. Technique et résultats de la RPE.	150
3.7.1.2.1. Cas d'un système isotrope.	150
3.7.1.2.2. Cas d'un système anisotrope.	152
3.7.1.2.3. L'interaction hyperfine.	155
3.7.1.3. Le marquage de spin. Spin-Trap.	158
3.7.1.3.1. Principe.	158
3.7.1.3.2. Marquage de spin des radicaux hydroxyle et superoxyde.	160
3.7.2. Couplage RPE – Electrochimie.	161
3.7.2.1. Principe de l'expérience.	161
3.7.2.2. Mode opératoire.	161
3.7.2.3. Résultats.	162
3.7.3. Piégeage des radicaux hydroxyle.	163
3.7.3.1. But et principe.	163
3.7.3.2. Mode opératoire.	166
3.7.3.3. Résultats.	166
3.7.4. Etude par RPE du complexe 4-mercaptoimidazole / Cu^{2+} .	169
3.7.4.1. Mode opératoire.	169
3.7.4.2. Résultats.	169
3.8. Oxydation des lipoprotéines de basse densité.	171
3.8.1. Rôle, composition et structure des LDL.	171
3.8.2. Mécanisme d'oxydation des LDL.	172
3.8.3. Suivi de l'oxydation des LDL <i>in vitro</i> .	173
3.8.4. Mode opératoire.	175
3.8.4.1. Préparation des LDL.	175
3.8.4.2. Induction de l'oxydation des LDL.	176
3.8.5. Résultats.	177
3.9. Modélisation moléculaire et QSAR.	180
3.9.1. Présentation rapide du QSAR.	180

3.9.1.1. Principes.	180
3.9.1.2. Les descripteurs moléculaires.	181
3.9.1.3. Approche de Hansch.	181
3.9.1.4. Choix des paramètres.	182
3.9.1.5. Validation des équations.	183
3.9.1.5.1. Le coefficient de corrélation.	183
3.9.1.5.2. Le test de Fischer.	183
3.9.1.5.3. La cross validation.	184
3.9.2. Optimisation de la géométrie des composés.	184
3.9.2.1. Méthode de calcul.	185
3.9.2.2. Géométrie des 4-mercaptoimidazoles.	185
3.9.3. Calcul des descripteurs.	188
3.9.3.1. Energies d'activation et enthalpies de réaction.	188
3.9.3.2. Autres descripteurs.	192
3.9.4. Relations QSAR.	195
3.9.4.1. Paramètres thermodynamiques.	195
3.9.4.2. Les densités de spin.	196
3.9.4.3. Les autres descripteurs.	199
3.9.4.4. Corrélation globale.	199
3.9.5. Conclusions de la modélisation moléculaire.	200
3.10. Etude de l'activité glutathion peroxydase-like.	202
3.10.1. Objectif et méthode.	202
3.10.1.1. Objectif.	202
3.10.1.2. Mode opératoire.	202
3.10.2. Résultats.	203
3.10.3. Réduction des 4-mercaptoimidazoles oxydés par le glutathion.	205
3.10.3.1. Présentation du problème.	205
3.10.3.2. Résultats	210
3.10.4. Conclusion.	211
Conclusion.	213
Bibliographie du chapitre 3.	215
4. MODES OPERATOIRES DES SYNTHESSES.	220
4.1. Général.	220
4.2. Synthèse du 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole.	222
4.3. Synthèse du 1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.	226
4.4. Synthèse du 1-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.	230
4.5. Synthèse du 1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.	234
4.6. Synthèse du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.	238
4.7. Synthèse du 1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.	241

4.8. Synthèse du 1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.	244
4.9. Synthèse du 1-méthyl-2-(2-trifluorométhylphényl)-4- mercapto- imidazole.	247
4.10. Synthèse du 1-méthyl-2-(3-trifluométhylrophényl)-4-mercapto- imidazole.	250
4.11. Synthèse du 1-méthyl-5-(2-trifluorométhylphényl)-4-mercapto- imidazole.	253
4.12. Synthèse du 1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.	257
4.13. Synthèse du 1-Méthyl-5-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.	261
4.14. Synthèse du 1-méthyl-5-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.	265
4.15. Synthèse du 1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4- mercaptoimidazole.	269
4.16. Remarques concernant la spectrométrie de masse.	273

INTRODUCTION

Tout le monde sait que l'oxygène que nous respirons est indispensable à notre existence, de même qu'à celle de nombreuses autres formes de vie. Toutefois, il nous faut considérer cette molécule comme un allié dangereux. En effet, il a été démontré ces dernières années que l'oxygène participe à diverses pathologies: troubles inflammatoires, syndrome d'ischémie reperfusion, athérosclérose, SIDA, maladies neurodégénératives, etc... Cette ambiguïté trouve son explication dans le fait que la biochimie de l'oxygène conduit à la formation de nombreux radicaux libres et autres dérivés actifs aux propriétés souvent nocives, dont les dommages sont connus sous le terme de "stress oxydatif".

Ces diverses considérations nous ont conduit à nous intéresser à une famille de molécules, les ovothiols, découverte il y a quelques années dans les oeufs de certains échinodermes. Ces 4-mercaptohistidines ont montré une forte aptitude à empêcher le stress oxydatif qui se développe lors de la fécondation de ces œufs, grâce à leur forte concentration *in vivo*, leurs propriétés de piègeurs de radicaux et leur activité glutathion peroxydase-like.

Nous avons donc décidé de synthétiser des dérivés du type 4-mercaptoimidazole, basés sur les molécules naturelles, pour lesquels nous avons varié la nature des substituants du noyau imidazole, en vue de moduler leurs propriétés antioxydantes.

1. RADICAUX LIBRES ET MALADIES HUMAINES.

1.1. La chimie de l'oxygène.

Les premiers organismes vivants seraient apparus sur terre il y a environ 3.7 milliards d'années [De Duve C., 1998]. Il s'agissait de petits procaryotes anaérobies, seuls capables de vivre dans l'atmosphère dépourvue d'oxygène de l'époque. En effet, l'oxygène moléculaire atmosphérique est un sous-produit de la vie et n'est apparu qu'avec les cyanobactéries. Ces micro-organismes photosynthétiques utilisent l'énergie solaire pour extraire l'hydrogène des molécules d'eau et élaborer leurs constituants, tout en libérant l'oxygène par la même occasion. Poursuivie par les algues et les plantes, la photosynthèse a permis d'amener la proportion de l'oxygène dans l'atmosphère à la valeur actuelle de 21%.

La concentration de l'oxygène atmosphérique est d'une importance capitale. En effet, trop peu présent dans l'atmosphère, l'oxygène ne permet que des formes de vie très primitives. Seuls quelques micro-organismes, pour bonne part des bactéries, sont aptes à vivre en l'absence d'oxygène. Mis à part ces exceptions, les êtres vivants, plantes et animaux, produisent leur énergie grâce à l'oxygène qui oxyde des molécules organiques au cours de la respiration. Les êtres unicellulaires ne partagent la planète avec leurs commensaux pluricellulaires que depuis les dernières 1.5 milliards d'années, date à laquelle l'oxygène parvient enfin à une concentration suffisante dans l'atmosphère (Fig. 1.1.1).

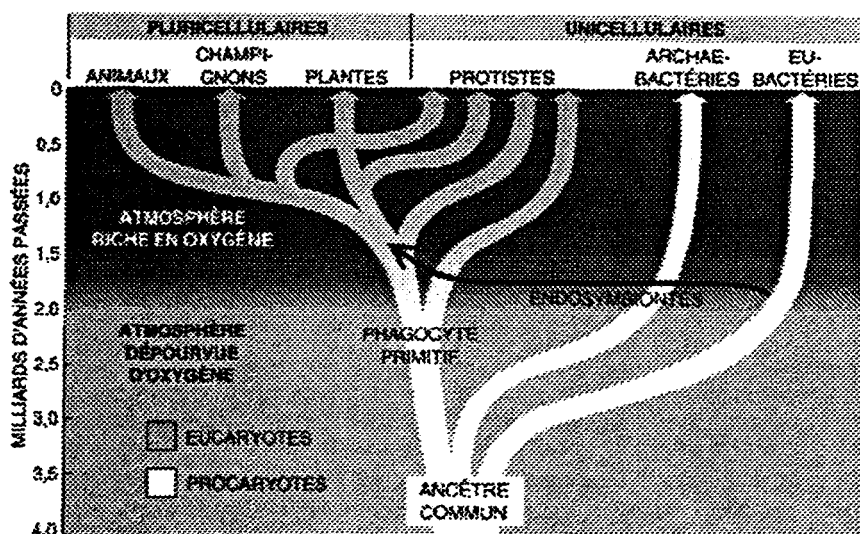


Fig. 1.1.1 : Oxygène atmosphérique et évolution de la vie.
D'après [De Duve C., 1998].

Par contre, en concentration trop élevée, l'oxygène est inapte à la vie : un rat ne peut survivre s'il est plongé 60 heures dans de l'oxygène pur, tandis qu'un humain exposé à ces

mêmes conditions pendant 6 heures subira une irritation pulmonaire. Certes, il s'agit là d'expériences extrêmes, mais la nocivité de l'oxygène peut apparaître dans des cas beaucoup plus usuels. Ainsi, dans les années 40, on constata une augmentation de l'incidence de la fibroplastie rétrolentale chez les nourissons, pouvant aller jusqu'à la cécité dans le cas des nouveaux-nés prématurés. C'est en 1954 que l'on se rendit compte que cette fibroplastie était due à une haute concentration d'oxygène dans les incubateurs [Sahnoun Z. *et al.*, 1997].

Ce caractère équivoque de l'oxygène, à la fois nécessaire et dangereux, est souvent appelé le "paradoxe de la vie aérobie" [Davies K.J.A., 1995].

1.1.1. L'état triplet ou état fondamental.

L'oxygène moléculaire, O_2 , existe à l'état fondamental sous la forme triplet $^3\Sigma_g^- O_2$, c'est-à-dire avec deux électrons non appariés localisés dans des orbitales antiliantes π^* , et possédant le même nombre de spin (Fig. 1.1.2). L'oxygène moléculaire est un vrai bi-radical [Davies K.J.A., 1995]. Il doit donc lever l'interdiction de spin pour réagir avec les molécules à diamagnétiques. Ceci nécessite une grande énergie d'activation et l'oxygène fait preuve, par conséquent, de peu de réactivité vis-à-vis de la plupart des composés organiques, qui existent à l'état singulet dans leur grande majorité. Ainsi, le sucre peut rester indéfiniment à l'air libre sans subir aucune oxydation [Deby C., 1991]. De fait, on trouve des métaux de transition dans la plupart des sites actifs des oxydases et oxygénases, car leur capacité d'accepter ou de donner des électrons libres peut l'emporter sur l'interdiction de spin [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989]. A l'opposé, l'oxygène possède une grande réactivité vis-à-vis des radicaux.

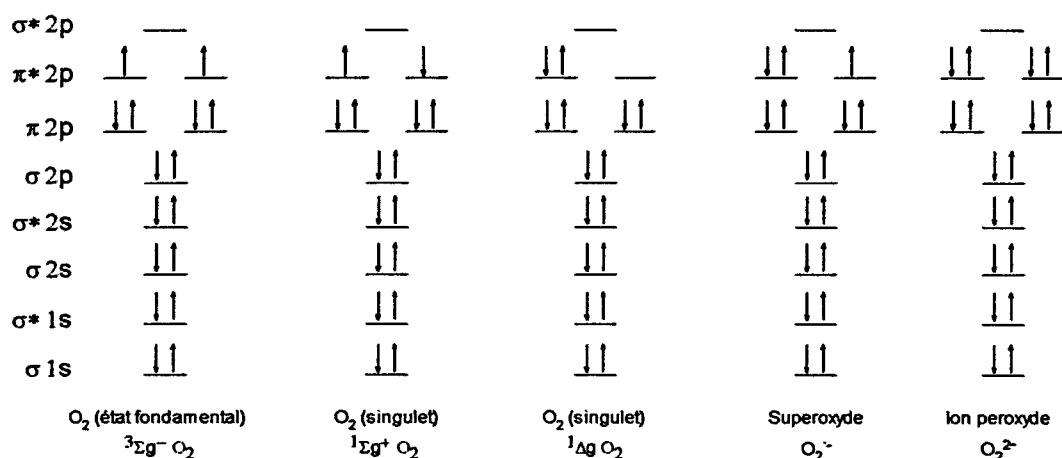


Fig. 1.1.2 : Structure électronique de l'oxygène.

En raison de sa faible polarité, l'oxygène possède une meilleure solubilité dans les milieux organiques que dans les milieux aqueux.

1.1.2. L'état singulet.

L'oxygène singulet $^1\Delta_g \text{O}_2$ (Fig. 1.1.2) est un état excité nécessitant un apport d'énergie de 23,4 kcal/mol [Bensasson R.V. *et al.*, 1993]. Très peu stable, il retourne à l'état fondamental en seulement 2 à 7 μs . Il ne peut être qualifié de radical, car il ne possède pas d'électron non apparié. Cependant, il n'est pas soumis à l'interdiction de spin et s'en trouve beaucoup plus réactif que l'oxygène à l'état fondamental [Davies K.J.A, 1995]. L'orbitale $\pi^* 2p$ vide facilite les réductions de l'oxygène à 1 et 2 électrons, renforçant le pouvoir oxydant de la molécule.

L'oxygène singulet $^1\Sigma_g^+ \text{O}_2$ (Fig. 1.1.2), très instable, se transforme en $^1\Delta_g \text{O}_2$ bien avant qu'il n'ait le temps de réagir avec quoi que ce soit (Fig. 1.1.3).

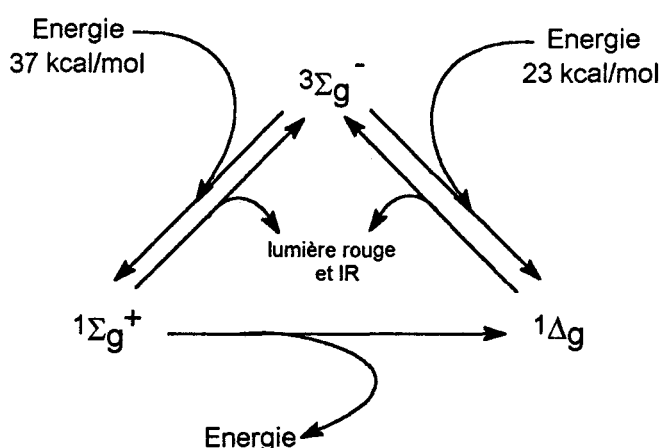
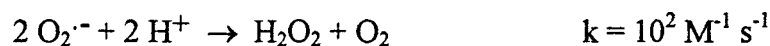


Fig. 1.1.3 : Les différents états de l'oxygène moléculaire.

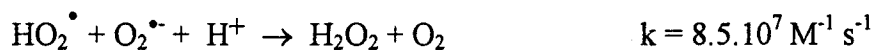
1.1.3. Le radical superoxyde.

Le radical superoxyde, $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Fig. 1.1.2), encore appelé anion superoxyde, est obtenu par réduction à un électron de l'oxygène. Dans les solutions aqueuses, $\text{O}_2^{\bullet -}$ est fortement hydraté et peu réactif. Il agit à la fois comme un réducteur et un oxydant faible, mais peut tout aussi bien réagir en tant que base, radical ou nucléophile [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991]. Le radical superoxyde peut subir une dismutation selon la réaction suivante :



En raison de son caractère ionique, le radical superoxyde se disperse peu en milieu apolaire. Il s'avère donc incapable de traverser les membranes plasmiques, à l'exception des cas où celles-ci sont pourvues de canaux ioniques, comme par exemple dans les érythrocytes [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989].

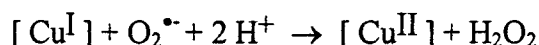
En milieu acide, l'anion superoxyde peut se protoner en donnant naissance à une forme non ionique $\text{HO}_2^\bullet$ ($\text{pK}_a=4.8$). Cette dernière molécule est beaucoup plus réactive. Le pH proche de 5, nécessaire à la formation de cette espèce, se présente à la surface des macrophages activés, dans les vacuoles phagocytiques et les tissus ischémiques [Davies K.J.A., 1995]. $\text{HO}_2^\bullet$ peut aussi subir des réactions de dismutation :



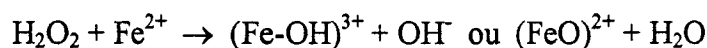
La vitesse de dismutation est donc fonction du pH, avec un maximum pour $\text{pH}=\text{pK}_a$ [Forman H.J. and Thomas M.J., 1986].

1.1.4. Le peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ne peut être produit à partir de l'eau qu'en apportant une quantité d'énergie importante. Cependant, elle peut provenir du radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, par dismutation (voir paragraphe précédent) ou par une réduction à un électron catalysée par des ions métalliques, comme le montre l'exemple suivant :



Par conséquent, H_2O_2 sera toujours présent lorsque $\text{O}_2^{\bullet-}$ l'est lui-même. L'eau oxygénée peut être à la base de la formation d'autres espèces, comme les ions ferryle extrêmement réactifs [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991] :



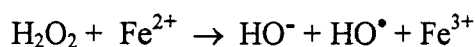
L'ion ferrique peut par exemple être celui de l'hémoglobine. Ces dérivés sont souvent appelés "crypto - $\text{HO}^\bullet$ " ou "pseudo - $\text{HO}^\bullet$ " car leur réactivité est proche de celle du radical hydroxyle (§ 1.1.5.). Ils se différencient de ce dernier par le fait qu'ils ne sont pas des radicaux libres, et ne possèdent qu'une mobilité très faible voire nulle. Leur position est ainsi déterminée par celle du métal dans la protéine [Davies K.J.A., 1995].

H_2O_2 possède une réactivité limitée, mais contrairement à $\text{O}_2^{\bullet-}$, il est capable de traverser aisément les membranes biologiques.

Rque : l'étude du piégeage du peroxyde d'hydrogène par les 4-mercaptoimidazoles étudiés peut être trouvée au paragraphe 3.4.1.

1.1.5. Le radical hydroxyle.

Le radical hydroxyle, $\text{HO}^\bullet$, est produit à partir de l'eau exposée à des radiations ionisantes ou à des ultrasons. Il peut également être obtenu par photolyse de l'eau à 350 nm. Enfin et surtout, $\text{HO}^\bullet$ est formé par la réaction de Fenton catalysée par Cu^+ ou Fe^{2+} [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989]:



Le radical hydroxyle est très réactif et réagit sur son lieu de formation. Il peut être à l'origine de réactions d'hydroxylation des noyaux aromatiques (Fig. 1.1.4) et de réactions avec d'autres radicaux [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991].

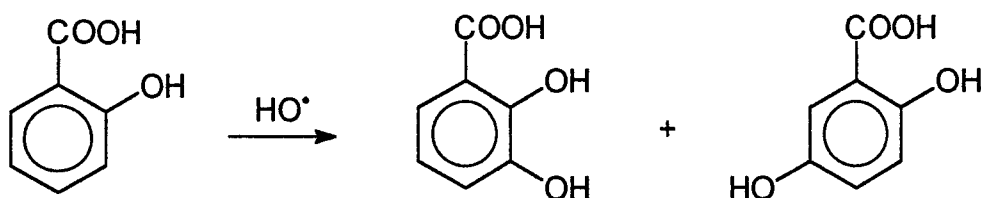
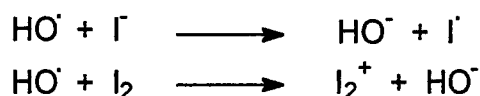


Fig. 1.1.4 : Hydroxylation de noyaux aromatiques par $\text{HO}^\bullet$.

Le radical hydroxyle a encore la possibilité de réagir par arrachement de proton et formation d'un autre radical :



Enfin, il peut se comporter comme accepteur (oxydant) lors de transferts d'électrons :



Rque : L'étude du piégeage du radical hydroxyle par les 4-mercaptoimidazoles synthétisés peut être trouvée au paragraphe 3.7.3.

1.1.6. Dérivés du monoxyde d'azote.

Plus connu sous le nom incorrect d'oxyde nitrique [Koppenol W.H. and Traynham J.G., 1996], le monoxyde d'azote $\text{NO}^\bullet$ n'est autre que l'Endothelium-Derived Releasing Factor (EDRF), second messenger agissant par liaison à l'hème de la guanylate cyclase [Koppenol W.H., 1998]. Ce vasodilatateur est synthétisé par un grand nombre de tissus et joue un rôle important, entre autres, dans la régulation de la pression sanguine, la respiration, la digestion,

l'érection et l'aggrégation plaquettaire [Beckman J.S. and Crow J.P., 1993]. Toutefois, NO[•] apparaît aussi comme un agent cytotoxique.

NO[•] et ses dérivés ne sont pas à proprement parler des dérivés actifs de l'oxygène. Cependant, la plupart des propriétés cytotoxiques du monoxyde d'azote apparaissent après activation par l'oxygène et ses dérivés. De plus, en bien des domaines, les dérivés cytotoxiques de NO[•] agissent de façon similaire aux dérivés actifs de l'oxygène. C'est pourquoi il peut être judicieux, dans cette partie, de lui consacrer quelques paragraphes.

1.1.6.1. Activité de NO[•] et de N₂O₃.

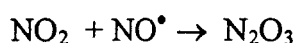
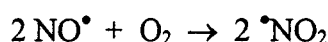
Bien qu'il soit de structure radicalaire, NO[•] est relativement stable, et, tout comme O₂^{•-}, n'est pas très réactif. Par contre, il est capable de réagir avec des réactifs organiques et de stopper ainsi des réactions en chaîne [Koppenol, W.H., 1998].

De plus, NO[•] est capable de réduire les ions ferryle (§ 1.1.4.) selon la réaction suivante :



NO[•] peut donc inhiber la chimie oxydative des espèces "métallo-oxo" [Wink D.A. and Mitchell J.B., 1998].

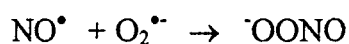
L'oxydation de NO[•] par l'oxygène peut amener la formation de N₂O₃ selon le mécanisme :



N₂O₃ s'hydrolyse facilement en HNO₂ en milieu aqueux. Cependant, dans les compartiments hydrophobes de la cellule, la durée de vie de N₂O₃ augmente, ce qui lui permet d'agir par nitration des thiols et des amines [Wink D.A. and Mitchell J.B. ; 1998].

1.1.6.2. Le peroxynitrite.

Le monoxyde d'azote est capable de réagir avec l'anion superoxyde pour produire le peroxynitrite ⁻OONO selon la réaction suivante :



Ce mécanisme a pour conséquence de transformer deux radicaux peu réactifs en une espèce beaucoup plus réactive [Squadrito G.L. and Pryor W.A., 1998]. Cette réaction est si

rapide que le processus est presque sous contrôle de la diffusion, de sorte que la réaction peut avoir lieu *in vivo*.

OONO^- , nucléophile puissant, est en équilibre avec sa forme acide HOONO ($\text{pK}_a=6.8$). Tous deux sont de forts oxydants, mais HOONO est, en général, à l'origine de réactions plus rapides au pH physiologique, à l'exception, comme nous le verrons, de la réaction avec CO_2 , l'ebesen et les thiols.

1.1.6.3. Réaction du peroxynitrite avec le dioxyde de carbone.

La principale réaction de OONO^- est celle engendrée par CO_2 . En effet, la concentration biologique du CO_2 est très élevée (1mM), puisque le principal système tampon des tissus est constitué par le bicarbonate. De plus, la vitesse de réaction du peroxynitrite avec le dioxyde de carbone est très importante [Squadrito G.L. and Pryor W.A., 1998].

Le premier état intermédiaire de cette réaction est donné dans la figure 5 :

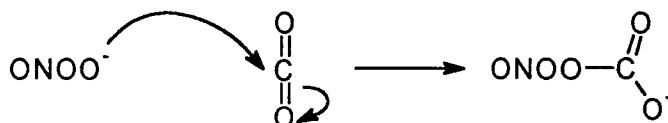


Fig. 1.1.5 : Réaction du dioxyde de carbone avec le peroxynitrite. Formation du nitrosoperoxycarbonate.

Cet intermédiaire, le nitrosoperoxycarbonate, est à l'origine, entre autres, de réactions de nitration qui ne peuvent être expliquées par la formation de NO_2^+ [Squadrito G.L. and Pryor W.A., 1998]. Au contraire, il va induire la formation d'un couple de radicaux $^{\bullet}\text{NO}_2 / \text{CO}_3^{\bullet-}$ en cage. Après diffusion, ces entités peuvent devenir des radicaux libres (Fig. 1.1.6) et provoquer des réactions de dimérisation, de transfert de $\text{O}^{\bullet-}$, d'oxydation et de nitration (Fig. 1.1.7).

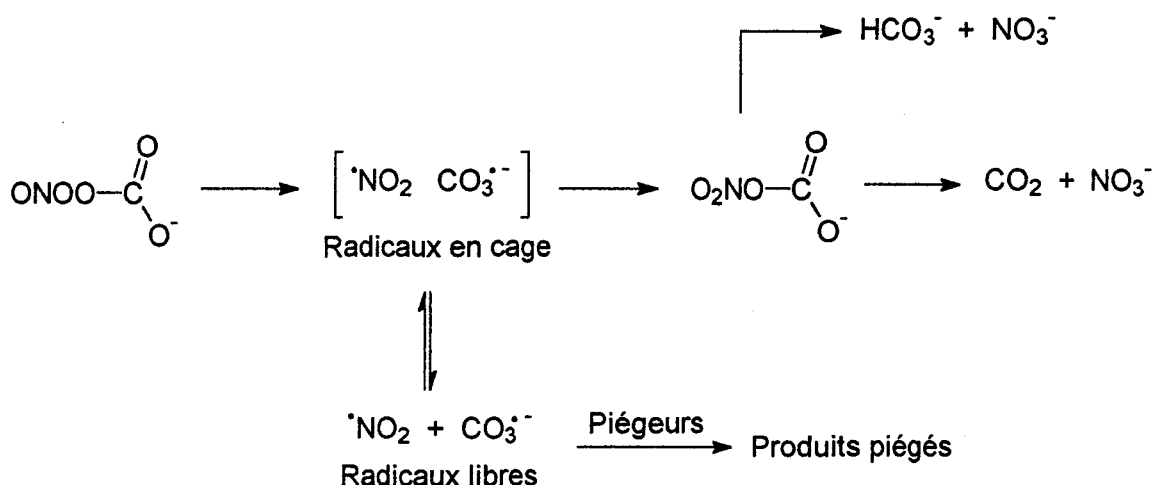
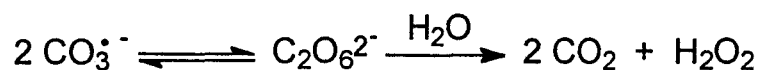
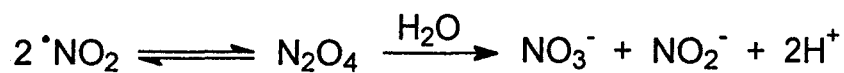
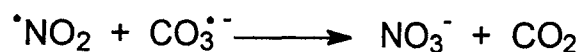


Fig. 1.1.6 : Mécanisme de décomposition du nitrosoperoxycarbonate.
D'après Squadrito G.L. and Pryor W.A., 1998.

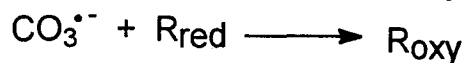
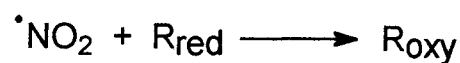
Réactions d'hydrolyse et de dimérisation:



Transfert d' $\text{O}^{\cdot-}$:



Réactions d'oxydation:



Réactions de nitration:

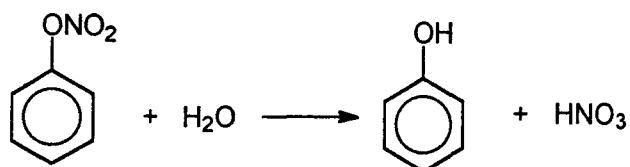
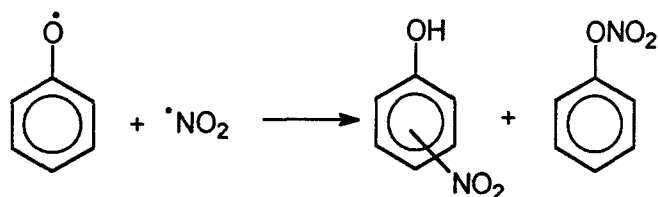
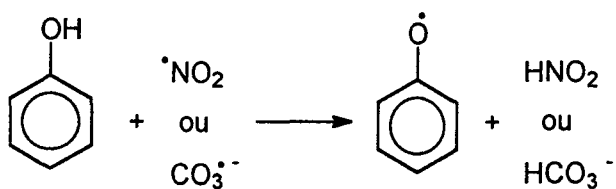


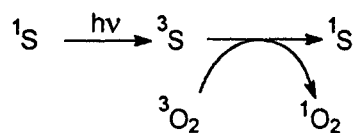
Fig. 1.1.7 : Réactions des radicaux libres $\cdot\text{NO}_2$ et $\text{CO}_3^{\cdot-}$.

D'après Squadrito G.L. and Pryor W.A., 1998.

1.2. Formation des dérivés actifs de l'oxygène *in vivo*.

1.2.1. Formation de l'oxygène singulet.

L'oxygène singulet peut être obtenu par photosensibilisation selon le mécanisme suivant:



Dans ce schéma, S représente un photosensibilisateur [Bensasson *et al.*, 1993]. Cette réaction peut se dérouler dans beaucoup de systèmes pigmentés exposés à la lumière, comme par exemple le cristallin de l'œil [Goosey J.D. *et al.*, 1980].

La formation de l'oxygène singulet peut encore survenir dans des phagocytes de type P.M.N. (Polymorphonucléaire). En effet, ceux-ci produisent une enzyme, la myéloperoxydase, capable de catalyser la synthèse d'hypochlorite (eau de javel) à partir de chlorure et d'eau oxygénée. L'hypochlorite va ensuite réagir avec l'eau oxygénée pour donner naissance à l'oxygène singulet [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989; Davies K.J.A., 1995]. De plus, l'hypochlorite, ClO^- , peut altérer les fonctions amines présentes dans le milieu pour former des fonctions chloramine, composés au pouvoir antiseptique (Fig. 1.2.1). Cependant, la formation de l'oxygène singulet par ce dernier mécanisme est encore mise en doute par certains auteurs qui affirment que les conditions nécessaires à sa réalisation ne peuvent être réunies *in vivo* [Kanosfky J.R., 1984].

Rque : l'étude du piégeage de l'hypochlorite par les 4-mercaptoimidazoles étudiés peut être trouvée au paragraphe 3.4.2.

1.2.2. Formation de l'anion superoxyde.

1.2.2.1. Dans les mitochondries.

La réoxydation de $NADH_2$ et de $FADH_2$ s'effectue en plusieurs étapes au niveau de la chaîne de transport des électrons. Cette oxydation se déroule grâce à la réduction à deux électrons de l'oxygène jusqu'à obtention d'une molécule d'eau (Fig. 1.2.1 et 1.2.2).

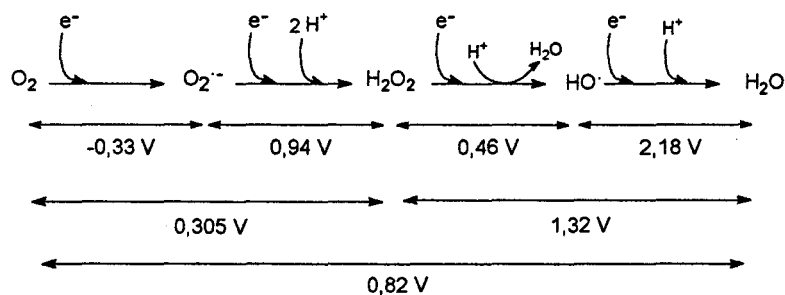


Fig. 1.2.1 : La chaîne respiratoire. Potentiels d'oxydoréduction.
D'après Ferradini C., 1986

Les intermédiaires de cette réaction sont le radical superoxyde, l'eau oxygénée et l'ion peroxyde (Fig. 1.2.1). Ces composés ont normalement une durée de vie courte étant donnée leur transformation finale en eau. Toutefois, une faible fraction de ceux-ci, de 1 à 2%, arrive à sortir de la chaîne respiratoire avant leur complète réduction en eau.

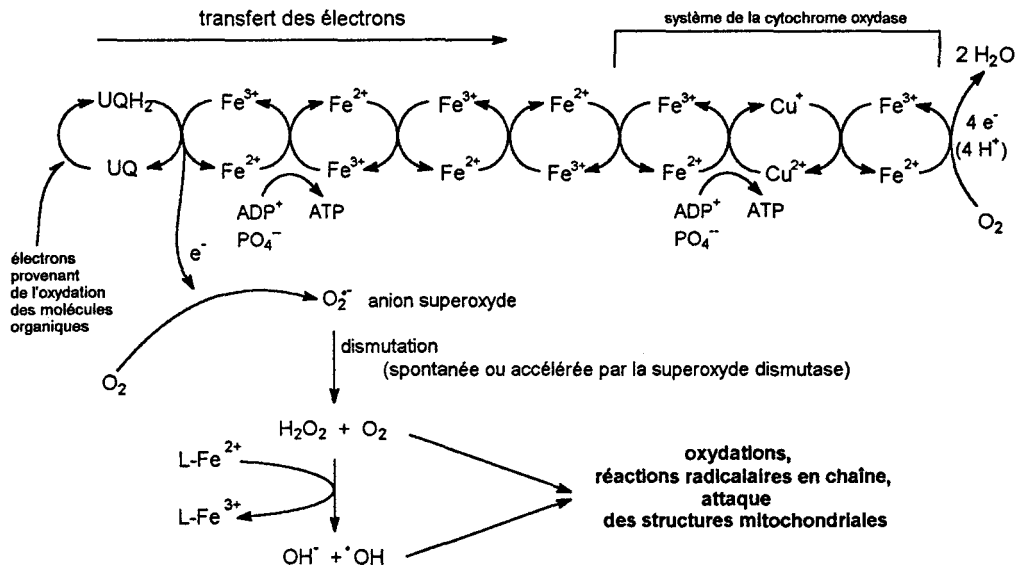
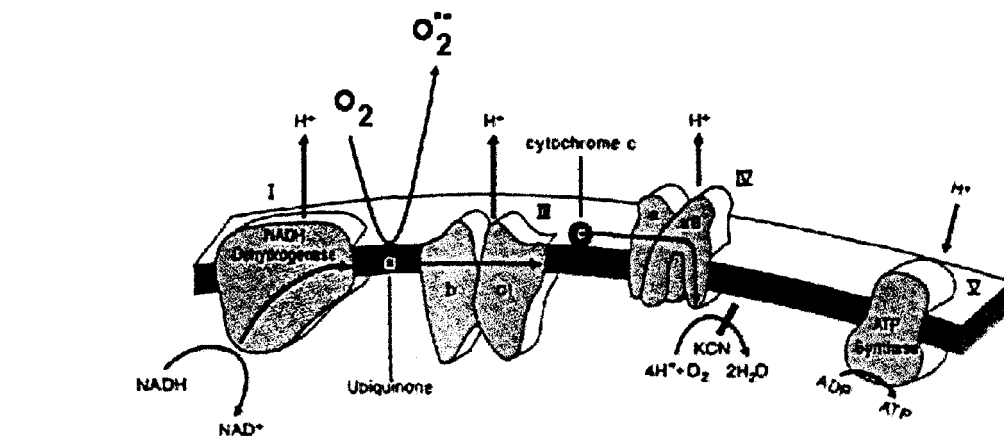
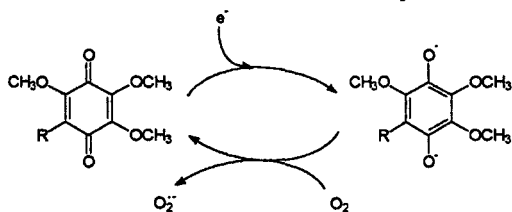


Fig. 1.2.2 : La chaîne respiratoire.
D'après Deby C., 1991.

Ainsi, une femme de 60 kg produira quelques 160 à 320 mmol de radical superoxyde par jour, uniquement par l'intermédiaire de la chaîne mitochondriale (basé sur une consommation d'O₂ de 6.4 l.kg⁻¹.jour⁻¹), tandis que dans le même temps un homme de 80 kg en produira 215 à 430 mmol (soit 1.2 à 2.5 kg.an⁻¹ !) [Davies K.J.A, 1995].



D'après Hockenbery D.M. *et al.*, 1993



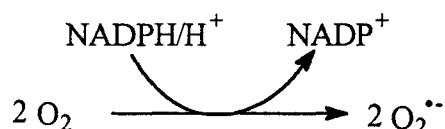
Formation d' O₂^{•-} à partir d'un cofacteur quinonique.

Fig. 1.2.3 : Formation d'O₂^{•-} au niveau de la mitochondrie.

C'est donc au niveau de la mitochondrie que l'on peut trouver la plus forte concentration en radicaux libres dans la cellule. Deux sites enzymatiques de la membrane interne de la mitochondrie produisent la quasi totalité des radicaux superoxyde : l'ubiquinone-cytochrome C réductase (85%) et la NADH déhydrogénase (15%) (Fig. 1.2.3).

1.2.2.2. Formation de l'anion superoxyde lors de la phagocytose.

Le radical superoxyde peut être formé au cours de la phagocytose au niveau des vacuoles de la membrane plasmique (Fig. 1.2.4). Il participe alors à la défense de l'organisme. Dans ce cas, $O_2^{\bullet -}$ est synthétisé par la NADPH oxydase, selon la réaction suivante.



Il subit ensuite une dismutation enzymatique, sous l'action de la SOD (voir plus loin), conduisant à la formation d'oxygène et d'eau oxygénée. Cette dernière, en présence de chlorure et de myéloperoxydase, va déclencher la réaction déjà vue au paragraphe 1.2.1.

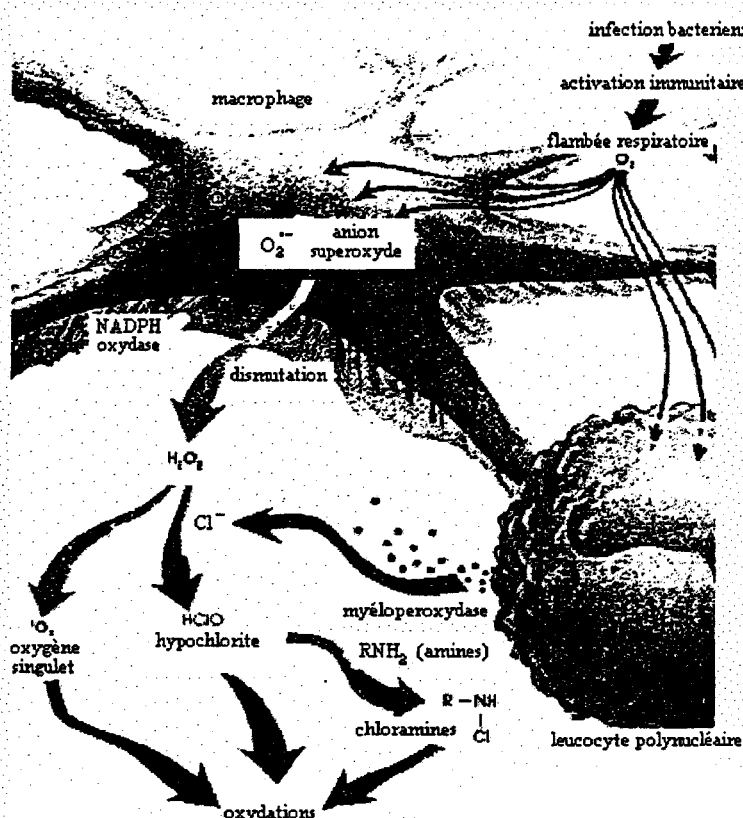


Fig. 1.2.4 : Formation de dérivés actifs de l'oxygène au cours de la phagocytose.
D'après Deby C., 1991.

1.2.2.3. Autres lieux de formation de l'anion superoxyde.

Le radical superoxyde se forme aussi dans la membrane du réticulum endoplasmique au niveau des systèmes impliqués dans la chaîne de transfert d'électrons. Il est libéré par le complexe oxy du cytochrome P-450 et par la NADPH-cytochrome P-450 réductase (Fig. 1.2.5 et 1.2.7) [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989]. Enfin $O_2^{\bullet -}$ peut aussi être produit par certaines molécules naturelles autooxydables, comme l'oxyhémoglobine, le glutathion, la vitamine C, ou encore par des xénobiotiques, comme l'adriamycine [Davies K.J.A., 1995].

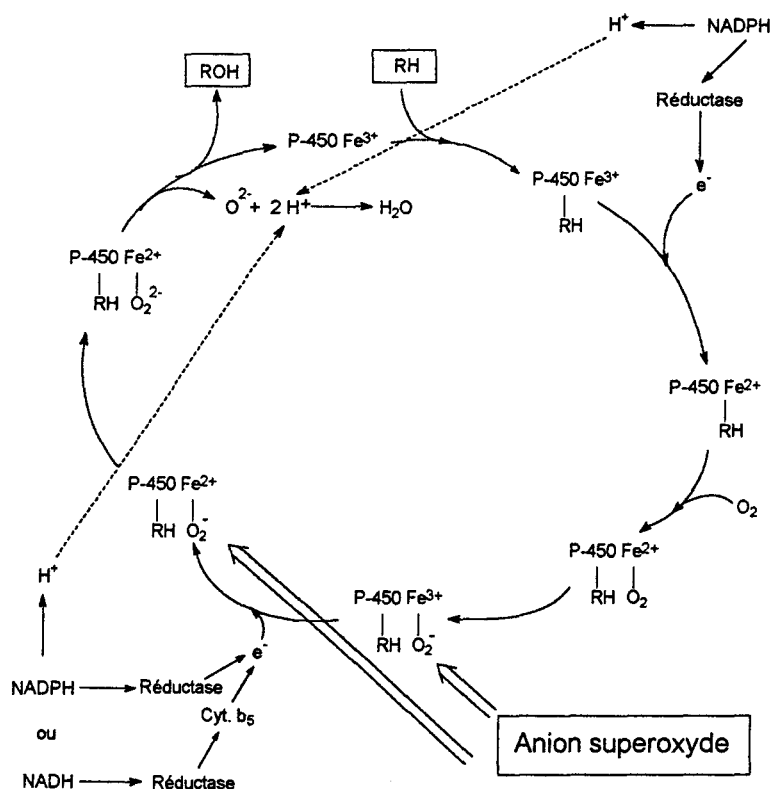


Fig. 1.2.5 : Cycle catalytique de la cytochrome P-450 réductase.

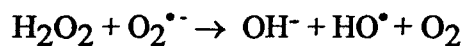
1.2.3. Formation de l'eau oxygénée.

In vivo, H_2O_2 est formé à partir de $O_2^{\bullet -}$ au cours d'une réaction de défense naturelle contre la toxicité du radical superoxyde. Cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase. La même enzyme catalyse aussi la formation de l'eau oxygénée lors de la phagocytose, comme nous l'avons déjà vu au paragraphe 1.2.2.2. (Fig. 1.2.4).

1.2.4 Formation du radical hydroxyle.

Le radical hydroxyle peut se former par coupure homolytique d'une molécule d'eau oxygénée sous action de la chaleur ou de radiations ionisantes. Mais surtout, comme nous l'avons déjà vu, $HO^{\bullet}$ peut se former par la réaction de Fenton (§ 1.1.5.). De plus, l'anion superoxyde et l'eau oxygénée peuvent réagir ensemble selon le mécanisme d'Haber-Weiss,

pour conduire au radical hydroxyle :



Cependant, cette réaction, très lente, nécessite une catalyse par un ion métallique selon le mécanisme de la figure 1.2.6.

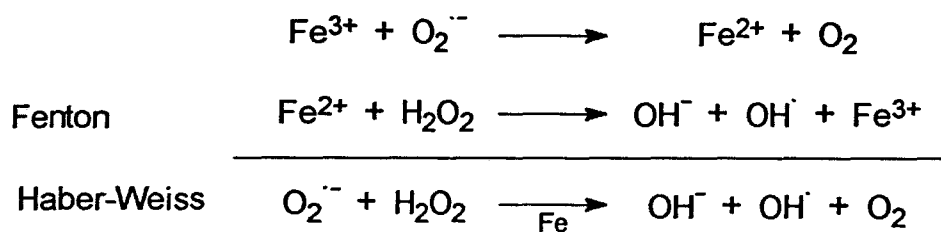


Fig. 1.2.6 : Mécanisme d'Haber-Weiss.

C'est le fer qui est le plus souvent impliqué dans la réaction de Fenton, car il est le plus disponible. Mais ce rôle peut très bien être rempli par le cuivre sous les formes $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$.

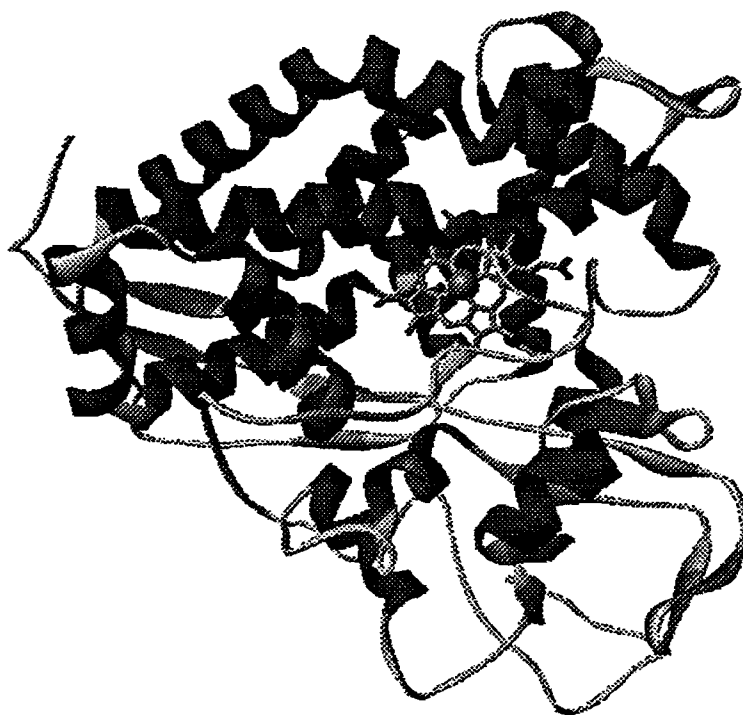


Fig. 1.2.7 : Structure de la cytochrome P-450 oxydase.

Couleur en fonction de la structure secondaire. Protoporphyrine en vert et Fe^{3+} en violet. Raag R. *et al.*, 1990.
Structure obtenue par l'intermédiaire de la Brookhaven Protein Database. ID : 1CP4. (E.C.1.14.15.1)

En résumé, on peut dire que la formation des dérivés actifs de l'oxygène se retrouve dans tous les compartiments de la cellule : mitochondries, lysosomes et même noyau (Fig. 1.2.8). Tous ces lieux de formation sont autant de cibles potentielles pour ces dérivés. Les destructions occasionnées par les radicaux libres peuvent toucher la totalité des composants biochimiques de la cellule.

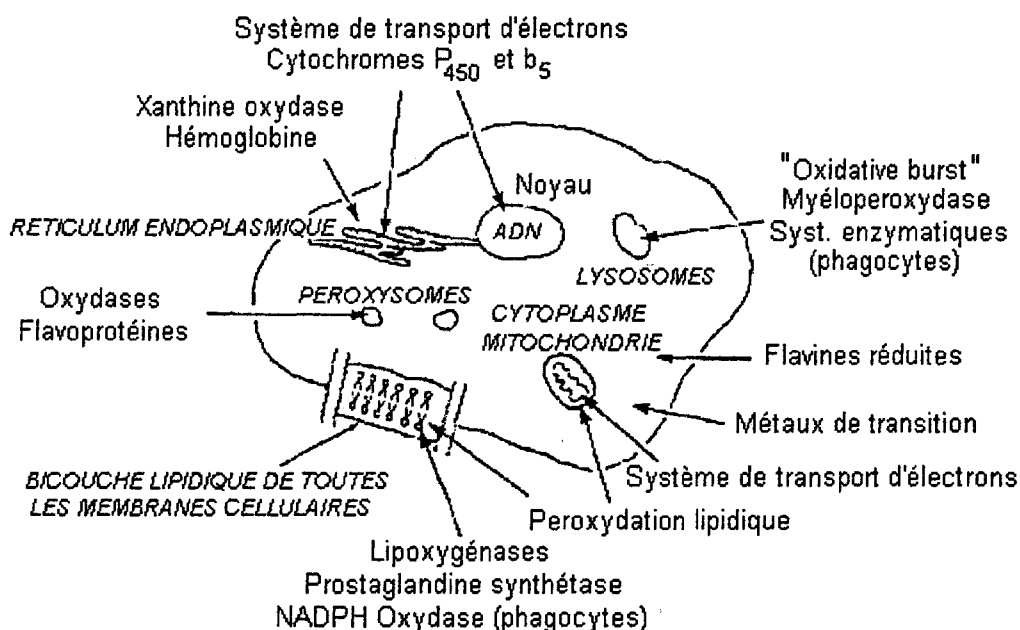


Fig. 1.2.8 : Lieux de formation des dérivés actifs de l'oxygène.
D'après Machlin L.J. and Bendich A., 1987.

1.2.5. Formation de l'oxyde nitrique et de ses dérivés.

$\text{NO}^\bullet$ est synthétisé de façon enzymatique grâce aux "Nitric Oxide Synthases" (NOS). Celles-ci peuvent être inductibles (iNOS) ou constitutives (cNOS) [Wink D.A. and Mitchell J.B., 1998]. Le site actif de l'enzyme est constitué autour d'un groupe hémique portant un atome de Fe (Fig. 1.2.9).

Parmi les cNOS, on trouve les NOS de l'endothélium et de neurones. Mais, la formation de $\text{NO}^\bullet$ est beaucoup plus importante dans les cellules exprimant la iNOS, comme par exemple les macrophages activés.

C'est justement au niveau des macrophages, sources comme nous l'avons vu d'anions superoxyde, que la formation de peroxynitrite sera la plus importante. Les mitochondries sont un autre lieu de choix pour la synthèse de OONO^- [Wink D.A. and Mitchell J.B., 1998].

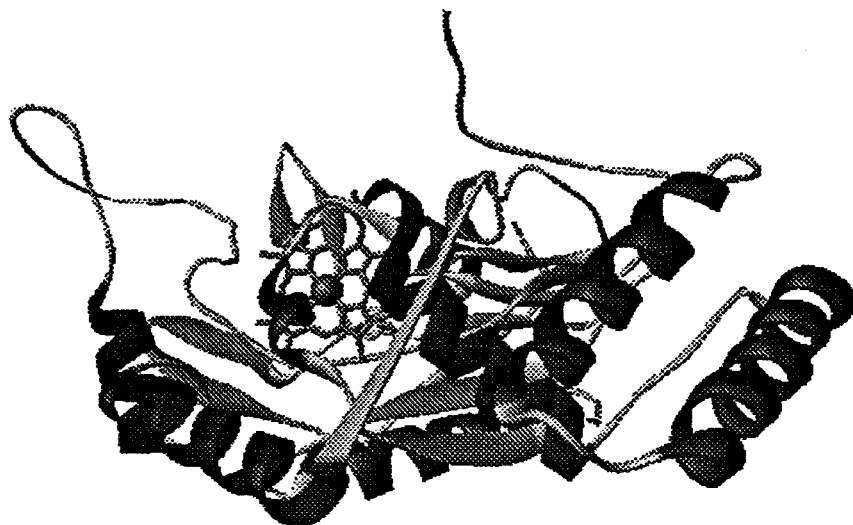


Fig. 1.2.9 : Structure de la iNOS de macrophage de souris.
Couleur en fonction de la structure secondaire. Protoporphyrine en vert et Fe^{3+} en violet. Crane B.R. *et al.*, 1997.
Structure obtenue par l'intermédiaire de la Brookhaven Protein Database. ID : 2NOS. (E.C. 1.14.13.39)

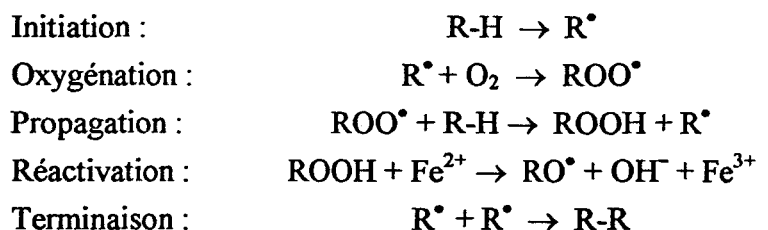
1.3. Les dommages causés par les dérivés actifs de l'oxygène.

1.3.1. Le stress oxydatif.

Les radicaux de l'oxygène sont à l'origine de multiples dommages. Ceux causés directement par $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 sont très limités, étant donnée leur faible réactivité. Par contre, en présence de fer par exemple, en suivant la réaction de Fenton, il peut se former des radicaux $HO^{\cdot}$ beaucoup plus réactifs, et par conséquent toxiques. Ce radical hydroxyle est capable d'endommager les tissus conjonctifs, les lipides, les sucres et même les acides nucléiques. Lorsque les mécanismes de défense, que nous expliciterons plus loin, sont débordés, il s'ensuit un "stress oxydatif" (Fig. 1.3.1).

1.3.2. La peroxydation lipidique.

Les lipides polyinsaturés, composants essentiels de la cellule, sont très sensibles aux radicaux libres. Leur dégradation se réalise au cours d'une réaction en chaîne :



L'initiation est le plus souvent induite par $HO^{\cdot}$.

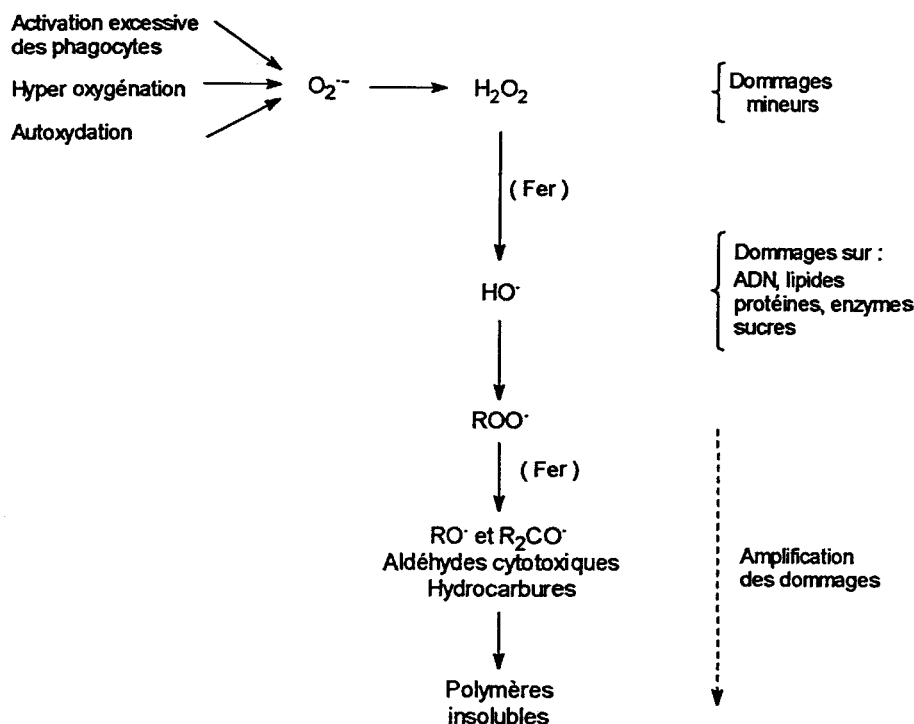
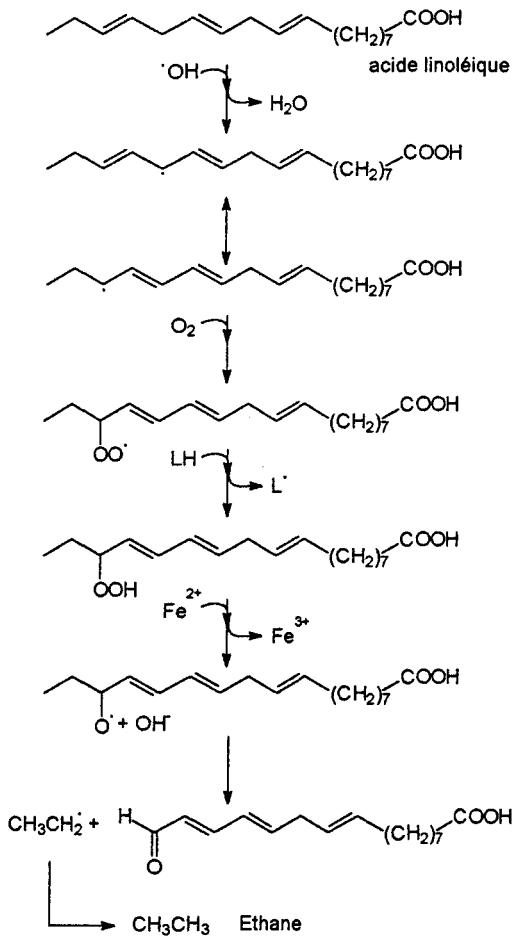


Fig. 1.3.1 : Le stress oxydatif.
D'après M.Fontecave and J.L. Pierre, 1991.

Au cours de ces peroxydations, il se forme des espèces chimiques simples comme l'éthane (Fig. 1.3.2) ou le malondialdéhyde (Fig. 1.3.3), qui permettent un dosage du stress oxydatif. Par exemple, le malondialdéhyde provoque une coloration rouge lorsqu'il est mis en présence de l'acide thiobarbiturique [Bird R.P. and Draper H.H., 1984 ; Bensasson *et al.*, 1993]. L'éthane, lui, peut être mesuré par chromatographie gazeuse [Lawrence G.D. and Cohen G., 1984 ; Bensasson *et al.*, 1993].



D'après Bensasson *et al.*, 1993 et Fontecave M. and Pierre J.L., 1991.

Fig. 1.3.2. : Formation d'éthane.

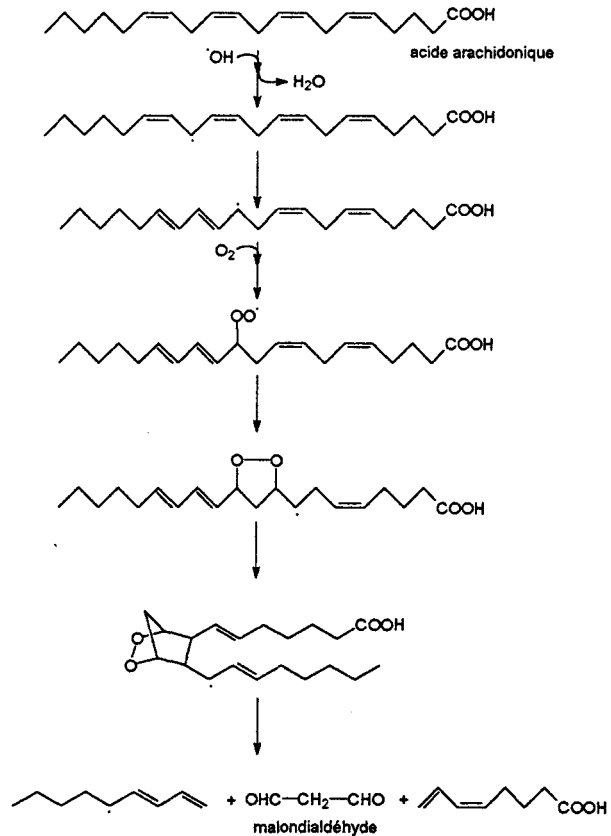


Fig. 1.3.3 : Formation de malondialdéhyde.

Une peroxydation lipidique incontrôlée peut altérer gravement les propriétés de semi-perméabilité et de rigidité de la membrane [Davies K.J.A., 1995] et peut entraîner la mort cellulaire. Nous verrons de plus que ce mécanisme de destruction des lipides est impliqué dans l'athérosclérose (§ 1.5.2.).

Un système cellulaire de réparation des lipides oxydés de la membrane cellulaire permet de limiter les effets délétères de ces mécanismes. En effet, les modifications structurales engendrées par les réactions d'oxydation font des lipides oxydés de meilleurs substrats pour la phospholipase A_2 . Les hydroperoxydes lipidiques, libérés dans le cytosol par cette enzyme,

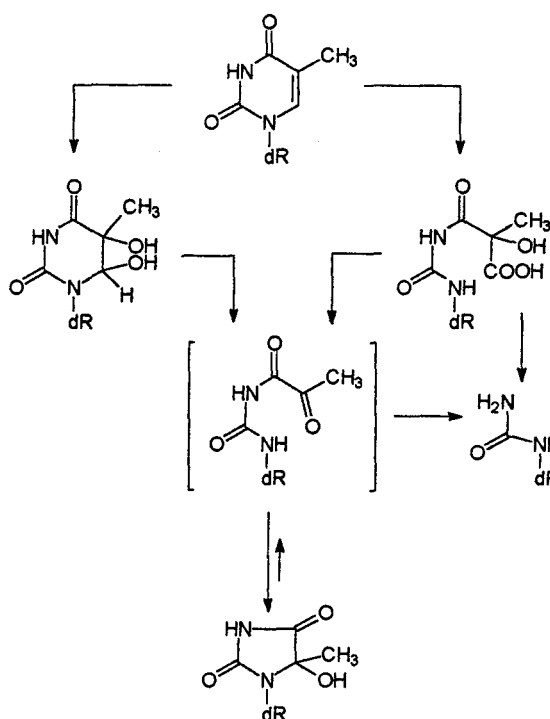
sont alors détoxifiés par la glutathion peroxydase qui les réduit sous forme d'hydroxy-lipides [Davies K.J.A., 1995].

Rque: l'étude de l'inhibition de la peroxydation lipidique par les 4-mercapto-imidazoles synthétisés peut être trouvée au paragraphe 3.8.

1.3.3. Dégâts causés à l'ADN.

Les dérivés actifs de l'oxygène peuvent s'attaquer de deux façons à la double hélice de l'ADN: d'une part en dégradant les bases puriques et pyrimidiques et d'autre part, en détruisant les sucres, en l'occurrence, le désoxyribose [Imlay J.A. and Linn S., 1988].

Les quatre bases de l'ADN sont susceptibles de subir des attaques oxydatives. Les bases pyrimidiques (Cytosine et thymine, Fig. 1.3.4.) apparaissent comme étant les plus sensibles [Davies K.J.A., 1995], mais les bases puriques (Adénine et guanine, Fig. 1.3.5) ne sont pas à l'abri. Le nombre de bases ainsi modifiées, même dans des conditions physiologiques normales, peut être très élevé. Il a en effet été estimé à une pour 130000 au niveau de l'ADN nucléaire et une pour 8000 dans l'ADN mitochondrial [Davies K.J.A., 1995].



D'après Sies H., 1986.

Fig. 1.3.4 : Dégradation de la thymine.

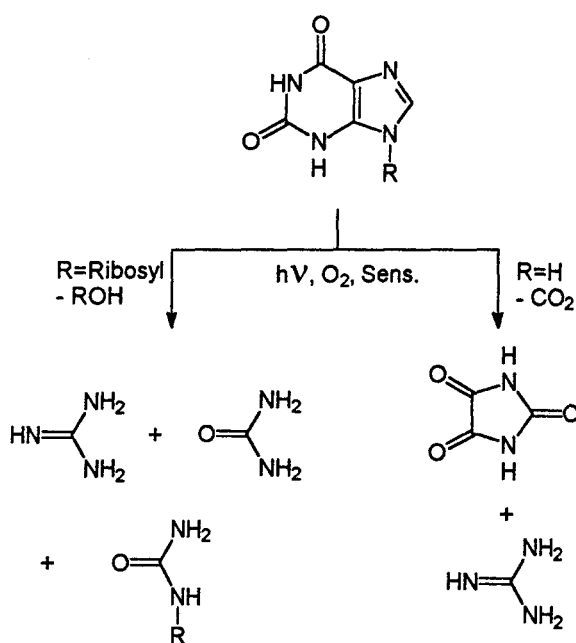


Fig. 1.3.5 : Dégradation de la guanine.

L'adénosine et la cytosine possèdent un comportement analogue vis-à-vis de l'oxydation [Demple B. and Harrison L., 1994].

L'attaque du désoxyribose par le radical hydroxyle peut se dérouler suivant de nombreux mécanismes différents selon la position de l'hydrogène arraché initialement

[Pogozelski W.K. and Tullius T., 1998]. Ces mécanismes peuvent entraîner l'ouverture du cycle, avec coupure de la chaîne correspondante [Sies H., 1986] (Fig.1.3.6) et formation de divers sous-produits: oligonucléotides 5'-phosphate, oligonucléotides 3'-phosphate, bases libres ou fixées sur des produits de dégradation du désoxyribose, 3-hydroxypropanal, 5-méthylène-2-furanone, furfural, etc... [Pogozelski W.K. and Tullius T., 1998]. Ces mécanismes entraînent la coupure de la chaîne correspondante.

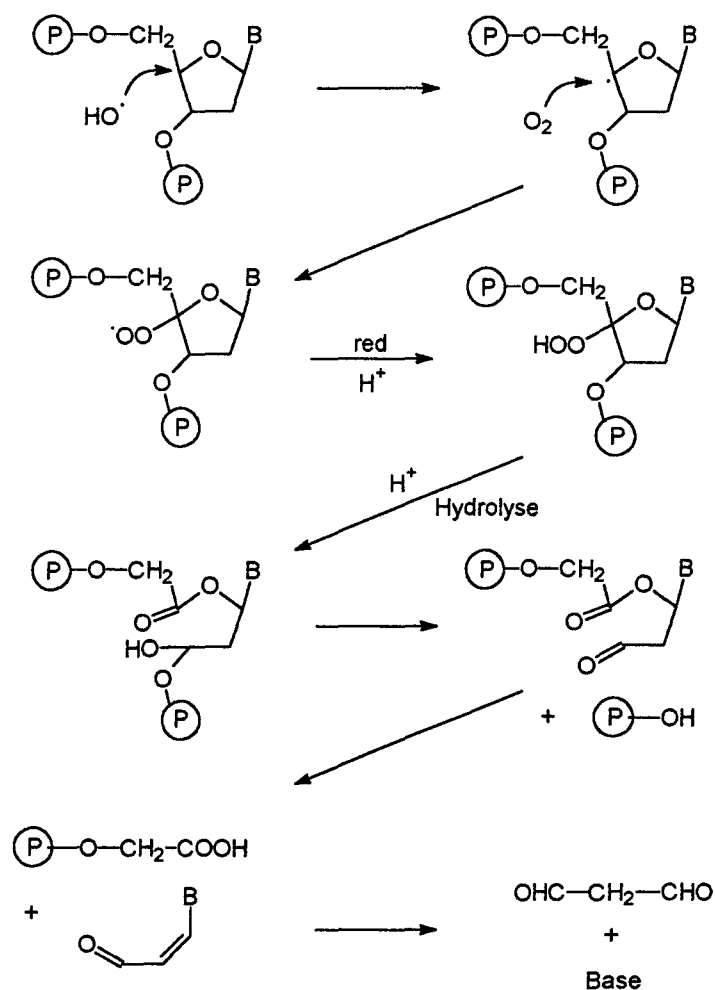


Fig. 1.3.6 : Un des nombreux mécanismes possibles de l'oxydation du désoxyribose: voie engendrée par l'abstraction de l'hydrogène H-4' en conditions aérobies par la bléomycine activée.
D'après Sies H., 1986 et Pogozelski W.K. and Tullius T., 1998.

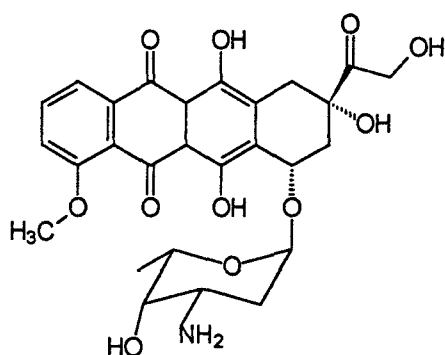


Fig. 1.3.7 : Structure de l'adriamycine.

Lorsqu'il est produit de manière incontrôlée, le stress oxydatif sur l'ADN est à l'origine de lésions importantes : dysfonctionnement de la cellule, voire coupure d'un chromosome. Par contre, ce phénomène peut être mis à contribution dans la lutte contre le cancer. En effet, une molécule capable à la fois de se lier à l'ADN et de produire des radicaux libres pourra entraîner une destruction de l'ADN des cellules cancéreuses, à condition d'être suffisamment sélective. Citons en exemple l'adriamycine (Fig 1.3.7) [Lown W., 1984 ; Bensasson *et al.*, 1993 ; Turner M.J. *et al.*, 1990]. La réduction de cette molécule va entraîner la formation de dérivés actifs de l'oxygène qui contribueront à la coupure de l'ADN, donc à l'activité anti-cancéreuse du médicament (en surplus de l'effet d'intercalation), mais aussi à ses effets secondaires cardiotoxiques.

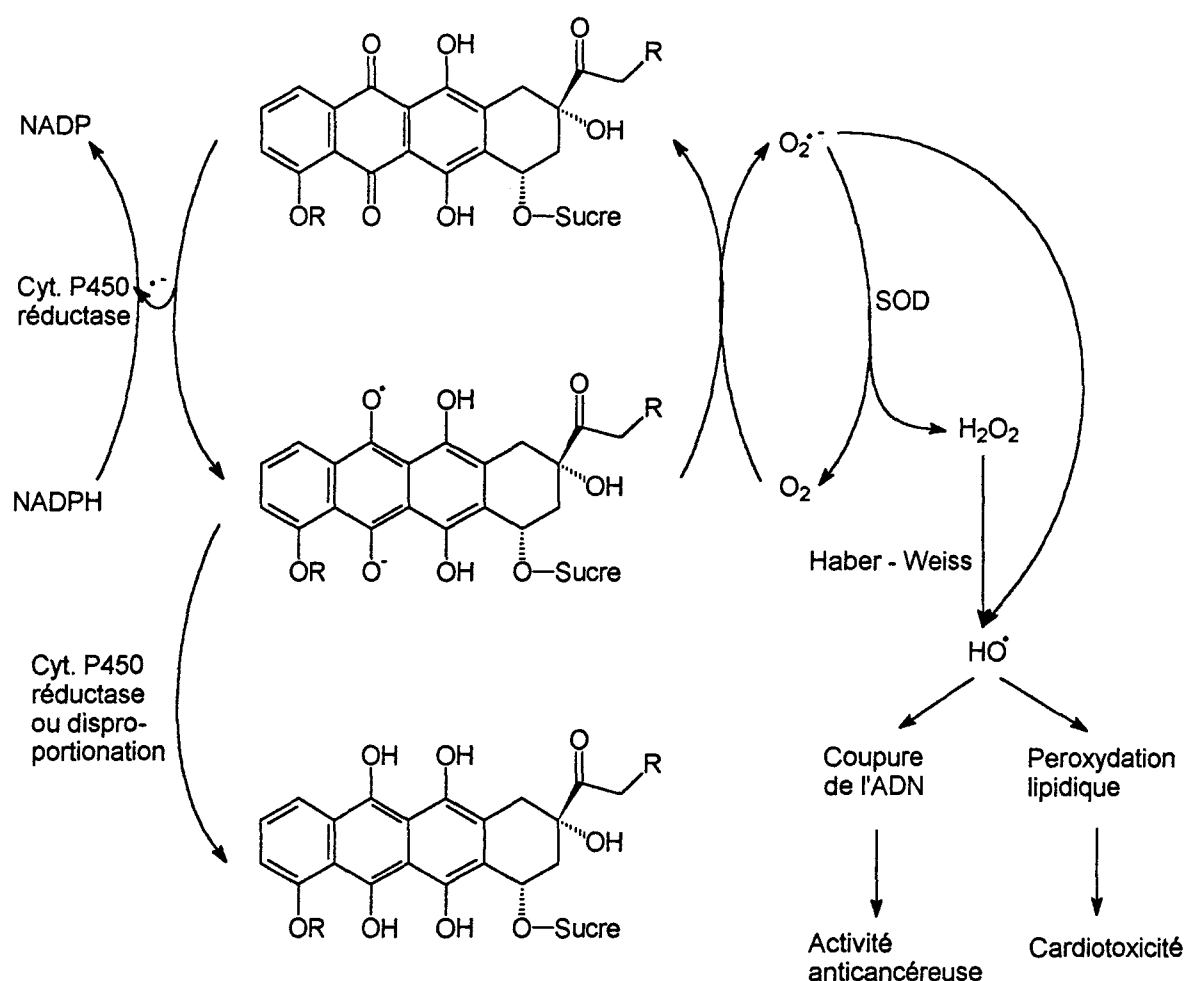


Fig. 1.3.8 : Stress oxydatif engendré par l'adriamycine.

Adapté de Bensasson *et al.*, 1993.

Les différents dégâts causés par les dérivés actifs de l'oxygène, à savoir oxydation des bases et coupure de la chaîne, peuvent être réparés à l'aide d'un système enzymatique faisant intervenir la DNA-glycosylase chargée de libérer la base endommagée (Fig. 1.3.9), des endonucléases et exonucléases dont le rôle est de couper la liaison phosphate/sucre, et enfin

des ligases et polymérase chargées de réparer le brin d'ADN par réplication [Demple B. and Harrison L., 1994]. Les bases modifiées ainsi libérées, comme par exemple la 8-hydroxydéoxyguanosine, peuvent être dosées dans les urines et permettent par conséquent le suivi du stress oxydatif chez un individu [Omar B. *et al.*, 1991; Davies K.J.A., 1995].

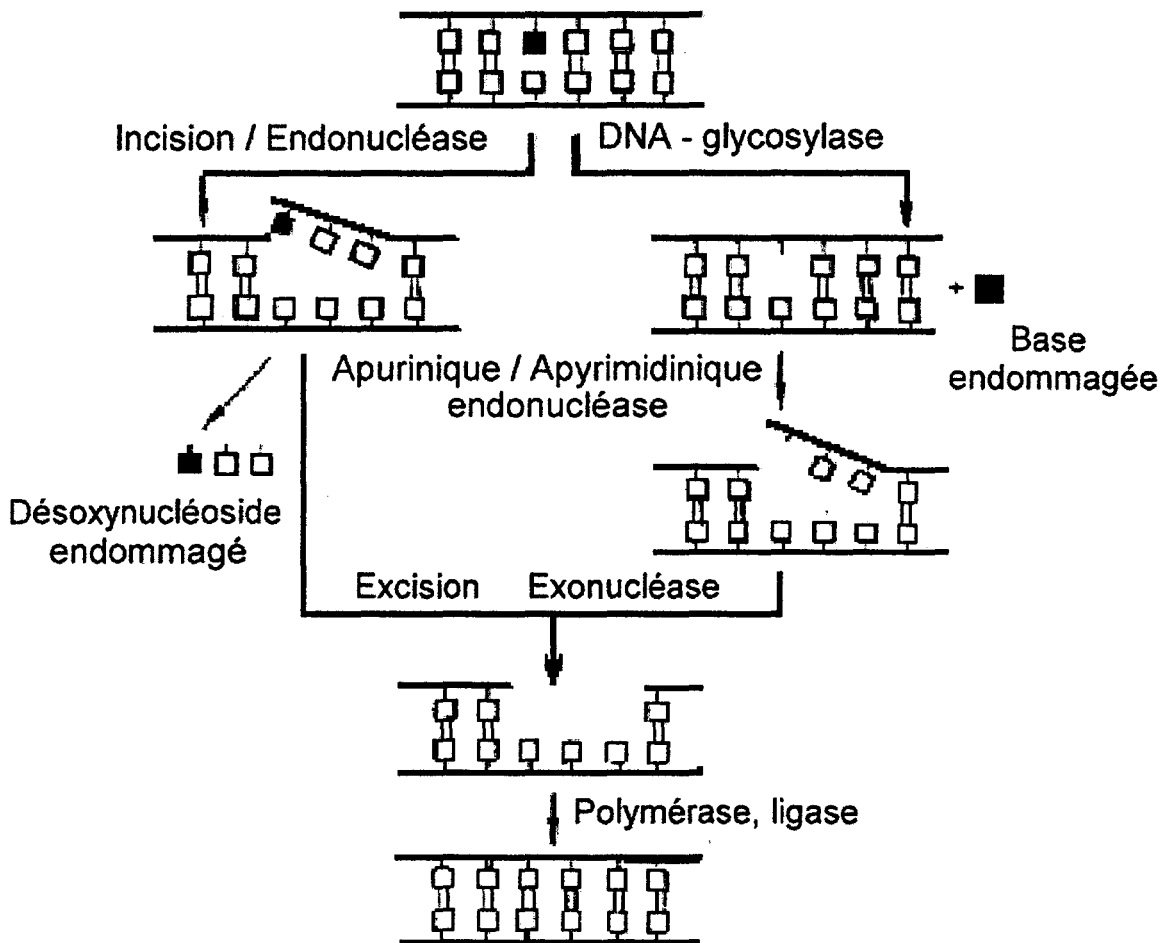


Fig. 1.3.9 : Mécanismes de réparation de l'ADN.
Adapté de Sies H., 1986.

1.3.4. Dégâts causés aux protéines.

Les dérivés actifs de l'oxygène peuvent causer des dégâts réversibles ou irréversibles aux peptides et protéines, en s'attaquant aux groupements des chaînes latérales (Fig. 1.3.10) ou aux carbones α de la chaîne protéique (Fig. 1.3.11).

Ces réactions d'oxydation peuvent être catalysées par les métaux selon divers mécanismes de type Fenton. L'implication de H_2O_2 dans ces mécanismes a été prouvée par inhibition à l'aide de la catalase (§ 1.4.2.2.) [Dean R.T. *et al.*, 1997].

Mais elles peuvent aussi provenir de radicaux "endogènes", c'est-à-dire produits par la protéine subissant l'oxydation. En effet, beaucoup d'enzymes possèdent une espèce radicalaire dans leur forme active, basée par exemple sur une tyrosine, un tryptophane, une glycine ou un

thiol. D'autres enzymes, encore, peuvent générer des espèces radicalaires au cours de leur interaction avec le substrat, comme par exemple la cytochrome P450 (§ 1.2.2.3.).

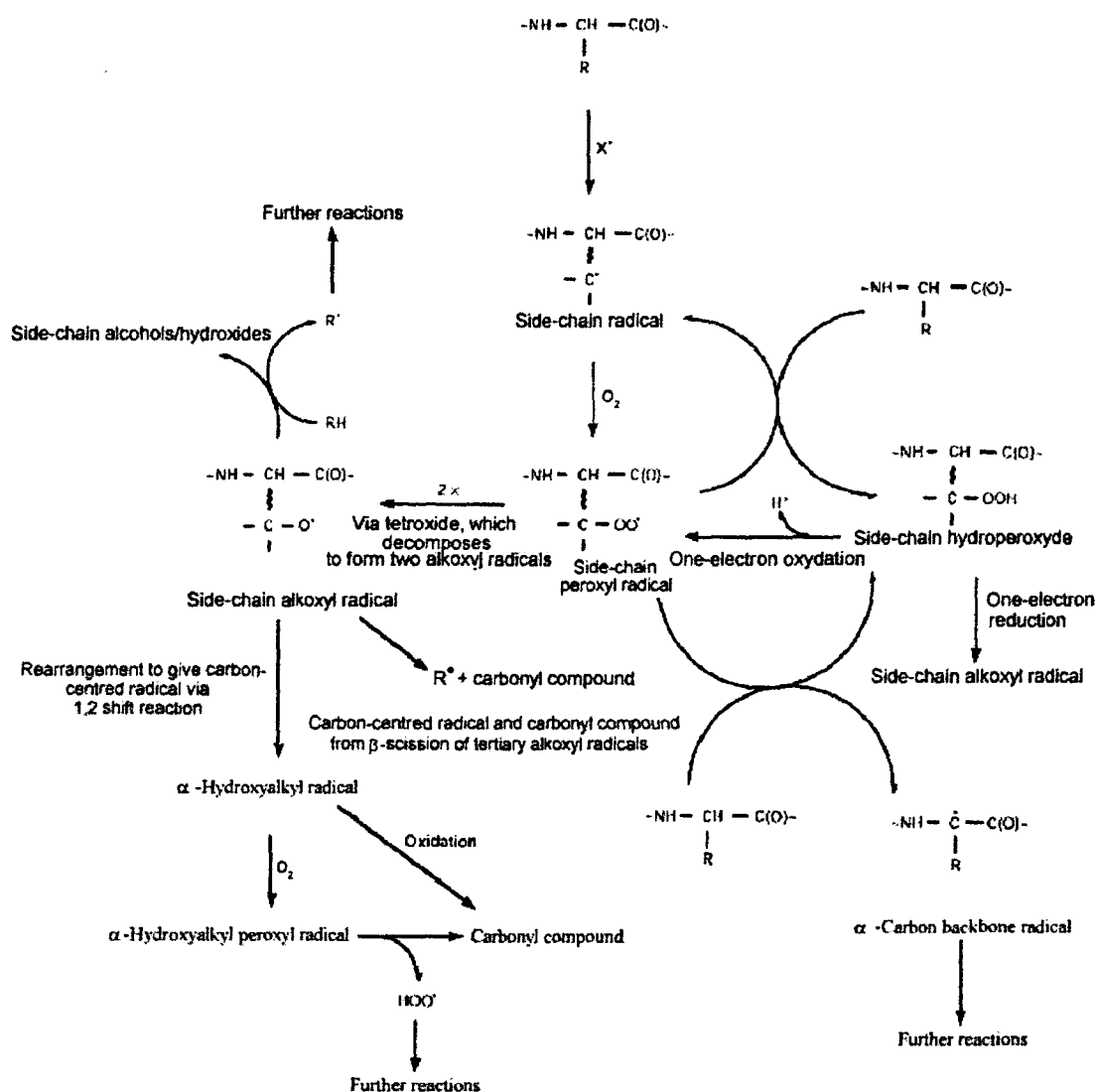


Fig. 1.3.10 : Principales réactions d'oxydation des protéines, par action sur les chaînes latérales.
D'après Dean R.T. *et al.*, 1997.

Les altérations réversibles impliquent essentiellement les groupements soufrés. Ainsi, les fonctions thiols peuvent être oxydées en pont disulfure, puis à nouveau réduites par le glutathion ou la cystéine. De même, les méthionines peuvent être oxydées en méthionine sulfoxyde (Fig. 1.3.12) et réduites par la suite par action de la méthionine sulfoxyde réductase [Dean R.T. *et al.*, 1997].

Il faut toutefois noter que l'oxydation de la méthionine sulfoxyde en méthionine sulfone (Fig. 1.3.12) est, quant à elle, une réaction irréversible [Dean R.T. *et al.*, 1997] pouvant conduire à la perte d'activité de la protéine [Sies. H, 1986]. De même, la cystéine peut

conduire à la formation de dérivés sulféniques, sulfiniques et sulfoniques ne pouvant être réduits (Fig. 1.3.13).

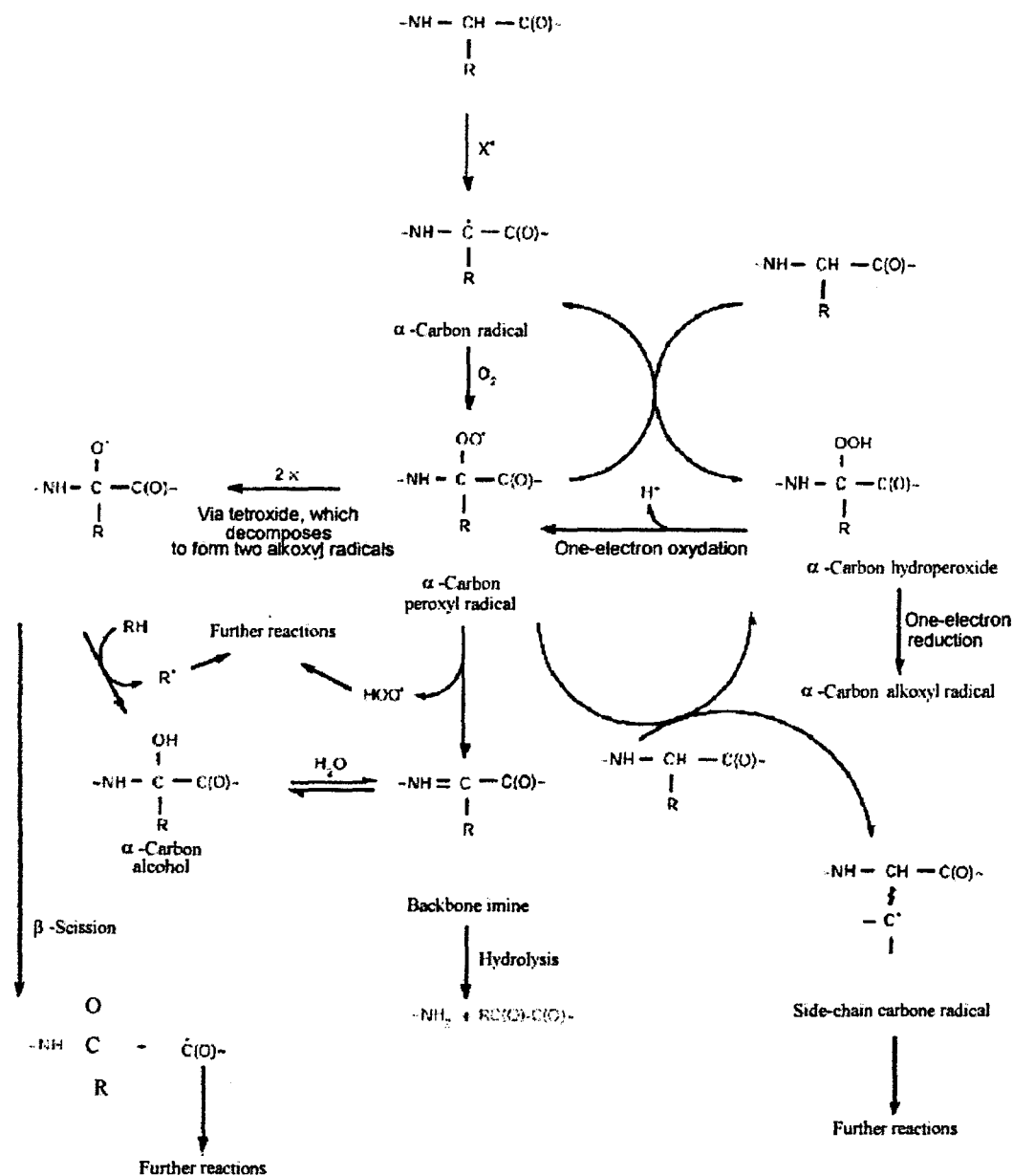
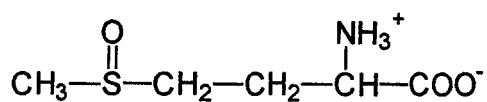
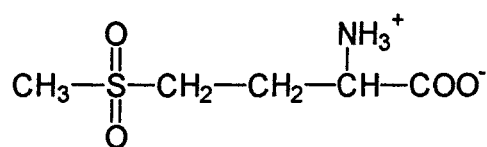


Fig. 1.3.11 : Principales réactions d'oxydation des protéines, par action sur les carbones α de la chaîne protéique.

D'après Dean R.T. *et al.*, 1997.



Méthionine sulfoxyde



Méthionine sulfone

Fig. 1.3.12. : Produits d'oxydation de la méthionine.

De nombreuses réactions d'oxydation faisant intervenir, notamment, le radical hydroxyle, peuvent conduire à des modifications irréversibles des acides aminés. Les produits formés sont très nombreux, et regroupent, entre autres, la dityrosine (Fig. 2.1.2), des hydroperoxydes et hydroxydes aromatiques (dérivés de la phénylalanine, de la tyrosine ou encore du tryptophane, Tableau 1.3.1).

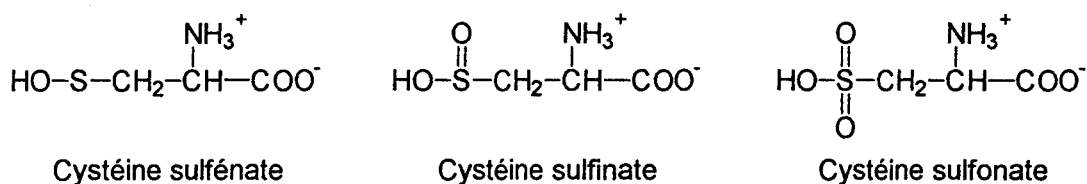


Fig. 1.3.13 : Produits d'oxydation de la cystéine.

Réactions oxydatives	Produits formés
Tyr + HO•	Dopa, dityrosine
Tyr + HOCl	3-Chlorotyrosine
Phe + HO•	o- ou m-tyrosine
Trp + HO•	5-hydroxytryptophane, 7-hydroxytryptophane, kynurénine
His + HO•	2-Oxohistidine
Glu + HO•	Hydroperoxyde de l'acide glutamique
Leu + HO•	Leucine hydroperoxyde et hydroxyde

Tableau 1.3.1 : Quelques réactions d'oxydation des acides aminés.
D'après Dean R.T. *et al.*, 1997.

Il va sans dire que ces diverses réactions d'oxydation s'accompagnent souvent de la perte d'activité de la protéine concernée, voire même de la fragmentation de celle-ci. Ainsi, l'oxydation de la proline [Sies H., 1986] (Fig. 1.3.14) ou de la glycine [Dean R.T. *et al.*, 1997], peut entraîner la formation d'un nouveau résidu N-terminal.

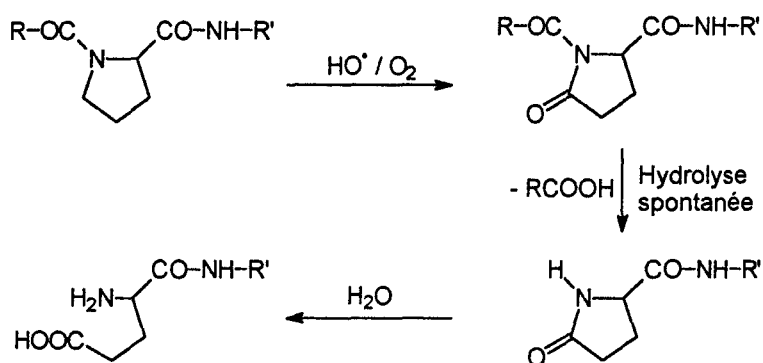


Fig. 1.3.14 : Mécanisme de destruction de la proline par les dérivés actifs de l'oxygène.
D'après Sies H., 1986.

Un système cellulaire de dégradation et de remplacement des protéines oxydées permet de faire face, dans des conditions physiologiques normales, aux dangers potentiels engendrés par toutes les modifications que nous venons de voir (Fig. 1.3.15). Les sites protéolytiques mis en jeu au cours de ce processus de régénération des protéines regroupent les mitochondries, les lysosomes et surtout les protéasomes, complexes formés de différentes protéases [Dean R.T. *et al.*, 1997].

En effet, il est reconnu [Dean R.T. *et al.*, 1997] qu'une oxydation limitée provoque, entre autres, l'apparition de fonctions hydrophiles (Tableau 1.3.1) augmentant l'hydrophilie globale de la protéine. Cependant, une oxydation plus poussée peut entraîner une dénaturation partielle de la macromolécule aboutissant à l'exposition de parties hydrophobes précédemment recluses au centre de la protéine. L'augmentation de la lipophilie, qui résulte donc d'une oxydation importante, fait des protéines concernées de meilleurs substrats pour les protéases.

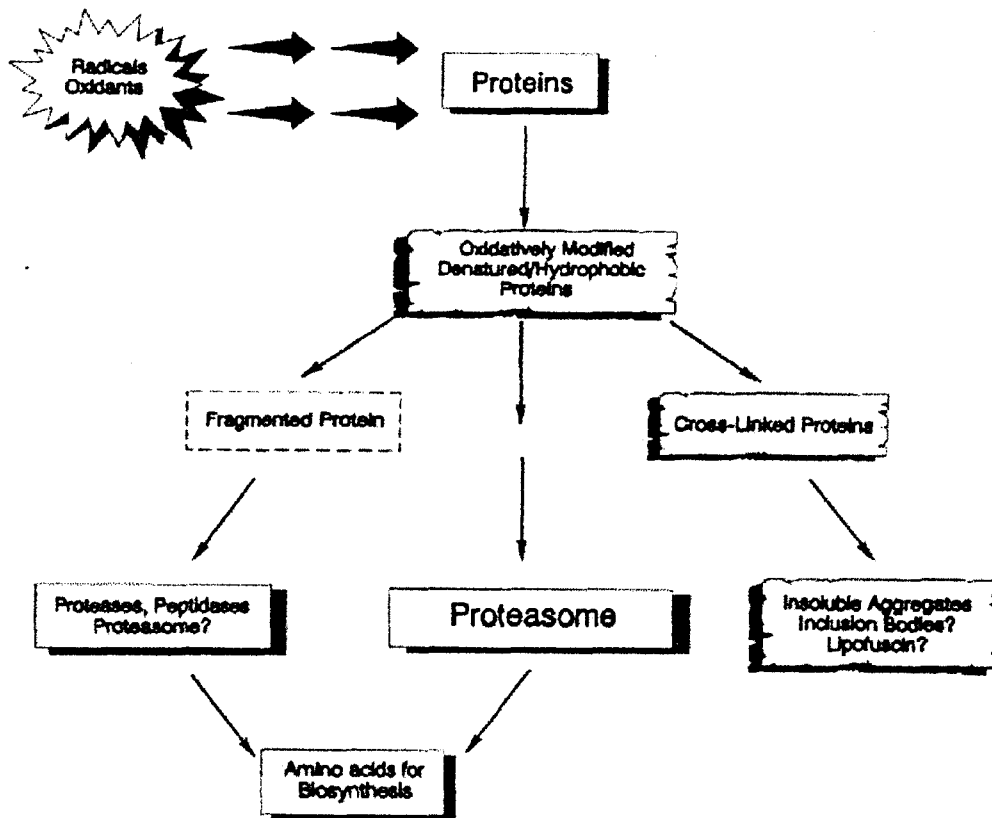


Fig. 1.3.15 : Mécanismes de dégradation des protéines oxydées.
D'après Davies K.J.A., 1995.

1.3.5. Dégradation des sucres.

Nous avons déjà envisagé le cas du désoxyribose (§ 1.3.3.). On peut noter aussi une dépolymérisation des polysaccharides et une oxydation des glycoprotéines [Sies H., 1986].

1.3.6. Dégâts entraînés par $\text{NO}^\bullet$ et ses dérivés.

Comme nous l'avons vu, $\text{NO}^\bullet$ est peut réactif par lui-même. Cependant, une fois activé par l'oxygène ou ses dérivés, il peut conduire à la formation de composés beaucoup plus dangereux [Wink D.A. and Mitchell J.B., 1998].

Ainsi, N_2O_3 engendrera des nitrosamines au pouvoir cancérogène, et des nitrosothiols. La formation de ces derniers au sein des protéines peut inhiber l'activité de la macromolécule ou encore moduler un signal de transduction. On parle de stress nitrosatif.

Le peroxynitrite, sous forme acide ou basique, avec ou sans action du CO_2 , sera à l'origine d'un stress oxydatif comme nous l'avons vu au paragraphe 1.1.6.3. (Fig. 1.3.16).

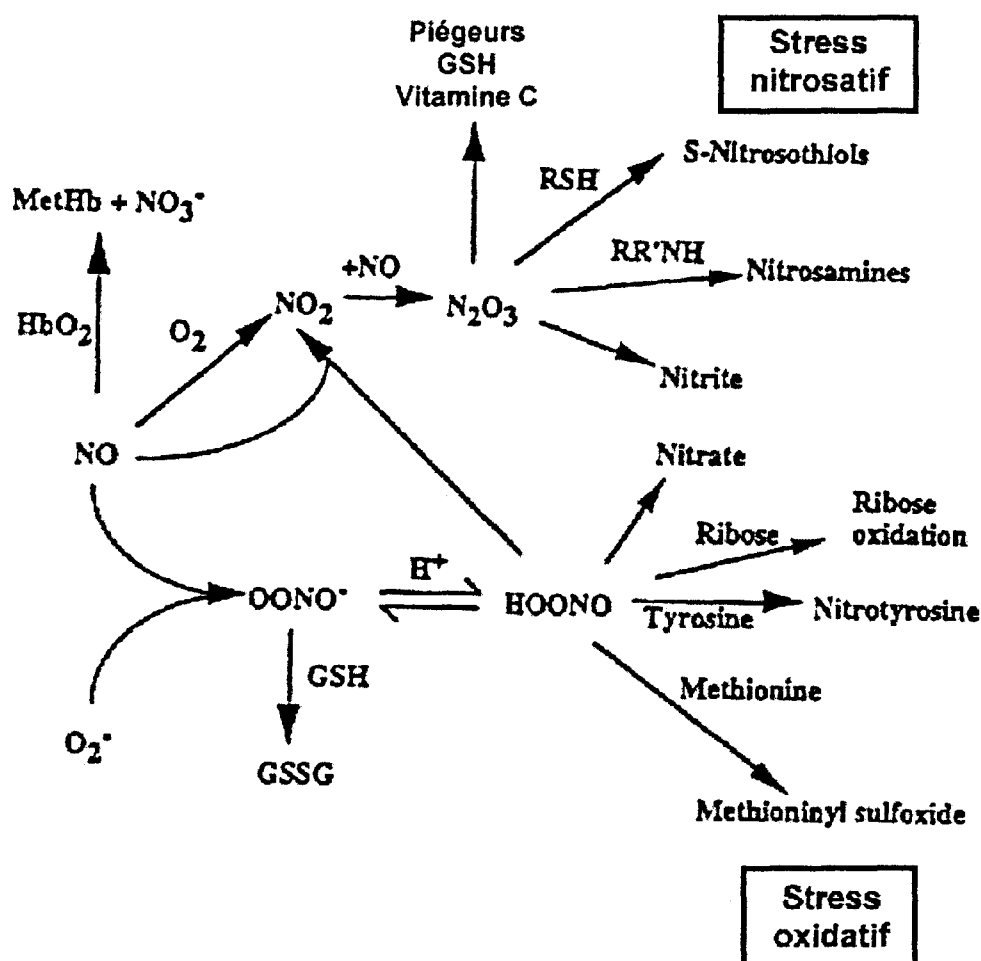


Fig. 1.3.16 : Stress oxydatif et nitrosatif engendrés par $\text{NO}^\bullet$ et ses dérivés.

1.3.7. Systèmes de réparation.

Comme nous venons de le voir, il existe pour les lipides (§ 1.3.2.), les acides nucléiques (§ 1.3.3.) et les protéines (§ 1.3.4.) des systèmes de réparation des dégâts engendrés par les réactions d'oxydation (Fig. 1.3.17).

Cependant, comme nous l'avions mentionné au début de ce chapitre (§ 1.3.1.), ces mécanismes de défense peuvent être débordés au cours de processus oxydatifs d'origine pathologique (§ 1.5.). Il serait alors nécessaire qu'un apport externe de systèmes antioxydants puisse aider la cellule à se défendre (§ 1.6.).

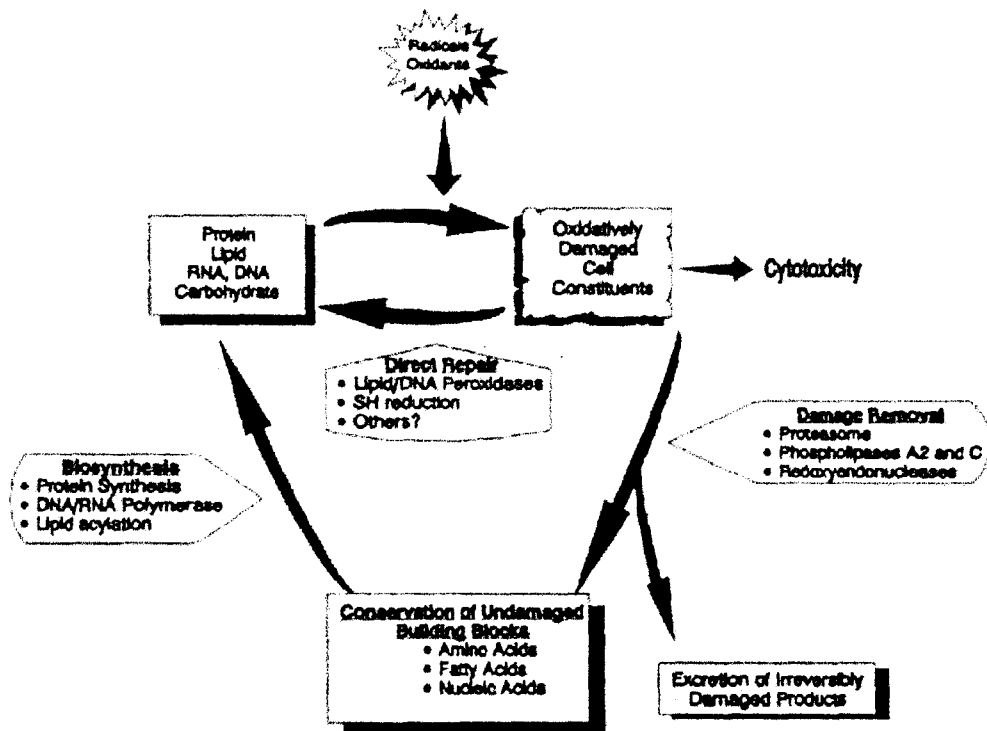


Fig. 1.3.17 : Systèmes de réparation des dégâts oxydatifs.
D'après Davies K.J.A., 1995.

1.4. Les défenses cellulaires contre le stress oxydatif.

Les défenses de la cellule interviennent à plusieurs niveaux. Elles peuvent agir en prévention de la formation des espèces dangereusement réactives, au niveau de leur interception ou enfin en réparation des dégâts causés par les composés ayant échappé aux défenses qui viennent d'être citées [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991].

1.4.1. La complexation des métaux.

Comme nous l'avons vu, le dérivé actif de l'oxygène le plus toxique pour la cellule est sans conteste le radical hydroxyle $\text{HO}^\bullet$ (§ 1.3.1.). La meilleure façon pour l'organisme de prévenir la formation de cette molécule est encore d'empêcher les réactions qui en sont à l'origine : réaction de Fenton et mécanisme d'Haber-Weiss. Ceci est réalisé en complexant les métaux, notamment le fer, afin d'interdire leur rôle de catalyseur [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1986a].

1.4.1.1. La transferrine.

Cette protéine est capable de lier deux ions fer par molécule avec une constante d'affinité très élevée, de l'ordre de 10^{20} [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1986a]. Il existe une concentration importante de transferrine dans le sang de sorte que le taux de saturation n'est jamais que de 20 à 30%. Ceci a pour effet de garder un taux de fer libre presque nul.

Le fer lié à cette protéine est incapable de catalyser la réaction de Fenton. Cependant, si le pH descend en dessous de 6, le fer peut alors être libéré et conduire à la formation du radical hydroxyle, comme c'est le cas dans les articulations d'un sujet atteint de polyarthrite rhumatoïde ou dans les tissus ischémiés [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1989; Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1986a].

1.4.1.2. La lactoferrine.

Il existe une hypothèse suggérant que cette protéine est libérée par les cellules phagocytaires afin de « nettoyer » le fer libéré de la transferrine pour des pH inférieurs à 6. En effet, il a été constaté que la lactoferrine est capable de complexer le fer jusqu'à un pH de 4 [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1989].

1.4.1.3. La ferritine, l'hémosidérine et la céruloplasmine.

La ferritine est une enzyme capable de stocker le fer. Sa synthèse est contrôlée par une augmentation de la concentration intracellulaire du fer non lié à une protéine. Celle-ci peut être dégradée dans les lysosomes pour donner un produit insoluble : l'hémosidérine. Bien que le fer puisse être libéré de la ferritine par des agents réducteurs, comme la cystéine ou l'anion

superoxyde, ce phénomène se produit plus difficilement avec l'hémosidérine. De fait, la transformation de la ferritine en hémosidérine pourrait être considérée comme un mécanisme de protection [Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1986b].

Un système de stockage similaire existe pour le cuivre dans le plasma, sous la forme d'une enzyme, la céruloplasmine [Davies K.J.A., 1995]. Cette enzyme pourrait agir, d'une part en inhibant la réaction de Fenton qui serait susceptible d'avoir lieu en présence de cuivre, et d'autre part en oxydant le Fer (II) en Fer (III) [Sahnoun Z. *et al.*, 1997].

1.4.2. Les enzymes.

Les cellules possèdent aussi des systèmes enzymatiques chargés de détoxifier la cellule des dérivés actifs de l'oxygène. Ces enzymes sont largement distribuées dans la nature, soulignant ainsi leur importance [Sies H., 1986].

Une détoxification par un système enzymatique n'est possible que si les vitesses des réactions spontanées de l'espèce à éliminer sont faibles, de sorte que la réaction de celle-ci avec l'enzyme est prépondérante, donc efficace [Sahnoun Z. *et al.*, 1997]. Ainsi, il n'existe aucun système enzymatique capable de contrôler les concentrations de $\text{HO}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, $\text{HOO}^\bullet$, etc... L'élimination des espèces dangereuses par la catalyse enzymatique concerne donc essentiellement l'anion superoxyde et les peroxydes [Michiels C., 1994] (Fig. 1.4.1).

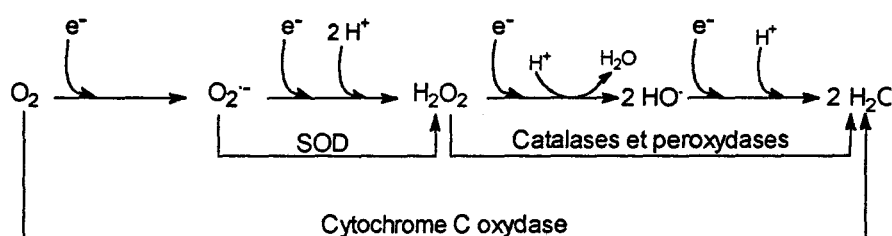


Fig. 1.4.1 : Défenses enzymatiques.

D'après Dodet B., 1991.

1.4.2.1. Les superoxydes dismutases (SOD).

Découverte en 1969 par Mc Cord et Fridovitch [McCord J.M. and Fridovitch I., 1969; Fridovitch I.J., 1989], la superoxyde dismutase est le point de départ de toutes les études concernant les dérivés actifs de l'oxygène et leur influence physiologique.

Chez l'homme, cette enzyme existe sous deux formes [Jadot G., 1989] : l'une comprenant du cuivre et du zinc et présente dans le cytosol, l'autre comprenant du manganèse et présente dans les mitochondries (Fig. 1.4.2). La $\text{SOD}_{\text{Cu,Zn}}$ du cytosol est caractéristique des eucaryotes tandis que la SOD_{Mn} est, quant à elle, caractéristique des procaryotes. La présence de la SOD_{Mn} dans les mitochondries fournit un des arguments à la théorie de l'évolution

cellulaire qui postule que la mitochondrie est l'ancêtre d'un procaryote adopté par les cellules eucaryotes (un endosymbionte) pour sa faculté d'utiliser l'oxygène [De Duve C., 1997].

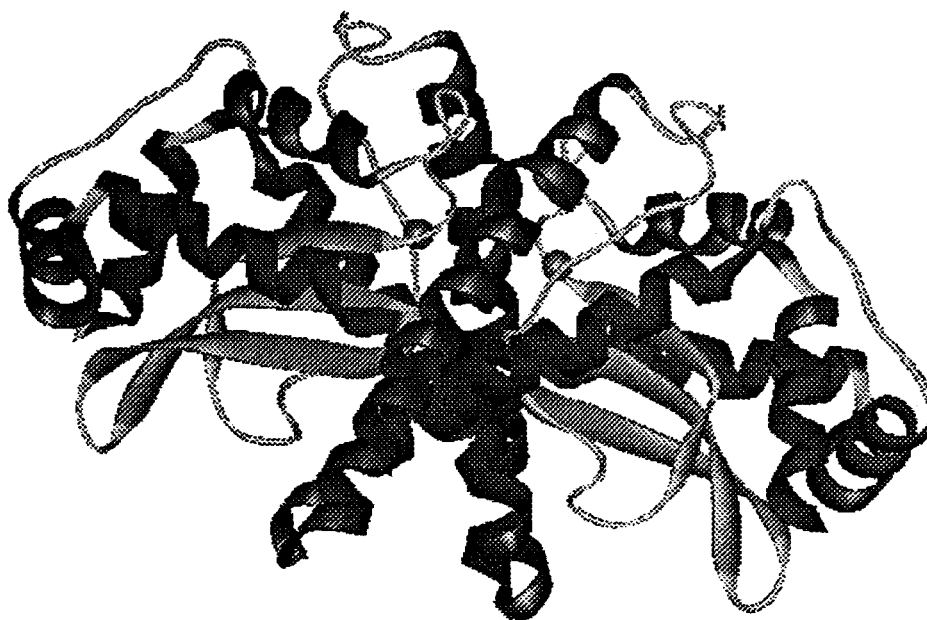


Fig. 1.4.2 : Structure de la SOD à Mn des mitochondries humaines.
Couleur en fonction de la structure secondaire. Mn²⁺ en violet. Hsieh Y. *et al.*, 1998.
Structure obtenue par l'intermédiaire de la Brookhaven Protein Database. ID : 1QNM. (E.C. 1.15.1.1)



Fig. 1.4.3 : Structure de la catalase de foie de boeuf.
Couleur en fonction de la structure secondaire. Protoporphyrine en vert, Fe³⁺ en violet, et NADPH en rose.
Fita I. and Rossmann M.G., 1985.
Structure obtenue par l'intermédiaire de la Brookhaven Protein Database. ID : 7CAT. (E.C. 1.11.1.6)

La glutathion peroxydase contient un atome de sélénium, sous forme de sélénocystéine, dans le site actif de chacune de ses sous-unités (Fig. 1.4.7).

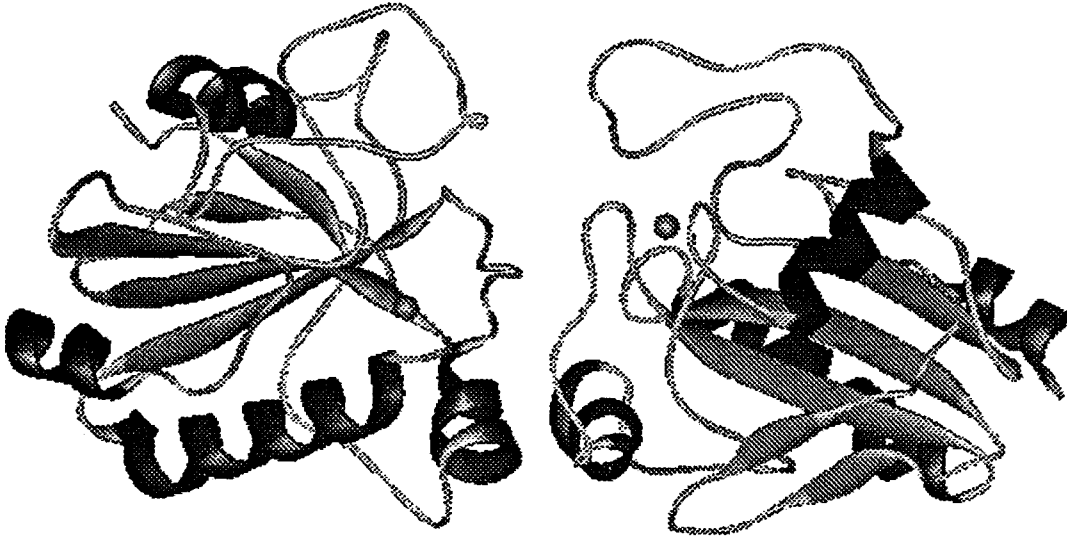


Fig. 1.4.7 : Structure de la Glutathion Peroxydase d'érythrocytes de boeuf.

Couleur en fonction de la structure secondaire. Se en orange. Epp O. *et al.*, 1983.

Structure obtenue par l'intermédiaire de la Brookhaven Protein Database. ID : 1GP1. (E.C.1.11.1.9)

Le mécanisme d'action de cette enzyme est donné dans la figure 1.4.8 [Fontecave M. and Pierre, J.L., 1991; Sies H., 1993].

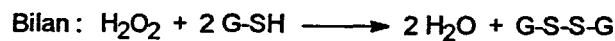
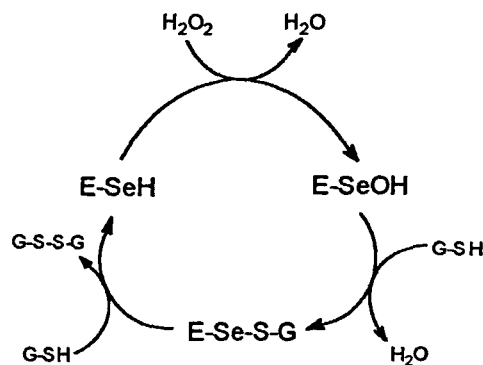


Fig. 1.4.8 : Mécanisme d'action de la glutathion peroxydase.

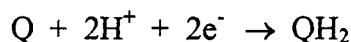
D'après Fontecave M. and Pierre, J.L., 1991.

Le glutathion oxydé GSSG est alors réduit grâce à la glutathion réductase, enzyme couplant cette réduction avec l'oxydation du NADPH en NADP^+ .

On pense que la glutathion peroxydase est principalement responsable de l'élimination des petites quantités d'eau oxygénée générée par le métabolisme normal dans le cytoplasme, tandis que la catalase s'occupe des grandes quantités produites dans les peroxysomes [Davies K.J.A., 1995].

1.4.2.4. La DT diaphorase.

Encore appelée quinone réductase, la DT diaphorase est capable de catalyser la réduction à deux électrons d'une déshydroquinone (Q) en dihydroquinone (QH₂), selon la réaction suivante [Davies K.J.A., 1995] :



En catalysant une réduction directe à deux électrons, la DT diaphorase évite la formation de radicaux semi-quinone de type Q^{•-} ou QH[•].

1.4.3. L'interception des espèces actives.

C'est le rôle des antioxydants qui ont pour propriété d'inhiber les réactions en chaîne. Ce sont en fait des capteurs de radicaux qui réagissent rapidement avec ceux-ci en donnant d'autres espèces suffisamment stables pour ne propager aucune réaction en chaîne.

1.4.3.1. La vitamine E.

Il s'agit de l' α -tocophérol (Fig. 1.4.9). Grâce à sa forte liposolubilité, elle est capable de limiter la peroxydation des acides gras insaturés. Le radical formé est stabilisé par délocalisation (Fig. 1.4.10).

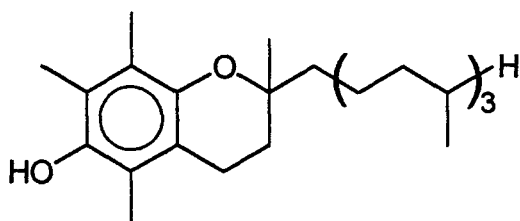


Fig. 1.4.9 : Vitamine E (α -tocophérol).

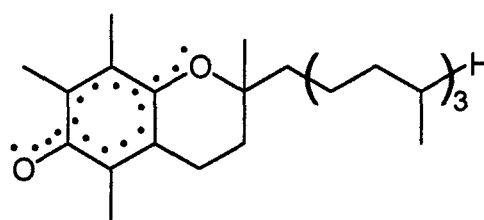


Fig. 1.4.10 : Stabilisation du radical dérivé de la Vitamine E.

C'est l'antioxydant le plus important pour les phases lipidiques [Davies K.J.A., 1995].

1.4.3.2. La vitamine C.

C'est l'acide ascorbique (Fig.1.4.11), piègeur de radical extrêmement efficace. La vitamine C est capable d'exercer un effet antioxydant sur l'eau, car elle peut réagir directement sur l'anion superoxyde et l'oxygène singulet. Ici encore, le radical est stabilisé par résonance (Fig. 1.4.11). Il lui est aussi possible de régénérer la vitamine E (Fig 1.4.12) [Davies K.J.A., 1995].

La vitamine C est très hydrophile. Elle peut donc réagir dans les fluides ou à l'interface de la membrane cytoplasmique. C'est l'antioxydant le plus important en phase aqueuse [Davies K.J.A., 1995].

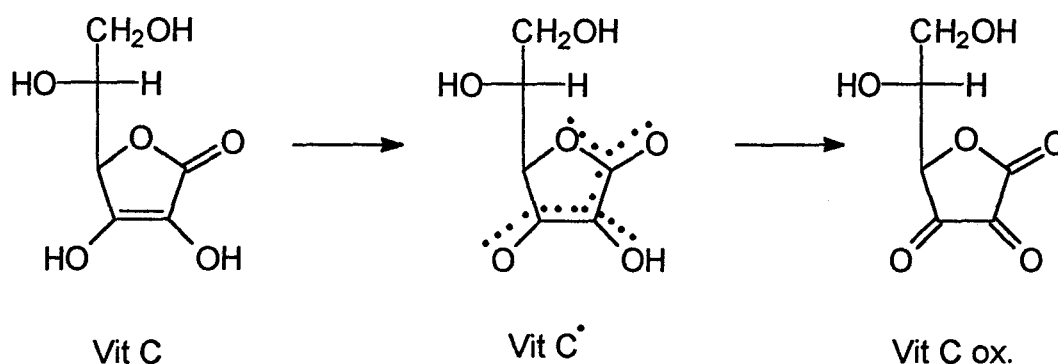


Fig. 1.4.11 : Vitamine C (Acide ascorbique).

La vitamine C fut isolée en 1925 grâce à ses propriétés culinaires. En effet, le noircissement que l'on peut rapidement constater sur les champignons, bananes et pommes de terre, pour ne citer qu'eux, est dû à une oxydation enzymatique des composés phénoliques des fruits et légumes. Cette oxydation conduit à la formation de polymères bruns ou gris. En s'intéressant au brunissement des végétaux, le biochimiste Albert Szent-György étudia ceux capables de résister à ce phénomène. Il remarqua tout d'abord que le jus de ces derniers ralentissait la coloration sombre des autres végétaux. En isolant le composé actif, il l'identifia comme étant un acide, qui sera plus tard nommé vitamine C.

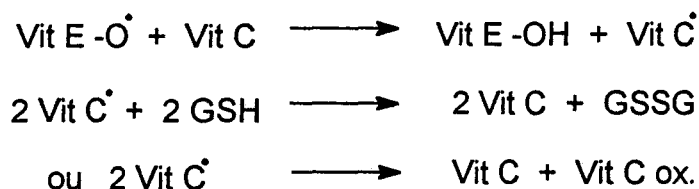
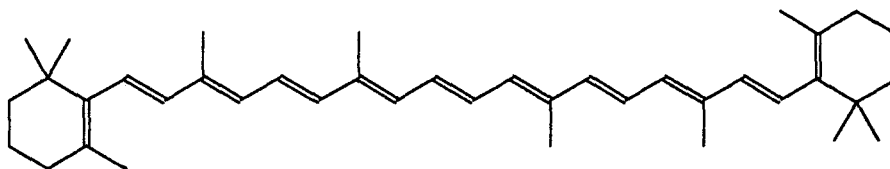


Fig. 1.4.12 : Régénération de la vitamine E par la Vitamine C.

1.4.3.3. Le β -carotène.

Il est liposoluble (Fig. 1.4.13), capable de piéger les radicaux oxygénés et d'inhiber la peroxydation lipidique. De plus, il désactive l'oxygène singulet et peut donc limiter les oxydations photochimiques [Krinsky N.I., 1993].

Fig. 1.4.13 : β -carotène

1.4.3.4. Le coenzyme Q.

Le coenzyme Q (Fig 1.4.14), ou ubiquinone (UQ), est actif sous sa forme réduite (UQH_2) comme inhibiteur de la peroxydation lipidique [Sahnoun Z. *et al.*, 1997]. Il agirait

indirectement en réduisant le radical α -tocophéroxy et en régénérant l' α -tocophérol, ou directement par piégeage des radicaux peroxy ou alkoxy.

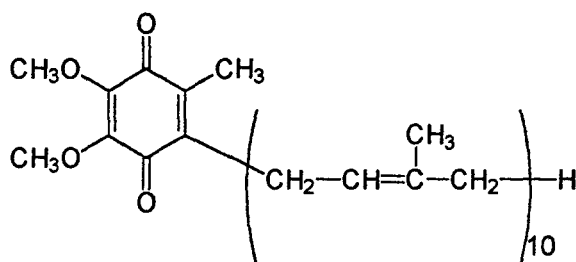


Fig. 1.4.14 : Ubiquinone₅₀ ou Coenzyme Q₁₀.

1.4.3.5. La bilirubine.

Il s'agit du produit final du métabolisme de l'hème. Ce composé est également capable d'inhiber la peroxydation lipidique [Sahnoun Z. *et al.*, 1997].

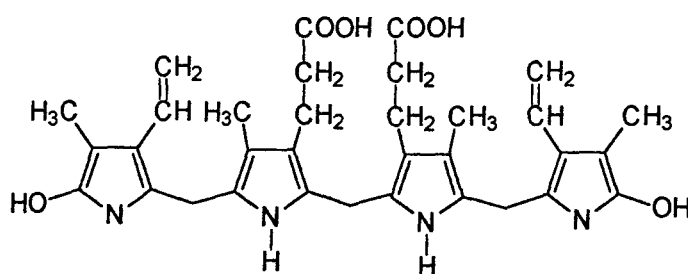


Fig. 1.4.15 : Bilirubine.

1.4.3.6. L'acide urique.

L'acide urique (Fig. 1.4.16) est le produit final du métabolisme des purines chez l'homme.

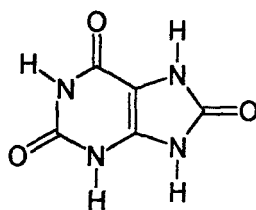


Fig. 1.4.16 : Acide urique.

Il peut agir comme un piègeur de radicaux classique, mais aussi en chélatant les métaux de transition [Davies K.J.A., 1995]. En isolant ces métaux, l'acide urique peut inhiber les mécanisme d'activation de l'oxygène par ceux-ci, sans être lui-même oxydé.

1.4.3.7. La mélatonine.

La mélatonine, à savoir la N-acétyl-5-méthoxytryptamine (Fig. 1.4.17), est une hormone synthétisée principalement par la glande pinéale de nombreux mammifères, dont l'homme. Sa production suit un rythme circadien, avec une synthèse maximum durant la journée. La mélatonine est utilisée dans le traitement de l'insomnie et des effets provoqués par

d'importants décalages horaires (Jet lag). Il a été suggéré de surcroît qu'elle pouvait avoir un effet anti-âge [Marshall K.-A. *et al.*, 1996; Reiter R.J. *et al.*, 1998].

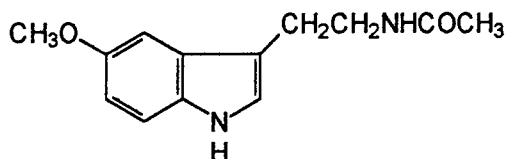


Fig. 1.4.17 : Structure de la mélatonine.

La mélatonine a démontré de nombreuses propriétés antioxydantes *in vivo*. Elle est capable, par exemple, de limiter les dégâts causés aux poumons de rats par l'administration de paraquat ou de supprimer l'apparition d'une cataracte chez des rats traités par des agents diminuant la concentration physiologique en glutathion [Marshall K.-A. *et al.*, 1996].

Cependant, et bien que les résultats publiés soient parfois fortement contradictoires à ce sujet [Marshall K.-A. *et al.*, 1996; Zang L.Y., 1998], il semble que la mélatonine n'exerce que peu d'activité antioxydante directe, c'est-à-dire en piégeant les espèces actives de l'oxygène. Ainsi, elle posséderait une faible activité vis à vis de HOCl et pas ou peu vis à vis de l'anion superoxyde [Marshall K.-A. *et al.*, Antunes F., 1999]. En outre, la mélatonine ne présente pas d'activité de piégeage des radicaux peroxydes [Antunes F., 1999] et son activité à l'encontre du radical hydroxyle est identique à celle d'autres composés aromatiques [Marshall K.-A. *et al.*]. Par contre, il semblerait qu'elle soit capable de piéger le peroxydinitrite [Gilad E. *et al.*, 1997].

Ces résultats semblent indiquer que la mélatonine exerce son activité antioxydante plutôt par un effet indirect (régulation des défenses antioxydantes endogènes) que par un effet direct (piégeage des espèces actives ou inhibition de leur formation) [Marshall K.-A. *et al.*, Reiter R.J. *et al.*, 1998]. Cependant, ces résultats sont encore sujet à discussion [Zang L.Y. *et al.*, 1998].

1.4.3.8. Antioxydants alimentaires.

Outre les vitamines C et E, les aliments peuvent apporter de nombreux antioxydants supplémentaires d'origine naturelle ou de synthèse [Davies K.J.A., 1995; Kochhar S.P. and Rossel J.B., 1990].

Parmi les antioxydants d'origine naturelle, on remarque notamment des dérivés de type polyphénols, comme les flavonoïdes (Quercétine, Kämpferol, etc...). Ceux-ci se trouvent en abondance dans les végétaux, les fruits et le vin, et ont démontré une forte activité en tant qu'inhibiteur de la peroxydation lipidique [Maxwell S.R.J., 1995].

Au nombre des antioxydants synthétiques, on retrouve notamment les BHA (HydroxyAnisole Butylé, E320) et BHT (HydroxyToluène Butylé, E321) ou encore le propyl-gallate (E310).

Mais ce ne sont là que quelques exemples parmi de très nombreux autres.

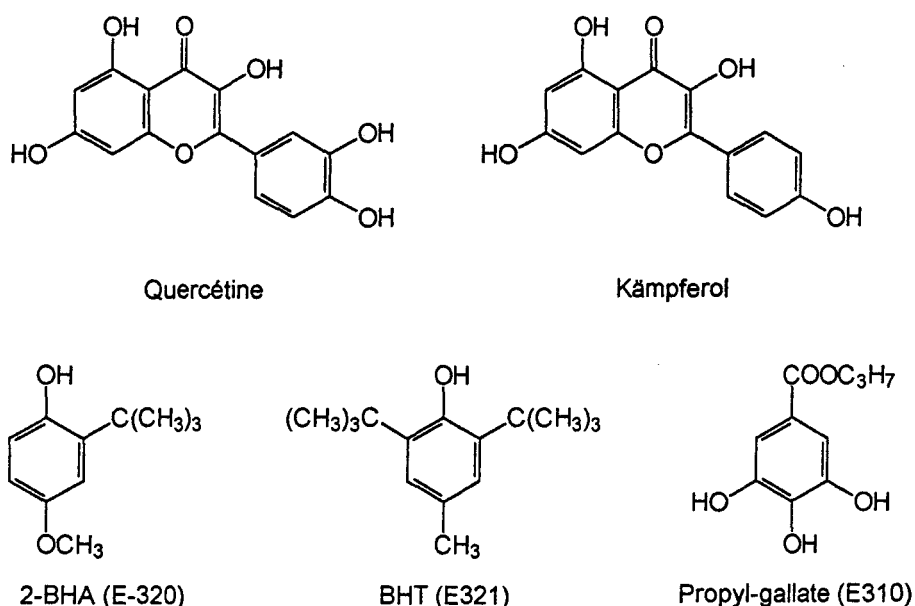


Fig. 1.4.18 : Quelques antioxydants d'origine alimentaire.

Tous ces composés, aux propriétés antioxydantes parfois très importantes, apporte un complément non négligeable au système de défense contre les radicaux [Davies K.J.A., 1995].

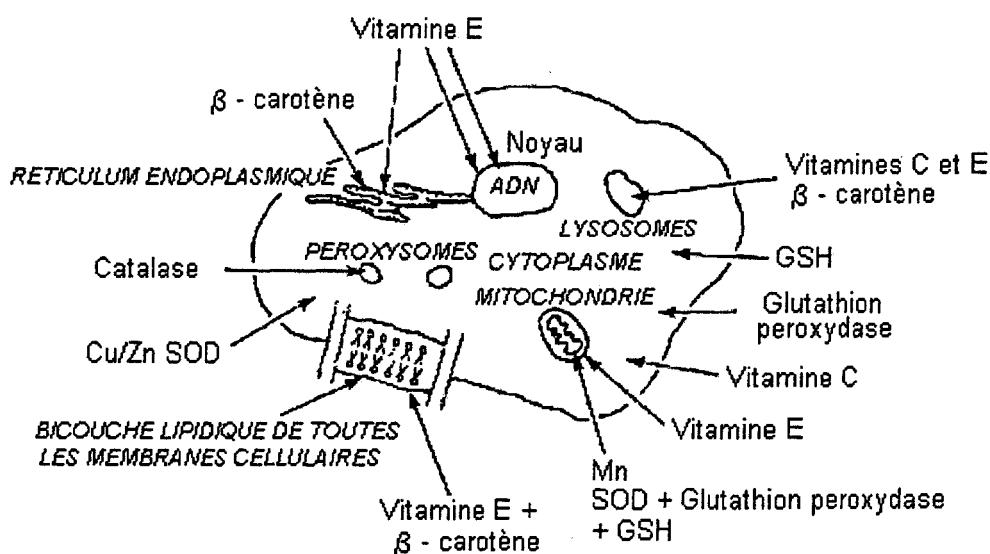


Fig. 1.4.19 : Récapitulatif des mécanismes de défense.

1.4.4. Pouvoir antioxydant de $\text{NO}^\bullet$.

Par bien des aspects, $\text{NO}^\bullet$ peut être considéré comme un antioxydant [Wink D.A. *et al.*, 1999] (Fig. 1.4.20).

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.1.6.1., $\text{NO}^\bullet$ est capable de réduire les ions ferryle, inhibant ainsi l'activité hautement oxydante de ces dérivés. Grâce à cette réaction, $\text{NO}^\bullet$ peut être considéré comme une espèce protégeant l'organisme de la toxicité de l'eau oxygénée (à l'origine des espèces ferryle, § 1.1.4.).

$\text{NO}^\bullet$ réagit très rapidement avec les radicaux peroxyde, ce qui entraînerait une terminaison de la peroxydation lipidique [Wink D.A. and Mitchell J.B., 1998].

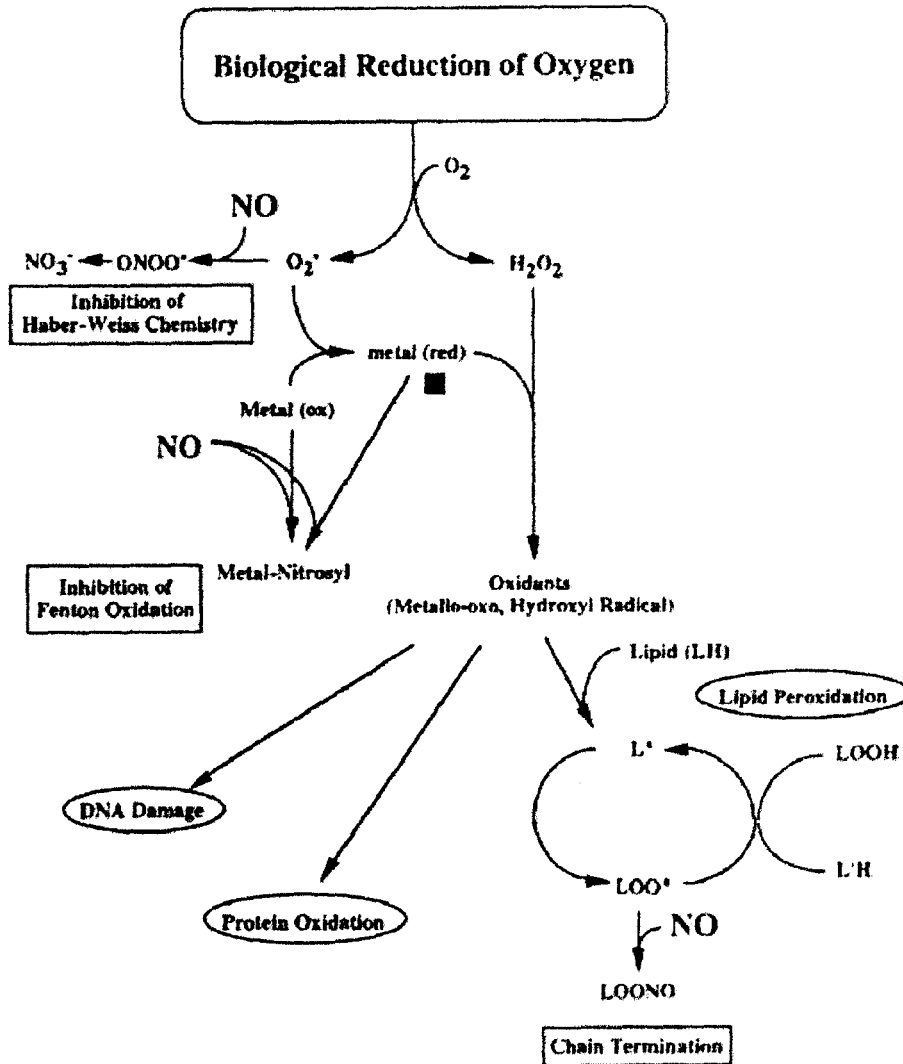


Fig. 1.4.20 :Protection contre le stress oxydatif par $\text{NO}^\bullet$.

D'après antioxydant Wink D.A. *et al.*, 1999.

1.5. Dérivés actifs de l'oxygène et pathologies humaines.

Comme nous le verrons dans ce chapitre, les dérivés actifs de l'oxygène sont plus ou moins impliqués dans de nombreuses pathologies humaines. Il ne faut pourtant pas en conclure qu'une thérapie antioxydante, à elle-seule, pourrait venir à bout de toutes ces maladies. En effet, bien qu'ils soient en partie responsables de l'aggravation, voire de l'initiation de certaines pathologies, les dérivés actifs de l'oxygène n'en sont pas le seul élément responsable. Il est en outre parfois difficile de savoir si le stress oxydatif mis en évidence lors du développement de certaines pathologies est une cause ou une conséquence de celles-ci.

Le tableau ci-après cite une partie des pathologies où se trouvent impliqués les dérivés actifs de l'oxygène. Cette liste n'est pas exhaustive.

• Arthrite rhumatoïde	• Surcharge en fer
• Ischémie-reperfusion (infarctus, transplantation d'organes)	• Toxicité médicamenteuse
• SIDA	• Maladies auto-immunes
• Athérosclérose	• Emphysème pulmonaire
• Cardiomyopathie alcoolique	• Maladies neurodégénératives
• Anémies diverses, malaria	• Encéphalomyélite
	• Cataracte, rétinopathies

Tableau 1.4.1 : Pathologies humaines où un stress oxydatif a pu être impliqué.

Adapté de Maxwell S.R.J., 1995.

Nous allons ici nous intéresser à certaines d'entre elles que nous prendrons en exemple : ischémie reperfusion, SIDA , athérosclérose et maladies neurodégénératives.

1.5.1. L'ischémie-reperfusion.

Lorsque la circulation sanguine se voit arrêtée dans une région de l'organisme, notamment au niveau du coeur lors de l'infarctus du myocarde, les fonctions cellulaires privées d'oxygène sont fortement altérées.

La première réponse à l'arrêt de la circulation consiste en une augmentation de la dégradation du glycogène suivie d'une glycolyse anaérobie, le tout menant à une production de lactate et à une acidose. La concentration d'ATP commence à chuter tandis que celle d'AMP augmente. La dégradation de ce dernier conduit finalement à la production d'hypoxanthine, via l'adénosine et l'inosine (Fig. 1.5.1) l'oxygène [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989].

Lorsque l'ischémie est relativement courte, les dommages causés aux tissus restent réversibles et ces derniers peuvent être sauvés par une reperfusion amenant de nouveau l'oxygène et les nutriments. La reperfusion est alors une procédure bénéfique. Cependant, lorsque l'ischémie perdure, la reperfusion peut, au contraire, aboutir à des dégâts supplémentaires causés par les radicaux libres de l'oxygène [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989; Maxwell S.R.J., 1995; Davies K.J.A., 1995].

En effet, une baisse suffisamment longue de la concentration en ATP va provoquer une profonde modification de la perméabilité de la membrane aux différents ions (par l'intermédiaire des pompes ATP-dépendantes). Il en résultera une augmentation des concentrations intracellulaires de Na^+ et de Ca^{2+} et une diminution de celle de K^+ . L'augmentation du calcium présent dans la cellule va entraîner l'activation des protéases. En détruisant les protéines ces dernières vont, entre autres, libérer des métaux et transformer la xanthine deshydrogénase en xanthine oxydase (Fig. 1.5.1) [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989; Maxwell S.R.J., 1995].

Lors de la réoxygénation, la xanthine oxydase formée au cours de l'ischémie va catalyser l'oxydation de l'hypoxanthine, elle-aussi formée au cours de l'ischémie, en xanthine. Ceci se fera sous l'action de l'oxygène nouvellement apporté et aboutira à la synthèse d'anion superoxyde. Celui-ci pourra réagir avec les métaux relâchés sous l'action des protéases pendant l'ischémie, en les réduisant. On assistera alors à la formation de peroxyde d'hydrogène et de radical hydroxyle. Les dégâts pourront alors se multiplier: dysfonctionnement de la contraction, arythmie, dégradation endothéliale [Maxwell S.R.J., 1995].

Indépendamment de ces phénomènes, il faut remarquer que la diminution de la concentration en oxygène va aussi produire, au niveau de l'ubiquinone, une fuite d'électrons aboutissant à la libération d'anion superoxyde.

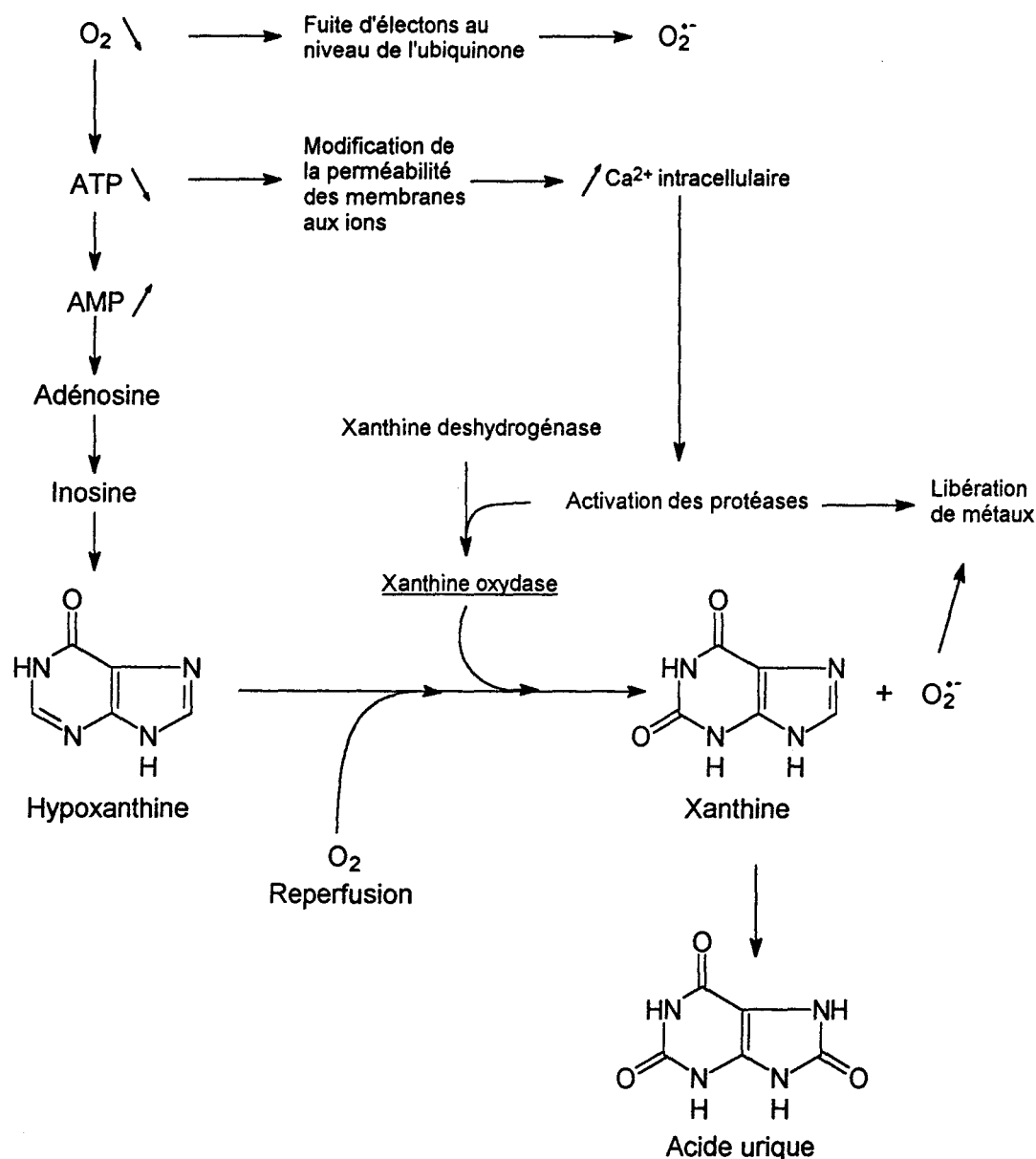


Fig. 1.5.1 : L'ischémie reperfusion.

Les dégâts causés par le processus d'ischémie reperfusion peuvent être limités par des traitements préalables à base d'inhibiteurs de la xanthine oxydase, comme l'allopurinol [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989; Maxwell S.R.J., 1995]. Il est encore possible de diminuer les effets de l'ischémie reperfusion à l'aide de molécules capables de complexer les métaux, comme la desferrioxamine (§ 1.6.2.4.), limitant ainsi la réaction de Fenton et le mécanisme d'Haber-Weiss. On peut encore utiliser des composés ayant la particularité de piéger les radicaux libres et notamment le radical hydroxyle, comme le tocophérol [Maxwell S.R.J., 1995]. Enfin, il reste la possibilité d'employer la catalase ou des dérivés à activité glutathion peroxydase comme l'ebesen, dans le but de limiter la propagation du peroxyde d'hydrogène, donc du stress oxydatif.

1.5.2. L'athérosclérose.

Le premier signe visible de la lésion athéroscléreuse consiste en l'apparition de stries lipidiques, réunions de cellules spumeuses. Ces dernières sont en fait des macrophages dont le cytoplasme est envahi de vacuoles lipidiques renfermant des esters de cholestérol. Ces macrophages que l'on trouve dans l'intima des artères, sous l'endothélium, proviennent des monocytes sanguins, tandis que les esters de cholestérol proviennent des lipoprotéines [Fruchart J.C., 1992].

On considère généralement que le processus d'athérosclérose commence par l'apparition de premiers dégâts causés par divers mécanismes, peut-être hémodynamiques. Les monocytes présents dans la circulation viennent alors se fixer à l'endothélium vasculaire et se transformer en macrophages dans la paroi du vaisseau, après y avoir pénétré sous l'action d'agents chimiotactiques (prostaglandines) [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989]. Les sécrétions de $O_2^{\bullet-}$, d' H_2O_2 et d'enzymes hydrolytiques provenant des monocytes et macrophages activés vont, à leur tour, provoquer des dégâts dans leur environnement immédiat, tandis que les différents facteurs rejetés dans le milieu par les macrophages entraîneront la prolifération des cellules musculaires lisses.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont capables de traverser la couche de cellules endothéliales de l'artère. Sous cette forme native, elles sont peu absorbées par les macrophages résidents, et la plupart d'entre elles retourneront dans la circulation. Cependant, lors d'un processus athéroscléreux et au contact des macrophages et des cellules musculaires lisses, les LDL sont progressivement oxydées. Les produits d'oxydation ainsi formés (notamment le 4,5-dihydroxydecénal et le 4-hydroxynonénal) vont modifier les propriétés de surface des lipoprotéines, qui seront alors reconnues par des récepteurs appartenant aux macrophages que l'on appelle "récepteurs scavengers" ou récepteurs acétyl-LDL [Haberland M.E. and Fogelman A.M., 1987]. Les LDL fixées à ces derniers sont internalisées avec une grande efficacité et sans rétrocontrôle. Il en résulte une forte accumulation de LDL oxydées dans les macrophages qui finissent par se transformer en cellules spumeuses produisant la plaque d'athérome [Haberland M.E. and Fogelman A.M., 1987; Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989; Maxwell S.R.J., 1995] (Fig. 1.5.2).

De plus les LDL oxydées vont provoquer, dans les cellules de l'endothélium, la synthèse de facteurs chimiotactiques attirant les monocytes circulants et amplifiant encore le phénomène [Maxwell S.R.J., 1995].

Différentes études ont montré les effets bénéfiques, sur le retardement de l'apparition et de la prolifération de l'athérome, de l'emploi d'antioxydants tels que des flavonoïdes [Maxwell S.R.J., 1995]. Le probucol, utilisé en premier lieu pour diminuer le taux sanguin de cholestérol, a montré des effets antioxydants capables d'intensifier ses effets bénéfiques contre

l'athérosclérose [Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1989; Maxwell S.R.J., 1995; Partharathy S. *et al.*, 1986].

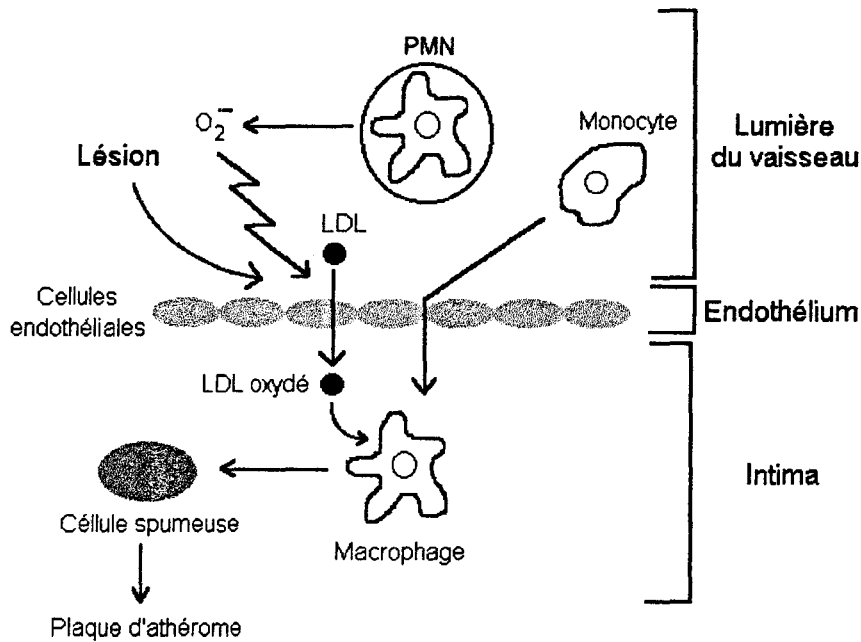


Fig.1.5.2 : Formation de la plaque d'athérome.

Rque: l'étude de l'inhibition de la peroxydation lipidique par les 4-mercapto-imidazoles synthétisés peut être trouvée au paragraphe 3.8.

1.5.3. SIDA et stress oxydatif.

De nombreuses études suggèrent que les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et ceux qui développent la maladie (SIDA) sont soumis à un stress oxydatif chronique [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995].

1.5.3.1. Stress oxydatif chez les patients infectés par le VIH.

L'une des premières preuves de l'existence d'un stress oxydatif chez le patient infecté par le VIH est la présence de faibles taux de glutathion GSH dans le sang et différents tissus [Maxwell S.R.J., 1995]. Il a été montré que le taux de glutathion total diminue rapidement suite à l'infection et continue ensuite à décroître lorsque la maladie progresse. De même, le taux plasmatique de cystéine, acide aminé rentrant dans la séquence du glutathion, est plus faible chez ces patients, suggérant une limitation de la synthèse du glutathion [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995]. Une étude a par ailleurs montré qu'un faible taux de glutathion était en général associé avec une faible probabilité de survie [Herzenberg L.A. *et al.*, 1997].

D'autres antioxydants importants, comme l'acide ascorbique, le tocophérol, les caroténoïdes et le sélénium sont présents à des concentrations plus faibles chez les patients infectés par le VIH, que chez des personnes saines. Ces faibles taux pourraient provenir d'une mauvaise alimentation ou d'une mauvaise absorption des nutriments [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995].

Enfin, de manière générale, la mesure des concentrations sanguines des produits secondaires du stress oxydatif, comme le malondialdéhyde et les hydroperoxydes, ainsi que la plus grande consommation globale d'oxygène des patients séropositifs indiquent que ces derniers sont soumis à un stress oxydatif prononcé [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995].

1.5.3.2. Stress oxydatif et développement du SIDA.

Il est supposé que le stress oxydatif présent chez les patients séropositifs contribuerait à augmenter la réplication virale et à intensifier l'infection [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995].

En effet, lorsque l'ADN provenant du provirus a été intégré au génome des cellules hôtes, il s'établit un temps de latence au cours duquel la synthèse des protéines virales est presque inexistante. En fait, le taux de transcription virale dépend de l'état d'activation général de la cellule, influencé lui-même par différents facteurs comme des antigènes, des cytokines (par exemple Tumor Necrosis Factor- α), ou des activateurs produits par d'autres virus. Ces différents éléments induisent l'expression de facteurs de transcription, comme NF- κ B, dont le rôle est de réguler l'expression des différents gènes impliqués dans l'activation cellulaire et qui est, en outre, nécessaire à la réplication du VIH. La forme la plus abondante de NF- κ B dans le cytoplasme est un hétérodimère inactif composé des sous-unités p50, p65(RelA) et de l'inhibiteur I κ B. C'est cette sous-unité inhibitrice qui retient le complexe p50/p65(RelA) dans le cytoplasme, en masquant les signaux de localisation nucléaire. Un stimulus activateur, qui peut être constitué de dérivés actifs de l'oxygène, détache I κ B de l'hétérodimère p50/p65(RelA) qui va alors pénétrer dans le noyau pour se fixer à l'ADN sur l'élément régulateur κ B et activer les gènes qui le contiennent (Fig. 1.5.3) [Costello R. *et al.*, 1995; Flohé L. *et al.*, 1997; Ginn-Pease M.E. and Whisler R.L., 1998; Suzuki Y.J. and Packer L., 1993].

Dans ce modèle, le VIH et les infections opportunistes pourraient directement ou indirectement promouvoir le stress oxydatif, amplifiant ainsi la réplication virale et diminuant encore les systèmes de défenses antioxydantes. Ce cycle autocatalysé faciliterait la progression de la maladie [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995].

Différents antioxydants regroupant la N-acétylcystéine [Roederer M. *et al.*, 1990; Roederer M. *et al.*, 1992; Staal F.J.T. *et al.*, 1990], le glutathion, l'acide ascorbique, le BHA,

et l'acide lipoïque ont montré des activités antivirales [Pace G.W. and Leaf C.D., 1995; Maxwell S.R.J., 1995].

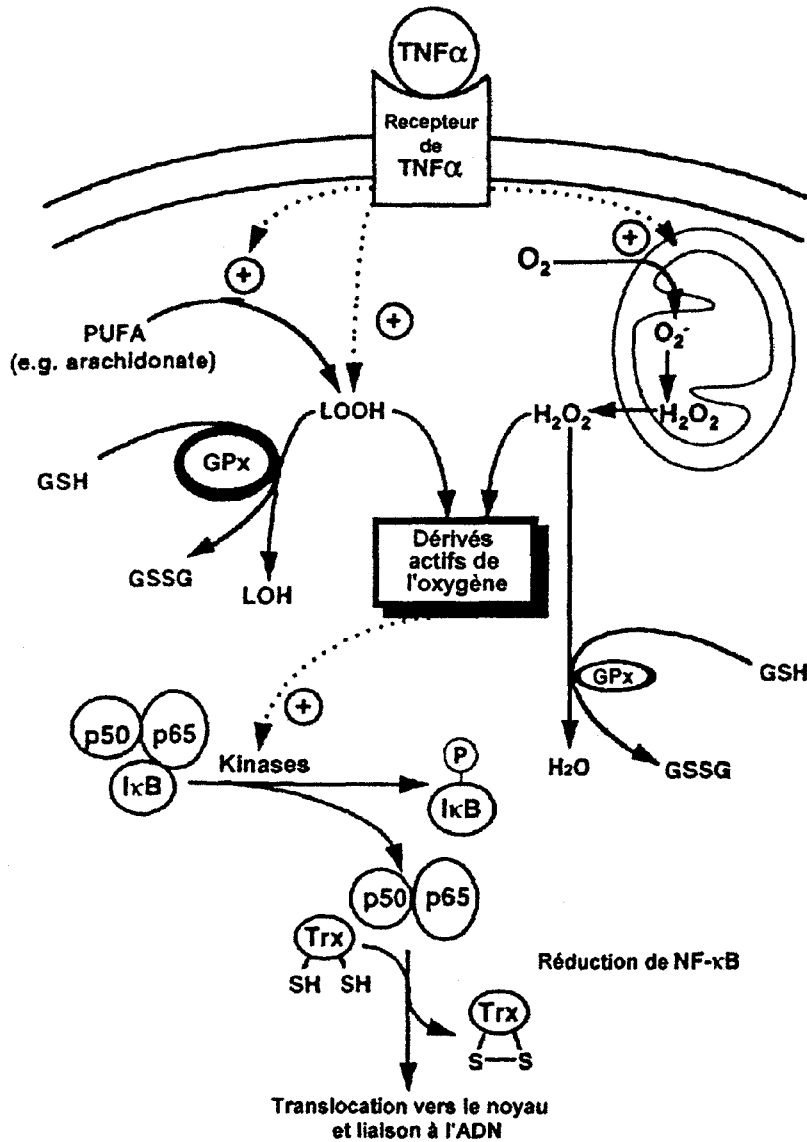


Fig. 1.5.3 : Régulation redox du facteur de transcription NF-κB.
D'après Flohé L. *et al.*, 1997.

1.5.4. Les maladies neurodégénératives.

Plusieurs études semblent prouver l'implication du stress oxydatif dans certaines maladies neurodégénératives, comme la Sclérose Latérale Amiotrophique (ALS), la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997; Davies K.J.A., 1995; Jenner P, 1994].

1.5.4.1. La Sclérose Latérale Amyotrophique.

L'ALS est une maladie neurodégénérative qui s'attaque aux neurones moteurs et apparaissant la plupart du temps vers l'âge de 50 ou 60 ans. Elle touche approximativement 5 à 10 personnes pour 100000. Elle se caractérise notamment par une perte des facultés motrices et une atrophie musculaire [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997].

Il apparaît que 5 à 10% des cas d'ALS sont d'origine familiale et que 20 à 25% de ceux-ci sont associés à une mutation du gène SOD-1, codant pour la SOD_{Cu/Zn}. Le mécanisme par lequel cette mutation induit une dégénérescence neuronale peut être attribué à une activité réduite de la SOD, ou au contraire, à l'apparition d'une fonction adverse: instabilité de l'enzyme conduisant à la formation d'agrégats, diminution de l'affinité pour le substrat provoquant la libération de produits toxiques, ou encore perte d'affinité pour le cuivre et le zinc aboutissant à leur libération [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997].

Toujours est-il qu'il a été montré que la quantité de groupements carbonyle présents dans les protéines (et qui traduit leur état d'oxydation) de patients atteints d'ALS est supérieure de 119% à celui de personnes saines [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997].

1.5.4.2. La maladie de Parkinson.

Une deuxième maladie neurodégénérative qui a pu être liée solidement au stress oxydatif n'est autre que la maladie de Parkinson. Cette pathologie se caractérise par la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire. Les premiers symptômes de tremblements incontrôlés apparaissent en général vers l'âge de 60 ans. Le fait que le stress oxydatif pourrait être une cause primaire ou secondaire de la maladie de Parkinson a été mis en évidence par des études *postmortem* qui ont montré des taux anormaux de glutathion réduit [Jenner P., 1994] et une activité SOD accrue dans la substance noire [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997].

Ce stress oxydatif pourrait provenir du propre métabolisme de la dopamine dont on sait que l'autooxydation ou les processus catalytiques l'impliquant peuvent être à l'origine de la formation de radicaux semiquinoniques et de peroxyde d'hydrogène [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997; Maxwell S.R.J., 1995].

1.5.4.3. La maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est la plus répandue des maladies neurodégénératives provoquant une perte des facultés intellectuelles. Elle se caractérise par une perte des neurones pyramidaux de l'hippocampe et des aires néocorticales, ainsi que des neurones cholinergiques, et par la présence de dépôts (plaques) de protéines β -amyloïdes ($A\beta$) et de filaments cyto-squelettiques anormaux (NFT) [Bains J.S. and Shaw C.A, 1997].

Des radicaux libres peptidiques pouvant initier la peroxydation lipidique [Butterfield D.A. *et al.*, 1994] ont été détectés dans des solutions aqueuses de A β , suggérant la possibilité que la protéine amyloïde elle-même pourrait générer des radicaux libres [Behl C., 1997]. De plus, les protéines A β solubles présentent la faculté de s'agréger suite à une oxydation catalysée par des métaux [Bains J.S. and Shaw C.A., 1997].

D'autres preuves, comme la formation de 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE, sous produit de l'oxydation des LDL) chez les sujets exprimant l'apolipoprotéine apoE4 (connue pour favoriser l'apparition de la maladie d'Alzheimer) et non ceux exprimant l'apoE3, ainsi que la présence d'espèces prouvant l'oxydation de l'ADN et des protéines [Markesbery W.R., 1997], suggèrent fortement l'implication du stress oxydatif dans le développement de la maladie d'Alzheimer [Bains J.S. and Shaw C.A., 1997]. Cependant, il reste encore à déterminer si ce stress oxydatif est une cause première de la maladie ou simplement une conséquence aggravante [Bains J.S. and Shaw C.A., 1997].

1.6. La thérapie antioxydante.

1.6.1. Principes.

Lorsqu'il advient que les défenses naturelles sont dépassées ou déficientes, il faut envisager des techniques thérapeutiques dites "antioxydantes". Celles-ci peuvent être résumées par le schéma de la figure 1.6.1.

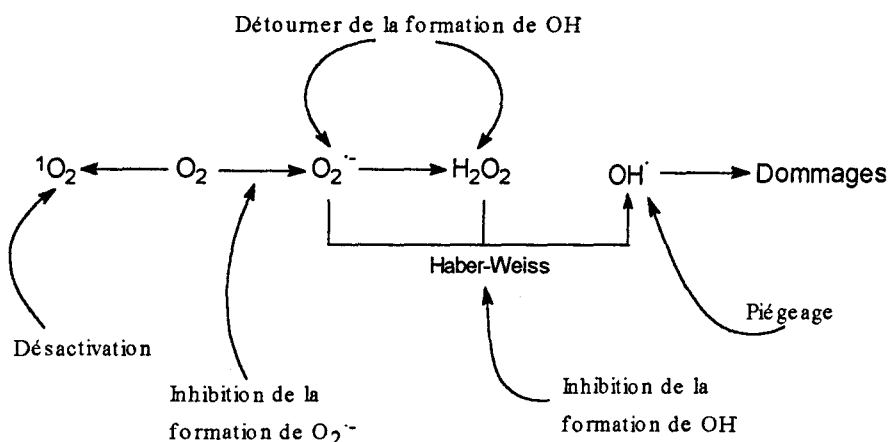


Fig. 1.6.1 : Thérapies antioxydantes.

D'après Fontecave M. and Pierre J.L., 1991.

La plupart des thérapeutiques déjà mises en oeuvre ou encore à l'état de projet miment les systèmes naturels de défense [Maxwell S.R.J., 1995].

1.6.2. Exemples.

1.6.2.1. Désactivation de l'oxygène singulet.

Nous avons déjà vu que le β -carotène peut jouer ce rôle (§1.4.3.3.). Cette "provitamine A" est en fait un piègeur non stoechiométrique de l'oxygène singulet. Ceci veut dire qu'une seule molécule de β -carotène est capable d'inactiver un très grand nombre de molécules d'oxygène singulet. Le mécanisme de "quenching" mis en oeuvre est en fait un mécanisme physique : l'énergie de l'oxygène singulet capturée par le β -carotène est utilisée pour faire passer ce dernier de la forme cis à la forme trans, et inversement [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991, Krinsky N.I., 1993].

1.6.2.2. Inhibition de la formation du radical superoxyde.

Il est possible d'inhiber la xanthine oxydase, responsable de la formation du radical superoxyde, par l'allopurinol (Fig. 1.6.2). Cette molécule, utilisée comme antigoutteux, s'est avérée capable de limiter les dommages (peroxydation lipidique) lors de phénomènes d'ischémie reperfusion [Maxwell S.R.J., 1995].

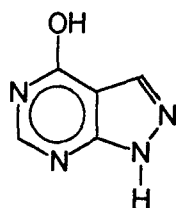


Fig.1.6.2 : Formule développée de l'allopurinol.

1.6.2.3. Ecarter $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 de la formation de $HO^{\bullet}$.

Pour empêcher $O_2^{\bullet -}$ de participer à la formation du radical hydroxyle, il est possible d'utiliser une superoxyde dismutase d'origine bovine [Jadot G., 1989]. La SOD peut être encapsulée dans des liposomes ou couplées à des polymères du type polyéthylèneglycol de façon à accroître sa durée de vie dans le plasma. Il serait aussi possible d'utiliser un complexe du cuivre à effet "SOD like" comme par exemple celui de la figure 1.6.3 [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991].

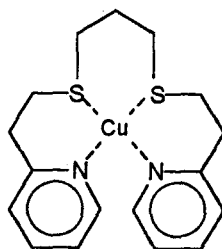
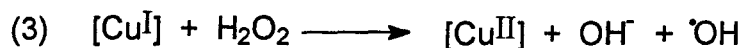
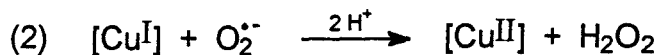
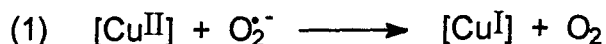


Fig. 1.6.3 : Complexe à activité SOD.

Cependant, un tel procédé présente un certain risque. En effet, l'activité SOD du complexe résulte de la suite réactionnelle composée des équations (1) et (2) présentées ci-après. Or, le complexe $[Cu^I]$ est aussi capable d'être oxydé par le peroxyde d'hydrogène selon l'équation (3), c'est-à-dire l'équation de Fenton, pour former un radical hydroxyle extrêmement toxique. La compétition entre les équations (2) et (3) doit donc absolument se faire au profit de (2) [Fontecave M. and Pierre J.L., 1991].



Pour détourner H_2O_2 de la formation de $HO^{\bullet}$, il est possible d'utiliser des composés sélénisés à "activité glutathion peroxydase". L'ebiselen [Fischer H. and Dereu N., 1987; Sies H., 1993; Sies H., 1995a, Sies H., 1995b] en est un exemple (Fig. 1.6.4).

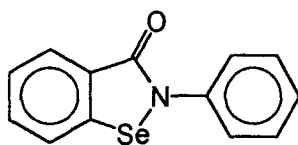


Fig. 1.6.4 : Formule développée de l'ebsele.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'activité glutathion peroxydase de l'ebsele (Fig. 1.6.5) [Fischer H. and Dereu N., 1987, Maiorino M. *et al.*, 1988; Sies H., 1993]. Il est intéressant de noter que, contrairement à la glutathion peroxydase qui montre une forte spécificité pour le glutathion, l'ebsele est capable d'accepter d'autre thiol dans son cycle catalytique [Sies H., 1993].

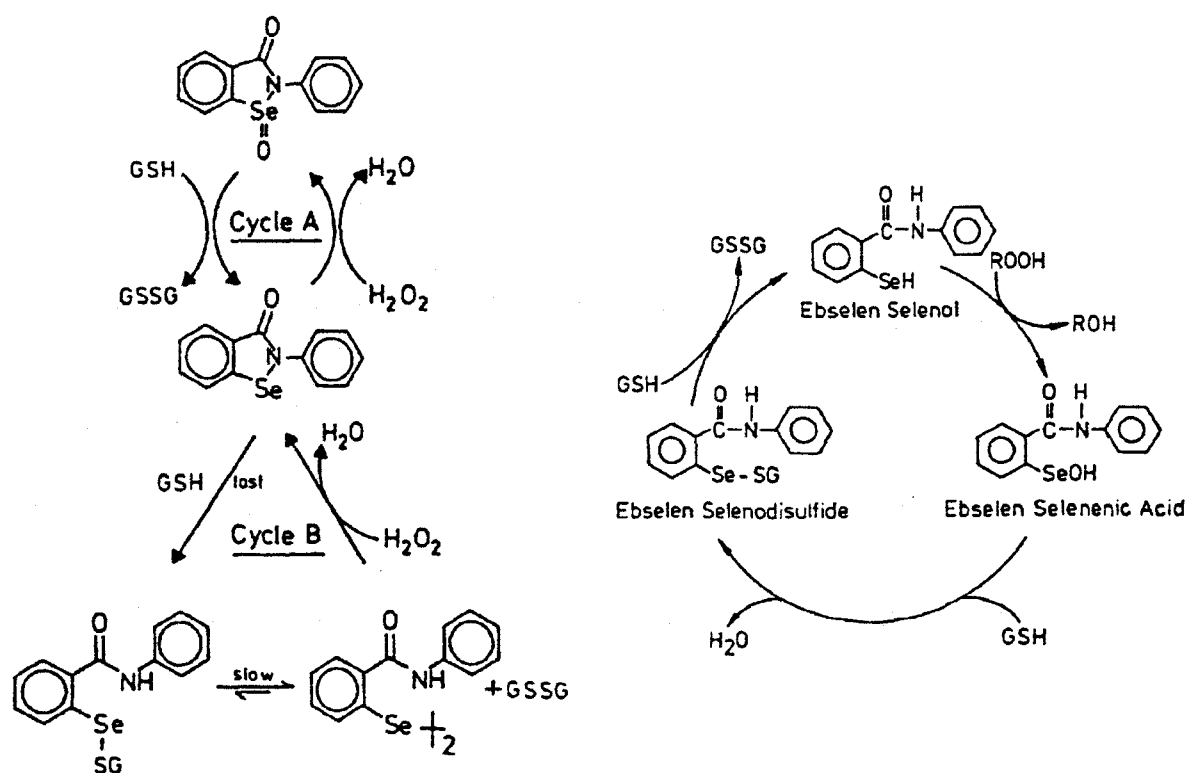
Cycle catalytique de l'ebsele proposé par
Fischer H. and Dereu N., 1987Cycle catalytique de l'ebsele proposé par
Maiorino M. *et al.*, 1988

Fig. 1.6.5 : Mécanismes possibles de l'activité glutathion peroxydase de l'ebsele.

L'ebsele a montré une activité dans de nombreux modèles biologiques, comme par exemple la protection des cellules saines de la peroxydation lipidique, grâce à son activité glutathion peroxydase [Sies H., 1993]. Cependant, il ne présente qu'une faible activité en tant que piègeur de radicaux libres [Sies H., 1993].

1.6.2.4. Inhibition de la formation de HO[•].

Cette inhibition peut être réalisée en chélatant le fer de manière à le rendre inaccessible à la catalyse des réactions de radicaux libres. Un exemple de molécule permettant une telle inhibition est la desferrioxamine [Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., 1993], chélateur hexadentate du fer (Fig. 1.6.6), dont la constante de formation de 10^{31} rend le métal totalement inutilisable pour la réaction de Fenton. De plus, cette molécule s'est avérée être un bon piègeur de radicaux hydroxyle ou superoxyde.

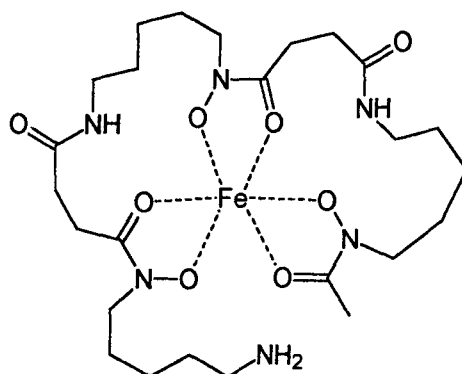
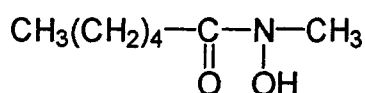


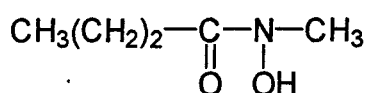
Fig. 1.6.6 : Complexe ferrique du desferal.
[Fontecave M. and Pierre J.L., 1991].

La desferrioxamine a montré une activité en tant qu'inhibiteur de la peroxydation lipidique [Maxwell S.R.J., 1995].

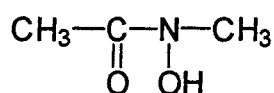
Cependant, la desferrioxamine possède une activité relativement faible à cause de ses mauvaises propriétés pharmacocinétiques. Pour palier à cet inconvénient, il est possible d'utiliser des molécules de la famille des monohydroxamates (Fig. 1.6.7). Ces composés présentent des activités supérieures à celle de la desferrioxamine.



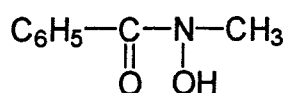
acide N-méthyl hexanoylhydroxamique (NMHH)



acide N-méthyl butyrohydroxamique (NMBH)



acide N-méthyl acéthydroxamique (NMAH)



acide N-méthyl benzhydroxamique (NMBzH)

Fig. 1.6.7 : Structures de composés du type monohydroxamate [Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., 1993].

1.6.2.5. Piégeage de HO[•].

Nous avons déjà vu le rôle que peuvent jouer les vitamines E et C ainsi que le β -carotène (§ 1.4.3.). De plus, d'autres molécules, le plus souvent des dérivés soufrés, sont utilisés.

1.6.2.5.1. Le captopril.

Le captopril est un anti-hypertenseur inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Par ailleurs, il se révèle être un piègeur de radicaux libres grâce à sa fonction thiol [Westin W. *et al.*, 1988] (Fig. 1.6.8). Il en résulte une activité cardioprotectrice lors du syndrome d'ischémie reperfusion et de l'infarctus du myocarde.

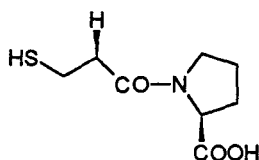


Fig. 1.6.8 : Formule développée du captopril.

1.6.2.5.2. Le probucol.

Le probucol (Fig. 1.6.9) est un hypolipémiant agissant sur le taux de cholestérol. Par ailleurs, il est capable d'inhiber l'oxydation des LDL, à l'origine de la formation des plaques d'athérome [Kohler H. and Jenzer H., 1989] (voir § 1.5.2.).

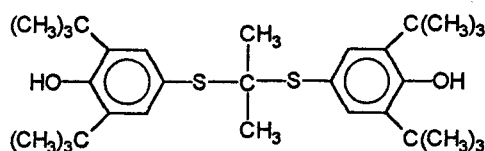


Fig. 1.6.9 : Formule développée du probucol.

1.6.2.5.3. La N-(2-mercaptopropionyl)-glycine.

Cette molécule (Fig. 1.6.10) est utilisée dans le traitement de la cataracte et de l'arthrite rhumatoïde, maladies comprenant un stress oxydatif [Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., 1993].

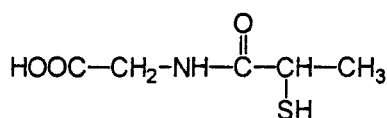


Fig. 1.6.10 : Formule développée de la N-(2-mercaptopropionyl)-glycine.

1.6.2.5.4. La N-acétylcystéine.

La N-acétylcystéine agit d'une part, grâce à son groupement thiol (Fig. 1.6.11) et d'autre part, à travers le métabolisme du glutathion. Elle est capable de piéger directement le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochlorique [Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., 1993].

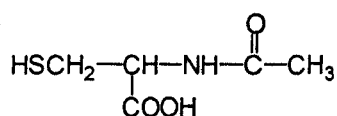


Fig. 1.6.11 : Formule développée de la N-acétylcystéine.

Cette molécule a notamment présenté une activité antivirale dans le cas d'une infection par le VIH (§ 1.5.3).

Le principal inconvénient de l'utilisation de groupements thiols en tant que piègeur de radicaux libres tient dans le fait que le radical thiyle susceptible de se former peut mener à la formation du radical peroxysulphényle en présence d'oxygène:



Or ce radical est beaucoup plus réactif et s'avère de ce fait toxique [Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., 1993]. En effet, il peut, en présence d'une fonction thiol, provoquer la formation d'anion superoxyde qui, par dismutation, engendrera de l'eau oxygénée (Fig. 1.6.12).

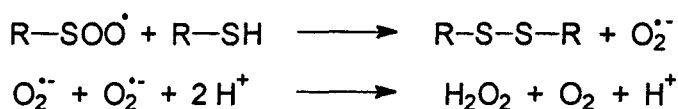


Fig. 1.6.12 : Formation d'anion superoxyde et d'eau oxygénée à partir du radical peroxysulphényle.

1.6.2.6. Les lazaroïdes.

Les lazaroïdes [Dodet B., 1991; Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., 1993] sont des composés du type 21-aminostéroïde (Fig. 1.6.13). Ils ont initialement été développés pour le traitement des traumatismes du système nerveux central. Cependant, ils se sont aussi avérés être de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique induite par le fer [Maxwell S.R.J., 1995], actifs à des concentrations de l'ordre de la micromole dans les tissus neuronaux. Le U-74006F présente aussi une activité de piègeur de radicaux peroxyde et présente en outre la particularité d'épargner l' α -tocophérol.

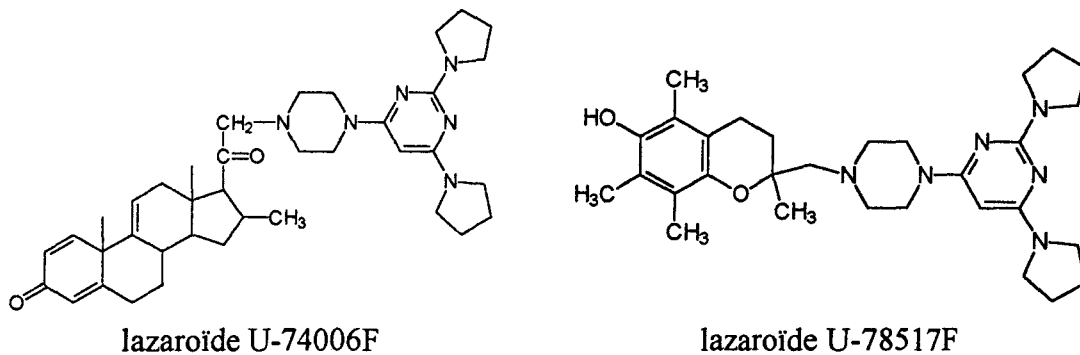


Fig. 1.6.13 : Formules développées de lazaroïdes.

Bibliographie du chapitre 1

- Antunes F., Barclay L.R., Ingold K.U., King M., Norris J.Q., Scaiano J.C. and Xi F., "On the Antioxidant Activity of Melatonin". *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26, 117-128
- Bains J.S. and Shaw C.A., "Neurodegenerative Disorders in Humans : the Role of Glutathione In Oxidative Stress-Mediated Neuronal Death". *Brain Res. Rev.*, **1997**, 25, 335-358
- Beckman J.S. and Crow J.P., "Pathological Implications of Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite Formation". *Biochem. Soc. Trans.*, **1993**, 21, 330-334.
- Behl C., "Amyloid β -Protein Toxicity and Oxidative Stress in Alzheimer Disease". *Cell Tissue Res.*, **1997**, 290, 471-480
- Bensasson R.V., Land E.J. and Truscott T.G., "Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine". Oxford University Press Ed. (1993)
- Bird R.P. and Draper H.H., "Comparatives Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination". *Methods in Enzymology*, **1984**, 105, 299-305
- Butterfield D.A., Hensley K., Harris M., Mattson M. and Carney J., " β -Amyloid Peptide Free Radical Fragments Initiate Synaptosomal Lipoperoxidation in a Sequence-Specific Fashion: Implications to Alzheimer Disease". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1994**, 200, 710-715
- Costello R., Lecine P., Kahn-Perlès B., Algarté M., Lipcey C., Olive D., Imbert J., "Activation du Système de Facteurs de Transcription Rel/NF- κ B". *m/s*, **1995**, 11, 957-965
- Crane B.R., Arvai A.S., Gachhui R., Wu C., Ghosh D.K., Getzoff E.D., Stuehr D.J. and Tainer J.A., "The Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Domain and Inhibitor Complexes". *Science*, **1997**, 278, 425-431.
- Davies K.J.A., "Oxidative Stress : the Paradox of Aerobic Life". *Biochem. Soc. Symp.*, **1995**, 61, 1-31
- De Duve C., "La Naissance des Cellules Complexes". *Dossier Pour la Science – Les sociétés cellulaires*, **1998**, 14-21
- Dean R.T., Fu Shanlin, Stocker R. and Davies M.J., "Biochemistry and Pathology of Radical-Mediated Protein Oxidation". *Biochem. J.*, **1997**, 324, 1-18.
- Debby C., "La Biochimie de l'Oxygène". *La Recherche*, **1991**, 22, 57-64
- Demple B. and Harrison L., "Repair of Oxidative Damage to DNA: Enzymology and Biology". *Annu. Rev. Biochem.*, **1994**, 63, 915-948

- Dodet B., "La Chasse aux Radicaux Libres Oxygénés". *Dossier Biofutur*, 1991, 101, 23-32
- Epp O., Ladenstein R. and Wendel A., "The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution". *Eur. J. Biochem.*, 1983, 133, 51-69
- Ferradini C., "Espèces Activées Radicalaires de l'Oxygène". *Biochimie*, 1986, 68, 779-785
- Fischer H. and Dereu N., "Mechanism of the Catalytic Reduction of Hydroperoxides by Ebselen: A Selenium 77 NMR Study". *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1987, 96, 757-768
- Fita I. and Rossmann M.G., "The NADPH Binding Site on Beef Liver Catalase". *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 1985, 82, 1604-1608
- Flohé L., Brigelius-Flohé R., Saliou C., Traber M.G. and Packer L., "Redox Regulation of NF-Kappa B Activation". *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, 22, 1115-1126
- Fontecave M. and Pierre J.L., "Activation et Toxicité de l'Oxygène. Principe des Thérapeutiques Antioxydante". *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1991, 128, 505-520
- Forman H.J. and Thomas M.J., "Oxidant Production and Bactericidal Activity of Phagocytes". *Ann. Rev. Physiol.*, 1986, 48, 669-680
- Fridovitch I.J., "Superoxide Dismutase. An Adaptation to a Paramagnetic Gas". *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 7761-7764
- Fruchart J.C., "Le Transport du Cholestérol et sa Fixation dans les Artères". *Pour la science*, 1992, 175, 40-47
- Gilad E., Cuzzocrea G.E., Zingarelli B., Salzman A.L. and Szabo C., "Melatonin is a Scavenger of Peroxynitrite". *Life Sci*, 1997, 60, 169-174
- Ginn-Pease M.E. and Whisler R.L., "Redox Signal and NF-κB Activation in T Cells". *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, 25, 346-361
- Goosey J.D., Zigler J.S. and Kinoshita J.H., "Cross-Linking of Lens Crystallins in a Photodynamic System : a Process Mediated by Singlet Oxygen". *Science*, 1980, 208, 1278-1280
- Haberland M.E. and Fogelman A.M., "The Role of Altered Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis". *Am. Heart J.*, 1987, 113, 573-577
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., "Free Radicals in Biology and Medicine". 2nd ed., Clarendon Press. Oxford (1989)
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., "Iron and Free Radicals Reactions : Two Aspects of Antioxidant Protection". *TiBS*, 1986a, 11, 372-375.

- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., "Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine : Some Problems and Concepts". *Arch. Biochem. Biophys.*, **1986b**, 246, 501-514.
- Herzenberg L.A., De Rosa S.C., Dubs J.G., Roederer M., Anderson M.T., Ela S.W. and Deresinski S.C., "Glutathione Deficiency is Associated with Impaired Survival in HIV Disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 1967-1972
- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.-M., Milliman C.L. and Korsmeyer S.J., "Bcl-2 Functions in an Antioxidant Pathway to Prevent Apoptosis". *Cell*, **1993**, 75, 241-251.
- Hsieh Y., Guan Y., Tu C., Angerhofer A., Lepock J.R., Hickey M.J., Tainer J.A., Nick H.S. and Silverman D.N., "Probing The Active Site Of Human Manganese Superoxide Dismutase: The Role Of Glutamine 143". *Biochemistry*, **1998**, 37, 4731-4739
- Imlay J.A. and Linn S., "DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity". *Science*, **1988**, 240, 1302-1309
- Jadot G., "Les superoxydes dismutases", Masson Ed., Paris (1989)
- Jenner P., "Oxidative Damage in Neurodegenerative Disease". *Lancet*, **1994**, 344, 796-795
- Kanofsky J.R., Wright J., Miles-Richardson G.E. and Tauber A.I. "Biochemical Requirements for Singlet Oxygen Production by Purified Human Myeloperoxidase". *J. Clin. Invest.*, **1984**, 74, 1489-1495
- Kochhar S.P. and Rossel J.B., "Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food Systems". In "Food Antioxidants" Elsevier Science Publishers Ed. (1990)
- Kohler H. and Jenzer H., "Interaction of Lactoperoxidase with Hydrogen Peroxide". *Free Radic. Biol. Med.*, **1989**, 6, 323-339
- Koppenol W.H. and Traynham J.G., "Say NO to Nitric Oxide : Nomenclature for Nitrogen- and Oxygen-Containing Compounds". *Methods Enzymol.*, **1996**, 268, 3-7
- Koppenol W.H., "The Basic Chemistry of Nitrogen Monoxide and Peroxynitrite". *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 25, 385-391
- Krinsky N.I., "Antioxidant Functions of Carotenoids". *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**, 7, 617-635
- Lawrence G.D. and Cohen G., "Concentrating Ethane from Breath to Monitor Lipid Peroxidation *in vivo*". *Methods in Enzymology*, **1984**, 105, 305-311
- Lown W., "Ethidium Binding Assay for Reactive Oxygen Species Generated from Reductively Activated Adriamycin (Doxorubicin)". *Methods in Enzymology*, **1984**, 105, 532-539

- Machlin L.J. and Bendich A., "Free Radical Tissue Damage : Protective Role of Antioxidant Nutrients". *FASEB J.*, **1987**, *1*, 441-445
- Maiorino M., Roveri A., Coassin M. and Ursini F., "Kinetic Mechanism and Substrate Specificity of Glutathione Peroxidase Activity of Ebselen (PZ51)". *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, *37*, 2267-2271
- Markesbery W.R., "Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease". *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, *23*, 134-147
- Marshall K.-A., Reiter R.J., Poeggeler B., Aruoma O. and Halliwell B., "Evaluation of the Antioxidant Activity of Melatonin *in vitro*". *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *21*, 307-315
- Maxwell S.R.J., "Prospects for the Use of Antioxidant Therapies". *Drugs*, **1995**, *49*, 345-361
- McCord J.M. and Fridovitch I., "Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Crythrocuprein (Hemocuprein)". *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 6049-6055.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O. and Remacle J., "Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase and Cu/Zn-SOD for Cell Survival Against Oxidative Stress". *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**, *17*, 235-248
- Omar B., McCord J. and Downey J. "Ischaemia Reperfusion" In "Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants." Sies H. Ed. Academic Press (1991) London, pp 493-527
- Pace G.W. and Leaf C.D., "The Role of Oxidative Stress in HIV Disease". *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *19*, 523-528
- Partharathy S., Young S.G., Witzum J.L., Pittman R.G. and Steinberg D., "Probucol Inhibits Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein". *J. Clin. Invest.*, **1986**, *7*, 641-644
- Pogozelski W.K. and Tullius T., "Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from Sugar Moiety". *Chem. Rev.*, **1998**, *89*, 1089-1107
- Raag R., Swanson B.A., Poulos T.L. and Ortiz de Montellano P.R., "Formation, Crystal Structure, and Rearrangement of a Cytochrome P-450cam Iron-Phenyl Complex". *Biochemistry*, **1990**, *29*, 8119-8126.
- Reiter R.J. *et al.*, "Reactive Oxygen Intermediates, Molecular damage, and Aging Relation to Melatonin". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1998**, *854*, 410-424
- Rice-Evans C.A. and Diplock A.T., "Current Status of Antioxidant Therapy". *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**, *15*, 77-96
- Roederer M., Ela S.W., Staal F.J. and Herzenberg L.A., "N-Acetylcystein : a New Approach to Anti-HIV Therapy". *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **1992**, *8*, 209-217

- Roederer M., Staal F.J.T., Raju P.A., Ela S.W. and Herzenberg L.A., "Cytokine Stimulated Human Immunodeficiency Virus Replication is Inhibited by N-Acetyl-L-Cysteine". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 4884-4888
- Sahnoun Z., Jamoussi K. and Mounir Zeghal K., "Radicaux Libres et Anti-Oxydants : Physiologie, Pathologie Humaine et Aspects Thérapeutiques". *Thérapie*, **1997**, 52, 251-270
- Sies H., "Biochemistry of Oxidative Stress". *Angew. Chem. Int. ed. Engl.*, **1986**, 25, 1058-1071
- Sies H., "Ebselen, a Selenoorganic Compound as Glutathione Peroxidase Mimic". *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**, 14, 313-323
- Sies H., "Ebselen". *Methods in Enzymology*, **1995a**, 252, 341-342
- Sies H., "Ebselen: a Glutathione Peroxidase Mimic". *Methods in Enzymology*, **1995b**, 252, 476-482
- Squadrito G.L. and Pryor W.A., "Oxidative Chemistry of Nitric oxide : the Roles of Superoxide, Peroxynitrite and Carbon Dioxide". *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 25, 392-403
- Staal F.J.T., Roederer M., Herzenberg L.A. and Herzenberg H.A., "Intracellular Thiols Regulate Activation of Nuclear Factor κ B and Transcription of Human Immunodeficiency Virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 9943-9947
- Suzuki Y.J. and Packer L., "Inhibition of NF- κ B Activation by Vitamin E Derivatives". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 193, 277-283
- Turner M.J., Everman D.B., Ellington S.P. and Fields C.E., "Detection of Free Radicals During the Cellular Metabolism of Adriamycin". *Free Radic. Biol. Med.*, **1990**, 9, 415-421
- Westin W., Mullkane K. and Loner R.A., "Does Captopril Attenuate Reperfusion-Induced Myocardial Dysfunction by Scavenging Free Radicals ?". *Circulation*, **1988**, 77 (suppl I), 1-30
- Wink D.A. and Mitchell J.B., "Chemical Biology of Nitric Oxide : Insights into Regulatory, Cytotoxic, and Cytoprotective Mechanism of Nitric oxide". *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 25, 434-456.
- Wink D.A., Vovovotz Y., Grisham M.B., DeGraff W., Cook J.C., Pacelli R., Murali K. and Mitchell J.B., "Antioxidant Effects of Nitric Oxide". *Methods in Enzymology*, **1999**, 301, 413-425.
- Zang L.Y., Cosma G., Gardner H. and Vallyathan V., "Scavenging of Reactive Oxygen Species by Melatonin". *Biochem. Biophys. Acta.*, **1998**, 1425, 469-477

2. PRESENTATION DU SUJET.

2.1. Les ovothiols.

2.1.1. Fertilisation, explosion oxydative et enveloppe de protection.

2.1.1.1. L'enveloppe de fertilisation des œufs d'oursins de mer.

On sait depuis plus d'un siècle que les œufs d'oursins de mer sont capables de construire une enveloppe protectrice suite à leur fertilisation [Derbes M., 1847]. Cette enveloppe, entourant l'embryon, agit comme une sorte de micro-incubateur et permet aux premières divisions cellulaires d'avoir lieu à l'abri des dangers extérieurs, comme les micro-organismes, ou des autres spermatozoïdes. C'est au cours de l'étude de la formation de cette enveloppe que Bennett M. Shapiro et Paul B. Hopkins de l'Université de Washington, découvrirent l'ovothiol [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

Dès le contact avec le spermatozoïde fertilisant, et l'augmentation de concentration en calcium Ca^{2+} intracellulaire qui s'en suit, une formidable vague d'exocytose expulse au voisinage immédiat de la cellule 5% de son contenu. Ces protéines interagissent de façon non covalente avec la couche de vitelline afin de former, au bout d'une à deux minutes, une première enveloppe appelée "enveloppe souple" (Fig. 2.1.1). Celle-ci se durcit dans les cinq minutes qui suivent par une réaction de réticulation. L'enveloppe finale ainsi obtenue, qui peut être considérée comme une seule macromolécule [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991], est capable de résister à l'action de molécules susceptibles de dénaturer les protéines ainsi qu'aux détergents [Shapiro B.M., 1991].

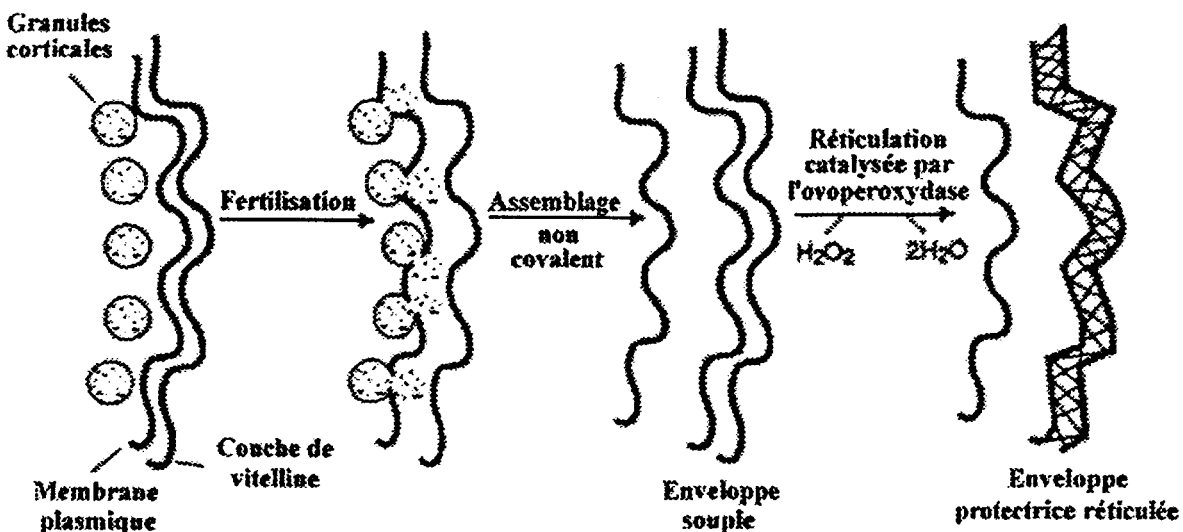


Fig. 2.1.1 : Formation de l'enveloppe de protection de l'œuf d'oursin de mer suite à sa fertilisation.

D'après Shapiro B.M., 1991.

Cette réticulation résulte de la formation de liaisons entre des résidus tyrosines adjacents, sous l'action d'une enzyme monomérique de 70 kDa contenant un résidu hémunique, l'ovoperoxydase [Foerder D. and Shapiro B.M., 1977]. Celle-ci, présente dans l'enveloppe, utilise l'eau oxygénée afin de catalyser la formation de liaisons o,o-dityrosyles (Fig. 2.1.2) [Shapiro B.M., 1991; Foerder D. and Shapiro B.M., 1977; Hall H.B., 1978]. Chaque molécule d'ovoperoxydase est capable de conduire à la formation de 5 à 10 liaisons de ce type [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

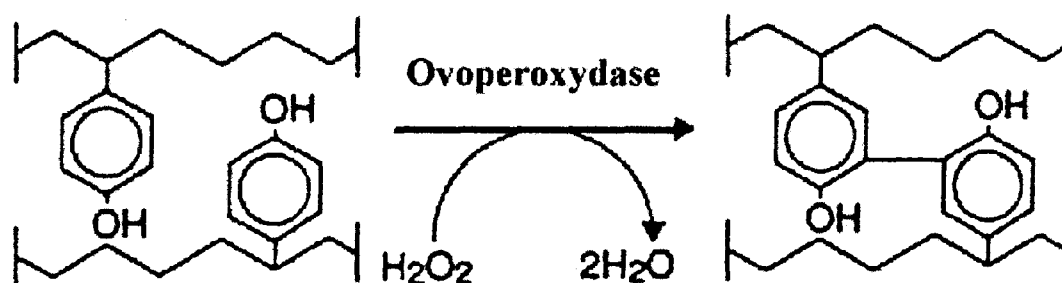
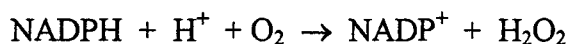


Fig. 2.1.2 : Formation d'une liaison o,o-dityrosine catalysée par l'ovoperoxydase.
D'après Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991.

2.1.1.2. L'explosion oxydative.

On sait depuis longtemps que la fertilisation des œufs d'oursins de mer est immédiatement suivie d'une forte augmentation de la consommation d'oxygène, que l'on appelle explosion oxydative.

La fusion du spermatozoïde avec l'œuf va activer une protéine G entraînant elle-même l'activation d'une phospholipase C. Celle-ci, en clivant un phospholipide membranaire, va conduire à la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3). Cet IP3 libère alors les réserves de Ca^{2+} intracellulaires. L'action conjuguée de ce calcium et du DAG va stimuler une protéine kinase C (PKC) dont le rôle est d'activer une oxydase en la phosphorylant [Shapiro B.M., 1991]. C'est cette oxydase qui va fournir l'eau oxygénée à partir de la réaction suivante:



Cette réaction permet de rendre compte de l'explosion oxydative faisant suite à la fertilisation des œufs d'oursin de mer, ainsi que de la formation de l'eau oxygénée nécessaire à l'ovoperoxydase pour durcir l'enveloppe de protection. La figure 2.1.3 montre ce mécanisme.

2.1.1.3. Découverte des ovothiols.

En étudiant l'explosion oxydative des œufs d'oursins de mer, Turner *et al.* découvrirent que l'ovoperoxydase elle-même possède une activité NAD(P)H oxydase [Turner E. *et al.*,

excès d' H_2O_2 [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

La purification et l'analyse structurale de la famille des ovothiols montra que celle-ci se compose de dérivés de l'histidine N-méthylés et possédant une fonction thiol en position 4 de leur noyau imidazole (Fig. 2.1.4).

L'ovothiol présent dans les œufs d'oursins de mer (*Strongylocentrotus purpuratus*), et préalablement appelé facteur ET, n'est autre que l'ovothiol C. C'est pratiquement le seul représentant de la famille dans cet organisme où il peut atteindre la concentration de 4.3 mM. De plus, il n'est présent que dans les œufs et les ovaires de l'oursin de mer et reste absent des autres tissus. L'ovothiol B, quant à lui, a pu être retrouvé dans une famille de coquille Saint-Jacques (*Chlamys hastata*) et l'ovothiol A dans une étoile de mer (*Evasteria troschelii*), une fois de plus uniquement dans les œufs et les organes reproducteurs [Turner E. *et al.*, 1987].

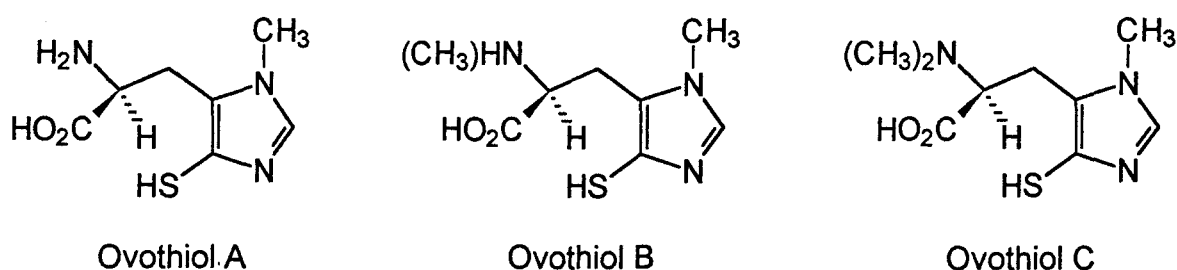


Fig. 2.1.4 : Structure de la famille des ovothiols.

Certaines espèces de poissons recèlent aussi des représentants de la famille. Ainsi, la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) et le saumon Coho contiennent tous deux les formes A et B de l'ovothiol [Turner E. *et al.*, 1988].

Des dérivés des ovothiols ont pu être isolés d'autres organismes marins. Ainsi, on retrouve dans une famille de pieuvres (*Octopus vulgaris*) de l'adénochrome (Fig 2.1.5) [Ito S. *et al.*, 1976; Ito S. *et al.*, 1979], dans laquelle on peut reconnaître un noyau de type 4-mercaptohistidine. De même, l'imbricatine a pu être isolée dans une famille d'étoile de mer (*Dermasterias imbricat*) (Fig. 2.1.5) [Pathirana C. and Andersen R.J., 1986].

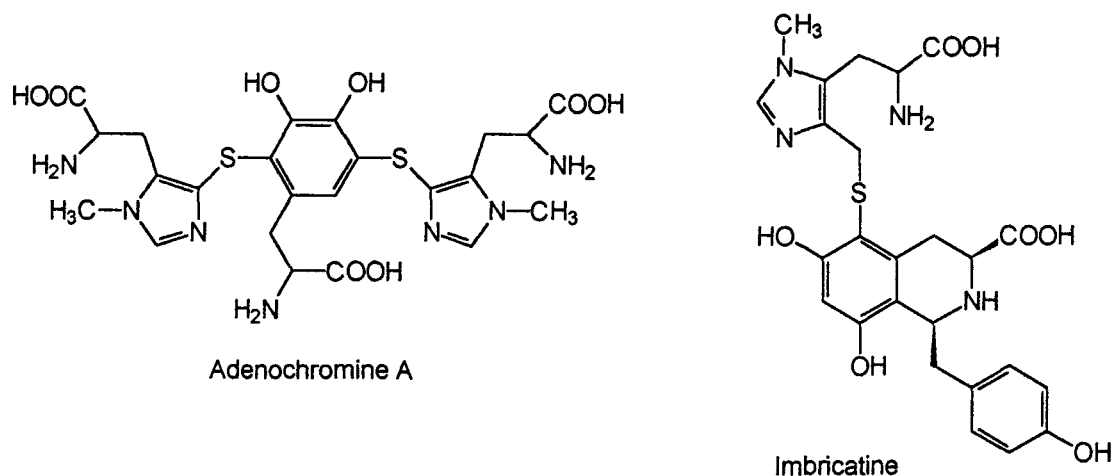


Fig 2.1.5: Structure de dérivés de l'ovothiol.

Enfin, l'ovothiol A a pu être isolé dans des microorganismes comme le trypanosome *Crithidia fasciculata* [Steenkamp D.J. and Spies H.S.C., 1994] ou le *Leishmania donovani* [Spies H.S.C. and Steenkamp D.J., 1994].

2.1.2. Biosynthèse et synthèse totale des ovothiols.

Une étude récente sur la biosynthèse de l'ovothiol A [Steenkamp D.J. *et al.*, 1996] a montré que le soufre de la fonction thiol provient de la méthionine tandis que le groupe méthyle peut provenir, quant à lui, à la fois de la cystéine ou de la méthionine. Ce dernier, enfin, semble être ajouté à l'histidine après la transulfuration, ce qui fait de la 4-mercaptohistidine l'intermédiaire principal de la biosynthèse de l'ovothiol A.

Bien que leurs concentrations soient très élevées dans les organismes où ils sont présents (de l'ordre du millimolaire), il n'était pas possible d'isoler les ovothiols dans les proportions nécessaires à l'étude de leur propriétés chimiques. Il était donc nécessaire, afin de pouvoir les étudier, de mettre au point une synthèse totale susceptible de les produire dans des quantités de l'ordre du gramme. Cette synthèse permettait, de surcroît, de vérifier les hypothèses faites quant à leur structure [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

Cette synthèse totale des ovothiols à la fois dans leur forme optiquement active et dans leur forme racémique fut mise au point par Tod P. Holler et Paul B. Hopkins [Spaltenstein A. *et al.*, 1987; Holler T.P. *et al.*, 1989; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995]. Nous reviendrons en détail sur cette synthèse au paragraphe 2.3.3.

2.1.3. Propriétés physico-chimiques.

2.1.3.1. Constantes d'acidité.

Afin d'étudier les constantes d'acidité des ovothiols en s'affranchissant de l'interférence des fonctions amines et carboxyliques des substances naturelles, Holler et Hopkins choisirent de titrer un analogue qui en soit dépourvu, à savoir le 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole (DMI) [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1988]. Les deux constantes d'acidité de 2.3 et de 10.3 présentées par le DMI, associées à l'unique pKa de 6.0 qu'offre le dérivé S-méthylé du DMI, permettent d'écrire le diagramme de la figure 2.1.5.

On peut voir donc qu'en solution aqueuse à pH neutre, le DMI, et par conséquent les ovothiols, existent presque exclusivement sous la forme zwitterionique dans laquelle le soufre se présente sous forme d'une fonction thiolate, tandis que l'atome d'azote de la position 3 du noyau imidazole est protoné. De plus, cette forme protonée de l'azote est suffisamment stabilisée par la fonction thiolate pour persister jusqu'à un pH de 10, au lieu d'un pH de 6 dans le cas de l'histidine [Holler T.D. and Hopkins P.B., 1995].

L'ovothiol s'oppose donc ici au glutathion dont la fonction thiol possède un pKa de 8.6 en solution aqueuse. Ce dernier, contrairement à l'ovothiol, se présente donc à 90% sous la forme protonée, SH, à pH neutre.

Il est à noter que la forme thiolate de l'ovothiol à pH neutre pourrait représenter une forme isostère de la forme sélénate active de la glutathion peroxydase [Epp O., 1983].

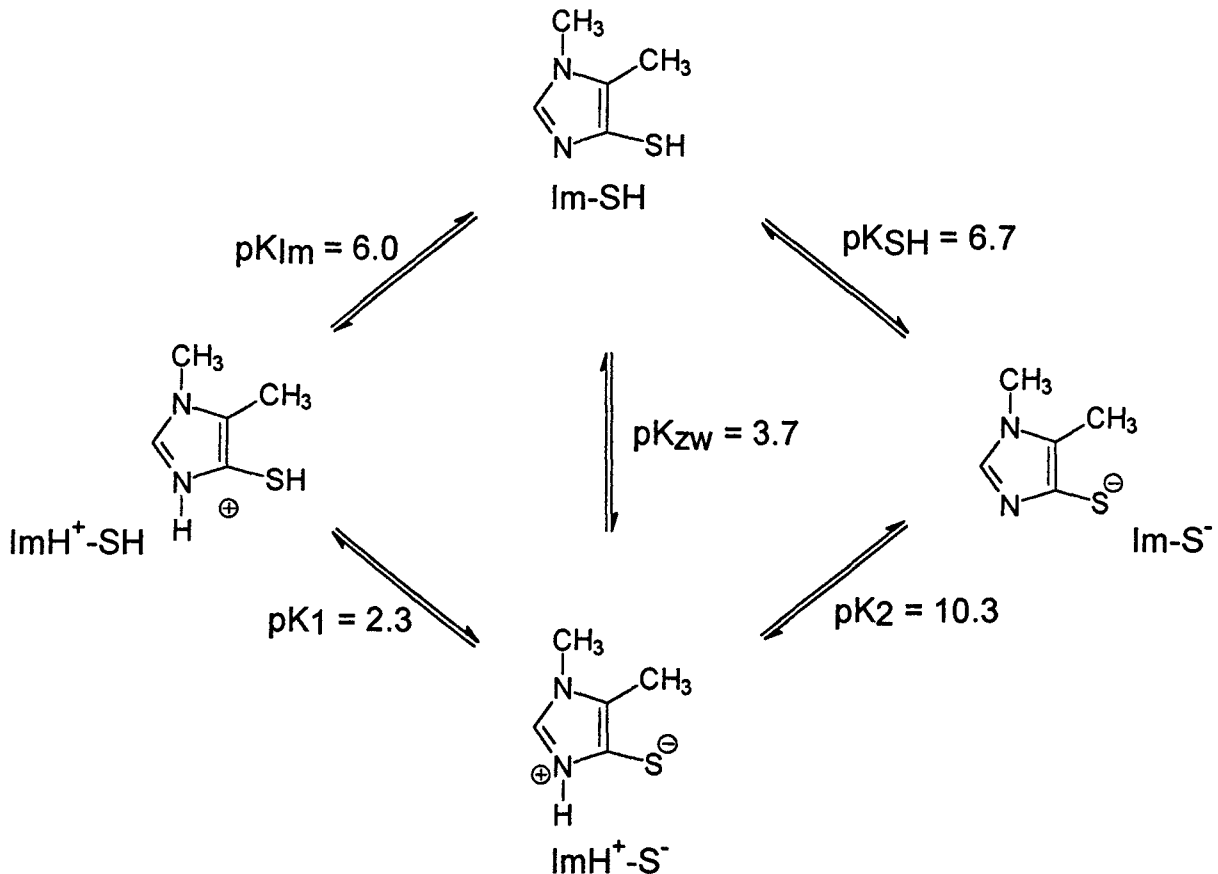


Fig. 2.1.5: Constantes d'acidité d'un modèle d'ovothiol, le 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole DMI.

Adapté de Holler T.P. and Hopkins P.B., 1988.

2.1.3.2. Sensibilité à l'oxydation.

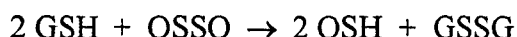
Les ovothiols se comportent, vis-à-vis de l'oxydation, comme la plupart des thiols aromatiques [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991]. Ils sont rapidement oxydés sous forme de disulfure, par exemple en solution aqueuse aérée. Ce processus peut être accéléré en présence d'oxydants métalliques, ou d'eau oxygénée [Turner E. *et al.*, 1988]. Réciproquement, le disulfure peut être facilement réduit sous la forme thiol par ajout de borohydrure de sodium [Holler T.P. *et al.*, 1989] ou de dithiothréitol [Turner E. *et al.*, 1988].

Ce comportement de l'ovothiol s'oppose à celui de l'ergothionéine, dérivée de la 2-mercaptocystéine. Celle-ci est principalement présente sous la forme mésomère thione et, par conséquent, ne s'oxyde pas facilement en disulfure [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

2.1.3.3. Equilibres rédox.

L'ovothiol et le glutathion coexistent dans les œufs d'oursins de mer, tous deux à des concentrations de l'ordre de 3 à 4 mM. Dans un premier temps, les équilibres rédox existant entre ces deux composés ont pu être étudiés dans le cas de l'ovothiol C, par spectrophotométrie UV [Shapiro B.M. and Turner E., 1988].

Il apparaît que l'équilibre entre les formes réduites et oxydées de l'ovothiol et du glutathion est déplacé dans le sens suivant:



où GSH et GSSG représentent respectivement les formes réduites et oxydées du glutathion tandis que OSH et OSSO représentent celles de l'ovothiol.

Dans cette étude, pour un pH de 7.0 et une température de 30°C en milieu aqueux, la variation d'enthalpie libre de cette réaction est de $\Delta G = -3.86$ kcal/mol. Comme $\Delta G = -RT \ln K_{eq} = -23.06.nE$, avec n le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction, on en déduit que le couple redox OSSO/OSH possède un potentiel d'oxydo-réduction supérieur de 84 mV à celui du couple GSSG/GSH [Shapiro B.M. and Turner E., 1988].

Une deuxième étude, plus récente, a permis d'étudier les mêmes couples d'oxydo-réduction mais cette fois pour l'ovothiol A, et en utilisant la RMN ^1H [Weaver K.H. and Rabenstein D.L., 1995]. Cette étude montre que le potentiel d'oxydoréduction de l'ovothiol est supérieur à celui du glutathion de 170 mV à pH 7.0. La différence entre les potentiels obtenus par les deux méthodes est probablement plus due à la diversité des techniques employées qu'à un éventuel comportement différent des ovothiols A et C sur le plan de l'oxydo-réduction [Weaver K.H. and Rabenstein D.L., 1995]. En effet, rappelons que ces deux ovothiols ne diffèrent que par la méthylation de la fonction amine qui n'intervient pas dans les équilibres rédox, et qui est, de surcroît, éloignée des centres réactionnels de ces équilibres.

En considérant une valeur de -0.262 V par rapport à l'électrode à hydrogène pour le glutathion à pH 7.0, on en déduit que les ovothiols possèdent un potentiel d'oxydo-réduction de l'ordre de -0.090 V par rapport à cette même électrode, ce qui leur donne un des potentiels rédox les plus élevés pour un thiol organique [Weaver K.H. and Rabenstein D.L., 1995].

Etant donné que le glutathion existe de façon prédominante sous la forme thiol dans les œufs d'oursins de mer, et qu'il est capable de réduire l'ovothiol, on en déduit que ce dernier se présentera, lui aussi, essentiellement sous la forme thiol, sans nécessité de présence d'une "ovothiol réductase" [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

Il est intéressant de noter que la réaction de réduction de l'ovothiol oxydé sous forme de disulfure, OSSO, par le glutathion GSH se décompose en fait en deux étapes faisant intervenir la formation d'un disulfure mixte OSSG [Weaver K.H. and Rabenstein D.L., 1995; Shapiro B.M. and Turner E., 1988]. L'équilibre peut alors être écrit par les réactions suivantes:

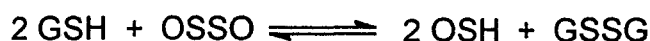
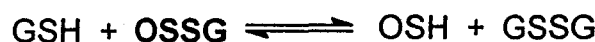
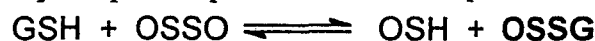


Fig. 2.1.6: Réduction de l'ovothiol par le glutathion.
Formation intermédiaire d'un disulfure mixte.

2.1.3.4. Réactivité vis à vis des radicaux.

La différence la plus frappante entre les ovothiols et le glutathion concerne leur réactivité vis-à-vis des radicaux. Que la réaction soit mieux décrite par un transfert d'électron ou d'hydrogène, l'ovothiol s'avère beaucoup plus réactif que le glutathion, parfois de plusieurs ordres de grandeur [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995].

Ainsi, la réaction du glutathion et de l'ovothiol A ou du DMI avec le sel de Fremy ou le radical de Banfield, deux molécules contenant une fonction nitroxyde (Fig. 2.1.7), a été étudiée [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990b]. On a pu mettre en évidence que pour ces deux molécules le glutathion réagissait beaucoup plus lentement que les 4-mercaptoimidazoles. Dans le cas du radical de Banfield, le DMI a montré une vitesse de réaction 100 fois supérieure à celle du glutathion. Un effet similaire a été constaté pour la réduction du ferricyanure en ferrocyanure et du ferricytochrome C en ferrocyclochrome C.

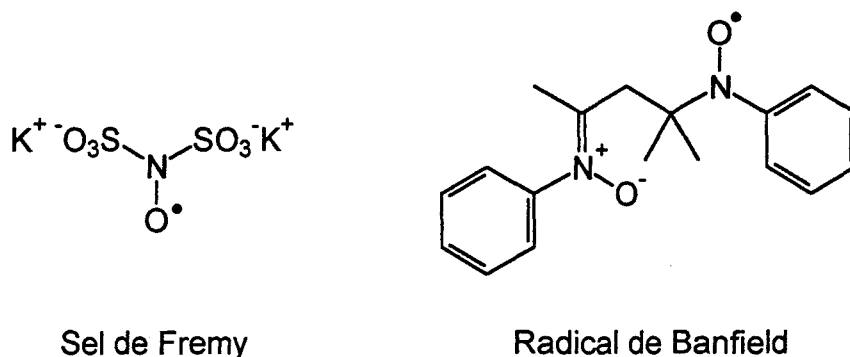


Fig. 2.1.7 : Structure du sel de Fremy et du radical de Banfield.

Un résultat très significatif concerne la réactivité de ces composés vis-à-vis du radical phénolique tyrosyle. En effet, étant stabilisé par résonance, et provenant d'un acide aminé commun, ce radical doit être un des composés ultimes formés au cours de toute cascade radicalaire dans la cellule [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991]. De plus, nous avons vu qu'au cours de la formation de l'enveloppe de protection des œufs d'oursins de mer les

radicaux tyrosyle étaient produits en grand nombre (§ 2.1.1.1 et § 2.1.1.2).

La capacité de l'ovothiol A à piéger ce radical a été comparée à celle du glutathion et d'autres composés [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1988; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990a; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990b]. Ce piégeage peut être mis en évidence en suivant l'inhibition de la formation de la dityrosine, produit par le radical tyrosyle. Les molécules testées se séparent en deux groupes. Un premier groupe de piègeurs relativement inefficaces ralentit, sans toutefois supprimer, la formation de la dityrosine. Il s'agit du glutathion, de la L-cystéine et de l'acide urique. Un autre groupe contenant l'ovothiol, le DMI, l'acide ascorbique et le trolox, supprime complètement la formation de la dityrosine.

Un analogue structurel des ovothiols, le MEMI (1-méthyl-5-éthyl-4-mercapto-imidazole), a par ailleurs montré une activité de piégeage de l'anion superoxyde et du radical peroxyde linoléate [Marjanovic B. *et al.*, 1995].

2.1.4. Rôle biologique de l'ovothiol.

Il a été montré que l'ovothiol réagit beaucoup plus rapidement avec H_2O_2 que le glutathion [Turner *et al.*, 1988]. Ainsi, à 30°C et à un pH de 7.2, l'ovothiol et le peroxyde d'hydrogène réagissent avec une constante de vitesse de $2.0 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, tandis que le glutathion réagit avec une constante de vitesse de seulement $0.43 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$:

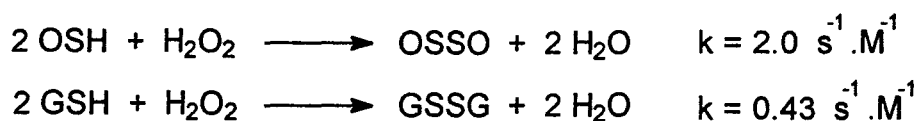


Fig. 2.1.8: Réaction de l'ovothiol et du glutathion avec l'eau oxygénée.

Cet état de fait suggère que l'ovothiol pourrait détoxifier la cellule de l'œuf de la forte concentration en H_2O_2 présente lors de la fécondation et ainsi de l'en protéger [Turner E. *et al.*, 1988; Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995]. En effet, bien qu'il soit nécessaire au durcissement de l'enveloppe de protection de l'œuf (§ 2.1.1.1.), le peroxyde d'hydrogène pourrait avoir des conséquences délétères graves pour le développement ultérieur de l'embryon s'il était produit en excédent (§ 2.1.1.3.) [Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991].

De plus, comme nous l'avons vu, l'ovothiol possède un potentiel d'oxydo-réduction supérieur à celui du glutathion. Ceci permet au glutathion de réduire la forme oxydée de l'ovothiol. La combinaison de ces deux réactions fournit alors l'équation bilan d'une activité glutathion peroxydase, l'enzyme étant remplacée par la molécule d'ovothiol (Fig. 2.1.9) [Turner E. *et al.*, 1988; Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991; Shapiro B.M., 1991; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995].

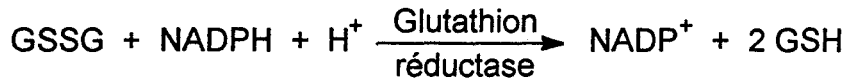
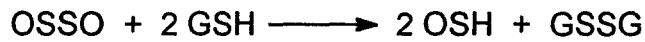
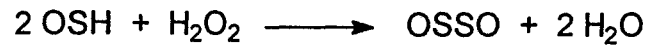


Fig. 2.1.9 : Réduction de H_2O_2 catalysée par l'ovoithiol. Réduction du glutathion par la glutathion réductase.

L'ovoithiol présente donc une activité "glutathion peroxydase-like" qui a été mise en évidence pour la molécule seule (Fig. 2.1.10) et pour des homogénats d'œufs d'oursin de mer [Turner E. *et al.*, 1988].

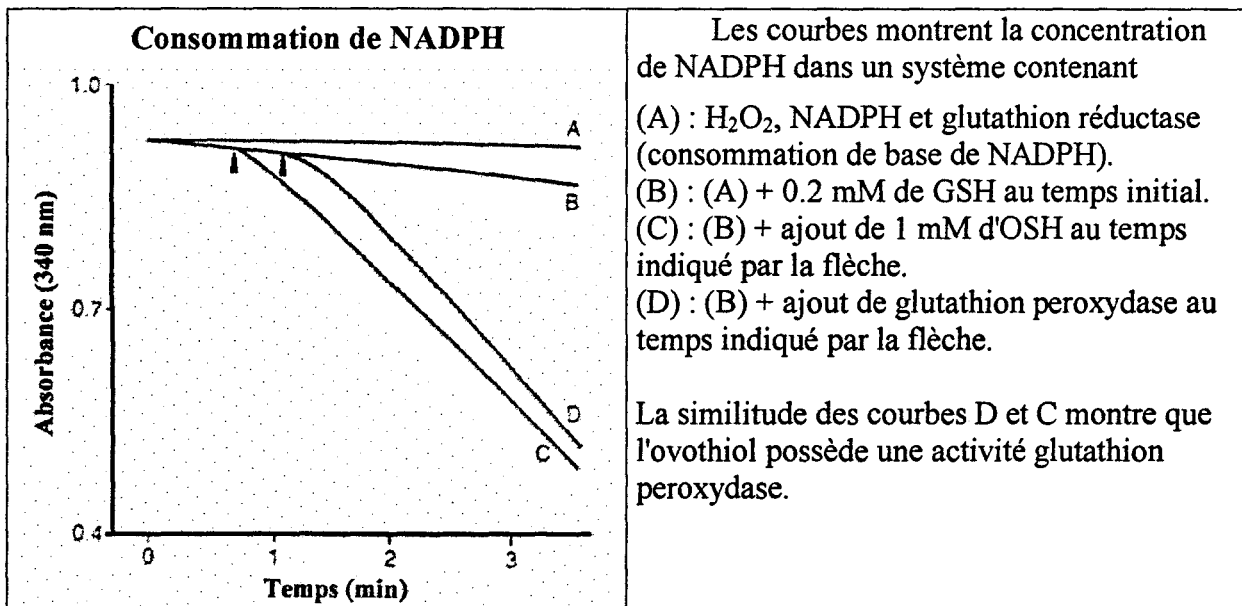


Fig. 2.1.10: Activité glutathion peroxydase-like de l'ovoithiol.

D'après Turner E. *et al.*, 1988.

Au delà de l'activité de l'ovoithiol en tant que piègeur d' H_2O_2 , la propension de l'ovoithiol à réagir rapidement avec les radicaux permet de supposer qu'il peut aussi agir en tant qu'inhibiteur des dommages radicalaires que pourrait subir l'embryon au cours de l'explosion oxydative [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995].

2.2. But de l'étude.

Les ovothiols présentent des potentialités antioxydantes indéniables. En nous inspirant de ces données, nous nous proposons de réaliser des 4-mercaptoimidazoles sur lesquels nous allons effectuer une pharmacomodulation du noyau hétérocyclique afin d'améliorer les propriétés "piégeur de radicaux libres" et "glutathion peroxydase-like" de la molécule naturelle.

2.2.1. La stabilisation des radicaux libres.

Il existe plusieurs facteurs contribuant à la stabilité thermodynamique ou cinétique d'un radical [Fossey J. *et al.*, 1993].

2.2.1.1. L'hyperconjugaison.

Il s'agit de l'effet à l'origine de la séquence de stabilité suivante :

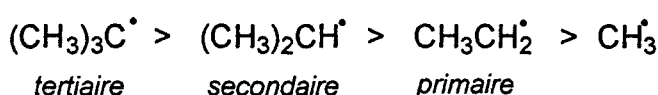


Fig. 2.2.1 : Stabilisation d'un radical par hyperconjugaison.

Cette stabilisation peut être expliquée par le raisonnement suivant. Les orbitales s des trois atomes d'hydrogène peuvent se combiner comme indiqué sur la figure 2.2.2 pour former une orbitale de symétrie σ par rapport à la "liaison C-H₃" et deux autres de symétrie π . Si on considère alors une hybridation sp des orbitales du carbone méthylique, on voit que celui-ci peut former une liaison σ et deux liaisons π avec les hydrogènes (Fig. 2.2.2).

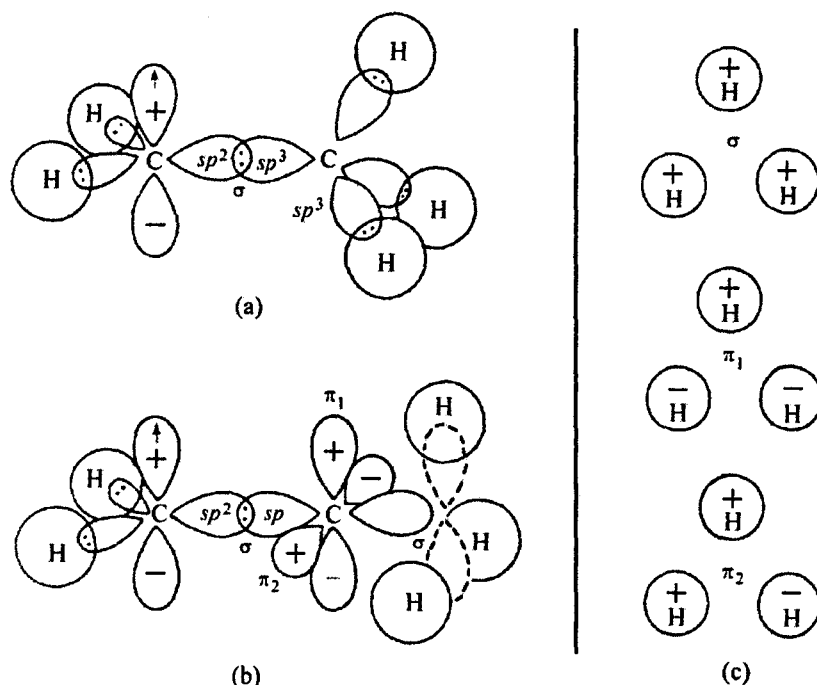


Fig. 2.2.2 : Hyperconjugaison du radical éthylique. (a) Liaison σ normale. (b) Liaison π hyperconjuguée. (c) Orbitales σ et π de l'hydrogène.

D'après [Karplus M. and Porter R.N., 1970].

La liaison faisant intervenir π_1 a la même symétrie que l'orbitale contenant l'électron célibataire du groupement méthylène, et il peut donc se former une orbitale liante s'étendant sur tous les atomes C-C-H₃. Ainsi, l'électron célibataire se trouve délocalisé sur les atomes d'hydrogène du méthyle adjacent au méthylène [Karplus M. and Porter R.N., 1970]. Bien entendu, cette délocalisation, qui stabilise l'électron célibataire, est d'autant plus forte que le nombre de groupes méthyle est important.

2.2.1.2. Stabilisation par mésomérie.

La stabilisation du radical peut être obtenue par résonance. Ce phénomène concerne les radicaux conjugués avec des systèmes insaturés, par exemple allyliques ou benzyliques (Fig. 2.2.3). C'est cet effet qui est le principal pourvoyeur de radicaux stables.

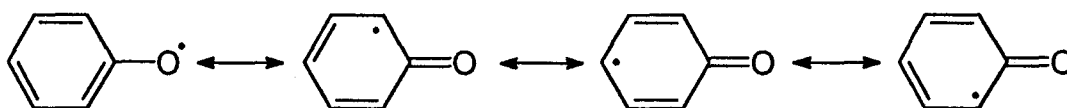


Fig. 2.2.3 : Stabilisation de radical par mésomérie.

Cette stabilisation s'explique d'un point de vue orbitalaire de la même façon que dans le cas de l'hyperconjugaison. Cependant, les interactions sont ici plus importantes car les orbitales π sont plus énergétiques et plus nombreuses. Cette stabilisation est encore possible avec le doublet libre d'un hétéroatome, notamment avec l'oxygène et l'azote [Fossey J. *et al.*, 1993].

2.2.1.3. Action de l'hybridation.

La déstabilisation d'un radical croît avec le caractère s de l'orbitale. Ainsi, un radical de type σ est moins stable qu'un radical de type π , où l'électron célibataire est porté par une orbitale de type p pure. Le rôle joué par l'hybridation permet donc de déterminer l'ordre de stabilité exprimé dans la figure 2.2.4 [Fossey J. *et al.*, 1993].

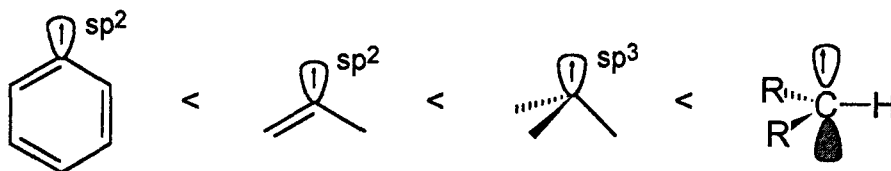


Fig. 2.2.4 : Influence de l'hybridation sur la stabilisation d'un radical.

2.2.1.4. Stabilisation cinétique.

La stabilité d'un radical peut être la conséquence d'une gêne stérique. En effet, un encombrement élevé autour du centre portant le radical va fortement diminuer sa réactivité vis-à-vis d'une autre molécule. La durée de vie du radical s'en trouve alors puissamment

augmentée, si bien que ce dernier en devient persistant et même observable à l'aide des méthodes spectroscopiques habituelles.

Ainsi, le radical 2,4,6-*tert*-butylphényle (Fig. 2.2.5) possède un temps de demi-vie de l'ordre de 0,1s alors qu'il est déstabilisé d'un point de vue énergétique (comme le radical phényle). De même, la stabilité du radical triphénylméthyle est la conséquence d'un effet stérique plutôt que d'un effet de conjugaison. En effet, les cycles aromatiques ne sont pas coplanaires, mais sont répartis dans l'espace sous forme d'une hélice [Fossey J. *et al.*, 1993].

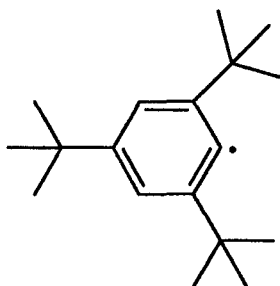


Fig. 2.2.5 : Structure du radical persistant 2,4,6-*tert*-butylphényle.

2.2.1.5. Effet capto-datif.

Lorsque le groupe portant un radical possède deux substituants, la stabilisation apportée par ces deux derniers n'est pas strictement additive. Si les deux groupements possèdent le même caractère (tous deux électro-donneurs ou tous deux électro-attracteurs), la stabilisation énergétique résultante est inférieure à la somme des stabilisations respectives apportées par chacun des groupements seuls.

Par contre, lorsque le premier substituant est donneur - appelons le d - et l'autre attracteur - appelons le c - la stabilisation énergétique obtenue est supérieure à la somme des stabilisations apportées par chacun des groupements. Cet effet de synergie est encore appelé **effet capto-datif** (Fig. 2.2.6) [Viehe H.G. *et al.*, 1979; Viehe H.G *et al.*, 1985].

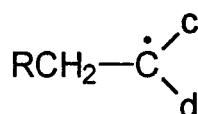


Fig. 2.2.6 : Disubstitution capto-dative d'un radical.

L'effet capto-datif peut être expliqué par un raisonnement orbitalaire. Rappelons d'abord qu'en terme d'orbitales frontières, l'interaction (et donc la stabilisation de l'orbitale d'énergie la plus faible) entre deux orbitales est d'autant plus importante que les énergies des orbitales initiales sont proches.

Partons du principe général que les énergies des orbitales frontières LUMO A (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) du groupement attracteur, HOMO D (Highest Occupied Molecular Orbital) du groupement donneur et SOMO (Singly Occupied Molecular Orbital) du radical sont dans l'ordre suivant :

$$\text{LUMO A} > \text{SOMO} > \text{HOMO D}$$

Nous voyons sur la figure 2.2.7 que l'interaction entre l'orbitale du radical $\text{CH}_3^\bullet$ (pris en exemple) et l'HOMO du groupement donneur entraîne une stabilisation de celle-ci (Ψ_1) et une légère déstabilisation de l'orbitale radicalaire (Ψ_2 , Fig. 2.2.7A). Cependant, cette déstabilisation rapproche l'énergie de la SOMO du radical de celle de la LUMO du groupement attracteur (Fig. 2.2.7B), de sorte que la stabilisation résultante est beaucoup plus importante pour le radical $\text{CH}_2\text{AD}^\bullet$ que pour le radical $\text{CH}_2\text{A}^\bullet$ (Fig. 2.2.7B et 2.2.7C). Cette stabilisation permet en outre de compenser largement la légère déstabilisation évoquée précédemment et résultant de l'interaction entre la SOMO initiale et l'HOMO du groupement attracteur.

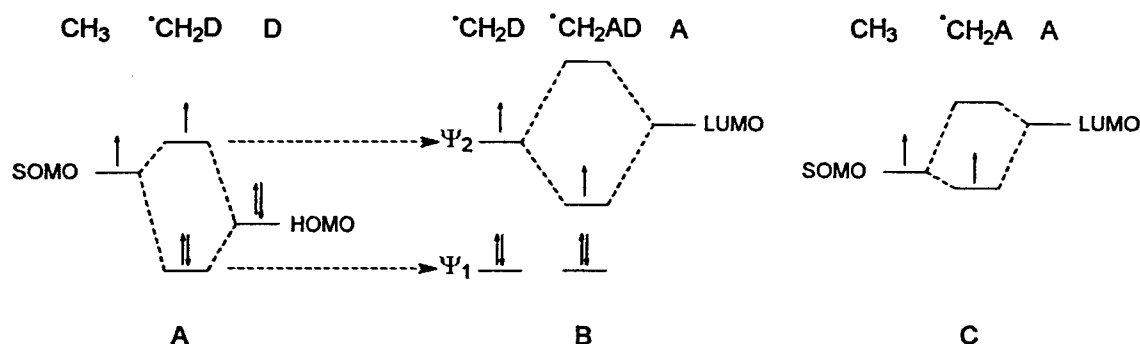
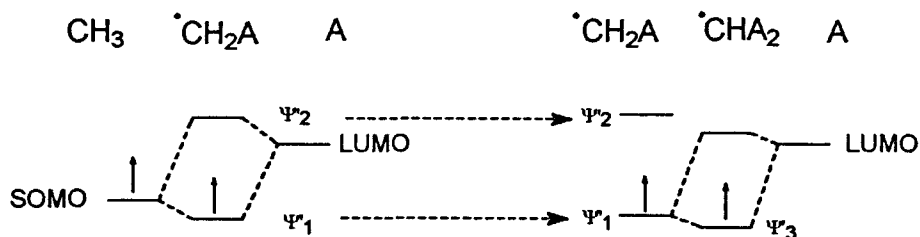


Fig. 2.2.7 : Stabilisation d'un radical par effet capto-datif.

Bien entendu, cette explication est encore valable si l'on prend comme point de départ du raisonnement l'interaction entre la LUMO du groupement attracteur et la SOMO du radical. En effet, cette interaction va rapprocher l'énergie de la SOMO de celle de l'HOMO du groupement donneur, augmentant par conséquent la stabilisation globale de la molécule lors de l'interaction entre ces deux dernières orbitales (légère déstabilisation de la SOMO compensée par la stabilisation précédente et la forte stabilisation de l'HOMO).



$$E(\Psi'_3) - E(\text{SOMO}) = [E(\Psi'_3) - E(\Psi'_1)] + [E(\Psi'_1) - E(\text{SOMO})] < 2 \times [E(\Psi'_1) - E(\text{SOMO})]$$

Fig. 2.2.8 : Explication orbitalaire de la non-additivité des activités de deux substituants identiques.

Reprenons le cas d'un radical substitué par deux groupements attracteurs. On voit que la stabilisation de la SOMO résultant de l'interaction de cette orbitale avec la LUMO du premier groupement attracteur va éloigner l'énergie de cette SOMO (Ψ'_1) de celle de la LUMO du deuxième groupement attracteur (Fig. 2.2.8). La deuxième stabilisation énergétique sera donc inférieure à la première, expliquant ainsi que la stabilisation globale de la molécule par deux groupements attracteurs est inférieure à la somme des stabilisations provoquées par chacun des groupements attracteurs pris séparément. Un raisonnement presque identique peut être suivi dans le cas d'un radical disubstitué par des groupements donneurs.

2.2.2. Le sujet de l'étude.

Le premier objectif de cette étude est de moduler les substitutions du noyau imidazole de molécules de type 4-mercaptoimidazole (Fig. 2.2.9) de façon à examiner la possibilité d'obtenir des composés aux propriétés antioxydantes supérieures à celles des ovothiols.

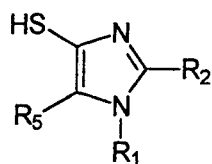


Fig. 2.2.9 : Numérotation des positions du noyau imidazole.

Holler et Hopkins [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990] avaient suggéré que l'électron célibataire pouvant apparaître au cours d'une réaction de piégeage de radicaux libres était en fait délocalisé principalement sur l'atome d'azote de la position 1. Leur raisonnement se basait sur une analogie avec le radical nitroxyde pour lequel l'électron célibataire est principalement délocalisé sur l'azote (Fig. 2.2.10). Les auteurs pensaient qu'une délocalisation identique pouvait être obtenue, et ceci bien que le soufre possédât une électronégativité inférieure à celle de l'oxygène.

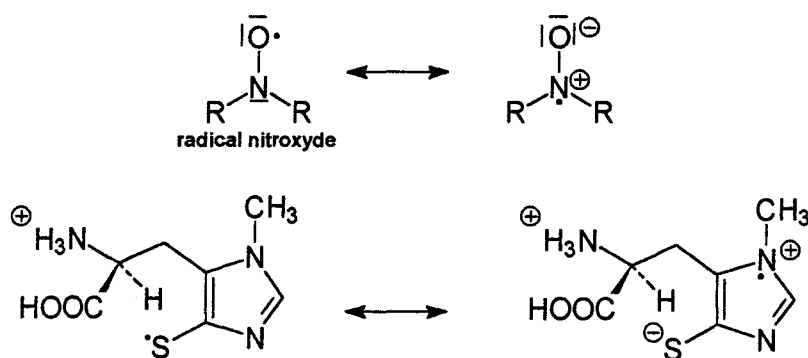


Fig. 2.2.10 : Délocalisation de l'électron célibataire sur l'azote de la position 1
Proposée par Holler et Hopkins [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990].

Il a donc été choisi de synthétiser une série de 4-mercaptoimidazoles en substituant la position 1 du noyau imidazole par un groupement électro-donneur (R_1) et les positions 2 et 5 par des groupements électro-attracteurs (R_2 et R_5) de manière à bénéficier d'un éventuel effet capto-datif sur cette position (Fig. 2.2.11).

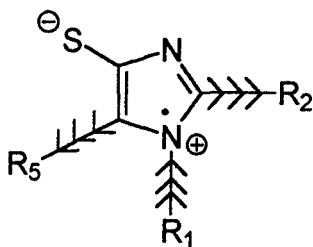


Fig. 2.2.11 : Schématisation de l'effet capto-datif sur l'éventuel radical cation de la position 1.

Suite à leur synthèse (§ 3.1.), une série de tests pouvaient alors nous permettre d'étudier les propriétés antioxydantes de ces composés (§ 3.2. à 3.10).

De telles molécules permettraient d'économiser le glutathion cellulaire et les thiols plasmatiques, leur mécanisme d'action étant proche de celui de la N-acétylcystéine. Elles pourraient trouver, par exemple, une application dans le traitement des ischémies, de l'athérosclérose, des maladies neurodégénératives et du SIDA ainsi que dans les autres pathologies où le stress oxydatif peut jouer un rôle (§ 1.5.).

2.3. Les stratégies de synthèse.

2.3.1. Utilisation d'un cycle imidazolique préexistant.

La première méthode envisageable est d'introduire la fonction thiol en position 4 sur un cycle imidazole préexistant, en déplaçant un brome par un nucléophile soufré tel que le thiophosphate de sodium, selon le schéma réactionnel de la figure 2.3.1 [Bienarz C. and Cornwell M.J., 1993].

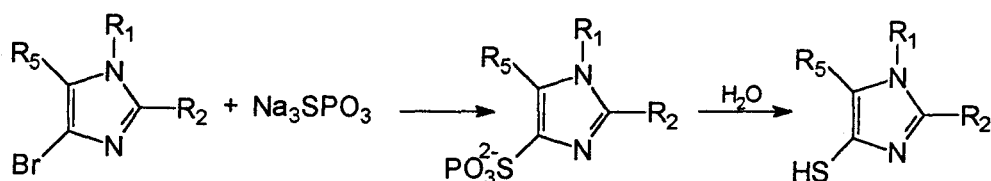


Fig. 2.3.1 : Synthèse par introduction de la fonction thiol.

Pour utiliser cette méthode, il faudrait disposer de dérivés du type 4-bromoimidazole substitués en positions 1, 2 et 5. Considérant, de plus, la non sélectivité de la bromation du noyau imidazole, il a été choisi de ne pas entreprendre cette voie de synthèse.

2.3.2. Condensation d'imines et d' α -oxothioamides.

Afin d'obtenir un noyau imidazole possédant une fonction thiol en position 4 et substitué en 1, 2 et 5, il s'avère nécessaire de construire l'hétérocycle à partir de synthons contenant les substituants adéquats.

Une voie de synthèse respectant ce choix stratégique consiste à former le cycle imidazole en condensant des imines et des α -oxothioamides selon le mécanisme de la figure 2.3.2 [Asinger F. *et al.*, 1966 ; Asinger F. *et al.*, 1971].

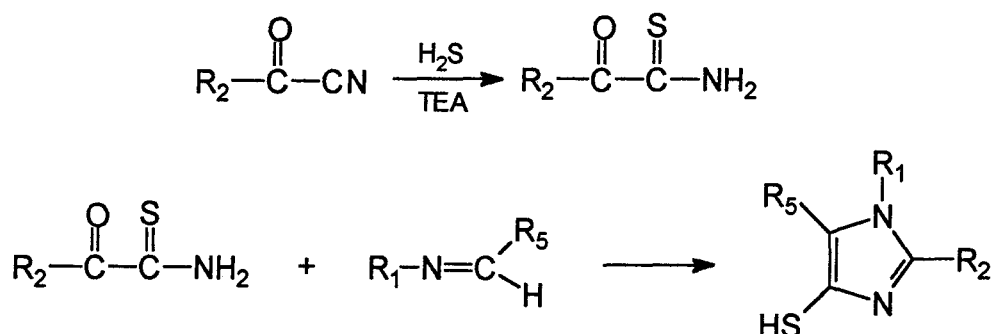


Fig. 2.3.2 : Condensation d'imines et d' α -oxothioamides.

Cependant, cette méthode est défavorisée par de faibles rendements.

2.3.3. Addition sur un isothiocyanate.

Une autre possibilité consiste à provoquer une addition intramoléculaire sur une fonction isothiocyanate (Fig. 2.3.3) [Zyabrev V.S. *et al.*, 1994]. Un rendement de 90% pour l'étape de cyclisation est obtenu lorsque celle-ci se déroule sous l'action du *tert*-butanolate de potassium. L'autre possibilité, à savoir l'action d'un chlorure d'acide aromatique ne présente qu'un rendement de 40%.

Toutefois, cette méthode ne permet pas l'obtention rapide de molécules substituées en positions 1 et 5 par les groupements adéquats.

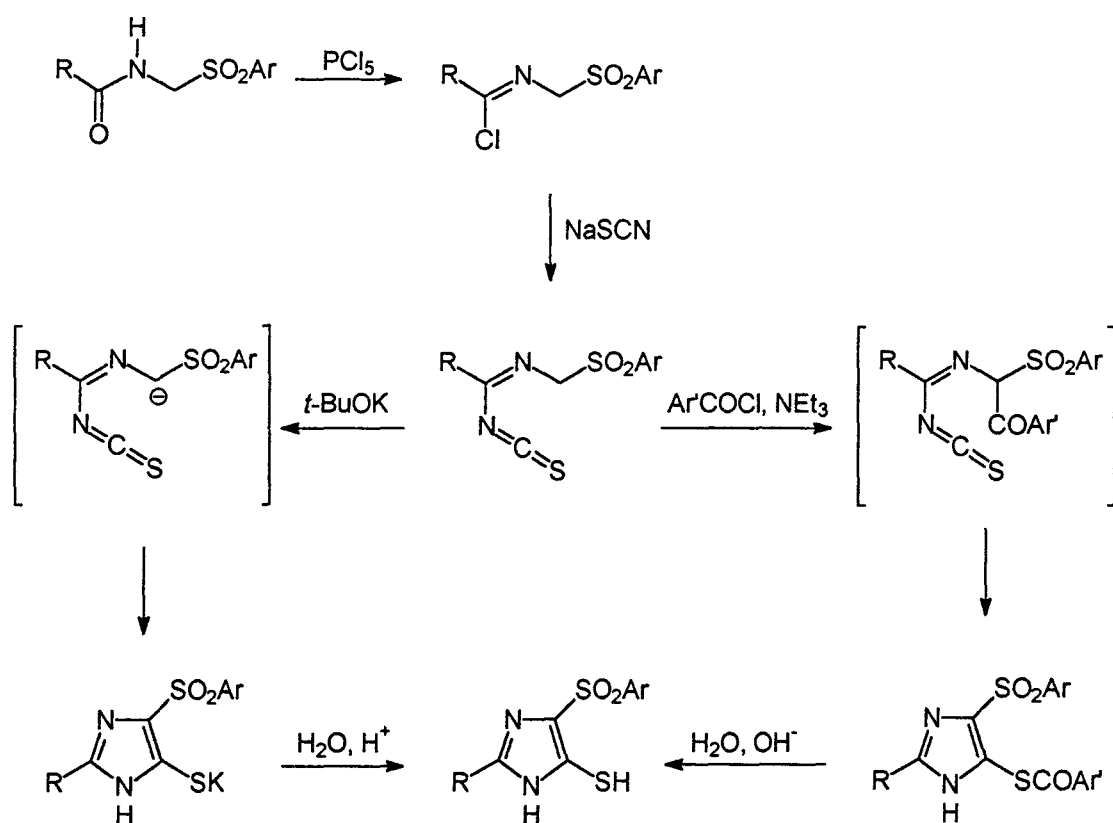


Fig. 2.3.3 : Formation de 4-mercaptoimidazoles par addition sur un isothiocyanate.

2.3.4. Cyclisation de thioacétamides.

Cette voie de synthèse possède plusieurs étapes. Tout d'abord, la condensation de l'aldéhyde R_5CHO et de l'amine R_1NH_2 en présence de cyanure de sodium conduit à la cyanométhylamine **a** (Fig. 2.3.3). Ensuite, le groupe amino est converti en amide, soit par formylation, en utilisant un anhydride mixte formique/éthanoïque, soit en utilisant un chlorure d'acide R_2COCl , conduisant à l'intermédiaire **b**. Le groupe nitrile de ce dernier est alors transformé en fonction thioamide par action de sulfure d'hydrogène pour donner le thioacétamide **c**. Celui-ci est finalement cyclisé à l'aide de silanes (Chlorure de triméthylsilyle

ou trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle) en présence de triéthylamine (TEA) pour donner le 4-mercaptoimidazole souhaité [Spaltenstein A. *et al.*, 1987 ; Holler T.P. *et al.*, 1989].

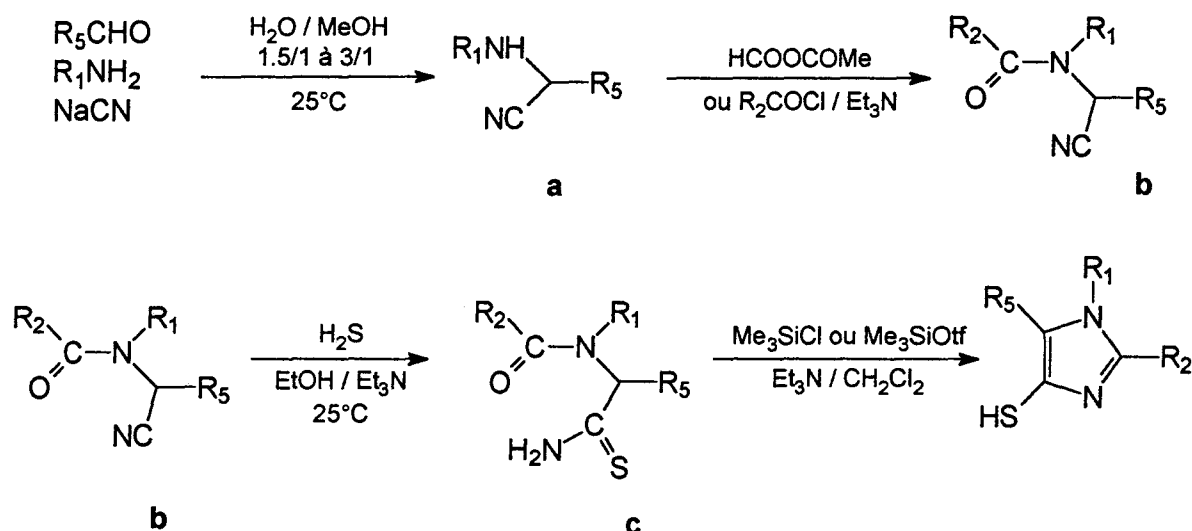


Fig. 2.3.3 : Schéma de synthèse utilisé.

Les rendements des différentes étapes sont quantitatifs ou presque, mis à part la dernière étape qui présente plus de difficultés. Le noyau imidazole totalement substitué est synthétisé en un nombre relativement restreint d'étapes. De plus, les produits de départ, très simples, permettent d'obtenir une grande variété de mercaptoimidazoles. Nous avons donc adopté cette stratégie de synthèse [Zoete V. *et al.*, 1997].

Bibliographie du chapitre 2

- Asinger F., Sans A., Offermanns H. and Hahn H.D., "Darstellung von α -Oxothinamiden und Substituierten Imidazolthionen". *Liebigs Ann. Chem.*, **1966**, 691, 92-103
- Asinger F., Sans A., Offermanns H., Krings P. and Andree H., "Über die Umsetzung von α -Oxothinamiden mit Aldiminen". *Liebigs Ann. Chem.*, **1971**, 744, 51-56
- Bienarz C. and Cornwell M.J., "A Facile High-Yielding Method for Conversion of Halides to Mercaptan". *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34, 939-942
- Derbes M., "Observations sur le Mécanisme et les Phénomènes qui Accompagnent la Formation de l'Embryon Chez l'Oursin Comestible". *Ann. Sci. Nat. Zool.*, **1847**, 8, 80-98
- Epp O., Laddenstein R. and Wendel A., "The Refined Structure of the Seleno-Enzyme Glutathione Peroxidase at 0.2 nm Resolution". *Eur. J. Biochem.*, **1983**, 133, 51-69
- Foerder D. and Shapiro B.M., "Release of Ovoperoxidase from Sea Urching Eggs Hardens the Fertilization Membrane with Tyrosine Crosslinks". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 4214-4218
- Fossey J., Lefort D. and Sorba J., "Les Radicaux Libres en Chimie Organique". Masson Ed. (1993)
- Hall H.B., "Hardening of the Sea Urchin Fertilization Envelope by Peroxidase-Catalyzed Phenolic Coupling of Tyrosines". *Cell*, **1978**, 15, 243-255
- Holler T.P. and Hopkins P.B., "A Qualitative Fluorescence-Based Assay for Tyrosyl Radical Scavenging Activity: Ovothiol A Is an Efficient Scavenger". *Anal. Biochem.*, **1990a**, 180, 326-330
- Holler T.P. and Hopkins P.B., "Ovothiol as Free Radical Scavengers and the Mechanism of Ovothiol-Promoted NADP(H)-O₂ Oxidoreductase Activity". *Biochemistry*, **1990b**, 29, 1953-1961
- Holler T.P. and Hopkins P.B., "Ovothiols as Biological Antioxidants. The Thiol Groups of Ovothiol and Glutathione Are Chemically Distinct". *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4837-4838
- Holler T.P. and Hopkins P.B., "Ovothiols". *Methods in Enzymol.*, **1995**, 252, 115-123
- Holler T.P., Ruan F., Spaltenstein A. and Hopkins P.B., "Total Synthesis of Marine Mercaptohistidines: Ovothiols A, B and C". *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4570-4575

- Holler T.P., Ruan F., Spaltenstein A. and Hopkins P.B., "Total Synthesis of Marine Mercaptohistidines : Ovothiol A,B and C". *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 4570-4575
- Ito S., Nardi G. and Prota G., "Structures of Adenochromines A and B, the Iron (III) Binding Amino-acids of a Unique Group of Peptides, Adenochromes from *Octopus vulgaris*". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1976**, 1042-1043
- Ito S., Nardi G., Palumbo A. and Prota G., "Isolation and Characterization of Adenochrome, a Unique Iron (III) Binding Peptide from *Octopus vulgaris*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1979**, 2617-2623
- Karplus M. and Porter R.N., in "Atomes & Molecules: An Introduction for Students of Physical Chemistry". Benjamin/Cummings Publishing Company (1970)
- Marjanovic B., Simic M.G. and Jovanovic S.V., "Heterocyclic Thiols as Antioxidants: Why Ovothiol C is a Better Antioxidant than Ergothioneine", *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 679-685
- Pathirana C. and Andersen R.J., "Imbricatine, an Unusual Benzyltetrahydroisoquinoline Alkaloid Isolated from the Starfish *Dermasterias imbricata*". *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 8288-8289
- Shapiro B.M. and Hopkins P.B., "Ovothiols: Biological and Chemical Perspectives". *Adv. Enzymol. And Rel. Areas Molec. Biol.*, **1991**, *64*, 291-316.
- Shapiro B.M. and Turner E., "Oxidative Stress and the Role of Novel Thiol Compounds at Fertilization". *Biofactors*, **1988**, *1*, 85-88
- Shapiro B.M., "The Control of Oxidant Stress at Fertilization". *Science*, **1991**, *252*, 533-536
- Spaltenstein A., Holler T.P. and Hopkins P.B., "A New Synthesis of 4- and 5-Imidazolethiols". *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 2977-2979
- Spies H.S.C. and Steenkamp D.J., "Thiols of Intracellular Pathogens. Identification of Ovothiol A in *Leishmania donovani* and Structural Analysis of a Novel Thiol from *Mycobacterium bovis*". *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *224*, 203-213
- Steenkamp D.J. and Spies H.S.C., "Identification of a Major Low-Molecular-Mass Thiol of the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata* as Ovothiol A. Facile Isolation and Structural Analysis of the Bimane Derivative". *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *223*, 43-50
- Steenkamp D.J., Weldrick D. and Spies H.S.C., "Studies on the Biosynthesis of Ovothiol A. Identification of 4-Mercaptohistidine as an Intermediate". *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *242*, 557-566

Turner E., Hager L.J. and Shapiro B.M., "Ovothiol Replaces Glutathione Peroxidase as an H_2O_2 Scavenger in Sea Urchin Eggs". *Science*, **1988**, *242*, 939-941

Turner E., Klevit R., Hager L.J. and Shapiro B.M., "Ovothiols: A Family of Redox-Active Thiohistidine Compounds from Marine Invertebrate Eggs". *Biochemistry*, **1987**, *26*, 4028-4036

Turner E., Klevit R., Hopkins P.B. and Shapiro B.M., "Ovothiol: A Novel Thiohistidine Compound from Sea Urchin Eggs that Confers NAD(P)H- O_2 Oxidoreductase Activity on Ovoperoxidase". *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 13056-13063

Turner E., Somers C.E. and Shapiro B.M., "The Relationship Between a Novel NAD(P)H Oxidase Activity of Ovoperoxidase and the CN⁻-Resistant Respiratory Burst that Follows Fertilization of Sea Urchin Eggs". *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 13163-13171

Viehe H.G., Janousek Z., Merényi R. and Stella L., "The Captodative Effect". *Acc. Chem. Res.*, **1985**, *18*, 148-154

Viehe H.G., Merényi R., Stella L. and Janousek Z., "Capto-dative Substituents Effects in Syntheses with Radicals and Radicophiles". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1979**, *18*, 917-932

Weaver K.H. and Rabenstein D.L., "Thiol/Disulfide Exchange Reactions of Ovothiol A with Glutathione". *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1904-1907

Zoete V., Bailly F., Catteau J.-P. and Bernier J.-L., "Design, Synthesis and Antioxidant Properties of Ovothiol-Derived 4-Mercaptoimidazoles". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 2983-2988

Zyabrev V.S., Kiselev V.V., Romanenko E.O. and Drach B.S., "Synthesis of 5-Mercaptoimidazole Derivatives on Basis of N-Arylsulfonylmethimidoyl Isothiocyanates". *Zh. Org. Khim.*, **1994**, *5*, 715-719

3. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

3.1. La synthèse.

Cette partie a pour but d'expliciter les réactions utilisées dans la synthèse des 4-mercaptoimidazoles, et de décrire brièvement les différentes étapes préparatoires. Les modes opératoires complets ainsi que les analyses des composés obtenus sont disponibles au chapitre 4.

3.1.1. Première étape : synthèse de cyanométhylamines.

La première étape du schéma de synthèse utilisé n'est autre que la synthèse de Strecker, encore employée pour l'obtention d'acide aminés.

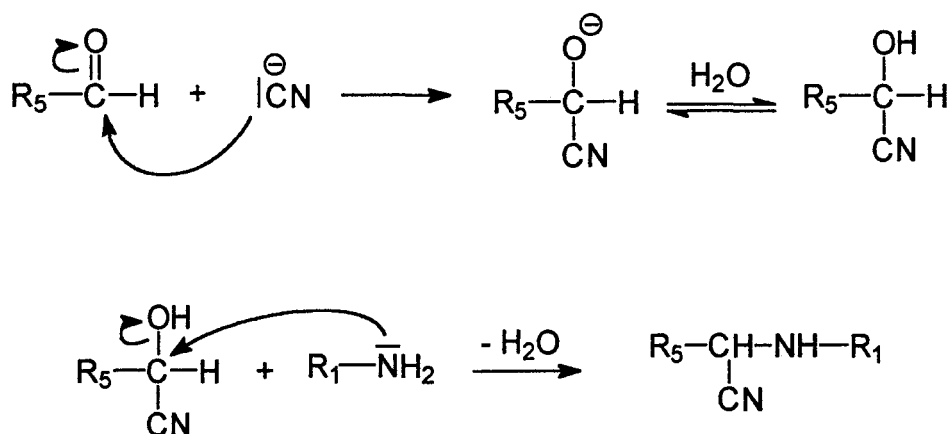


Fig. 3.1.1 : La synthèse de Strecker.

Cette étape donne de très bons résultats, avec des rendements allant jusqu'à 95%. Pour avoir la conversion la plus importante possible il est souhaitable d'utiliser 1.2 équivalents d'amine et de cyanure par équivalent d'aldéhyde.

La seule petite difficulté consiste à accorder les solubilités des différents réactifs. En effet, les benzaldéhydes nécessaires à la synthèse des molécules substituées en position 5, à savoir le 4-méthoxybenzaldéhyde, les 2- et 4-chlorobenzaldéhydes et le 2-trifluorométhylbenzaldéhyde, sont insolubles dans l'eau. Or la méthylamine et surtout le cyanure de sodium ou de potassium sont peu solubles dans le méthanol. Les proportions de ces deux solvants doivent donc être ajustées de façon à ce que tous les produits mis en oeuvre soient en solution et qu'ils puissent ainsi réagir correctement. Pour augmenter la conversion et la vitesse de réaction, il est conseillé de mener celle-ci à une température comprise entre 30 et 40°C [Dyke S.F. *et al.*, 1975].

3.1.2. Deuxième étape.

La deuxième étape consiste en la réaction de l'amine formée précédemment avec un anhydride mixte (formylation) ou un chlorure d'acide, de façon à former l'amide correspondante.

3.1.2.1. La formylation.

Cette synthèse donne aussi de très bons rendements (jusqu'à 98%).

La formylation se produit à partir de l'anhydride mixte d'acide acétique et d'acide formique. Ce dernier est obtenu en mélangeant un large excès (jusqu'à 20 à 25 équivalents par rapport à la cyanoamine) d'acide formique et d'anhydride acétique (§ 4.2. à 4.5. et § 4.11. à 4.15.).

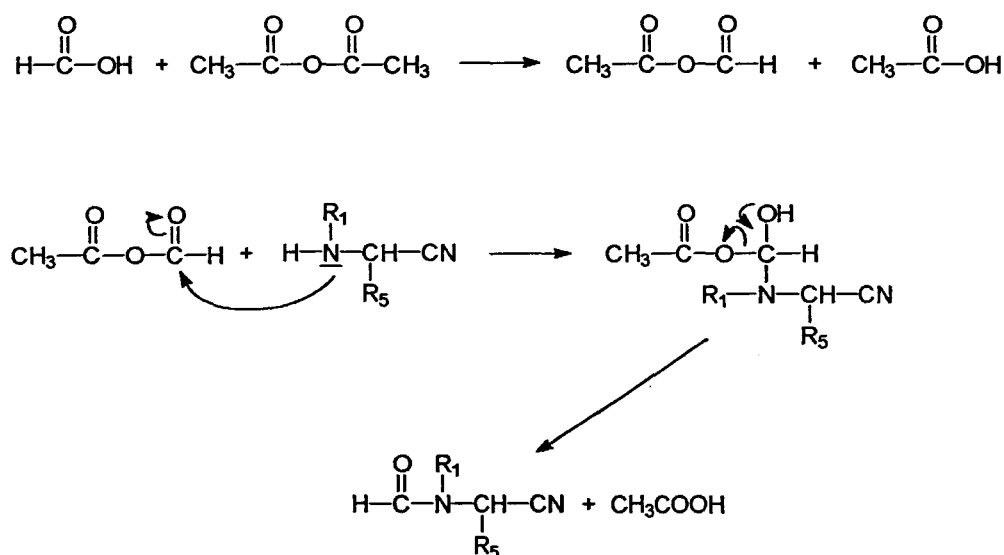


Fig. 3.1.2 : La formylation.

L'ajout de l'anhydride et de l'acide se déroule à 0°C. Cependant, pour que la formation de l'anhydride mixte soit optimale, il est préférable de chauffer le mélange à une température de l'ordre de 55°C à 60°C pendant 15 minutes. Toutefois, il est nécessaire de ne pas dépasser cette température de façon à ne pas détruire l'anhydride obtenu. On refroidit alors à nouveau ce mélange à 0°C afin d'ajouter la cyanoamine (Fig. 3.1.2). Cette amélioration du mode opératoire a pu être appliquée lors de la synthèse des intermédiaires des molécules substituées en position 5 du noyau imidazole, les dernières à avoir été synthétisées (§4.11 à 4.14).

3.1.2.2. Réaction avec un chlorure d'acide ou un anhydride d'acide.

Cette étape doit remplacer la formylation qui vient d'être décrite à chaque fois que l'on veut obtenir un imidazole substitué en position 2.

Lorsque l'on veut faire réagir un chlorure d'acide benzoïque avec le (méthylamino)acétonitrile (§ 4.6. à 4.10.), on ajoute un équivalent de chlorure d'acide et de TEA (Triéthylamine - dissous dans du chloroforme) à un équivalent de (méthylamino)-acétonitrile et de TEA eux-mêmes dissous dans du chloroforme, à 0°C. La réaction est rapide et offre des rendements de plus de 90%.

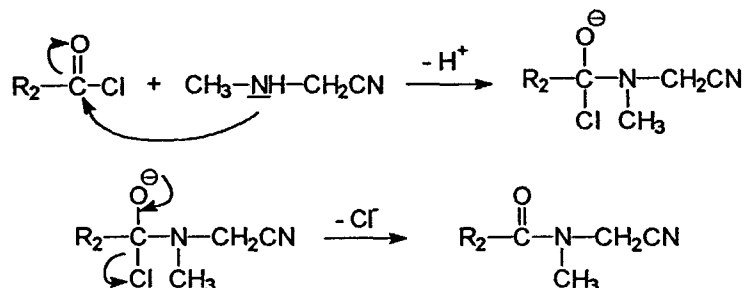


Fig. 3.1.3 : Réaction du (méthylamino)acétonitrile avec un chlorure d'acide.

Par contre, lorsque l'on veut obtenir l'amide de l'acide trifluoroacétique (§ 4.15.), on commence d'abord par dissoudre la cyanoamine (synthétisée selon le mode opératoire du paragraphe 3.1.1.) dans le solvant en présence de trois équivalents de TEA. On refroidit ensuite cette solution à 0°C avant d'ajouter l'anhydride trifluoroacétique. Le rendement est ici plus faible (de l'ordre de 70%).

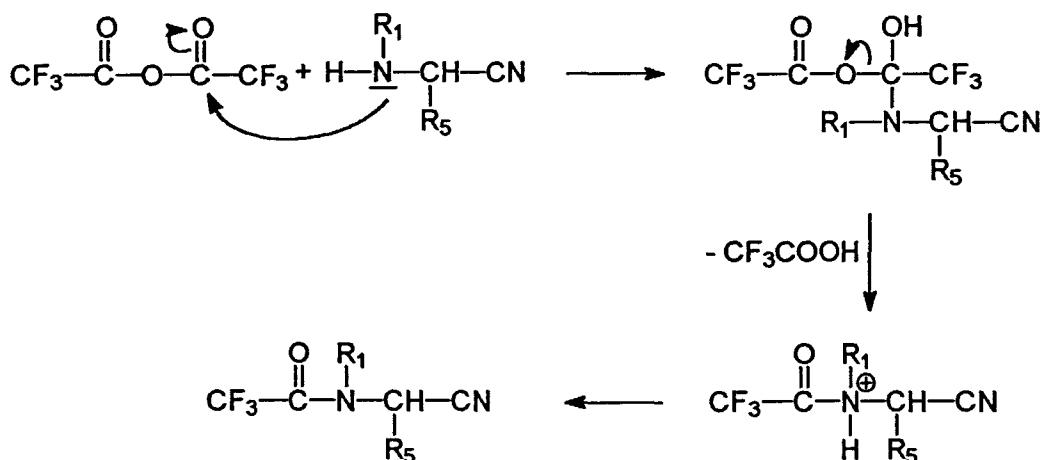


Fig. 3.1.4 : Réaction de l'anhydride trifluoroacétique avec la cyanométhylamine.

3.1.3. Troisième étape : traitement par le sulfure d'hydrogène.

Cette étape consiste en la conversion de la fonction nitrile en thioamide. Ceci se déroule très simplement en faisant passer un courant de sulfure d'hydrogène, H_2S , dans une solution éthanolique ou méthanolique de TEA (5 à 10 équivalents) et de la molécule obtenue à l'étape précédente.

Cette réaction est quantitative dans la plupart des cas. Le thioacétamide peut être purifié par cristallisation dans le chloroforme. Si cette voie de purification s'avère impossible

(§ 4.2.15), il est nécessaire de réaliser une chromatographie flash afin d'obtenir un produit sous la forme la plus pure possible avant la dernière étape.

3.1.4. Dernière étape : la cyclisation.

Cette étape est la moins reproductible de cette voie de synthèse. Pour la réaliser, le thioacétamide est dissous dans du dichlorométhane (distillé sous argon en présence de CaH_2), et de TEA (6 équivalents, distillée sous argon en présence de CaH_2). La solution ainsi obtenue doit être de concentration 0.1 mol/l en thioacétamide. Le mélange est refroidi à -5°C ou -10°C selon les cas. On ajoute alors, sous courant d'argon, 4 équivalents de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (Me_3SiOTf).

Ce réactif est capable de provoquer la formation d'un silyl-énol à partir d'un groupement carbonyle, aussi nous pensons que, dans le cas présent, ce dernier active le groupement thioamide sous la forme d'un groupement imine-thiolate (Fig. 3.1.6).

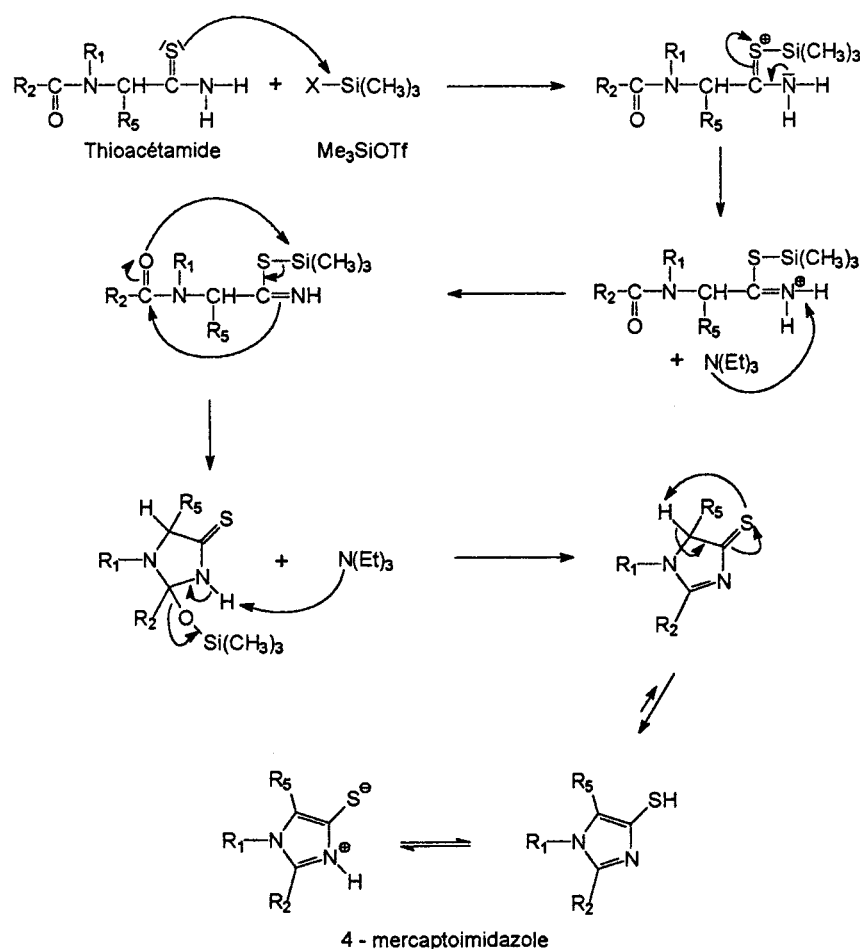


Fig. 3.1.6 : Mécanisme probable de l'étape de cyclisation.

Cette étape est très peu reproductible et dépend fortement de l'état de pureté du silane. Il va sans dire que cette réaction doit se dérouler dans des conditions parfaitement anhydres. Il

est aussi préférable de dégazer la solution au préalable afin d'éviter l'oxydation du 4-mercaptoimidazole formé. Les rendements vont de 13% à 63%.

Il n'est pas rare d'obtenir l'imidazole sous forme oxydée, notamment pour les composés les plus actifs lors des tests d'activité de piégeage de radicaux libres. Le dimère peut se former pendant la réaction si le solvant n'a pas été suffisamment dégazé et qu'il subsiste des traces d'oxygène, ou bien encore lors de l'élimination *in vacuo* du solvant, surtout si la température du bain marie est élevée.

3.1.5. Conservation des produits synthétisés.

Le dimère, produit d'oxydation, peut très facilement être obtenu dans certains cas. Il suffit par exemple d'agiter le 4-mercaptoimidazole à température ambiante et à l'air libre dans du méthanol. Pour les composés les plus oxydables, la réaction est totale au bout de 15 minutes (Fig. 3.1.7). En phase solide, à température ambiante et à l'air libre, cette oxydation peut se produire en seulement quelques jours à quelques semaines.

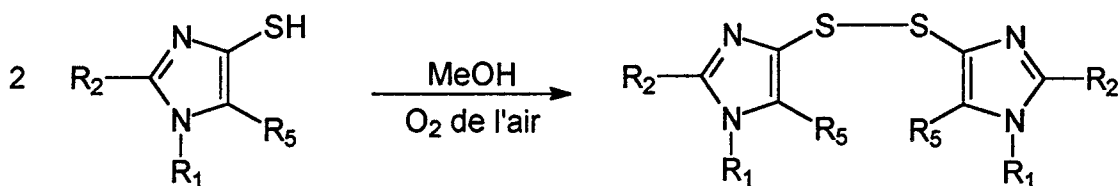


Fig. 3.1.7 : Oxydation des 4-mercaptoimidazoles.

Les 4-mercaptoimidazoles peuvent toutefois être conservés sous forme réduite pendant plusieurs mois dans un dessiccateur sous vide.

3.2. Mesure des différentes constantes d'acidité.

3.2.1. But et méthode.

Dans le cadre de cette étude il est utile de déterminer les constantes d'acidité des 4-mercaptoimidazoles synthétisés. En effet, comme nous l'avons vu dans le paragraphe concernant les propriétés de l'ovothiol, il est fondamental que la fonction thiol de la molécule soit sous la forme thiolate au pH physiologique afin de conserver l'activité glutathion peroxydase.

La molécule possède deux protons acides : celui présent sur l'atome d'azote 3 du noyau imidazole en milieu acide à neutre et celui présent sur le soufre à pH acide. Le composé présentera donc deux acidités lors de tout titrage pH-métrique. Cependant, ces deux acidités macroscopiques (mesurées), pK_{a1} et pK_{a2} , sont représentatives de quatre acidités microscopiques pK_1 , pK_2 , pK_{Im} et pK_{SH} (Fig. 2.1.5).

Les constantes mesurées dépendent des constantes microscopiques selon les deux formules suivantes :

$$Ka_1 = K_1 + K_{Im} \quad (1)$$

et

$$\frac{1}{Ka_2} = \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_{SH}} \quad (2)$$

Cependant, selon l'étude menée par Holler et Hopkins, on a :

$$\begin{array}{lll} K_1 \gg K_{Im} & \text{Donc} & Ka_1 \approx K_1 \\ K_{SH} \gg K_2 & \text{Donc} & Ka_2 \approx K_2 \end{array}$$

On peut donc considérer que les pK_a mesurés, pK_{a1} et pK_{a2} , sont identiques aux pK_a microscopiques respectifs pK_1 et pK_2 (Fig. 3.2.1) [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1988].

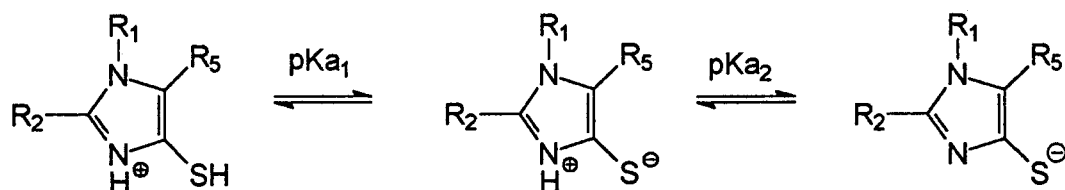


Fig. 3.2.1 : Les constantes d'acidité des 4-mercaptoimidazoles.

Les molécules obtenues étant extrêmement peu solubles dans l'eau, il a été choisi de mesurer leurs constantes d'acidité dans une solution comprenant 10% d'éthanol et 90% d'eau en volume. Les pK_a obtenus ne représentent donc que des valeurs approchées des constantes d'acidité en solution aqueuse.

Pour mesurer les constantes d'acidité, une méthode spectroscopique fut utilisée. Celle-ci repose sur le fait que les différentes formes du 4-mercaptoimidazole possèdent des répartitions électroniques distinctes selon le pH, entraînant une variation du spectre UV.

Ainsi, si l'on a :

C	Concentration totale en soluté
ϵ_{AH}	Coefficient d'extinction molaire de l'espèce AH
ϵ_{A^-}	Coefficient d'extinction molaire de l'espèce A^-
$[AH]$	Concentration à l'équilibre de AH
$[A^-]$	Concentration à l'équilibre de A^-



alors l'absorbance A s'écrit : $A = \epsilon_{AH}[AH] + \epsilon_{A^-}[A^-]$

Si l'on suppose maintenant, pour fixer les idées, que $\epsilon_{AH} < \epsilon_{A^-}$, alors, pour un pH proche du pK_a , l'absorbance sera comprise entre les valeurs limites :

$$A_{\max} = \epsilon_{A^-}C \text{ et } A_{\min} = \epsilon_{AH}C$$

Pour des concentrations faibles en soluté nous permettant de négliger le coefficient d'activité, ce qui est le cas ici, il est possible d'écrire :

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right)$$

d'où l'on déduit :

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A}\right)$$

Cette équation est connue sous le nom d'équation de Henderson-Hasselbach [Perkampus H.H., 1992].

On pourra négliger ici la force ionique de la solution. En effet, si on en tenait compte, on obtiendrait :

$$K_a = \frac{a_{H^+} \times a_{A^-}}{a_{AH}} = \frac{m_{H^+} \times m_{A^-}}{m_{AH}} \times \frac{\gamma_{H^+} \times \gamma_{A^-}}{\gamma_{AH}}$$

où m est une molalité et γ le coefficient d'activité.

Il viendrait alors :

$$pKa = pH - \log\left(\frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A}\right) - \log(\gamma_{\pm})$$

avec :

$$-\log(\gamma_{\pm}) = 0.5092 \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.2 \times I$$

et :

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \quad \text{est la force ionique}$$

On voit sur la figure ci-contre que si l'on fixe une force ionique supérieure à une mole par litre à l'aide de NaClO_4 , comme c'est le cas dans notre mode opératoire, l'influence de celle-ci sur la valeur du pKa sera négligeable. En effet, l'erreur expérimentale est plus grande que la valeur calculée de $\log(\gamma)$ (de l'ordre de 0.05 pour $I=1$ mol/l)

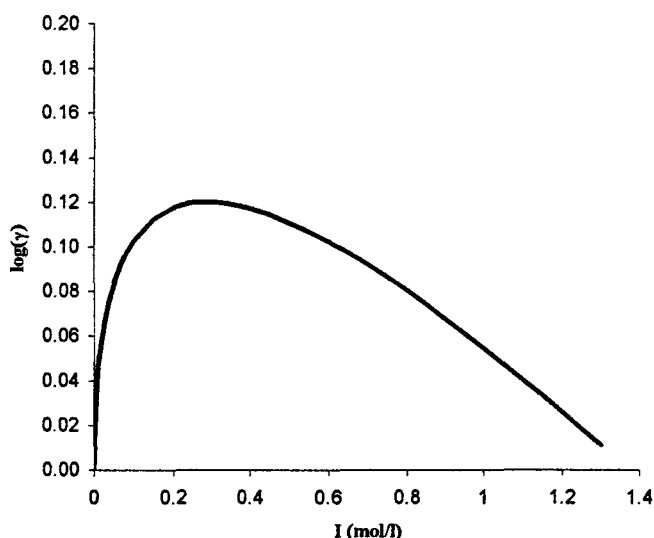


Fig. 3.2.2 : Evolution de $\log(\gamma)$ en fonction de la force ionique.

Ainsi, en prenant la valeur de l'absorbance d'une solution de 4-mercaptoimidazole de concentration constante (ici 10^{-4} molaire) pour différentes valeurs du pH, il est possible de déterminer les constantes d'acidité.

Le traitement mathématique le plus utilisé pour déterminer les constantes d'acidité à l'aide de l'équation de Henderson-Hasselbach consiste à déterminer $A_{\max}$ et $A_{\min}$ aux pH extrêmes (palier de la courbe pH/absorbance) et d'appliquer l'équation pour une valeur de pH où la courbe présente son point d'inflexion. Cependant, il nous était impossible d'appliquer cette méthode car la présence de deux acidités empêche l'existence d'un palier bien défini.

Nous avons donc choisi de tracer la dérivée seconde de l'absorbance en fonction du pH après avoir démontré que cette courbe coupe l'axe des abscisses pour $pH=pKa$ (ce qui revient à dire que la courbe absorbance/pH de même que la courbe pH/absorbance admettent un point d'inflexion pour $pH=pKa$). Bien que nous n'ayons pas trouvé trace de cette méthode mathématique dans la littérature dans le cadre de l'utilisation de l'équation d'Henderson-Hasselbach, celle-ci est souvent utilisée pour d'autres méthodes de dosage et est, de plus, totalement justifiée par la démonstration suivante :

$$pH = pKa + \log\left(\frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A}\right) = pKa + \log(A - A_{\min}) - \log(A_{\max} - A)$$

$$\Rightarrow \frac{dpH}{dA} = \left(\frac{1}{A - A_{\min}} + \frac{1}{A_{\max} - A}\right) \times \frac{1}{2.3}$$

Le point d'inflexion de la courbe se caractérise par une dérivée seconde nulle, soit :

$$\Rightarrow \frac{d^2 pH}{dA^2} = \left(-\frac{1}{(A - A_{\min})^2} + \frac{1}{(A_{\max} - A)^2}\right) \times \frac{1}{2.3} = 0$$

$$\Rightarrow (A_{\max} - A)^2 = (A - A_{\min})^2$$

et comme les deux termes sont du même signe $\Rightarrow A_{\max} - A = A - A_{\min}$

$$A \neq A_{\max} \Rightarrow \frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A} = 1 \quad \text{et donc} \quad \log\left(\frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A}\right) = 0$$

$$\Rightarrow pH = pKa$$

On suit donc l'évolution du spectre d'absorption du 4-mercaptoimidazole en fonction du pH (Fig. 3.2.3). On choisit ensuite, si possible, la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance varie le plus en fonction du pH (aux alentours de 250 nm pour la fonction thiol). Il faut faire très attention à choisir une concentration et une longueur d'onde telles que l'absorbance soit la plus élevée possible tout en restant dans la zone de linéarité du spectromètre, de façon à ce que la loi de Beer-Lambert soit applicable. Ainsi, dans l'exemple du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, **5**, on choisira de suivre la variation d'absorbance à 260 nm (§ 4.6.).

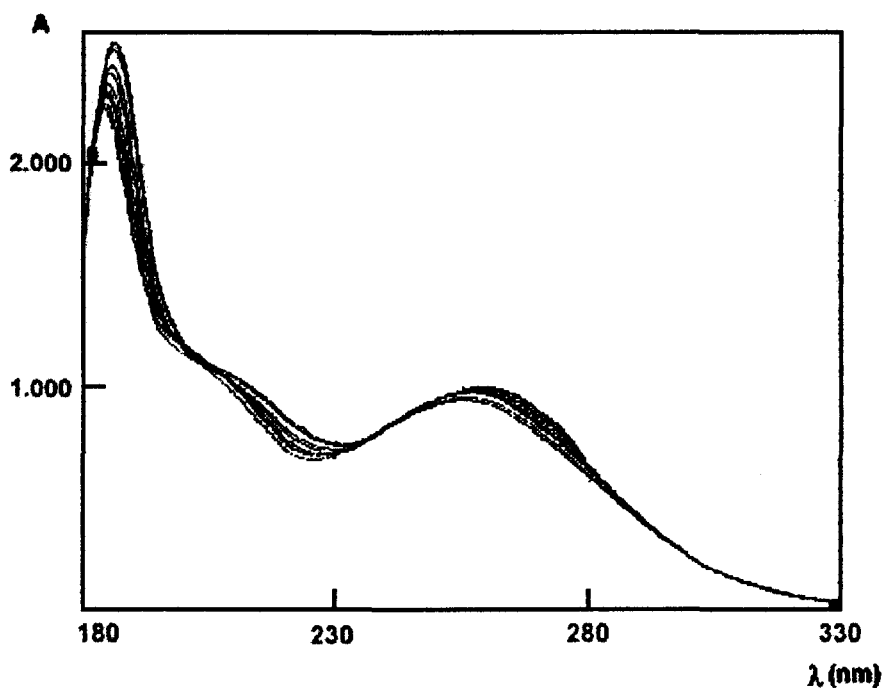


Fig. 3.2.3 : Variation du spectre d'absorption du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 5, en fonction du pH. (pH=1.5 à 3.0).

On peut alors tracer l'évolution de l'absorbance du 4-mercaptoimidazole à cette longueur d'onde lorsque le pH varie (Fig. 3.2.3)

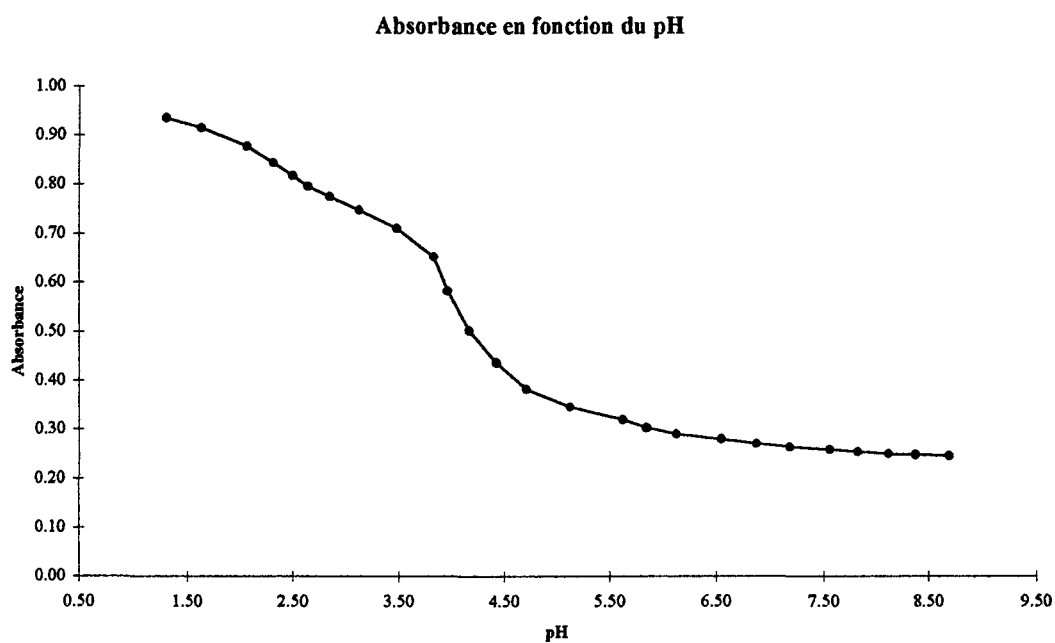


Fig. 3.2.4 : Courbe de variation de l'absorbance à 260 nm du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 5, en fonction du pH.

Comme nous l'avons démontré, la dérivée seconde de la courbe absorbance/pH montrée à la figure 3.2.4 va couper l'axe des abscisses pour $\text{pH}=\text{pK}_a$ (Fig. 3.2.5).

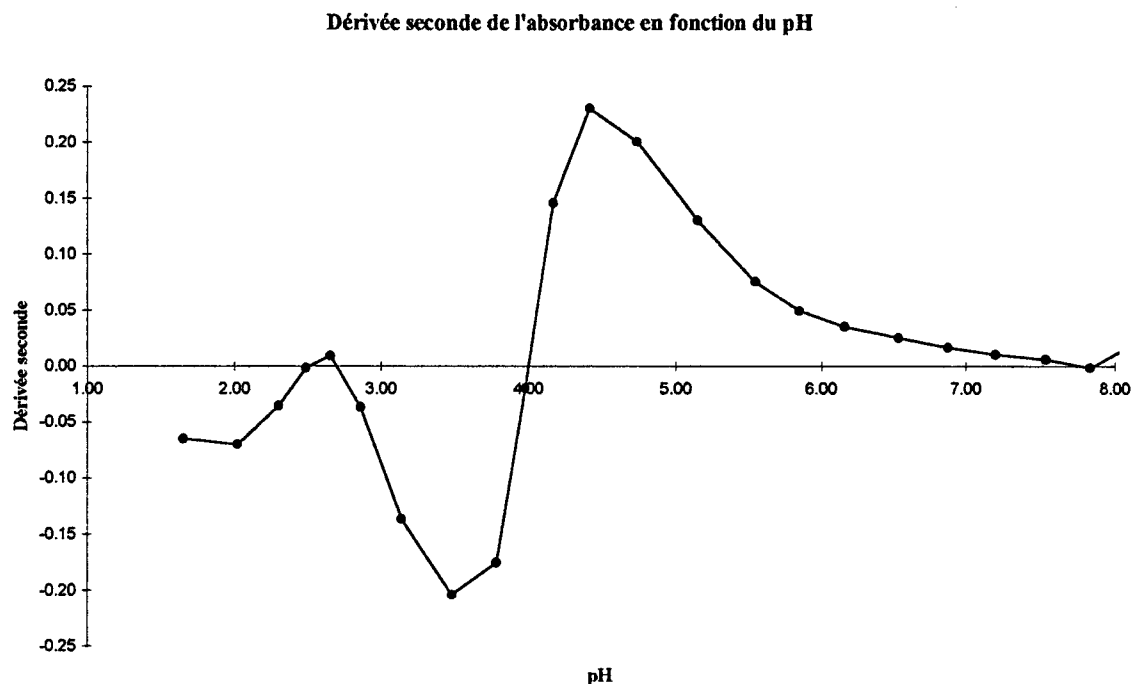


Fig. 3.2.5 : Dérivée seconde de l'absorbance à 260 nm du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, **5**, en fonction du pH.

Comme on peut le voir, cette méthode permet de déterminer facilement les pKa des protons acides de nos molécules. De plus, elle ne nécessite aucune hypothèse sur la valeur de la concentration du composé. Enfin, cette méthode se libère de la contingence présentée par le traitement mathématique habituel, à savoir que la courbe absorbance/pH n'est pas obligée de présenter des paliers de valeur constante de l'absorbance pour $\text{pH} < \text{pKa} - 2$ et $\text{pH} > \text{pKa} + 2$.

Les 4-mercaptoimidazoles étudiés étant très peu solubles dans l'eau, il nous a été impossible de mesurer leurs constantes d'acidité dans ce solvant seul. Aussi, les différents spectres UV ont dû être établis dans un mélange eau/éthanol 9:1, système qui possède des propriétés proches de celles de l'eau pure concernant les constantes de dissociation des acides et des bases.

3.2.2. Mode opératoire.

3.2.2.1. Solubilisation des 4-mercaptoimidazoles.

Etant donnée leur forte lipophilie, il est impossible de solubiliser facilement dans l'eau pure les 4-mercaptoimidazoles testés. Il est donc nécessaire d'utiliser la méthode suivante afin d'obtenir la concentration de 10^{-4} mol/l requise pour évaluer la variation des spectres UV de ces molécules selon le pH.

Les 2 à 3 mg de 4-mercaptoimidazole (selon la masse molaire de la molécule testée) sont dissous dans 10 ml d'éthanol. On ajoute alors, tout d'abord goutte à goutte puis plus

rapidement, 90 ml d'eau distillée en agitant fortement. La masse pesée n'a pas besoin d'être connue avec précision puisque le traitement mathématique des résultats ne requiert pas la connaissance exacte de la concentration du soluté. Enfin, on élève la force ionique à 1 mol/l par ajout de NaClO_4 .

3.2.2.2. Mesure de l'absorbance en fonction du pH.

Le pH de la solution ainsi obtenue est initialement amené à une valeur de 1.5 en utilisant quelques gouttes d'acide chlorhydrique 6N. Il est préférable d'utiliser une concentration aussi élevée afin de limiter tout phénomène de dilution lors de l'ajout de celui-ci. Le pH de la solution est suivi à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné.

1 ml de la solution est alors prélevé puis introduit dans une cellule de mesure afin d'en prendre le spectre UV. Lorsque celui-ci a été obtenu, le contenu de la cellule est reversé dans la solution puis le pH est ajusté à une valeur plus élevée à l'aide de quelques gouttes de soude 1N. On peut alors en prélever à nouveau 1 ml en vue d'en établir le spectre UV et ainsi de suite.

De façon à bénéficier d'une précision suffisante lors du traitement mathématique des résultats, il est essentiel d'acquérir les spectres UV pour des valeurs de pH espacées de l'ordre de 0.10 unité de pH.

Lorsque le pH se situe entre 5 et 9, les solutions d'acide chlorhydrique et de soude 6N et 1N doivent être remplacées par des solutions de concentration allant de 1 à 0.001N afin de garder une précision suffisante quant à l'espacement entre les différentes mesures.

3.2.3. Les résultats.

Le tableau 3.2.1 ci-dessous donne les valeurs des différents pK_a pour chacune des molécules testées.

Comme on peut le voir, les valeurs de pK_a obtenues pour les molécules synthétisées sont en accord relatif avec celles respectives de 2,3 et 10,3 du 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole trouvées dans la littérature [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1988]. La différence est due à la présence de 10% d'éthanol dans la solution.

On remarque que la valeur du premier pK_a , à savoir celui relatif au groupe thiol, est très sensible au caractère donneur ou attracteur des substituants du noyau imidazole. En effet, on constate que les valeurs les plus faibles, qui correspondent à une stabilisation accrue de la fonction thiolate, sont obtenues pour les substituants électroattracteurs en position 2 et surtout en position 5 du noyau imidazole. Par contre, les valeurs élevées de ce même pK_a , correspondant à une déstabilisation de la fonction thiolate, sont obtenues lorsque le noyau imidazole est substitué en position 1 ou 5 par un groupe donneur, comme les différents

méthoxyphényle. Concernant le 1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole **14**, on peut voir que l'influence du groupement donneur de la position 5 sur le pKa est plus prononcée que celle du groupe attracteur en position 2.

Composé	R ₁	R ₂	R ₅	pKa ₁	pKa ₂
1	CH ₃	H	CH ₃	3.3 ± 0.2	11.4 ± 0.2
2	3,4-diMeO-Ph	H	H	3.9 ± 0.2	11.9 ± 0.2
3	4-MeO-Ph	H	H	5.1 ± 0.2	12.5 ± 0.2
4	2-MeO-Ph	H	H	4.2 ± 0.2	11.5 ± 0.2
5	CH ₃	4-Cl-Ph	H	4.0 ± 0.2	11.4 ± 0.2
6	CH ₃	3-Cl-Ph	H	2.0 ± 0.2	11.1 ± 0.2
7	CH ₃	2-Cl-Ph	H	2.0 ± 0.2	12.0 ± 0.2
8	CH ₃	2-CF ₃ -Ph	H	2.9 ± 0.2	12.0 ± 0.2
9	CH ₃	3-CF ₃ -Ph	H	3.5 ± 0.2	12.2 ± 0.2
10	CH ₃	H	2-CF ₃ -Ph	1.2 ± 0.2	11.8 ± 0.2
11	CH ₃	H	2-Cl-Ph	< 1.0	8.9 ± 0.2
12	CH ₃	H	4-Cl-Ph	< 1.0	9.5 ± 0.2
13	CH ₃	H	4-MeO-Ph	4.4 ± 0.2	12.0 ± 0.2
14	CH ₃	CF ₃	2-MeO-Ph	5.7 ± 0.2	12.3 ± 0.2

Tableau 3.2.1 : Constantes d'acidité des composés mesurées en milieu eau/éthanol 9 :1.

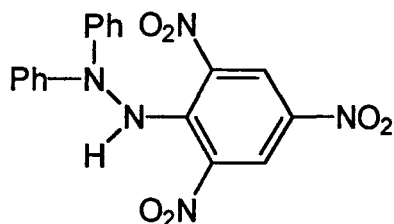
3.3. Evaluation de l'activité "piégeur de radicaux libres".

Cette première partie de l'étude des 4-mercaptoimidazoles eut pour but d'évaluer les propriétés de ces molécules en tant que piégeurs de radicaux. Pour se faire, deux tests furent sélectionnés. Le premier, très connu et largement utilisé comme examen préliminaire, est le test du DPPH. Le second, moins répandu, est le test du sel de Fremy.

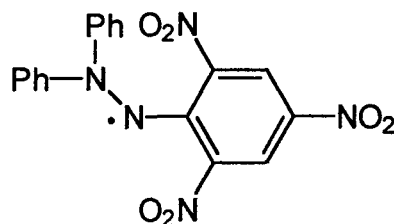
3.3.1. Le test du DPPH.

3.3.1.1. La méthode.

Il s'agit de la méthode de Mellors et Tappel [Mellors A. and Tappel A.L., 1966], basée sur la forte absorbance du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH, Fig. 3.3.1) à 517 nm. Elle consiste à calculer la concentration du piégeur de radicaux nécessaire pour diminuer de moitié, en 30 minutes, l'absorbance à 517 nm d'une solution de DPPH de 50 μM dans l'éthanol. Cette concentration, exprimée en μM , est appelée IC_{50} . La baisse d'absorbance constatée de la solution est due au passage du DPPH de sa forme radicalaire à sa forme non radicalaire. L' IC_{50} reflète ainsi l'aptitude de la molécule à donner un hydrogène au DPPH. Le composé étudié est donc un piégeur du radical DPPH d'autant plus efficace que son IC_{50} est faible.



$\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ 319 (15000)
517 (0)



$\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ 332 (19000)
517 (14000)

Fig. 3.3.1 : Structure et absorbance des formes radicalaires et non radicalaires du DPPH.

3.3.1.2. Mode opératoire.

On prépare tout d'abord 20 ml d'une solution mère de DPPH à 50 μM , ainsi qu'une solution mère de 4-mercaptoimidazole à 10^{-2} M tout deux dans de l'éthanol anhydre.

On calcule ensuite les volumes respectifs x_i et $(1-x_i)$ de ces deux solutions à ajouter pour obtenir 1 ml d'une solution de concentration 50 μM en DPPH et C_i en 4-mercaptoimidazole.

Ceci est possible car la concentration de la solution mère de l'imidazole est beaucoup plus élevée que celle de la solution mère de DPPH. On pourra donc négliger $(1-x_i)$ devant x_i , ce qui revient à négliger la dilution de la solution de DPPH lors de l'ajout ultérieur de l'imidazole. On prévoira de faire varier C_i de 10 μM à 500 μM .

Pour chaque concentration C_i , on procède de la sorte :

Les x_i ml de DPPH sont versés dans la cellule de 1 ml afin de mesurer la valeur initiale de l'absorbance à 517 nm. On ajoute alors rapidement les $(1-x_i)$ ml de la solution mère de 4-mercaptoimidazole dans la cuve. Après une prompt agitation, on suit l'absorbance de la solution à 517 nm pendant 30 minutes. A la fin de cette période, on relève l'absorbance à la longueur d'onde en question puis on calcule le pourcentage d'extinction de celle-ci durant les 30 minutes du test.

Lorsque les différents pourcentages d'extinction ont été obtenus pour toutes les valeurs de la concentration C_i , on établit la régression linéaire %-d'extinction/ C_i afin de déterminer la valeur de C_i pour laquelle l'absorbance diminue de 50% en 30 minutes. Cette valeur n'est autre que l' IC_{50} du 4-mercaptoimidazole testé.

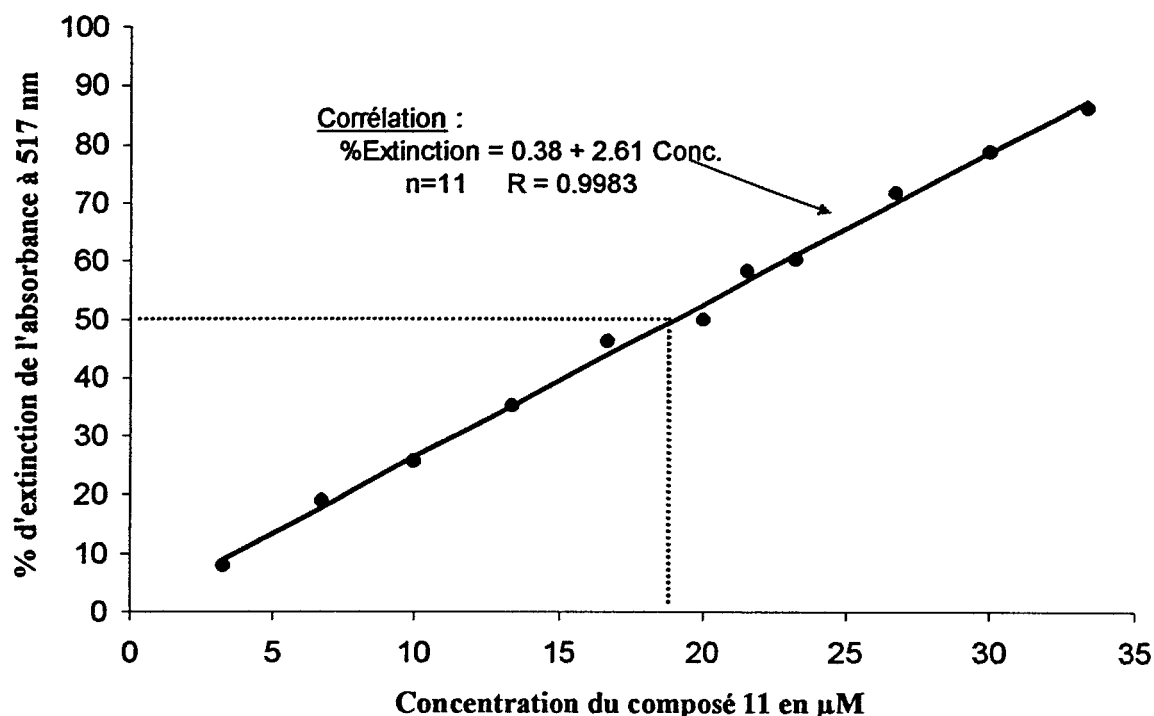


Fig. 3.3.2 : Détermination de l' IC_{50} du 1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 11, dans le test du DPPH.

L'attente de 30 minutes entre l'ajout et la dernière lecture de l'absorbance est normalement nécessaire afin de s'assurer que l'on lit bien l'absorbance de la solution à la fin de la réaction de piégeage du radical. Cependant, dans le cas des 4-mercaptoimidazoles, on peut remarquer que cette réaction est en fait extrêmement rapide. Pour les plus actives d'entre elles, la réaction est terminée dès l'agitation, et l'on n'observe plus aucune modification de l'absorbance par la suite.

3.3.1.3. Les résultats.

Le tableau ci-dessous donne les valeurs d'IC₅₀ des molécules synthétisées ainsi que celles du glutathion (GSH) et de la vitamine C.

On remarque tout de suite que les deux molécules les plus actives sont celles possédant des groupements chlorophényle ou trifluorométhylphényle en position 2 ou 5. Les molécules substituées en position 1 ou 5 par des groupements méthoxyphényle sont, quant à elles, peu actives à inactives. Le composé 14, à la fois substitué en position 5 par un groupement méthoxyphényle et en position 2 par un groupement trifluorométhyle possède une forte activité.

Composé	R ₁	R ₂	R ₅	IC ₅₀ (μM)
1	CH ₃	H	CH ₃	2900 ± 150
2	3,4-diMeO-Ph	H	H	780 ± 40
3	4-MeO-Ph	H	H	1340 ± 90
4	2-MeO-Ph	H	H	2090 ± 150
5	CH ₃	4-Cl-Ph	H	500 ± 40
6	CH ₃	3-Cl-Ph	H	33 ± 3
7	CH ₃	2-Cl-Ph	H	19 ± 2
8	CH ₃	2-CF ₃ -Ph	H	39 ± 3
9	CH ₃	3-CF ₃ -Ph	H	19 ± 2
10	CH ₃	H	2-CF ₃ -Ph	23 ± 2
11	CH ₃	H	2-Cl-Ph	19 ± 2
12	CH ₃	H	4-Cl-Ph	20 ± 2
13	CH ₃	H	4-MeO-Ph	1300 ± 120
14	CH ₃	CF ₃	2-MeO-Ph	23 ± 2
Glutathion				26 ± 3
Vitamine C				13 ± 1

Tableau 3.3.1 : Activités des 4-mercaptoimidazoles dans le test du DPPH.

On peut donc lier l'activité de piégeage du radical DPPH à la nature de la substitution du noyau imidazole. Cette relation est évidente lorsque l'on compare les molécules 10 à 14.

En effet, la substitution des 4-mercaptoimidazoles en position 5 par des groupements électro-attracteurs (10, 11 et 12) permet d'obtenir un très bonne activité de piégeage du radical DPPH. Par contre, la substitution de la même position par un groupement électrodonneur (13) aboutira à une très faible activité. Si maintenant, on ajoute à une telle molécule un groupe fortement électro-attracteur en position 2 (14), on retrouve une activité élevée.

On peut donc conclure qu'une substitution du noyau imidazole des composés par un groupement électro-attracteur (trifluorométhyle, trifluorométhylphényle ou chlorophényle) augmente l'activité de piégeage du radical DPPH, tandis qu'une substitution du noyau imidazole par un groupement électro-donneur diminue cette activité.

3.3.2. Le test du sel de Fremy.

3.3.2.1. But et méthode.

Le test du DPPH explicité ci-dessus donne un aperçu de la quantité totale de radicaux libres que peut piéger chaque 4-mercaptoimidazole. Cependant, il ne donne aucune indication sur la rapidité de ce piégeage. En effet, la cinétique de piégeage du radical DPPH par les 4-mercaptoimidazoles est beaucoup trop rapide pour être étudiée par les moyens classiques de spectrophotométrie UV. Pour palier à ce défaut, nous avons utilisé le test du sel de Fremy (nitrodisulfonate de potassium) en développant une étude mathématique de la cinétique de la réaction. Nous avons ainsi obtenu la constante de vitesse du piégeage du radical libre qu'est le sel de Fremy par chacun des 4-mercaptoimidazoles étudiés. Nous pourrions ainsi comparer entre eux, les 4-mercaptoimidazoles sur le plan de leur vitesse de réaction avec un radical.

Comme il vient de l'être précisé, ce test utilise comme source de radical persistant le nitrodisulfonate de potassium, c'est-à-dire le sel de Fremy [Zimmer H. *et al.*, 1971] (Fig. 3.3.3). Ce dernier a été synthétisé selon le mode opératoire du paragraphe 4.5.1. peu avant le début du test.

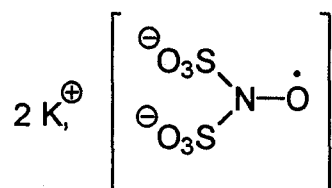
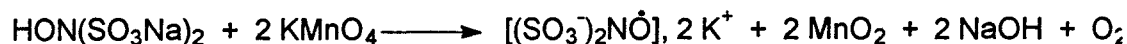
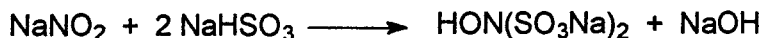


Fig. 3.3.3 : Sel de Fremy.

Le test consiste à suivre l'évolution de l'absorbance à 248 nm d'une solution de sel de Fremy après ajout d'une certaine quantité de 4-mercaptoimidazole. Cette longueur d'onde est caractéristique du sel de Fremy (maximum d'absorption de la fonction nitroxyde).

3.3.2.2. Synthèse du sel de Fremy.

Le sel de Fremy peut être obtenu par la méthode suivante [Zimmer H. *et al.*, 1971].



100 ml d'une solution de NaNO_2 à 5 mol/l sont placés dans un bécher de 2 litres. On refroidit l'ensemble à 0°C puis on ajoute 200 g de glace pilée. On ajoute alors 100 ml d'une solution fraîchement préparée de NaHSO_3 à 3 mol/l en agitant régulièrement. 20 ml d'acide acétique glacial sont alors versés. La solution passe du jaune à l'orange. La réaction est totale en 2 à 3 minutes.

On verse ensuite 25 ml d'une solution concentrée d'ammoniaque en rajoutant de la glace de façon à ce qu'il y en ait toujours dans le milieu. On ajoute alors 500 ml d'une solution refroidie de KMnO_4 à 0.2 mol/l. On observe la précipitation de MnO_2 (précipité brun). La solution est filtrée. Le filtrat violet peut être conservé à température ambiante mais la suspension non filtrée doit être conservée dans un bain de glace.

Formation de la solution A : 10 à 15 ml du filtrat sont prélevés et on y ajoute 10 à 15 ml d'une solution de KCl saturée. Des cristaux jaunes sont obtenus en refroidissant la solution ainsi obtenue dans la glace. Cette solution a pour but de favoriser la germination du sel de Fremy.

Au filtrat conservé à température ambiante, on ajoute goutte à goutte, pendant 45 minutes 250 ml de la solution saturée de KCl , tout en agitant. Dans le même temps, on ajoute des petites fractions de la solution A. La cristallisation est terminée en agitant la solution refroidie dans un bain de glace pendant 45 autres minutes. Des cristaux jaunes apparaissent. La suspension est ensuite filtrée sur büchner. On obtient un solide orange qu'il ne faut pas sécher totalement. On lave alors le solide avec la solution ammoniacale saturée en KCl (5 ml de NH_4OH concentré pour 100 ml de solution saturée de KCl) puis deux fois avec la solution ammoniacale de méthanol (5 ml de NH_4OH concentré pour 100 ml de méthanol) et enfin à l'acétone.

On étale finalement le sel de Fremy sur un verre de montre de façon à laisser l'acétone s'évaporer. On vérifie finalement la pureté du produit par IR [Moser W. and Howie R.A., 1968] et UV [Murib J.H. and Ritter D.M., 1952].

IR $\nu_{as}(\text{SO}_3)=1280 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_s(\text{SO}_3)=1060 \text{ cm}^{-1}$

UV $\epsilon=1690 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 248 nm, $\epsilon=20.8 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 545 nm

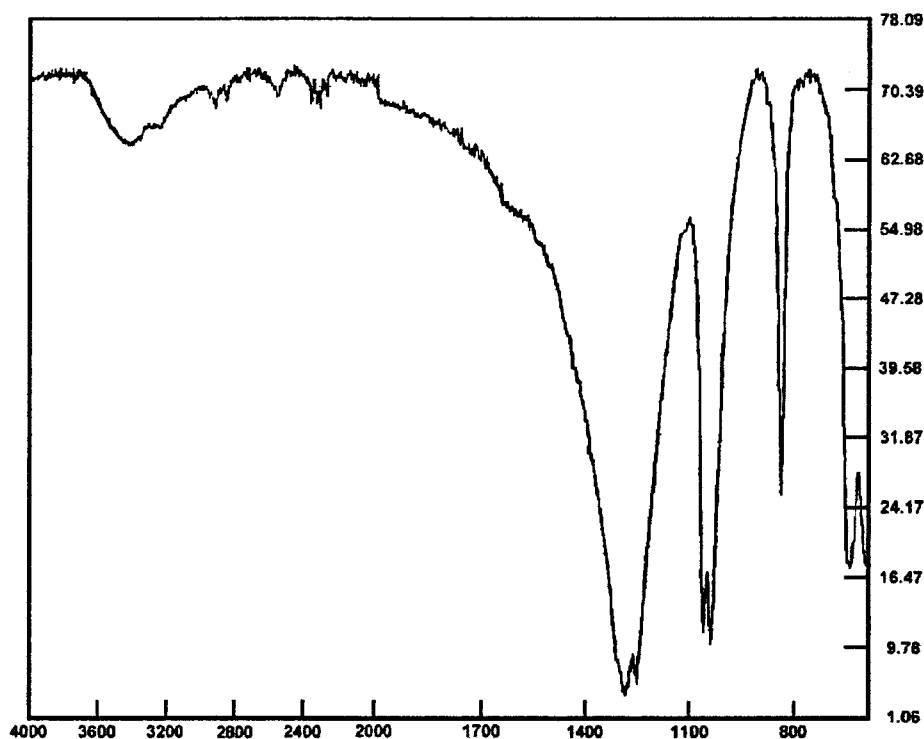


Fig. 3.3.4 : Spectre IR du sel de Fremy.

Malgré son caractère instable [Zimmer H. *et al.*, 1971], le sel de Fremy peut être conservé quelques semaines, à l'état solide, à l'abri de la lumière, dans un dessiccateur. La durée de conservation peut encore être prolongée s'il est maintenu dans une atmosphère ammoniacale.

3.3.2.3. Mode opératoire du test.

Le nitrodisulfonate de potassium (600 μM) est ajouté à une solution alcoolique (70 % d'eau / 30 % d'éthanol en volume) tamponné par du phosphate à 50 mM, pH=7.0 et contenant 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 600 μM de 4-mercaptoimidazole, de façon à obtenir des concentrations finales de 300 μM en thiol et en sel de Fremy. La disparition du radical nitroxyde est suivi par UV à 248 nm. La réaction est jugée terminée lorsqu'aucune variation supplémentaire n'est visible.

3.3.2.4. Résultats.

Dans un premier temps, on peut avoir une idée de l'efficacité des 4-mercaptoimidazoles en rapportant à 100% la variation totale de l'absorbance au cours de la réaction, et en comparant les courbes ainsi obtenues avec celles de molécules connues pour leur activité antioxydante. C'est cette méthode qui avait été retenue par Holler et Hopkins lors de leur étude préliminaire des propriétés des ovothiols [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990].

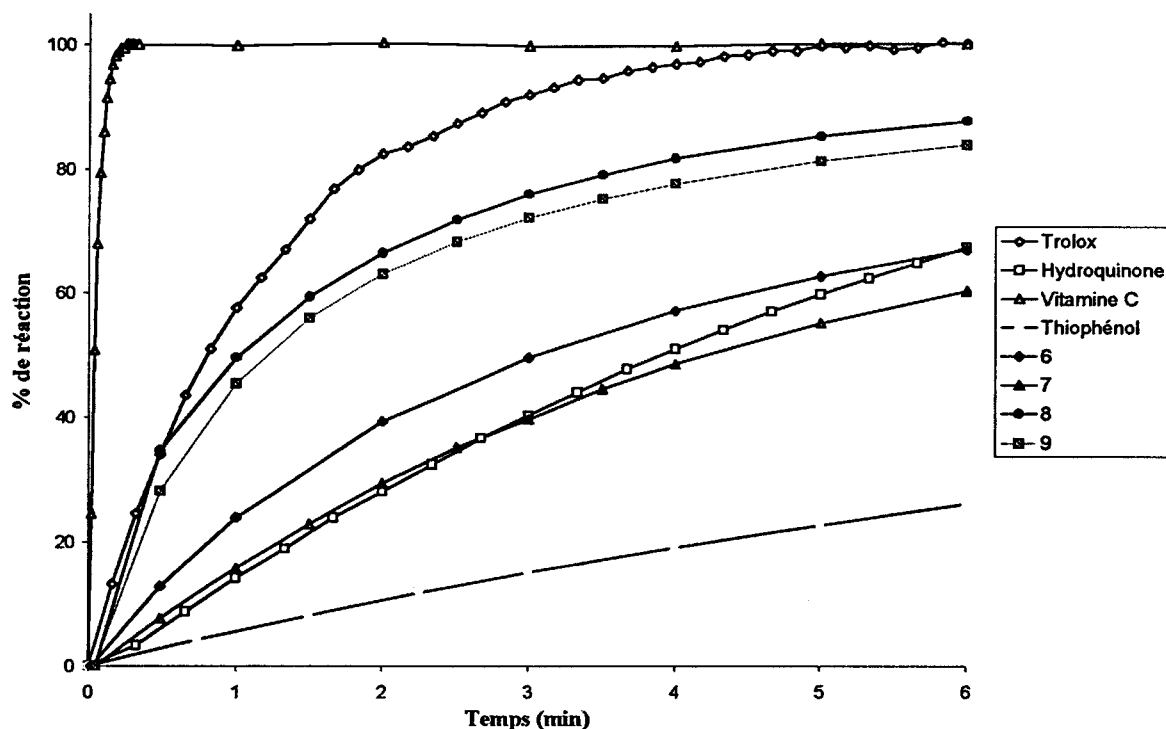


Fig. 3.3.5 : Cinétique de réaction avec le sel de Fremy.

La figure précédente montre que les 4-mercaptoimidazoles possèdent une cinétique de réaction avec le sel de Fremy très rapide. Les molécules les plus actives, à savoir les composés 8 et 9, montrent une vitesse de réaction plus élevée que l'hydroquinone, et proche de celle du Trolox, un analogue de la vitamine E. Les molécules 6 et 7, présentent une vitesse de réaction proche de l'hydroquinone. Les molécules 10, 11, 12 et 14, bien que moins actives, possèdent toutefois une cinétique de réaction plus élevée que celle du glutathion, et proche de celle du thiophénol. Enfin, les molécules 2, 3 et 4, ne présentent qu'une activité très faible, voire nulle. Le composé 13 ne possède aucune activité mesurable.

La vitamine C est la molécule présentant de loin la cinétique de réaction avec le sel de Fremy la plus rapide.

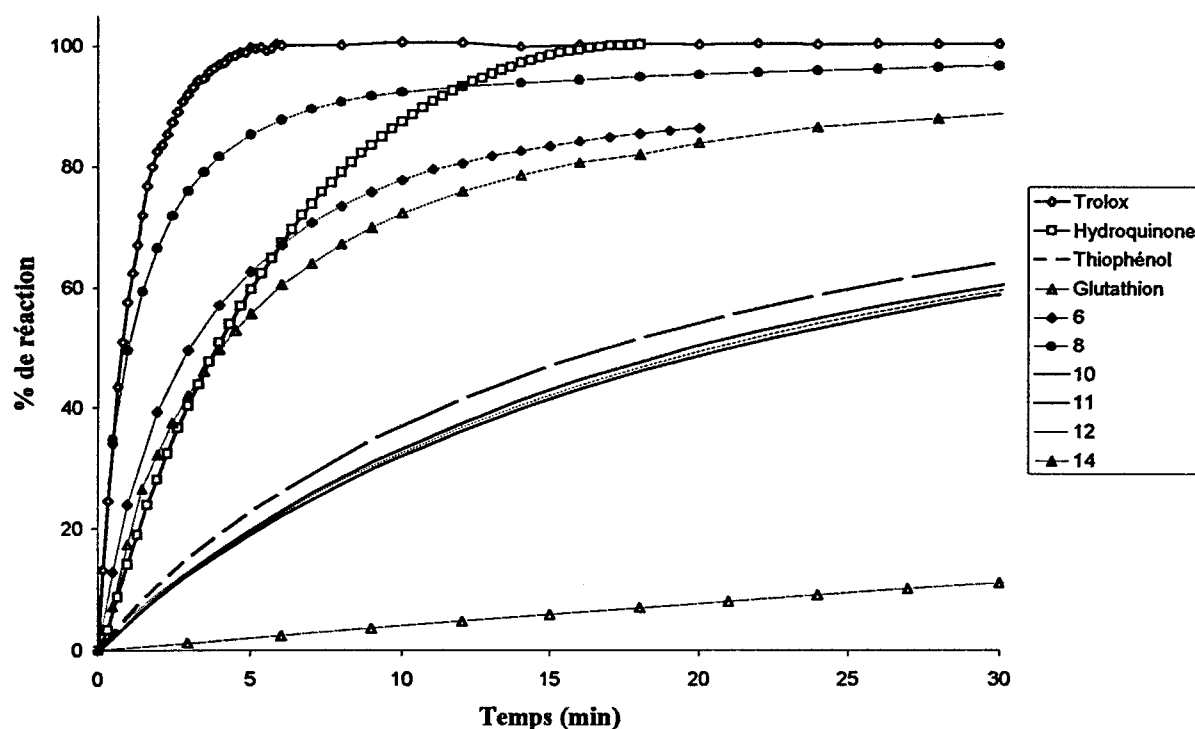


Fig. 3.3.6 : Cinétique de réaction avec le sel de Fremy (suite).

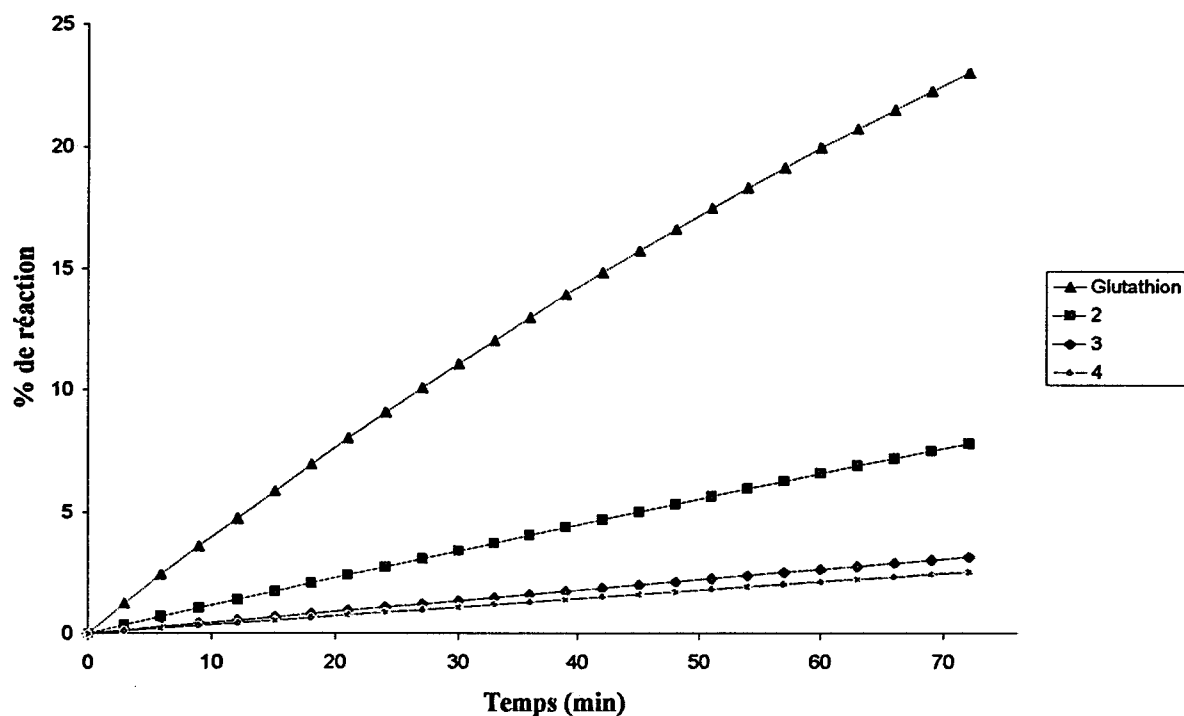


Fig. 3.3.7 : Cinétique de réaction avec le sel de Fremy (suite).

On retrouve les propriétés que nous avons mises en évidence pour le piégeage du DPPH. En effet, on peut voir que les molécules possédant l'activité la plus grande vis-à-vis du sel de Fremy sont les molécules substituées en position 2 par un groupement trifluorométhylphényle (8 et 9), fortement électro-attracteur. Viennent ensuite les molécules substituées, toujours en position 2, par un groupement chlorophényle, lui aussi fortement électro-attracteur (6 et 7). L'effet des groupements électro-attracteurs en position 5 est moindre, mais reste visible, comme le démontrent les activités des composés 10, 11 et 12. Enfin, le composé 14 présente une cinétique intermédiaire entre ces deux groupes, due à la présence simultanée d'un groupement électro-attracteur en position 2, et d'un groupement électro-donneur en position 5.

3.3.2.5. Etude de la cinétique de piégeage du sel de Fremy.

Afin d'avoir une meilleure base de comparaison des différents 4-mercaptoimidazoles, nous avons déterminé les constantes de vitesse du piégeage. Toutefois, les molécules testées, ainsi que celles formées au cours de la réaction possèdent elles-aussi une forte absorbance à 248 nm. Il a donc été nécessaire d'établir l'équation exacte de l'absorbance en fonction du temps, en tenant compte de celle de chacun des composés présents en solution.

En nous basant sur le suivi par UV d'une cinétique plus simple, mais proche de celle examinée ici [Perkampus H.H., 1992], il nous a été possible de déterminer l'équation exacte de l'absorbance à 248 nm de la solution étudiée.

Ainsi, faisons l'hypothèse, que nous vérifierons par la suite, que la stoechiométrie du mécanisme de piégeage du sel de Fremy par un 4-mercaptoimidazole est :

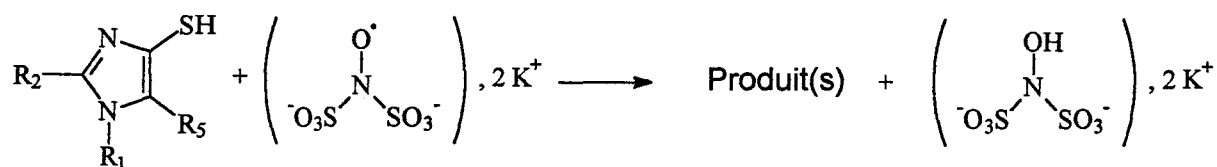


Fig. 3.3.8 : Stoechiométrie de la cinétique du piégeage du sel de Fremy par les 4-mercaptoimidazoles.

Nous verrons dans la suite de la démonstration que la nature et la stoechiométrie du ou des produits formés ne modifient en rien les équations finales qui vont être obtenues.

Aussi, pour fixer les idées, notons la : $A + B \rightarrow P + R$

Notons a_0 les concentrations de A et B au temps $t=0$ (prises égales expérimentalement) et a et p , les concentrations respectives de A et B, et P et R (égales) au temps t . Les concentrations finales de P et R seront égales à a_0 .

Au temps t , quelconque, on peut poser :

$$\begin{aligned} a &= a_0 - x & p &= x \\ r &= x \end{aligned}$$

Ainsi, si l'on appelle :

A_λ	l'absorbance de la solution au temps t à la longueur d'onde λ
$A_{\lambda,0}$	l'absorbance initiale de la solution à la longueur d'onde λ
$A_{\lambda,\infty}$	l'absorbance de la solution lorsque la réaction est terminée (temps infini), à la longueur d'onde λ
ε_a	le coefficient d'extinction molaire de A à la longueur d'onde λ
ε_b	le coefficient d'extinction molaire de B à la longueur d'onde λ
ε_p	le coefficient d'extinction molaire de P à la longueur d'onde λ
ε_r	le coefficient d'extinction molaire de R à la longueur d'onde λ
d	la longueur utile de la cuve
t	le temps
k	la constante de vitesse de la réaction

On pourra écrire :

$$\begin{aligned} A_{\lambda,0} &= d.a_0(\varepsilon_a + \varepsilon_b) \\ A_\lambda &= d.a_0(\varepsilon_a + \varepsilon_b) + d.x(\varepsilon_p + \varepsilon_r - \varepsilon_a - \varepsilon_b) \\ A_{\lambda,\infty} &= d.a_0(\varepsilon_p + \varepsilon_r) \end{aligned}$$

Si l'on pose maintenant :

$$Q = d(\varepsilon_p + \varepsilon_r - \varepsilon_a - \varepsilon_b)$$

Alors, il vient : $A_\lambda - A_{\lambda,0} = Q.x$, et donc :

$$\frac{1}{Q} \frac{d(A_\lambda - A_{\lambda,0})}{dt} = \frac{1}{Q} \frac{dA_\lambda}{dt} = \frac{dx}{dt}$$

Or : $\frac{dx}{dt} = k(a_o - x)^2$ donc: $\frac{dA_\lambda}{dt} = \frac{k}{Q}(a_o \cdot Q - A_\lambda - A_{\lambda,o})^2$

De plus, on peut remarquer que : $A_o \cdot Q - A_\lambda + A_{\lambda,o} = A_{\lambda,\infty} - A_\lambda$

On peut donc écrire :

$$\boxed{\frac{dA_\lambda}{dt} = \frac{k}{Q}(A_{\lambda,\infty} - A_\lambda)^2}$$

Cette équation différentielle est l'équation régissant la cinétique de notre réaction, telle qu'elle peut être observée par spectrophotométrie UV. Elle admet pour solution :

$$\frac{1}{A_{\lambda,\infty} - A_\lambda} - \frac{1}{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}} = \frac{k}{Q} \cdot t$$

Ce qui peut encore se noter :

$$\frac{A_\lambda - A_{\lambda,o}}{t} = \frac{k}{Q}(A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o})(A_{\lambda,\infty} - A_\lambda)$$

Comme, $A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o} = Q \cdot a_o$ on obtient finalement :

$$\frac{A_\lambda - A_{\lambda,o}}{t} = k \cdot a_o \cdot A_{\lambda,\infty} - k \cdot a_o \cdot A_\lambda \quad (1)$$

Ce qui s'écrit encore

$$A_\lambda = \frac{k \times a_o \times A_{\lambda,\infty} \times t + A_{\lambda,o}}{1 + k \times a_o \times t} \quad (2)$$

Rappelons que a_o est déterminé par le mode opératoire, tandis que les différentes absorbances sont des données expérimentales. La seule inconnue stricte de ces équations est donc la constante de vitesse de la réaction, k .

N.B. : La nature et la stoechiométrie des produits formés n'auraient pour conséquence que de modifier l'écriture de l'intermédiaire de calcul Q , sans modifier autrement le raisonnement. La relation $A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,0} = Q.a_0$ serait toujours vraie, de sorte que les équations finales ne seraient aucunement modifiées. En d'autres termes, le développement explicité ci-dessus ne dépend que de la stoechiométrie des composés de départ de la réaction de piégeage du sel de Fremy, à savoir 1 pour celui-ci et 1 pour le thiol.

Le suivi de l'absorbance de la solution à 248 nm après l'ajout du 4-mercaptoimidazole nous permet donc de déterminer la constante de vitesse k de la réaction. Plusieurs méthodes peuvent être envisagées :

- Si l'on est en présence d'une cinétique lente, soit si $k \times a_0 \times t \ll 1$

alors, d'après (2) : $A_{\lambda} \approx k \times a_0 \times A_{\lambda,\infty} \times t + A_{\lambda,0}$ en début de réaction

on voit que l'on peut obtenir facilement la valeur de k en établissant la régression linéaire :

$$A_{\lambda} = f(t)$$

La droite sera de pente $k.a_0.A_{\lambda,\infty}$ et comme $A_{\lambda,\infty}$ et a_0 sont déterminés ou imposés expérimentalement, on détermine la valeur de k . Cependant, pour les cinétiques lentes, la valeur de $A_{\lambda,\infty}$ peut être difficile à obtenir à cause de la longueur de la réaction, ou encore entachée d'erreur suite à la lente dégradation du sel de Fremy.

- Il est possible de remarquer, que, d'après l'équation (1) :

$$\frac{A_{\lambda} - A_{\lambda,0}}{t} \text{ est une droite de pente } -k.a_0 \text{ (Fig. 3.3.10).}$$

La détermination expérimentale de $A_{\lambda,0}$ nous permet donc de déterminer la constante de vitesse k . Cependant, dans le cas de cinétique très rapide, il peut être difficile d'obtenir avec précision l'absorbance au moment de l'ajout, puisque celle-ci aura varié au moment de la mesure.

- Enfin, il est possible de réaliser une régression selon la méthode de Newton-Raphson généralisée à partir de l'équation (2), en prenant $A_{\lambda,0}$, $A_{\lambda,\infty}$ et k comme paramètres. Les valeurs calculées de $A_{\lambda,0}$ et $A_{\lambda,\infty}$ comparées aux spectres permettent d'apprécier la justesse des résultats. Cette méthode, mathématiquement plus difficile à mettre en œuvre que les précédentes, possède toutefois l'avantage d'être applicable dans tous les cas.

Les figures suivantes montrent un exemple de cinétique ainsi établie pour le 1-méthyl-5-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 12.

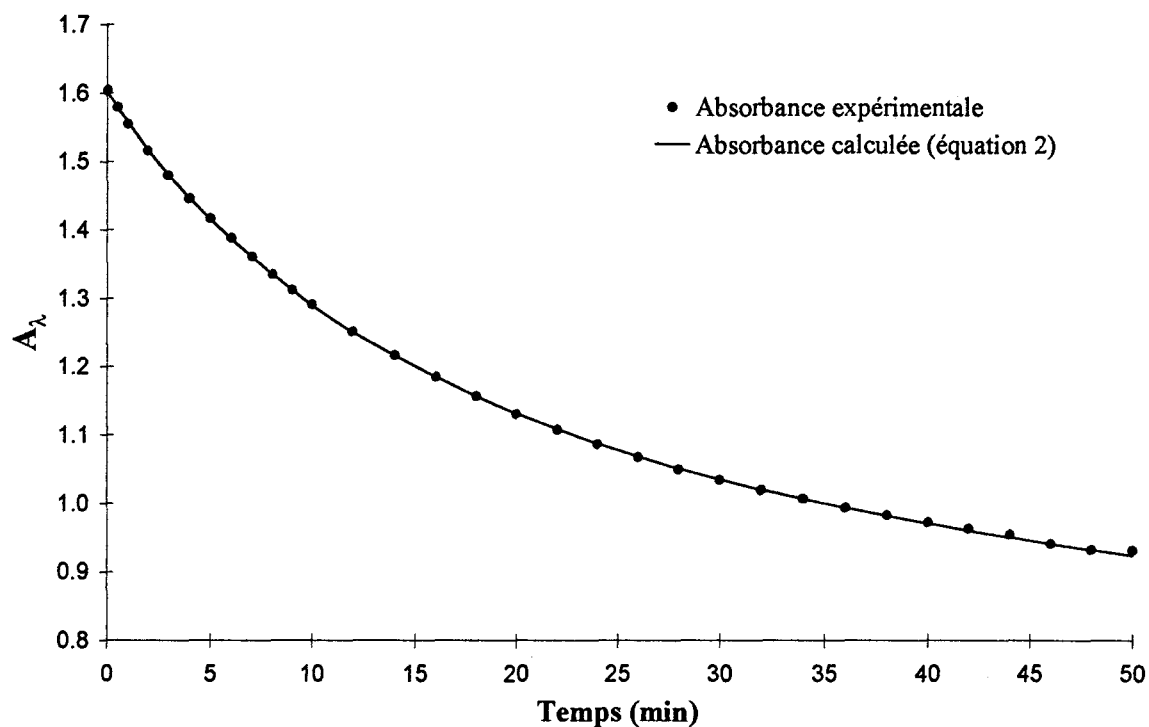


Fig. 3.3.9 : Cinétique de piégeage du sel de Fremy par le composé 12.

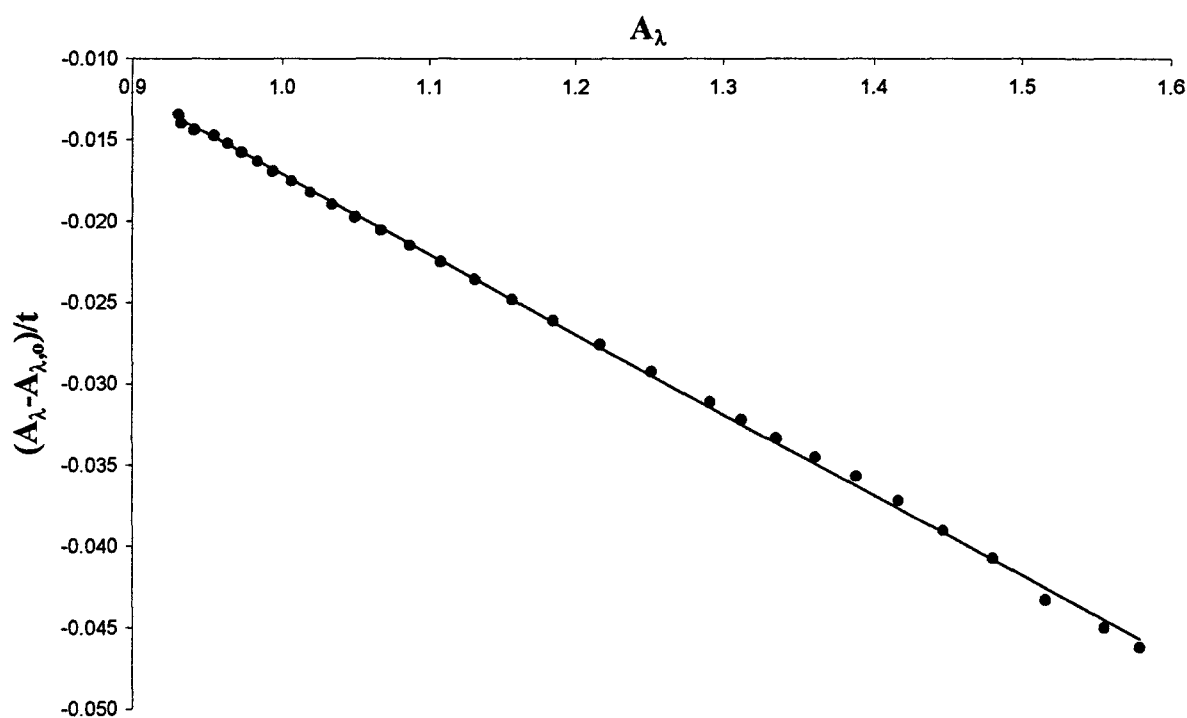


Fig. 3.3.10 : Application de l'équation (1) à la cinétique de piégeage du sel de Fremy par le composé 12.

Le tableau de valeurs ci-dessous donne les constantes de vitesse de réaction entre les 4-mercaptoimidazoles et le sel de Fremy.

Composé	R ₁	R ₂	R ₅	k (l.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
1	CH ₃	H	CH ₃	0.065 ± 0.03
2	3,4-diMeO-Ph	H	H	0.025 ± 0.04
3	4-MeO-Ph	H	H	0.020 ± 0.04
4	2-MeO-Ph	H	H	-
5	CH ₃	4-Cl-Ph	H	-
6	CH ₃	3-Cl-Ph	H	19.2 ± 0.7
7	CH ₃	2-Cl-Ph	H	12.5 ± 0.5
8	CH ₃	2-CF ₃ -Ph	H	54 ± 3
9	CH ₃	3-CF ₃ -Ph	H	53 ± 3
10	CH ₃	H	2-CF ₃ -Ph	2.63 ± 0.08
11	CH ₃	H	2-Cl-Ph	2.82 ± 0.09
12	CH ₃	H	4-Cl-Ph	2.68 ± 0.07
13	CH ₃	H	4-MeO-Ph	-
14	CH ₃	CF ₃	2-MeO-Ph	15.2 ± 0.5
Glutathion				0.23 ± 0.04
Thiophénol				3.27 ± 0.09

Tableau 3.3.2 : Constantes de vitesse de réaction entre les 4-mercaptoimidazoles et le sel de Fremy.

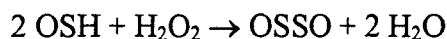
Il s'avère que la constante de vitesse de la réaction entre un 4-mercaptoimidazole et le sel de Fremy dépend fortement de la nature des substituants. Les molécules substituées en position 2 par un groupement trifluorométhyl-phényle, dont on a déjà vu qu'elles sont les plus actives, possèdent une constante de vitesse 17 fois plus élevée que celle du thiophénol et 230 fois plus élevée que celle du glutathion. On voit aussi que la variation d'activité en fonction du substituant est très élevée. Ainsi, il existe un rapport de 800 à 2700 entre les constantes de vitesse les plus élevées, enregistrée pour des composés substitués par des groupements électroattracteurs, et celles mesurées pour les 4-mercaptoimidazoles substitués par des groupement électrodonneurs.

3.4. Piégeage des dérivés actifs de l'oxygène.

3.4.1. Piégeage du peroxyde d'hydrogène.

3.4.1.1. Réaction de l'ovothiol avec le peroxyde d'hydrogène.

Comme nous l'avons déjà vu, l'ovothiol C réagit avec le peroxyde d'hydrogène selon le mécanisme suivant :



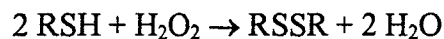
Cette réaction apparaît comme étant du premier ordre à la fois en H_2O_2 et en thiol. Une constante de vitesse du deuxième ordre de $2.0 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a été mesurée à 30°C , à pH 7.2, pour l'ovothiol C. Pour la même réaction, le glutathion présente une constante de vitesse de l'ordre de $0.43 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ [Turner E. *et al.*, 1988].

3.4.1.2. Mode opératoire.

Le composé, préalablement dissous dans de l'éthanol, est dilué à l'aide d'une solution aqueuse, tamponnée à pH 7.2 par 20 mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ et contenant 2 mM d'EDTA, de façon à obtenir une concentration finale en thiol de 0.1 mM. On ajoute alors la quantité nécessaire d'une solution concentrée d'eau oxygénée pour atteindre une concentration de 1 mM. On peut ensuite suivre la cinétique de réaction par spectrophotométrie UV, à 240-320 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance de la fonction thiol. Cette expérience est menée à 20°C . La concentration en éthanol dans le milieu ne dépasse pas 1%.

3.4.1.3. Etude de la cinétique de réaction des composés avec H_2O_2 .

Etant donnée la stoechiométrie du mécanisme de piégeage de H_2O_2 par un thiol:



et l'ordre de la cinétique, on peut écrire la vitesse v de réaction comme étant :

$$v = -\frac{1}{2} \frac{d[\text{RSH}]}{dt} = -\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = \frac{d[\text{RSSR}]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[\text{H}_2\text{O}]}{dt} = k. [\text{RSH}]. [\text{H}_2\text{O}_2]$$

Pour simplifier les notations ultérieures, notons la réaction :



A, B, P et R représentent donc respectivement le thiol, H_2O_2 , le disulfure et l'eau.

Notons maintenant a_o la concentration initiale de A ; a et p, les concentrations respectives de A et P au temps t ; B_o la concentration constante de B (expérimentalement choisi en excès). La concentration finale de P sera $a_o/2$. La concentration de R, c'est-à-dire celle de l'eau, est très élevée et insensible à la réaction.

B_o étant constante, on pourra l'écrire $B_o = z.a_o$, où z est lui-même une constante.

Au temps t, quelconque, on peut poser :

$$a = a_o - 2 x \quad \text{et} \quad p = x$$

Ainsi, si l'on appelle :

A_λ	l'absorbance de la solution au temps t à la longueur d'onde λ
$A_{\lambda,o}$	l'absorbance initiale de la solution à la longueur d'onde λ
$A_{\lambda,\infty}$	l'absorbance de la solution lorsque la réaction est terminée (temps infini), à la longueur d'onde λ
ϵ_a	le coefficient d'extinction molaire de A à la longueur d'onde λ
ϵ_b	le coefficient d'extinction molaire de B à la longueur d'onde λ
ϵ_p	le coefficient d'extinction molaire de P à la longueur d'onde λ
d	la longueur utile de la cuve
t	le temps
k	la constante de vitesse de la réaction

On pourra écrire :

$$A_{\lambda,o} = d.a_o(\epsilon_a + z.\epsilon_b)$$

$$A_\lambda = d.a_o(\epsilon_a + z.\epsilon_b) + d.x(\epsilon_p - 2\epsilon_a)$$

$$A_{\lambda,\infty} = d.a_o\left(z.\epsilon_b + \frac{1}{2}\epsilon_p\right)$$

N.B. : L'absorbance de l'eau, à savoir R dans notre notation, est nulle.

En posant :

$$Q = d(\varepsilon_p - 2\varepsilon_a)$$

il vient : $A_\lambda - A_{\lambda,o} = Q.x$, et donc :

$$\frac{1}{Q} \frac{d(A_\lambda - A_{\lambda,o})}{dt} = \frac{1}{Q} \frac{dA_\lambda}{dt} = \frac{dx}{dt}$$

Or, comme la réaction est d'ordre 1 en thiol et en eau oxygénée, on a :

$$\frac{dx}{dt} = k.B_o.(a_o - 2x) \quad \text{donc:} \quad \frac{dA_\lambda}{dt} = k.B_o.(a_o.Q - 2(A_\lambda - A_{\lambda,o}))$$

De plus, on peut remarquer que : $2(A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}) = Q.a_o$

D'où :

$$\boxed{\frac{dA_\lambda}{dt} = 2.k.B_o(A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}) \left(1 - \frac{A_\lambda - A_{\lambda,o}}{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}} \right)}$$

Si on pose maintenant : $y = \frac{A_\lambda - A_{\lambda,o}}{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}}$

on pourra écrire : $(A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}) \frac{dy}{dt} = 2.k.B_o(A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o})(1 - y)$

Et donc :

$$\int_0^1 \frac{1}{1-y} dy = \ln\left(\frac{1}{1-y}\right) = 2.k.B_o.t$$

Comme : $\frac{1}{1-y} = \frac{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}}{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda}}$ on peut finalement écrire la relation suivante :

$$\ln\left(\frac{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda,o}}{A_{\lambda,\infty} - A_{\lambda}}\right) = 2.k.B_o.t \quad (1)$$

Cette équation de droite, selon t, nous permet d'obtenir facilement la constante de vitesse de réaction d'un thiol avec H₂O₂, puisque B_o, constant, est imposé par les conditions expérimentales.

Les courbes suivantes montrent l'application de cette équation à la cinétique de piégeage de H₂O₂ par le 1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 11.

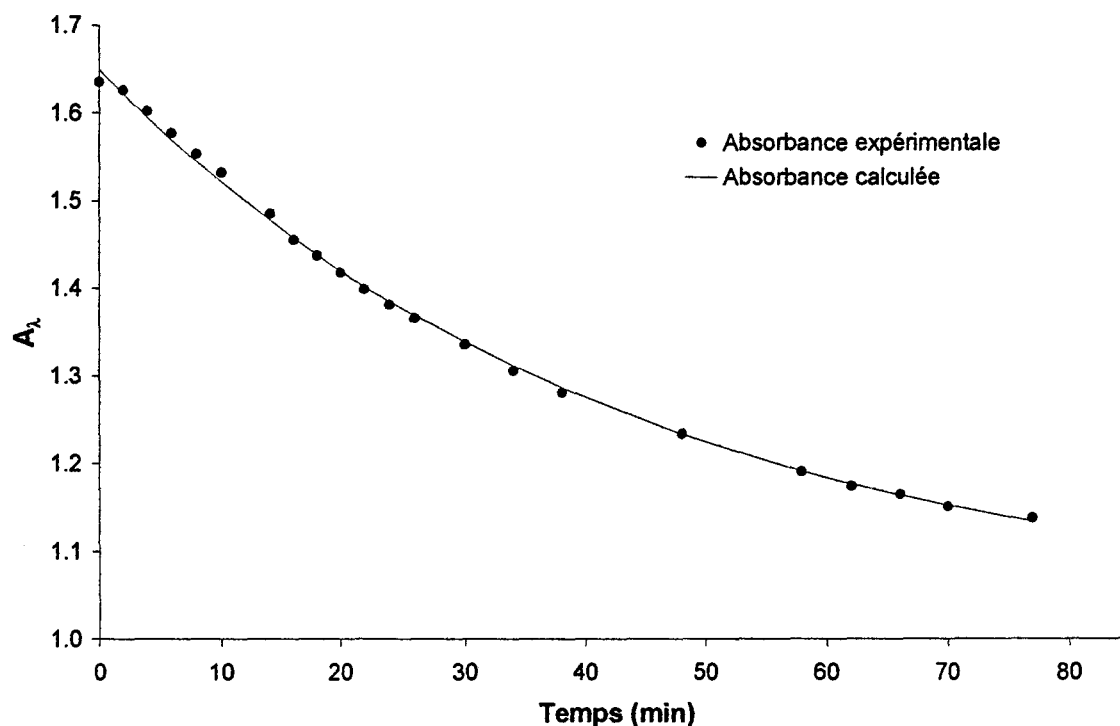


Fig. 3.4.1 : Cinétique de réaction du composé 11 avec H₂O₂.

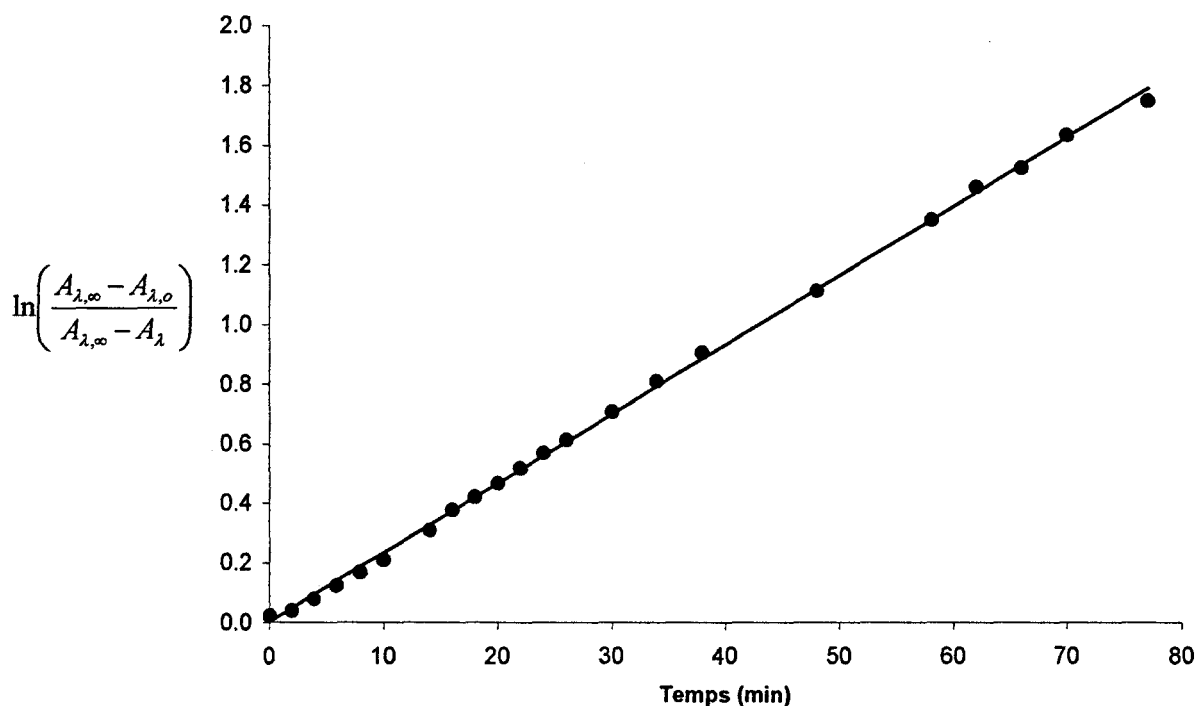


Fig. 3.4.2 : Application de l'équation (1) à la cinétique de réaction du composé 11 avec H_2O_2 .

3.4.1.4. Résultats.

Le tableau suivant donne les valeurs de constante de vitesse de réaction entre les différents 4-mercaptoimidazoles et H_2O_2 . Celle de la N-acétylcystéine (NAC) est jointe.

On remarque que les 4-mercaptoimidazoles sont au moins aussi rapides que la NAC quant à leur réaction avec H_2O_2 . Le rapport entre leur constante de vitesse et celle de la NAC varie en effet de 1.0 à 6.8. Bien que le rapport k/k_{NAC} varie fortement d'un composé à l'autre, l'influence des différents groupements est plus difficile à dégager que dans le cas des réactions avec le sel de Fremy ou le DPPH. En effet, on peut voir par exemple qu'un groupement électro-attracteur en position 2 augmente la cinétique de réaction par rapport à un groupement électro-donneur en position 1. Par contre, un groupement électro-attracteur en position 5 aura cette fois un effet négatif par rapport à un groupement électro-donneur dans cette même position. On remarque toutefois, que l'ajout d'un groupement électro-attracteur en position 2 (composé 14) à une molécule possédant un groupement attracteur en position 5 (composé 13) augmente fortement la cinétique de réaction.

La cinétique la plus rapide est obtenue pour les composés ayant un groupement attracteur en position 2, notamment un cycle 3-chlorophényle.

Les constantes obtenues sont du même ordre de grandeur que celle publiée par Holler *et al.* [Holler T.P. *et al.*, 1988] pour l'ovothiol C, mais globalement plus faibles. Ceci est en grande partie dû à la différence de température entre les deux expériences. Cependant, le

rapport existant entre la constante de vitesse des 4-mercaptoimidazoles et la NAC est proche de celui obtenu par Holler *et al.* entre l'ovothiol C et le glutathion [Holler T.P. *et al.*, 1988]. La substitution du noyau imidazole des composés ne semble donc pas apporter de forte amélioration à l'activité des 4-mercaptoimidazoles vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Composé	R ₁	R ₂	R ₅	k (M ⁻¹ .s ⁻¹)	k/k _{NAC}
1	CH ₃	H	CH ₃	0.33 ± 0.05	2.5
2	3,4-diMeO-Ph	H	H	0.31 ± 0.03	2.4
3	4-MeO-Ph	H	H	0.37 ± 0.05	2.8
4	2-MeO-Ph	H	H	0.45 ± 0.03	3.5
5	CH ₃	4-Cl-Ph	H	0.31 ± 0.04	2.4
6	CH ₃	3-Cl-Ph	H	0.68 ± 0.05	5.2
7	CH ₃	2-Cl-Ph	H	0.54 ± 0.04	4.2
8	CH ₃	2-CF ₃ -Ph	H		
9	CH ₃	3-CF ₃ -Ph	H	0.89 ± 0.05	6.8
10	CH ₃	H	2-CF ₃ -Ph		
11	CH ₃	H	2-Cl-Ph	0.19 ± 0.02	1.5
12	CH ₃	H	4-Cl-Ph	0.13 ± 0.02	1.0
13	CH ₃	H	4-MeO-Ph	0.38 ± 0.03	2.9
14	CH ₃	CF ₃	2-MeO-Ph	0.69 ± 0.06	4.6
NAC				0.13 ± 0.02	1.0

Tableau 3.4.1 : Constantes de vitesse de la réaction des 4-mercaptoimidazoles avec H₂O₂, à 20°C et à pH 7.2.

3.4.2. Piégeage de l'hypochlorite.

3.4.2.1. Objectif et principe.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2.2. la phagocytose peut mener à la production d'hypochlorite HOCl au pouvoir oxydant élevé. Une production excessive de cette espèce, par exemple lors d'une inflammation, peut donc s'avérer délétère, notamment vis-à-vis des protéines.

La présente expérience avait donc pour but d'évaluer l'activité des 4-mercaptoimidazoles à piéger l'hypochlorite.

3.4.2.2. Mode opératoire.

L'hypochlorite, HOCl, était produit immédiatement avant l'expérience en ajustant à 6.2 le pH d'une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à l'aide d'acide sulfurique H_2SO_4 dilué.

La rapidité de la réaction entre le 4-mercaptoimidazole et HOCl ne permettant pas une étude cinétique de la réaction, une méthode d'ajouts successifs fut utilisée. L'oxydation des 4-mercaptoimidazoles fut suivie par spectrophotométrie UV, en dosant la fonction SH était mesurée par la méthode du DTNB [Ellman G.L., 1959]. Le mode opératoire consistait à mettre en solution 100 μM de 4-mercaptoimidazole dans un tampon de KH_2PO_4 -KOH 50 mM à pH 6.6 contenant 5 mM d'EDTA, puis à ajouter des quantités croissantes d'HOCl jusqu'à ce qu'aucune modification supplémentaire ne soit observable en spectrophotométrie UV. Une incubation de 5 min suivait chaque ajout d'HOCl.

3.4.2.3. Résultats.

L'ajout d'HOCl à la solution de 4-mercaptoimidazole provoque une forte modification du spectre UV. La figure 3.4.3 montre cette évolution dans le cas du 1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 6.

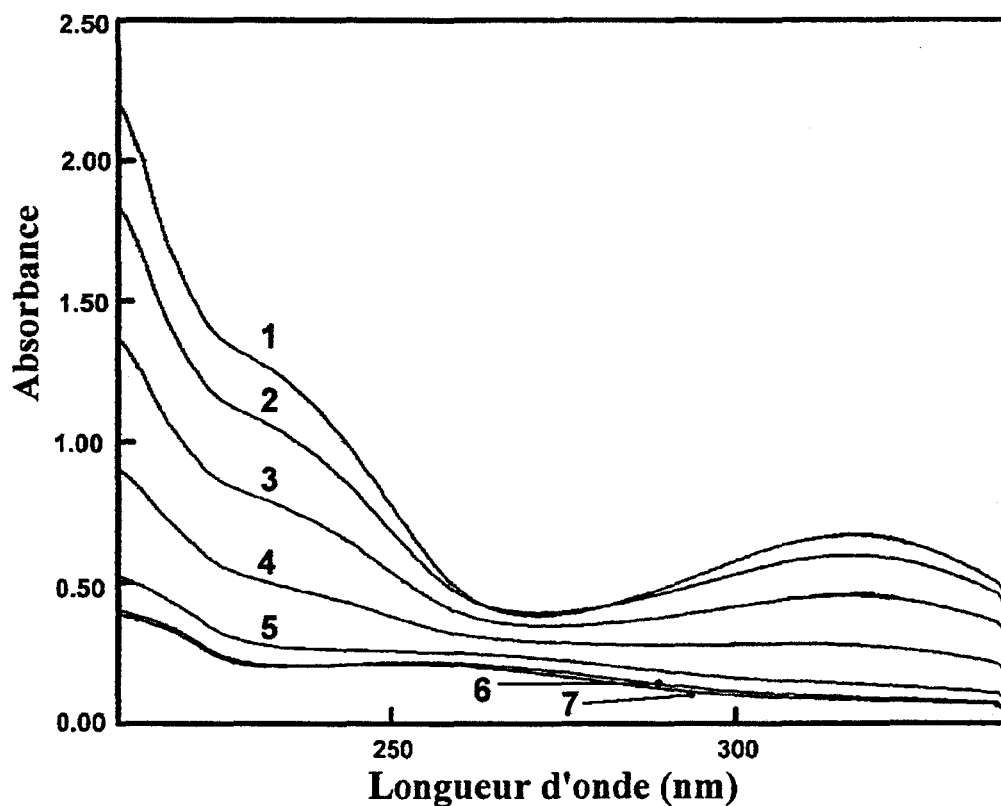


Fig. 3.4.3 : Spectre UV du 1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 6, à 100 μM (1), et après ajout de 10 μM (2), 20 μM (3), 30 μM (4), 40 μM (5), 50 μM (6) et enfin 60 μM (7) d'HOCl.

Comme on peut le voir sur la figure ci-dessus, plus aucune modification du spectre n'est visible lorsque l'on dépasse la concentration de 50 μM en HClO , c'est-à-dire pour une stoechiométrie 4-mercaptoimidazole/ HOCl de 2:1.

Afin de mettre en évidence le composé obtenu après réaction totale, celui-ci fut isolé dans la phase organique produite par extraction de la solution à l'aide d'un système $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$. Le spectre RMN du composé ainsi recueilli montre que l'on est en présence du disulfure (disparition du pic du proton de la fonction thiol et glissement du pic du proton en position 5 de l'imidazole). Ceci fut confirmé par spectrométrie de masse qui révèle le pic du disulfure.

La stoechiométrie (2:1) de la réaction mise en évidence par la méthode des ajouts successifs (Fig 3.4.3), ainsi que les spectres RMN et de masse indiquent que la réaction suivante a lieu lorsque l'on met en présence un 4-mercaptoimidazole et HOCl :



Tous les 4-mercaptoimidazoles, à l'exception du composé **1**, montrent un tel comportement. La N-acétylcystéine, à l'instar du 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, ne présentent qu'une oxydation partielle. Ainsi, la mesure de la concentration finale en fonction thiol mesurée par le DTNB montre que seulement 70% de la molécule **1** et 35% de la NAC sont oxydés en présence de 60 μM d' HOCl , indiquant une moindre réactivité vis-à-vis de ce dernier.

La NAC étant reconnue comme un inhibiteur puissant de l'action d' HOCl [Aruoma O.I. *et al.*, 1989] on peut en déduire que les 4-mercaptoimidazoles possèdent une excellente aptitude à piéger HOCl .

Cette propriété venant s'ajouter au piégeage d' H_2O_2 (§ 3.4.1.), dont on sait qu'il est un intermédiaire de la formation *in vivo* d' HOCl , par les 4-mercaptoimidazoles, laisse présager une synergie d'action de ceux-ci contre HOCl : inhibition de la formation d' HOCl par piégeage d' H_2O_2 , puis piégeage de la quantité d' HOCl pouvant tout de même se former.

3.4.3. Piégeages du radical hydroxyle.

L'étude de l'activité des 4-mercaptoimidazoles en tant que piégeurs du radical hydroxyle $\text{HO}^\bullet$, a été menée par RPE. Celle-ci est disponible au paragraphe 3.7.3.

3.5. Etude des composés par voltammétrie cyclique.

3.5.1. But et principe.

Des expériences de voltammétrie cyclique ont été menées sur les 4-mercaptoimidazoles synthétisés. Cette technique d'analyse permet, comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, de déterminer les potentiels d'oxydo-réduction des composés étudiés. De plus cette méthode permet de mettre en évidence le caractère réversible ou non des réactions de réduction ou d'oxydation, ainsi que d'éventuelles réactions chimiques couplées à un mécanisme d'oxydo-réduction.

Le but de cette partie de l'étude était de déterminer si un lien pouvait être établi entre l'activité des 4-mercaptoimidazoles en tant que piègeurs de radicaux et leurs potentiels d'oxydo-réduction. De plus, il pouvait être possible, par la même occasion, d'explorer le mécanisme de ces réactions et de révéler l'intervention d'éventuels intermédiaires.

3.5.1.1 La voltammétrie linéaire.

Cette méthode nécessite l'utilisation de trois électrodes : une **électrode fixe** dont on fait varier linéairement le potentiel par rapport à une **électrode au calomel**, ainsi qu'une **électrode de travail** (platine) qui permet de déterminer le courant provoqué par les réactions qui s'établissent [Tallec A., 1993]. Le potentiel imposé expérimentalement varie donc avec le temps selon l'équation : $E = E_0 \pm vt$, où v représente la vitesse de balayage en volt par unité de temps. La figure 3.5.1 montre l'évolution du potentiel imposé en fonction du temps.

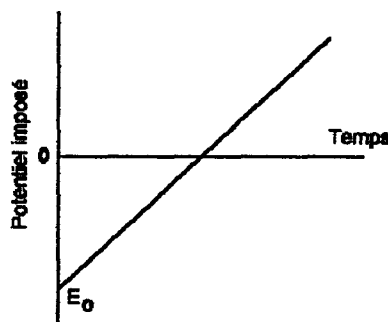


Fig. 3.5.1 : Evolution du potentiel imposé lors d'une expérience de voltammétrie linéaire.

En polarographie, les vitesses de balayage utilisées sont suffisamment faibles pour permettre l'établissement d'un équilibre à chaque instant. Cet équilibre se traduit par l'obtention d'un état stationnaire dans la couche de diffusion qui s'établit entre la surface de l'électrode et le reste de la solution. Par contre, lorsque les vitesses de balayage deviennent plus importantes (0.1 à 100 V.s^{-1}), la courbe de polarisation se trouve fortement modifiée. Le régime stationnaire ne peut alors plus s'établir et on observe l'apparition de pics sur la courbe courant/potentiel (Fig. 3.5.2).

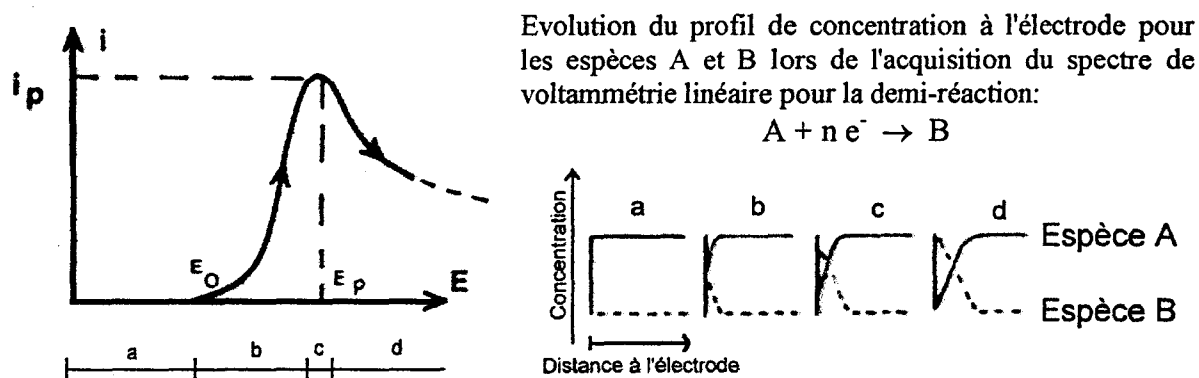


Fig. 3.5.2 : Pic de courant en voltammétrie linéaire et concentration des espèces.

D'après Tallec A., 1993.

En effet, on sait que la constante de vitesse de transfert de charge peut s'écrire:

$$k_f = k_0 \cdot \exp\left(\frac{-\alpha n F}{RT} (E - E^o)\right)$$

où E est le potentiel imposé et E^o est le potentiel d'oxydo-réduction formel du composé étudié [Mabbott G.A., 1983]. On voit donc que lorsque le potentiel imposé expérimentalement approche de la valeur du potentiel d'oxydo-réduction de l'espèce étudiée, la vitesse de transfert de charge augmente exponentiellement (Fig. 3.5.2, phase b).

Cependant, quand le potentiel atteint une valeur suffisante pour permettre la réaction électrochimique, la substance électro-active disparaît rapidement du voisinage de l'électrode à cause de la vitesse de balayage élevée qui empêche l'établissement de tout régime stationnaire de diffusion. Le gradient de concentration adopte alors une valeur préliminaire élevée tandis que la couche de diffusion s'épaissit (Fig. 3.5.2, phases b et c). La vitesse de diffusion de l'espèce active étant, comme on le sait, proportionnelle au gradient de concentration entre la solution et la surface de l'électrode, l'épaississement de cette couche entraîne la diminution de la vitesse de diffusion vers l'électrode. Lorsque cette diminution devient plus importante que l'accroissement de la vitesse de transfert de charge, le courant passe par un maximum (Fig. 3.5.2, phase c), puis diminue et tend vers une valeur stationnaire correspondant à un palier de courant (Fig. 3.5.2, phase d) [Tallec A., 1993; Mabbott G.A., 1983; Kissinger P.T. and Heineman W.R., 1983].

L'obtention de ce type de pics en voltammétrie linéaire (et cyclique) nécessite que la solution ne soit pas agitée, de façon à ce que les changements de concentration au niveau de l'électrode ne puissent avoir lieu que par diffusion, et non par convection [Mabbott G.A., 1983; Kissinger P.T. and Heineman W.R., 1983].

Les deux principales caractéristiques d'un voltammogramme sont le potentiel de pic (E_p) et le courant de pic (i_p). Ce dernier est donné par l'équation de Sevcik-Randles :

$$i_p = k \times A \times n^{3/2} \times D^{1/2} \times v^{1/2} \times C$$

où A est la surface de l'électrode, v la vitesse de balayage des potentiels, C la concentration du substrat et k un coefficient numérique.

- Pour un système réversible, le potentiel de pic est indépendant de la vitesse de balayage des potentiels :

$$E_{pa} = E^0 + \frac{0.03}{n} \quad \text{pour une demi-réaction d'oxydation}$$

$$E_{pc} = E^0 - \frac{0.03}{n} \quad \text{pour une demi-réaction de réduction}$$

- Pour un système irréversible, le potentiel de pic dépend de la vitesse de balayage v des potentiels :

$$E_{pa} = Cte + \frac{0.06}{\alpha \times n} \log(\sqrt{v}) \quad \text{pour une demi-réaction d'oxydation}$$

$$E_{pc} = Cte - \frac{0.06}{\alpha \times n} \log(\sqrt{v}) \quad \text{pour une demi-réaction de réduction}$$

3.5.1.2. La voltammétrie cyclique.

Le principe de la voltammétrie cyclique est comparable à celui de la voltammétrie linéaire. Cependant, le balayage s'effectue ici de façon cyclique. Par exemple, après avoir balayé en direction des potentiels anodiques en réalisant donc une oxydation, on inverse le sens du potentiel pour effectuer cette fois un balayage vers les potentiels cathodiques. Ainsi, si la vitesse de balayage est suffisamment importante, le produit formé à l'aller est encore présent au retour, et pourra être réduit [Tallec A., 1993]. On peut, de plus, balayer les potentiels choisis plusieurs fois de façon à suivre l'apparition ou la disparition de pics, c'est-à-dire l'apparition ou la disparition de réactions d'oxydo-réduction. La figure 3.5.3 montre un profil possible pour le potentiel imposé lors d'une expérience de voltammétrie cyclique.

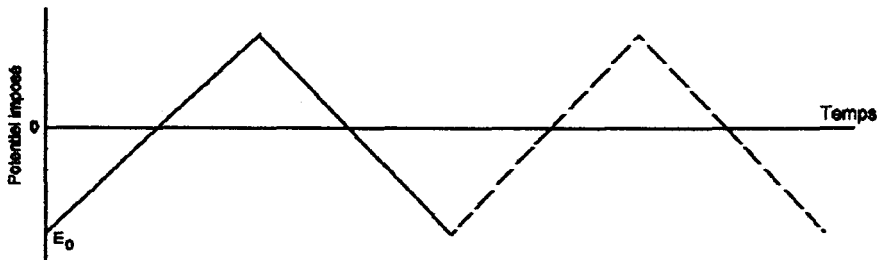


Fig. 3.5.3 : Profil du potentiel imposé lors d'une expérience de voltammétrie cyclique.

La voltammétrie cyclique permet de déterminer si l'on est en présence d'un système rapide ou lent.

Pour un système rapide, les équations développées dans le cas de la voltammétrie linéaire sont toujours valables. L'écart entre les potentiels des pics reste donc indépendant de la vitesse et peut s'écrire :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.06}{n}$$

On peut ainsi déterminer le nombre d'électrons mis en jeu par ce couple rédox.

On voit tout de suite que le potentiel standard de ce couple est la demi-somme des potentiels des pics de réduction et d'oxydation. La figure 3.5.4 montre le voltammogramme type d'un système rapide (Fig. 3.5.4a)

Dans le cas d'un système lent, ΔE_p est plus important et varie en fonction de la vitesse (Fig. 3.5.4b). Les équations ci-dessus ne sont alors plus applicables. Cependant, la position des pics et le comportement du voltammogramme lorsque l'on fait varier la vitesse de balayage peuvent apporter des informations quant aux mécanismes mis en jeu.

En effet, que ce soit dans le cas d'un système rapide ou d'un système lent, la voltammétrie cyclique permet de mettre en évidence une réaction chimique ayant lieu suite à la réduction ou à l'oxydation d'une espèce. On parle alors de mécanisme EC (pour Electrochimique/Chimique).

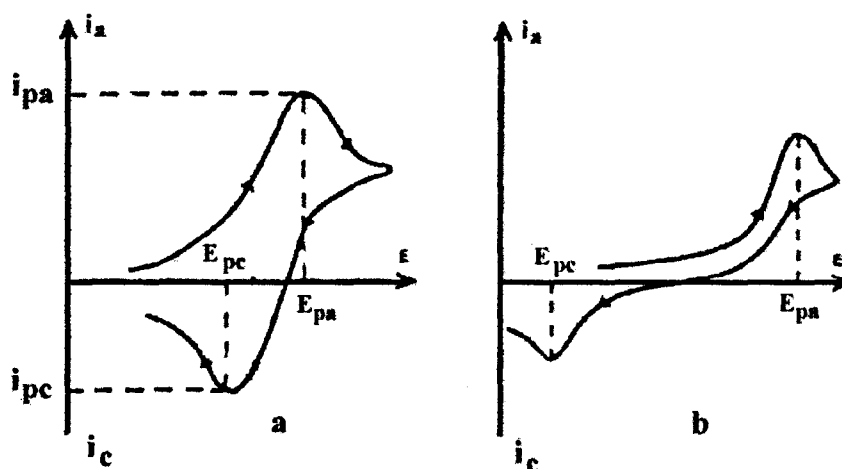


Fig. 3.5.4 : Courbes de voltammétrie cyclique dans le cas d'un système rapide (a) et d'un système lent (b).

D'après Tallec A., 1993.

La figure 3.5.5 montre l'exemple d'une série de voltammogrammes obtenue dans le cas d'un système EC. Il s'agit ici du couple redox $\text{CO}_2/\text{CO}_2^{\bullet-}$. Dans cet exemple, suite à la

réduction de CO_2 , l'espèce formée peut réagir avec elle-même pour former $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, ou avec une molécule d'eau pour conduire à $\text{HCO}_2^\bullet$. Ces réactions consommeront donc le radical anion qui ne sera plus disponible pour la réaction d'oxydation. Ainsi, si l'on diminue la vitesse de balayage, la réaction chimique aura le temps de faire disparaître la totalité de l'espèce réduite du couple avant que le potentiel ne soit à nouveau suffisamment élevé pour permettre la réaction d'oxydation. On verra alors disparaître le pic d'oxydation et seul le pic de réduction restera observable [Tallec A., 1993].

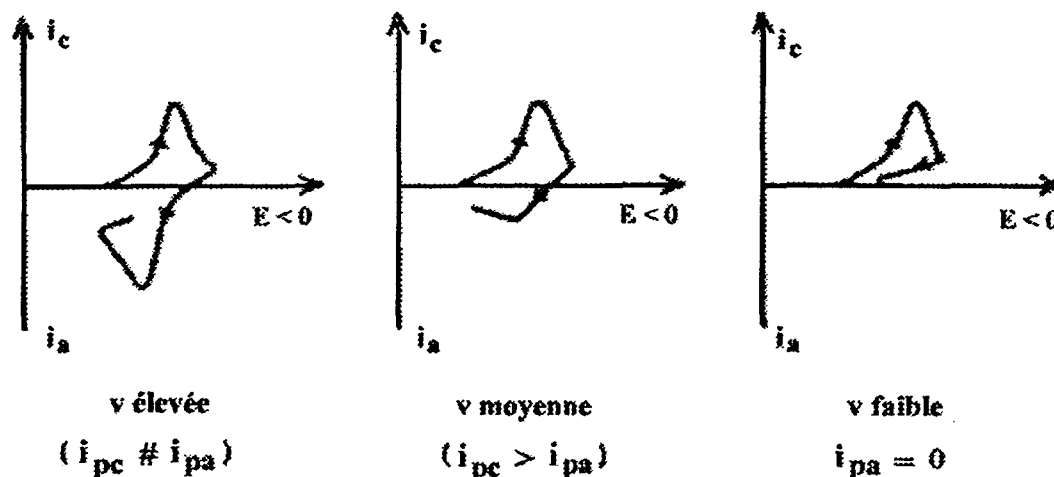


Fig. 3.5.5: Evolution de l'allure d'un voltammogramme en fonction de la vitesse de balayage v , dans le cas d'un mécanisme EC.

D'après Tallec A., 1993.

Une série de voltammogrammes telle que celle décrite dans la figure 3.5.5 est donc caractéristique d'un cas où une réaction chimique implique l'espèce formée lors d'une réaction d'oxydation ou de réduction. Différentes autres possibilités peuvent se présenter. Ainsi, la réaction chimique peut, elle-même, être réversible ou non. Elle peut, aussi, précéder la demi-réaction d'oxydation (mécanisme CE) et non la suivre [Mabbott G.A., 1983].

3.5.3. Mode opératoire.

Les voltammogrammes ont été obtenus à l'aide du potentiostat SOLEA TACUSSEL® PJT 120 équipé d'une interface programmable SOLEA TACUSSEL® IMT1. L'électrode de travail et l'électrode auxiliaire utilisées étaient respectivement une électrode de platine CTV 101T et un fil de platine. Une électrode de calomel fut employée comme référence. Celle-ci était séparée du système étudié par une solution saturée de KCl maintenue dans une cavité terminée par un verre fritté.

Les 4-mercaptoimidazoles (1 mM) furent mis en solution dans de l'acétonitrile anhydre, CH_3CN , de qualité analytique. Du perchlorate de tétraéthylammonium, $(\text{N}^+\text{Et}_4, \text{ClO}_4^-)$ recristallisé fut utilisé comme électrolyte à une concentration de 0.1 N. L'oxygène de la solution fut éliminé avant toute mesure par passage d'un courant d'azote anhydre. Ce dernier

était par ailleurs maintenu au dessus de la solution pendant l'acquisition des spectres afin d'éviter tout retour d'oxygène dans le milieu.

Les vitesses de balayages utilisées vont de 50 mV/s à 400 mV/s. Les potentiels furent explorés de -2.1 V à $+1.4$ V, à raison de deux balayages successifs (Fig. 3.5.4). Toute mesure reste impossible au delà de ces valeurs de potentiel à cause de la réactivité propre du solvant.

3.5.4. Les résultats.

La figure 3.5.6 montre le voltammogramme obtenu pour le 1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, **2**, à 400 mV/s.

On voit nettement la présence de 2 vagues de réduction notées 2 et 5 ($I < 0$) et de 4 vagues d'oxydation notées 1', 2', 3' et 4' ($I > 0$). On voit, de plus, que tous les systèmes visibles sont hautement irréversibles.

En effet, le couple d'oxydo-réduction $RS^-/RS^\bullet$ n'est jamais observable, car il est toujours suivi par une réaction chimique comme par exemple: $2 RS^\bullet \rightarrow RSSR$.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 3.5.1.2., ce couplage d'une réaction chimique avec une réaction d'oxydo-réduction conduit à un système irréversible. L'existence de cette réaction chimique et la présence du radical intermédiaire ont été vérifiées par RPE (§3.7.2.).

Les différentes demi-réactions d'oxydation et de réduction observables pour ce système ont pu être déterminées par analogie avec des travaux précédents rapportant l'étude par voltammétrie cyclique de thiols et de disulfures aromatiques [Bradbury J.R. *et al.*, 1981; Howie J.K. *et al.*, 1977; Simonet J. *et al.*, 1981].

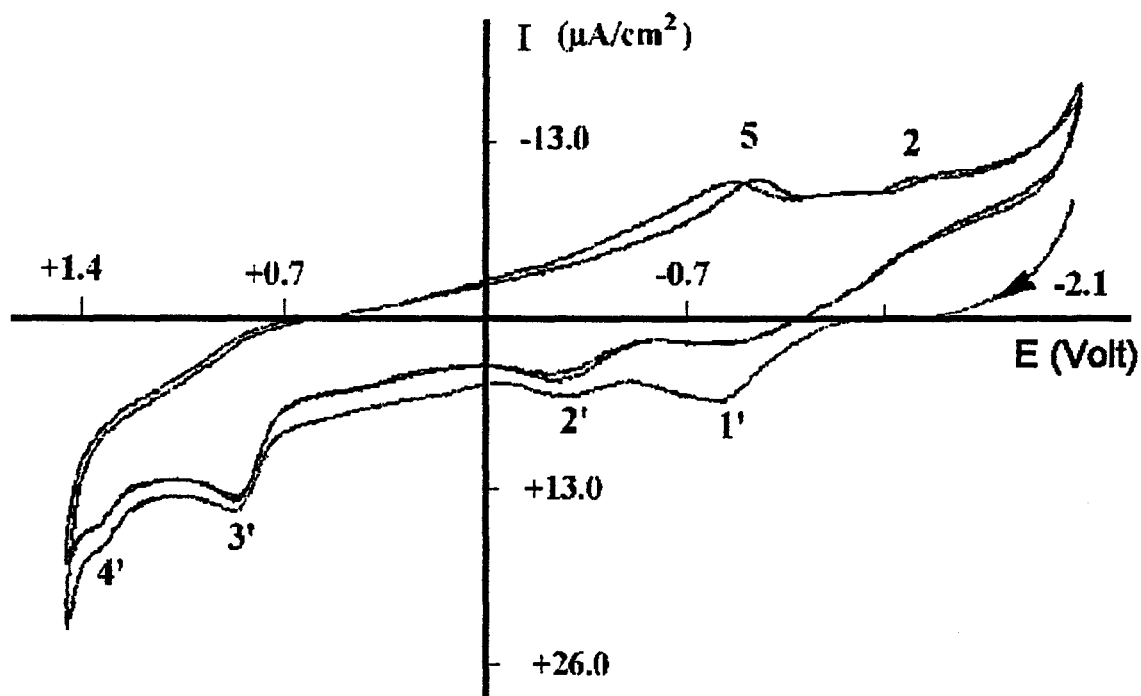
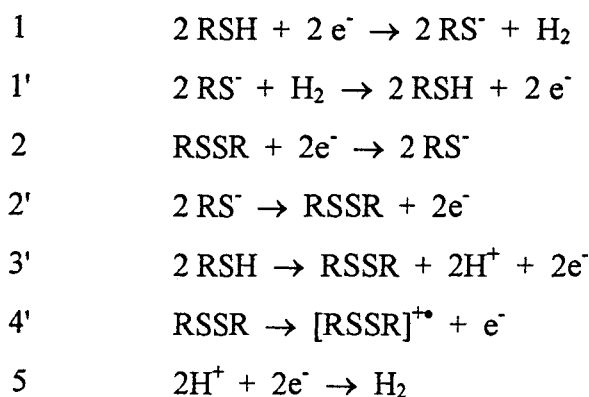


Fig. 3.5.6 : Voltammogramme obtenu pour le 1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, **2**, à 400 mV/s.

Les différents pics observables sur les voltammogrammes peuvent être attribués aux demi-réactions suivantes [Bradbury J.R *et al.*, 1981] :



Le pic de la demi-réaction 1 n'est visible pour aucune des molécules.

Les tableaux suivants donnent les différents potentiels observés pour les demi-réactions énoncées ci-dessus:

1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, 1:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.640	-0.851	-0.519		0.973	
100	-1.691	-0.851	-0.447	-0.088		1.459
150	-1.777	-0.881	-0.452	-0.068	1.016	1.487
200	-1.884	-0.908	-0.499	-0.057	1.112	1.509
300		-0.924	-0.493	0.010	0.977	1.400
Moyenne	-1.75	-0.88	-0.48	-0.05	1.02	1.46

1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 2:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.714	-0.953		-0.246	0.943	
100	-1.764	-0.966		-0.273	0.907	
150	-1.809	-0.937		-0.258	0.905	
200		-0.974			0.898	1.368
300		-0.911	-0.836	-0.199	0.889	1.371
400	-1.529	-0.905	-0.797	-0.258	0.894	1.350
Moyenne	-1.70	-0.94	-0.82	-0.25	0.91	1.36

1-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 3:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.680			-0.319	0.937	
100	-1.665				0.915	
150	-1.648		-0.883	-0.345	0.894	
200	-1.680		-0.862	-0.350		
300	-1.701	-0.786	-0.816	-0.319		1.292
400	-1.736	-0.819	-0.844	-0.321		1.303
Moyenne	-1.69	-0.80	-0.85	-0.33	0.92	1.30

1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 4:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.788				0.969	1.228
100	-1.788				0.947	1.217
150	-1.768			-0.366	0.905	1.212
200	-1.798		-0.818	-0.347		1.228
300			-0.812			1.217
400			-0.809	-0.330		1.239
Moyenne	-1.79		-0.81	-0.35	0.94	1.22

1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 5:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.790	-1.116				1.083
100	-1.768	-1.127		-0.387		1.083
150	-1.857	-1.161		-0.354		1.094
200		-1.167		-0.354		1.094
300			-0.635	-0.345		1.109
Moyenne	-1.81	-1.14	-0.64	-0.36		1.09

1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 6:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.564				0.246	
100	-1.623	-0.937		-0.457	0.243	0.998
200	-1.653	-0.987		-0.441	0.273	1.029
300	-1.663	-1.008		-0.431	0.273	1.019
400	-1.649	-1.008		-0.430	0.298	1.040
Moyenne	-1.63	-0.99		-0.44	0.27	1.02

1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 7:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.551				0.345	
100	-1.551				0.353	
150	-1.562				0.377	
200	-1.586			-0.326	0.354	1.124
300	-1.671		-0.553	-0.321	0.366	1.117
400	-1.768		-0.557	-0.326	0.369	
Moyenne	-1.61		-0.55	-0.32	0.36	1.12

1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, 9:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50	-1.745	-1.098				1.164
100	-1.766	-1.088				1.152
150	-1.806	-1.092				1.166
200		-1.173				1.174
300		-1.098	-0.528	-0.323		1.174
400			-0.687	-0.290		
Moyenne	-1.77	-1.11	-0.61	-0.31		1.17

1-méthyl-5-(2-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, 10:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50					0.197	
100	-1.675	-0.855			0.223	
200		-0.930			0.254	1.117
300		-0.935			0.273	1.158
400		-0.945			0.296	1.157
Moyenne	-1.68	-0.92			0.25	1.14

1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 11:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50				-0.456	0.142	
100	-1.617	-0.735		-0.441	0.172	1.071
200	-1.629	-0.804		-0.428	0.200	1.039
300	-1.680	-0.844		-0.424	0.227	1.071
400	-1.701	-0.872		-0.420	0.231	1.092
Moyenne	-1.66	-0.81		-0.43	0.19	1.07

1-méthyl-5-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 12:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50		-0.754			0.151	
100	-1.607	-0.859			0.168	0.903
200	-1.701	-0.914			0.187	
300		-0.930			0.187	1.086
Moyenne	-1.66	-0.86			0.17	0.99

1-méthyl-5-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 13:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50					0.924	1.178
100					0.903	1.172
200		-0.979			0.944	1.218
300		-0.993			0.916	1.177
400		-0.958			0.914	1.186
Moyenne		-0.98			0.92	1.18

1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 14:

Vitesse (mV/s)	Réduction (V)		Oxydation (V)			
	2	5	1'	2'	3'	4'
50				-0.315		
100	-1.565	-0.447		-0.305		
200	-1.579	-0.485		-0.284		
300	-1.598	-0.510		-0.284		
400	-1.634	-0.525		-0.311		
Moyenne	-1.59	-0.49		-0.30		

Comme on peut le voir à la lecture de ces tableaux, les valeurs de potentiels des différents pics varient en fonction de la vitesse de balayage. Ceci confirme donc le caractère irréversible des réactions mises en jeu.

En fonction des molécules étudiées, certains pics sont plus ou moins observables.

Le tableau 3.5.1 rassemble les moyennes des potentiels auxquels on peut observer le pic d'oxydation ou de réduction pour toutes les demi-réactions et chacune des molécules. De plus, on y trouvera les potentiels des demi-réactions d'oxydation et de réduction pour la N-acétylcystéine (NAC) et le thiophénol. Enfin, le logarithme de l'inverse de l' IC_{50} (exprimé en μM) relevé dans le test du DPPH y est reporté. Rappelons que $\log(1/IC_{50})$ est d'autant plus élevé que la molécule est active vis-à-vis du DPPH.

Composé	Réduction(V)		Oxydation (V)				log(1/ IC_{50})
	2	5	1'	2'	3'	4'	
1	-1.75	-0.88	-0.48	-0.05	1.02	1.46	2.538
2	-1.70	-0.94	-0.82	-0.25	0.91	1.36	3.111
3	-1.69	-0.80	-0.85	-0.33	0.92	1.30	2.871
4	-1.79		-0.81	-0.35	0.94	1.22	2.680
5	-1.81	-1.14	-0.64	-0.36		1.09	3.297
6	-1.63	-0.99		-0.44	0.27	1.02	4.482
7	-1.61		-0.55	-0.32	0.36	1.12	4.721
9	-1.77	-1.11	-0.61	-0.31		1.17	4.721
10	-1.68	-0.92			0.25	1.14	4.638
11	-1.66	-0.81		-0.43	0.19	1.07	4.721
12	-1.66	-0.86			0.17	0.99	4.699
13		-0.98			0.92	1.18	2.883
14	-1.59	-0.49		-0.30			4.638
NAC	-1.33				0.73		-
Thiophénol	-1.47			-0.16	0.98	1.26	-

Tableau 3.5.1 : Valeurs des potentiels des pics de demi-réaction d'oxydation et de réduction présentées par les 4-mercaptoimidazoles.

On remarque tout de suite la forte variation de la valeur du potentiel relatif au pic de la demi-réaction d'oxydation du thiol en disulfure, 3'. Cette variation ne se reproduit pas pour les autres demi-réactions. On voit, de plus, que ce potentiel est directement relié à l'activité des 4-mercaptoimidazoles en tant que piègeur du radical DPPH. Ainsi, les molécules substituées en positions 2 et 5 par des groupements électro-attracteurs et qui possèdent une forte activité dans le test du DPPH, montrent une valeur de potentiel de l'ordre de 0.15 à 0.36 V pour cette

demi-réaction (Fig. 3.5.7). Par contre, les molécules ayant des groupements électro-donneurs en positions 1 et 5, et qui n'ont qu'une faible activité vis-à-vis du DPPH, présentent un potentiel de l'ordre de 0.92 à 1.02 V (Fig. 3.5.7), à savoir de l'ordre de grandeur d'un thiol aromatique [Bradbury J.R *et al.*, 1981].

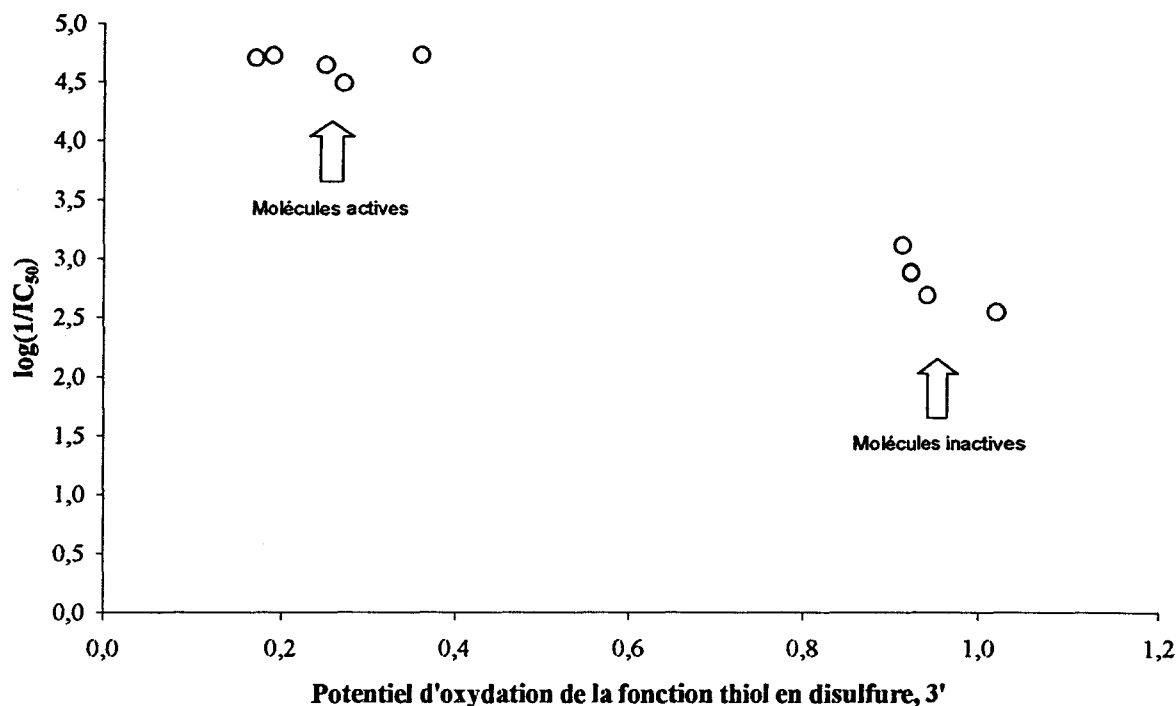


Fig. 3.5.7 : Séparation des molécules actives et inactives dans le test du DPPH en fonction du potentiel de demi-réaction d'oxydation du thiol en disulfure dans CH_3CN .

Le potentiel de la demi-réaction d'oxydation du thiol en disulfure est donc largement influencé par la nature de la substitution du noyau imidazole de nos molécules. De plus, le rapport existant entre ce potentiel et l'activité de 4-mercaptoimidazoles dans le test du DPPH semble prouver que le piégeage de ce radical se ferait par oxydation du thiol et formation d'une liaison disulfure. Le radical thiyle intermédiaire de cette réaction a par ailleurs pu être isolé par RPE (§ 3.7.2).

3.6. Complexation du cuivre par les 4-mercaptoimidazoles.

3.6.1. Intérêt de la complexation du cuivre.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.4., les métaux de transition tels que le cuivre peuvent être à l'origine de la formation de dérivés actifs de l'oxygène, comme par exemple le radical hydroxyle ou l'anion superoxyde. De plus, nous verrons au paragraphe 3.8.2., que la présence d'ion Cu^{2+} est nécessaire au mécanisme de peroxydation lipidique impliqué dans l'athérosclérose. Ces différents mécanismes font intervenir les propriétés réductrices de l'ion cuivreux Cu^+ , provenant lui-même de la réduction de l'ion cuivrique Cu^{2+} . Or, il a été montré que cette réduction de l'ion cuivrique en ion cuivreux pouvait résulter d'une réaction avec un thiol [Heinecke J.W. *et al.*, 1993].

Afin de limiter l'action nocive de cet ion, il peut être utile de chélater Cu^{2+} ou Cu^+ à l'aide d'un ligand qui empêchera toute réduction ultérieure du métal [Lodge J.K. *et al.*, 1998; Misik V. *et al.*, 1993].

Cette partie de l'étude avait pour but d'étudier l'éventuelle capacité des 4-mercaptoimidazoles à complexer le cuivre Cu^{2+} , et l'influence qu'une telle complexation pourrait avoir sur la réduction du cuivre II en cuivre I.

3.6.2. Etude de la complexation par spectrophotométrie UV.

3.6.2.1. Mode opératoire.

La formation d'un complexe entre le cuivre Cu^{2+} et les 4-mercaptoimidazoles fut étudiée dans un premier temps par spectrométrie UV. Le 4-mercaptoimidazole était mis en solution (100 μM) avec du sulfate de cuivre II, CuSO_4 (0 à 100 μM), dans de l'éthanol à température ambiante. L'éthanol fut en effet utilisé comme solvant, car les complexes s'avérèrent peu solubles en solvant aqueux, comme par exemple le PBS. La figure 3.6.1 montre l'évolution du spectre UV du 1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole lors d'ajouts successifs de Cu^{2+} . Parallèlement à l'acquisition des spectres, l'évolution des espèces en solution était suivie par chromatographie sur couche mince dans le système $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5.

3.6.2.2. Résultats.

On peut voir sur la figure 3.6.1 que l'ajout de quantités croissantes de Cu^{2+} en solution modifie fortement le spectre UV du 4-mercaptoimidazole. La présence de deux points isobestiques à 250 et 315 nm indique que cette modification provient de l'implication du 4-mercaptoimidazole dans une réaction qui doit de toute évidence faire aussi intervenir le cuivre.

On peut aussi noter que le spectre ne présente plus aucune modification au-delà d'une concentration de 50 μM en Cu^{2+} . On en déduit que la stoechiométrie de la réaction mise ainsi en évidence est de 2:1 par rapport au 4-mercaptoimidazole et au cuivre.

Les chromatographies sur couche mince montrent, de même, la disparition progressive de la forme réduite du 4-mercaptoimidazole et l'apparition concomitante d'une nouvelle espèce. Le R_f de ce nouveau composé nous permet d'affirmer qu'il ne s'agit pas du disulfure. Plus aucune modification de l'apparence de ces chromatographies n'est visible lorsque la concentration en Cu^{2+} dépasse les 50 μM .

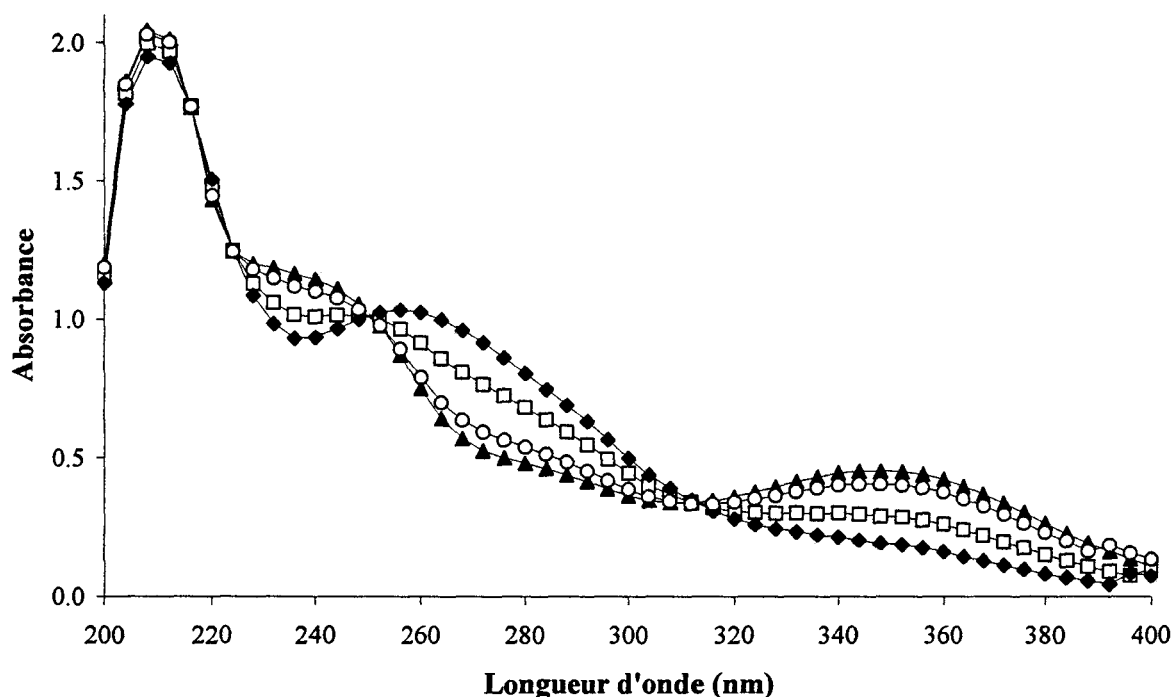


Fig. 3.6.1 : Evolution du spectre UV du 1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 6 (100 μM) en présence de (◆) 0 μM , (□) 10 μM , (○) 35 μM , (▲) 50 μM et plus de CuSO_4 .

Ces données semblent indiquer la formation d'un complexe impliquant 2 molécules de 4-mercaptoimidazole pour un ion cuivrique:



où ImSH représente le 4-mercaptoimidazole.

Afin de vérifier cette hypothèse, il était nécessaire d'étudier la réaction des 4-mercaptoimidazoles avec le cuivre à l'aide d'autres méthodes. Ainsi, le spectre RPE des complexes de 4-mercaptoimidazoles avec le cuivre Cu^{2+} a été obtenu (§ 3.7.4.). Ces complexes ont été, de plus, caractérisés par spectrométrie de masse.

3.6.3. Etude par RPE de la complexation de Cu^{2+} par les 4-mercaptoimidazoles.

Cette étude est décrite en détail dans la partie RPE de ce rapport (§ 3.7.4.). Elle montre que la mise en solution des 4-mercaptoimidazoles avec Cu^{2+} entraîne la formation d'un complexe entre ces deux espèces. L'existence d'un signal de RPE implique que le cuivre reste sous la forme cuivrique lors de la formation de ce complexe. Enfin, la présence de soufre dans la sphère de ligandation du cuivre a pu être affirmée.

3.6.4. Etude de la complexation de Cu^{2+} par spectrométrie de masse.

L'analyse par spectrométrie de masse de la solution formée par ajout d'un équivalent de CuSO_4 à une solution de 100 μM de 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, **9**, fournit le spectre de la figure 3.6.2.

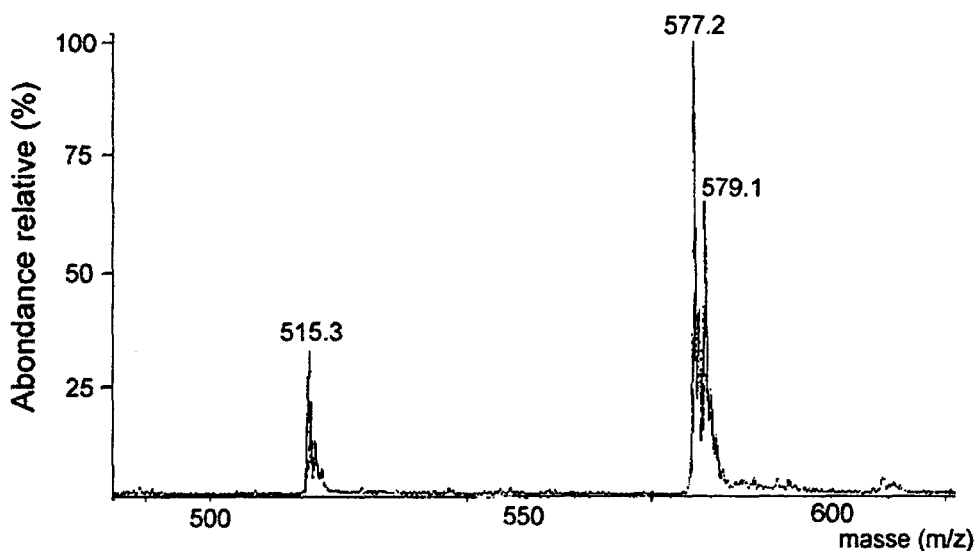


Fig. 3.6.2 : Spectre de masse de la solution formée par ajout d'un équivalent de CuSO_4 à une solution de 100 μM de 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, **8**.

Rappelons tout d'abord que le 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, **9**, possède une masse molaire de 258.2 g/mol. Le cuivre, quant à lui, possède deux isotopes : le ^{63}Cu d'une masse molaire de 62.93 g/mol et d'une abondance de 69.17% et le ^{65}Cu , d'une masse molaire de 64.93 g/mol et d'une abondance de 30.83%.

Le pic principal, à $m/e = 577$ est donc attribuable à l'espèce $(2 \text{ ImSH} + ^{63}\text{Cu} - 2 \text{ H})$, correspondant au complexe $(\text{ImS})_2\text{Cu}$. Le pic suivant, à $m/e = 579$ correspondant au même complexe, mais impliquant cette fois l'isotope ^{65}Cu du cuivre. Enfin, le pic visible à $m/e = 515$ n'est autre que le disulfure du 4-mercaptoimidazole.

La spectrométrie de masse montre donc, elle-aussi, la formation d'un complexe entre deux molécules de 4-mercaptoimidazole et un atome de cuivre.

3.6.5. Degré d'oxydation du cuivre.

Afin d'étudier l'éventuelle réduction de l'ion cuivrique Cu^{2+} en ion cuivreux Cu^+ par les 4-mercaptoimidazoles, la première étude consista à mettre en évidence la formation de Cu^+ à l'aide de la bathocuproïne. Ce chélateur spécifique de Cu^+ possède en effet la particularité de présenter, sous la forme complexée, un maximum d'absorption en UV à 480 nm ($\epsilon = 9047 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), rendant possible la mise en évidence de Cu^+ en solution [Misik V. *et al.*, 1993].

La bathocuproïne (1.0 mM) fut donc mise en solution avec du cuivre II (25 à 75 μM) et du 4-mercaptoimidazole. La quantité de cuivre réduit fut déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage provenant de solutions de différentes concentrations de cuivre Cu^{2+} totalement réduit par de l'ascorbate, en présence de bathocuproïne.

Les résultats obtenus par la méthode de la bathocuproïne montrent que, dans ces conditions expérimentales, le cuivre Cu^{2+} est totalement réduit sous la forme Cu^+ en présence de 4-mercaptoimidazole. Cependant, ces résultats sont en apparente contradiction avec l'obtention d'un signal caractéristique du complexe de cuivre par RPE. En effet, seul le cuivre Cu^{2+} est capable de fournir un tel signal.

Cependant, il fut montré au cours d'une dernière expérience que le signal RPE du complexe cuivrique pouvait être totalement éteint en présence de bathocuproïne. La réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par les 4-mercaptoimidazoles résulte en fait d'une "complexation réductive" déjà mise en évidence pour le captopril et l'épicaptopril [Misik V. *et al.*, 1993; Fernandes A.C. *et al.*, 1996]. En absence de la bathocuproïne, seule une fraction de Cu^{2+} est réduite sous l'action du 4-mercaptoimidazole. Cependant, en présence de bathocuproïne, la très forte affinité de celle-ci pour Cu^+ déplace l'équilibre vers la réduction de Cu^{2+} :

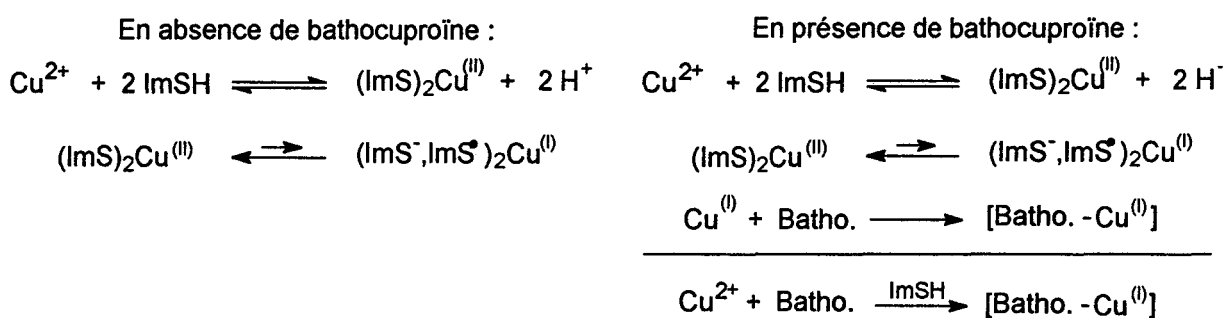


Fig. 3.6.3 : Mécanisme de complexation réductive de Cu^{2+} par les 4-mercaptoimidazoles en présence de bathocuproïne.

3.6.6. Modélisation moléculaire du complexe Cu^{2+} / 4-mercaptoimidazole.

La géométrie du complexe formé par les 4-mercaptoimidazoles et le cuivre Cu^{2+} a été étudiée par modélisation moléculaire.

Pour ce faire, les calculs ont été conduits en utilisant le programme Spartan[®] Plus 5.0, à l'aide de la méthode semi-empirique PM3 dans le formalisme UHF (Unrestricted Hartree Fock). La multiplicité du composé fut fixée à 2 pour tenir compte du degré d'oxydation, donc du spin électronique, du cuivre. Les géométries furent optimisées par minimisation de leur énergie totale.

Les calculs ont été initiés en utilisant plusieurs géométries de départ pour le complexe: tétraédrique, plan carré, et une géométrie quelconque.

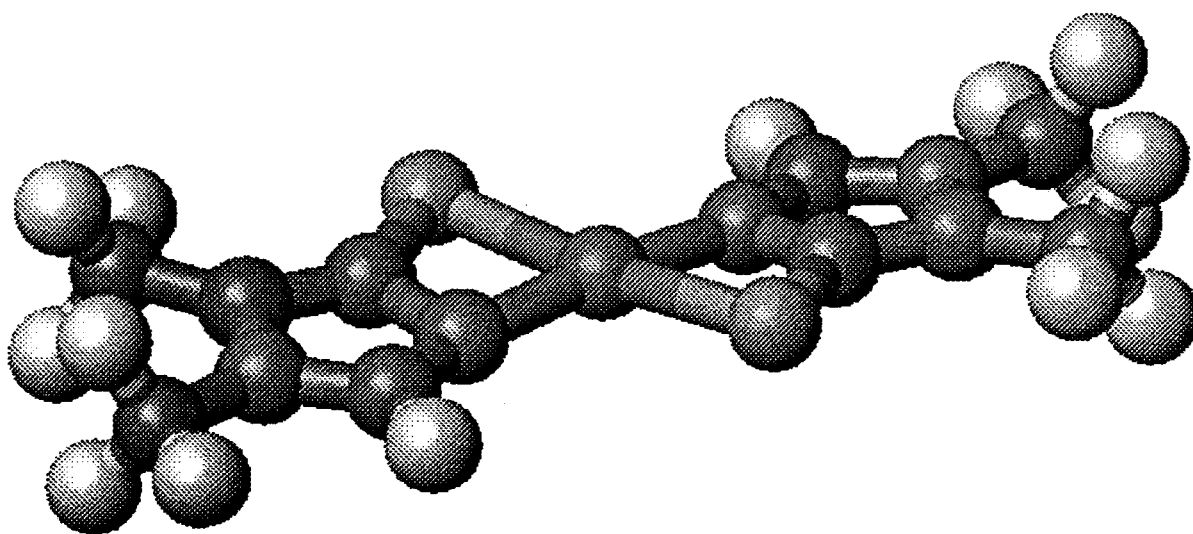
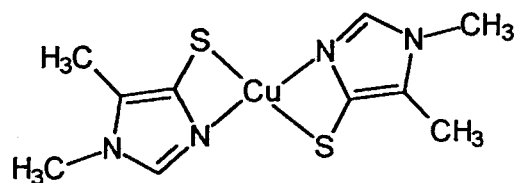
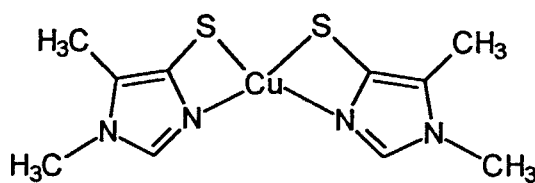


Fig. 3.6.4 : Complexe formé par le 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, 1, et le Cu^{2+} .
Géométrie optimisée par Spartan[®] Plus 5.0.

Il apparaît que la géométrie la plus stable énergétiquement correspond à un complexe plan carré (Fig. 3.6.4). Chacun des 4-mercaptoimidazoles est lié au cuivre par l'atome de soufre et l'atome d'azote de la position 3 du noyau imidazole. De plus, le complexe trans est plus stable de l'ordre de 3.0 kcal/mol que le complexe cis (Fig. 3.6.5)



Complexe Trans



Complexe Cis

Fig. 3.6.5 : Complexes Trans et Cis formés par le cuivre II et le 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, 1.

3.7. Utilisation de la Résonance Paramagnétique Electronique.

3.7.1. Principe de la RPE.

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une méthode de spectroscopie reposant sur l'interaction entre un champ magnétique et un moment magnétique permanent d'origine électronique. Cette méthode peut donc être utilisée dans l'étude des radicaux, mais aussi des complexes de métaux de transition et de terres rares, composés possédant tous un spin électronique non nul. Les lecteurs connaissant déjà les principes de la RPE pourront se reporter directement au paragraphe 3.7.2.

3.7.1.1. Propriétés magnétiques de l'électron.

3.7.1.1.1. Origine du moment magnétique de l'électron.

Le rapport entre le moment magnétique et le moment cinétique d'une particule chargée peut être déduit de simples considérations d'électrostatique et de magnétostatique classique. En effet, considérons un électron décrivant une trajectoire circulaire de rayon R , à la vitesse constante V (Fig. 3.7.1).

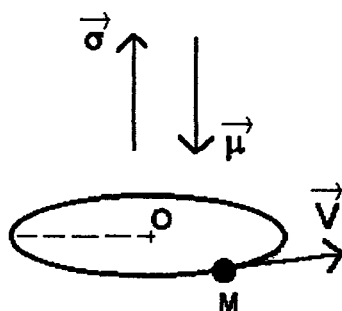


Fig. 3.7.1 Origine du moment magnétique de l'électron.

Notons m_e la masse de l'électron et prenons pour origine le centre O du cercle décrit. Si l'électron se trouve au point M à l'instant t , nous pouvons écrire le moment cinétique de celui-ci comme étant, par définition:

$$\vec{\sigma} = m_e \cdot \overrightarrow{OM} \wedge \vec{V}$$

On sait que le moment magnétique créé par une spire de rayon R parcourue par un courant électrique I peut s'écrire :

$$\vec{\mu} = I \oint_S \vec{u} \cdot d\vec{S} = I \cdot S \cdot \vec{u}$$

Où $\vec{u}$ est le vecteur normal au plan du disque et S la surface de celui-ci.

La période à laquelle l'électron décrit sa trajectoire est de $2\pi R/V$. Par définition, le courant I développé par le mouvement de l'électron est donc :

$$I = \frac{dQ}{dt} = -e \cdot \frac{V}{2\pi R}$$

Où $-e$ est la charge de l'électron.

Nous avons donc :

$$\vec{\mu} = -e \cdot \frac{V}{2\pi R} \cdot \pi R^2 \vec{u} = -\frac{e}{2} \cdot \frac{1}{m_e} \cdot m_e \cdot R \cdot V \cdot \vec{u} = -\frac{e}{2m_e} \cdot m_e \cdot \vec{OM} \wedge \vec{V}$$

C'est à dire :

$$\vec{\mu} = -\frac{e}{2m_e} \cdot \vec{\sigma}$$

N.B. : On trouve souvent dans la littérature la formule suivante : $\vec{\mu} = -\frac{e}{2m_e c} \cdot \vec{\sigma}$

Cette formule est en fait identique à la précédente, mais est exprimée en unités CGS-Gaussian-Mixed [Karplus M. and Porter R.N., 1970], pour laquelle, entre autres, la charge de l'électron est de :

$$e = (10 \times 1.602 \cdot 10^{-19} \times 2.998 \cdot 10^8) = 4.803 \cdot 10^{-10} \text{ esu.}$$

Dans la suite du présent chapitre nous continuerons toutefois à exprimer les différentes équations dans le Système International.

Le moment cinétique orbital σ_L de l'électron, ainsi que sa projection σ_{Lz} sur l'axe Oz sont des propriétés quantifiées pouvant admettre les valeurs suivantes :

$$\left\| \vec{\sigma}_L \right\| = \hbar \sqrt{l(l+1)} \quad \text{et} \quad \sigma_{Lz} = m\hbar$$

Où l est le nombre quantique orbital, m est le nombre quantique magnétique (entier compris entre $-l$ et $+l$) et $\hbar$ la constante de Planck réduite ($\hbar = h/2\pi$).

Comme nous l'avons vu précédemment, ce moment cinétique orbital de l'électron est à l'origine d'un moment magnétique orbital lui-aussi quantifié. Celui-ci, que nous noterons μ_L , et sa projection μ_{Lz} sur l'axe Oz peuvent en effet prendre les valeurs suivantes :

$$\left\| \vec{\mu}_L \right\| = \frac{e\hbar}{2m_e} \sqrt{l(l+1)} = \beta_e \cdot \sqrt{l(l+1)}$$

$$\mu_{Lz} = -m \cdot \beta_e$$

où β_e est le magnéton de Bohr.

En prenant $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ J.s, $m_e = 0.911 \cdot 10^{-30}$ kg et $e = 1.602 \cdot 10^{-19}$ C, on trouve que $\beta_e = 0.9274 \cdot 10^{-23}$ A.m² = $9.274 \cdot 10^{-27}$ J.T⁻¹.

3.7.1.1.2. L'effet Zeeman.

On sait que l'énergie d'interaction d'un moment magnétique μ avec un champ magnétique H_0 peut se noter :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H_0}$$

La présence d'un champ magnétique H_0 va donc perturber l'hamiltonien $\bar{H}$, qui, si l'on considère un spin électronique nul, deviendra:

$$\hat{H} = \bar{H} + \frac{e}{2m_e} \cdot H_0 \cdot \sigma_{Lz} , \text{ } H_0 \text{ définit l'axe Oz}$$

Chaque niveau d'énergie E_{nlm} va donc, sous l'influence du champ magnétique H_0 , être séparé en $2l+1$ sous-niveaux d'énergie :

$$E_{nlm}^{H_0} = E_{nlm} + m \cdot \beta_e \cdot H_0$$

Cette séparation des niveaux énergétiques de l'électron sous l'effet d'un champ magnétique appliqué est appelé effet Zeeman [Ayscough P.B., 1967; Karplus M. and Porter R.N., 1970].

3.7.1.1.3. Le moment magnétique de spin.

Comme nous venons de le voir, l'effet conjugué d'un champ magnétique et du moment magnétique orbital est à l'origine d'une séparation des niveaux d'énergie. Cependant, l'expérience de Stern et Gerlach a permis de mettre en évidence le clivage magnétique du niveau fondamental ($n = 1$ et $l = 0$). Ce clivage ne peut donc être dû au moment magnétique orbital [Ayscough P.B., 1967; Karplus M. and Porter R.N., 1970].

Uhlenbeck et Goudsmit ont, de ce fait, introduit la notion de moment cinétique de spin, qui serait en quelque sorte le moment cinétique intrinsèque de l'électron.

Le moment cinétique de spin, que nous noterons σ_s , et sa projection σ_{sz} sur l'axe Oz, sont des propriétés quantifiées pouvant prendre les valeurs suivantes :

$$\left\| \vec{\sigma_s} \right\| = \hbar \sqrt{s(s+1)} \quad \text{et} \quad \sigma_{sz} = m_s \cdot \hbar$$

Où s est le nombre quantique de spin et $m_s = \pm 1/2$.

On peut associer, au moment cinétique de spin de l'électron un moment magnétique de spin μ_s :

$$\vec{\mu}_s = -g_e \cdot \frac{e}{2m_e} \cdot \vec{\sigma}_s = \gamma_e \cdot \vec{\sigma}_s$$

Où $g_e = 2.0023$ est le facteur de Landé de l'électron libre et γ_e est le rapport gyromagnétique.

Lorsque le moment cinétique orbital est nul, le clivage magnétique dû au spin électronique produit donc deux sous-niveaux:

$$E_1^{Ho} = E_1 \pm g_e \cdot \frac{e \cdot \hbar}{4m_e} \cdot Ho = E_1 \pm g_e \cdot \frac{\beta_e}{2} \cdot Ho$$

3.7.1.1.4. Atome à plusieurs électrons. Le couplage spin-orbite.

Dans le cas général, le moment cinétique total σ_J est la somme du moment cinétique de spin et du moment cinétique orbital.

$$\vec{\sigma}_J = \vec{\sigma}_L + \vec{\sigma}_S$$

Dans le cas d'un atome possédant plusieurs électrons, il est possible d'écrire :

$$\vec{\sigma}_L = \sum_i \vec{\sigma}_{li} \quad \text{et} \quad \vec{\sigma}_S = \sum_i \vec{\sigma}_{si}$$

On définit alors $S = M_S$ maximum et $L = M_L$ maximum. On obtient:

$$\left\| \vec{\sigma}_J \right\| = \hbar \sqrt{J(J+1)} \quad \text{et} \quad \sigma_{Jz} = M_J \cdot \hbar$$

Avec $|M_J| \leq J$ entier ou demi-entier et $|L - S| \leq J \leq L + S$

Le moment magnétique total μ_J peut alors s'écrire :

$$\vec{\mu}_J = -g_J \cdot \frac{e}{2m_e} \cdot \vec{\sigma}_J$$

où g_J est le facteur de Landé :
$$g_J = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)}$$

Finalement, l'énergie magnétique d'interaction s'écrit : $E = g_J \cdot \beta_e \cdot M_J \cdot Ho$

3.7.1.1.5. Le couplage hyperfin.

Le couplage hyperfin résulte de l'interaction entre le moment magnétique de spin de l'électron et celui du noyau atomique qui le porte. Ainsi, si l'on considère le cas d'un électron de spin $m_s = \pm 1/2$ porté par un noyau de spin $m_I = \pm 1/2$, il existe 4 états de spin au total, possédant chacun une énergie différente lors d'une interaction avec un champ magnétique extérieur (Fig. 3.7.2).

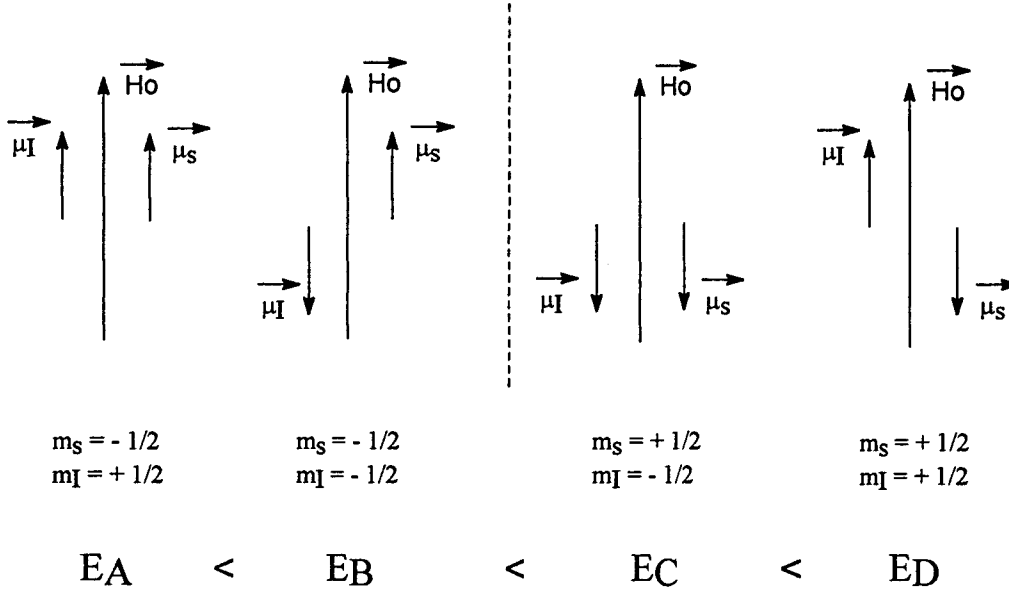


Fig. 3.7.2 : Couplage hyperfin.

Reque : E_A , E_B , E_C et E_D représentent les énergies des différents états de spin. Les rapports gyromagnétiques de l'électron et du noyau sont de signes opposés.

L'énergie totale du système est minimale lorsque les deux moments magnétiques sont parallèles. Cette énergie d'interaction peut s'écrire :

$$E_{SI} = \sum_i a_i \vec{\sigma}_{Ji} \cdot \vec{\sigma}_{Ii}$$

Où σ_{Ji} est le moment cinétique total de chaque électron, σ_{Ii} le moment cinétique de spin nucléaire et a_i la constante de couplage hyperfin [Ayscough P.B., 1967].

3.7.1.2.6. L'hamiltonien général.

L'hamiltonien général s'appliquant à un système cristallin soumis à un champ magnétique H_o peut donc s'écrire [Ayscough P.B., 1967] :

$$H = H_E + H_{LS} + H_{SI} + H_Q + H_V + H_{SH} + H_{IH}$$

Dans cette équation,

- H_E représente l'hamiltonien électronique composé de termes décrivant l'énergie cinétique totale des électrons, l'attraction coulombienne entre les électrons et les noyaux, ainsi que la répulsion entre les électrons.
- H_{LS} et H_{SI} représentent respectivement le couplage spin-orbite et le couplage hyperfin que nous avons décrits précédemment.
- H_Q donne l'interaction quadrupolaire du noyau.
- H_V est le terme décrivant l'effet du champ cristallin.
- H_{SH} représente l'interaction entre le champ magnétique appliqué et le moment cinétique total de l'électron. Il traduit l'effet Zeeman.
- H_{SI} représente, quant à lui, l'interaction entre le champ magnétique et le moment cinétique de spin du noyau. Cette dernière est négligeable en RPE, mais joue un rôle prépondérant en RMN.

Il est très important de noter que dans le cas des radicaux organiques et des métaux de transition, le moment cinétique orbital est le plus souvent négligeable. On pourra donc observer directement l'effet du champ magnétique sur l'état de spin du composé. Le facteur g du système sera alors proche de celui de l'électron libre, à savoir 2.0023 [Karplus M. and Porter R.N., 1970].

Cependant, le couplage spin orbite, bien que très faible peut provoquer des déviations par rapport à cette valeur.

3.7.1.2. Technique et résultats de la RPE.

3.7.1.2.1. Cas d'un système isotrope.

Considérons le cas le plus simple, à savoir un système possédant un spin non nul, tel que $m_S = \pm 1/2$. Nous avons vu que l'introduction d'un champ magnétique H_0 , de direction fixe définissant l'axe de quantification, va définir deux niveaux de Zeeman d'énergie $E(m_S) = g \cdot \beta_e \cdot m_S \cdot H_0$.

La différence d'énergie entre ces deux niveaux est donc :

$$\Delta E = g \cdot \beta_e \cdot H_0$$

La technique employée par la spectrométrie de RPE consiste donc à appliquer simultanément un champ magnétique H_0 dont on fait varier l'amplitude, et une onde électromagnétique de fréquence ν constante. Lorsque l'amplitude du champ magnétique est telle que la différence d'énergie entre deux niveaux de Zeeman est égale au quantum d'énergie de l'onde électromagnétique, cette dernière est absorbée, ce qui engendre un phénomène de résonance (Fig. 3.7.3) [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996].

Ce phénomène peut être décrit par la relation fondamentale de la RPE :

$$h\nu = g \cdot \beta_e \cdot H_0$$

On peut montrer qu'une telle transition ne peut avoir lieu que pour $\Delta m_s = \pm 1$.

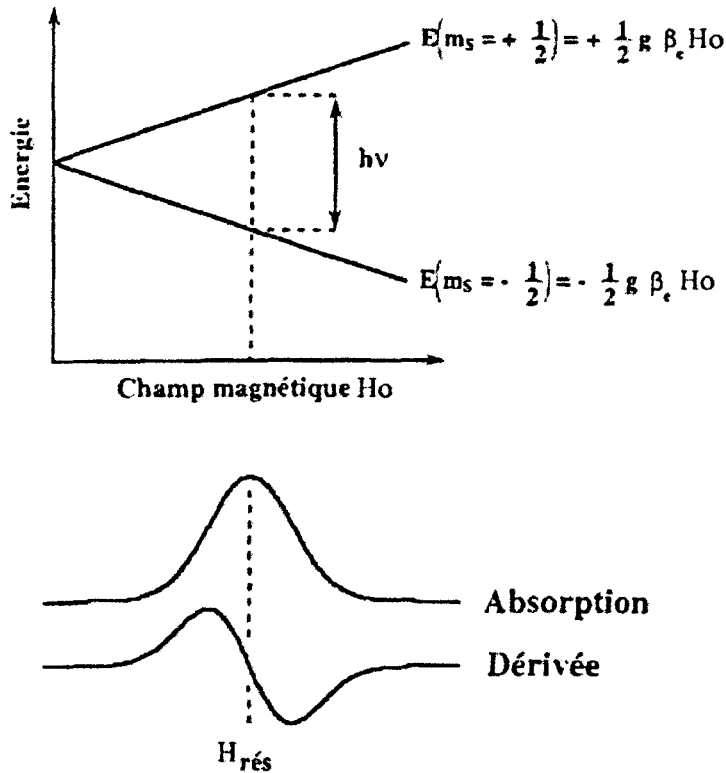


Fig. 3.7.3 : Niveaux de Zeeman d'un système de spin électronique $\frac{1}{2}$ et signal observé.
D'après [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996].

En pratique, on ajoute au champ magnétique H_0 une modulation H_m ($H_m \ll H_0$). De cette façon, ce n'est pas le signal d'absorption qui est observé, mais sa dérivée (Fig. 3.7.5). Cet artifice technique a pour effet d'augmenter la précision sur la position de la résonance.

Le spectromètre RPE consiste donc en (Fig. 3.7.4):

- un générateur de champ magnétique H_0 ,
- un générateur de hautes fréquences, le klystron,
- un isolateur empêchant l'onde de revenir dans le klystron,
- un atténuateur dont le rôle est d'éviter les phénomènes de saturation,
- un circulateur séparant l'onde électromagnétique en deux parties égales en puissance,

- un cristal détecteur qui transforme l'énergie reçue en courant continu,
- et enfin le « modulation coils » qui ajoute au champ principal une composante alternative (100 kHz) de faible intensité.

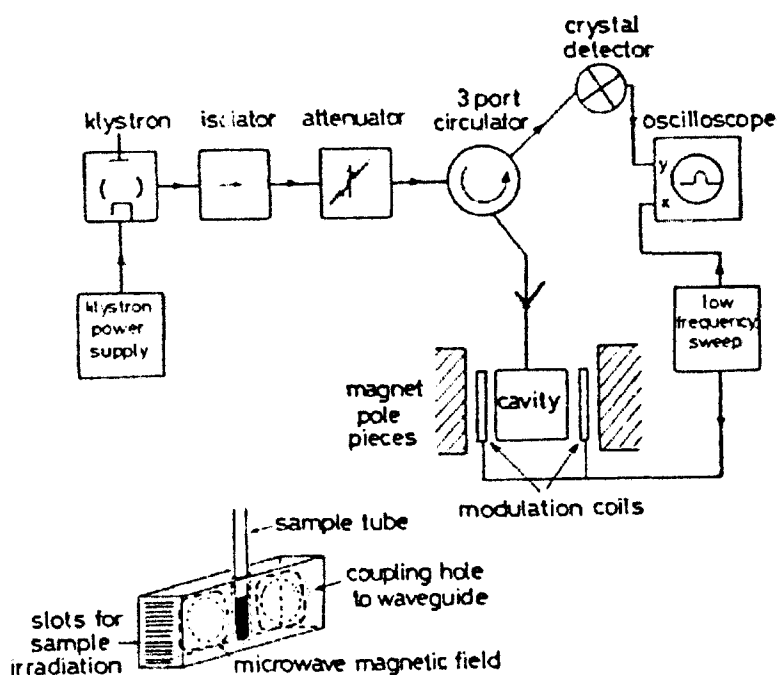


Fig. 3.7.4 : Schéma d'un dispositif de spectrométrie RPE.
D'après [Ayscough P.B., 1967] .

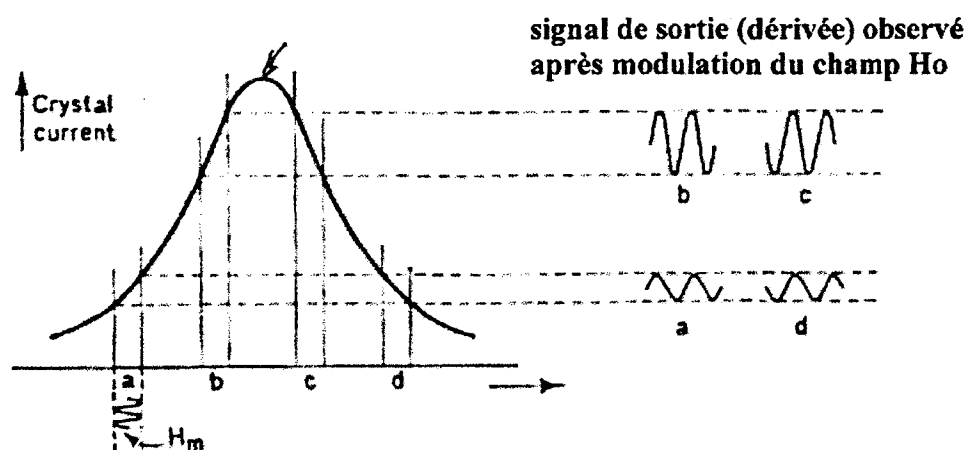


Fig. 3.7.5 : Production d'un signal dérivé par modulation du champ magnétique.

Au vue de la relation fondamentale de la RPE, on pourrait penser qu'il n'existe aucune inconnue. En effet, la constante de Planck, le magnéton de Bohr et le facteur de Landé de l'électron libre sont des constantes parfaitement connues, tandis que la fréquence ν de l'onde

électromagnétique est imposée expérimentalement. La valeur H_0 du champ à la résonance devrait donc être parfaitement déterminée.

En fait, comme l'électron n'est pas libre mais occupe une orbitale moléculaire, la valeur de son facteur de Landé g est différente de celle de l'électron libre (§ 3.7.1.2.6.). C'est donc le facteur de Landé qui sert ici d'inconnue et permet de caractériser le système étudié [Karplus M. and Porter R.N., 1970]

Plusieurs fréquences peuvent être utilisées pour l'onde électromagnétique (voir Tableau 3.7.1):

Bande	Fréquence ν (GHz)
S	3.2
X	9.4
K	23
Q	35

Tableau 3.7.1: Fréquences utilisables en RPE.

Les spectres exposés ici et dans la partie présentant les résultats expérimentaux ont tous été obtenus en utilisant la bande X. Cette gamme de fréquence présente un bon compromis pour l'obtention de spectres simples de radicaux organiques et de complexes de métaux de transition. En effet, la haute fréquence (bandes Q et T) permet de résoudre la structure fine du spectre due à l'anisotropie du système, mais au détriment des interactions hyperfine, qui seront mieux résolues à plus basse fréquence [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996].

3.7.1.2.2. Cas d'un système anisotrope.

Lorsque le système étudié n'est pas anisotrope, la réponse de la molécule n'est pas la même pour toutes les directions du champ magnétique par rapport à celle-ci.

De fait, le facteur g est en fait un tenseur $[g]$, dont la valeur dépend des directions de l'espace. On peut alors écrire H_{SH} , la partie de l'hamiltonien général décrivant l'effet Zeeman (voir § 3.7.1.2.6.) de la façon suivante :

$$H_{SH} = \beta_e . H_0 . [g] . S$$

Prenons l'exemple du complexe $[Cu(oxpn)]$ (Fig. 3.7.6). Celui-ci possède une symétrie plan carrée. Notons Oz l'axe perpendiculaire au plan de la molécule, $g_{//}$ la valeur du facteur g lorsque le champ magnétique H_0 suit la direction de Oz, et $g_{\perp}$ la valeur de $g_{\perp}$ lorsque le champ H_0 est dans le plan de la molécule (plan xOy). Le tenseur $[g]$ est défini par [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996] :

$$H_{SH} = \beta_e \cdot H_o \cdot [g] \cdot S \quad \text{et} \quad [g] = \begin{pmatrix} g_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{\parallel} \end{pmatrix}$$

Le système présente alors deux transitions permettant de calculer $g_{\parallel}$ et $g_{\perp}$ par les relations suivantes (Fig. 3.7.7) :

$$g_{\parallel} = \frac{h\nu}{\beta_e \cdot H_{\parallel \text{rés}}} \quad \text{et} \quad g_{\perp} = \frac{h\nu}{\beta_e \cdot H_{\perp \text{rés}}}$$

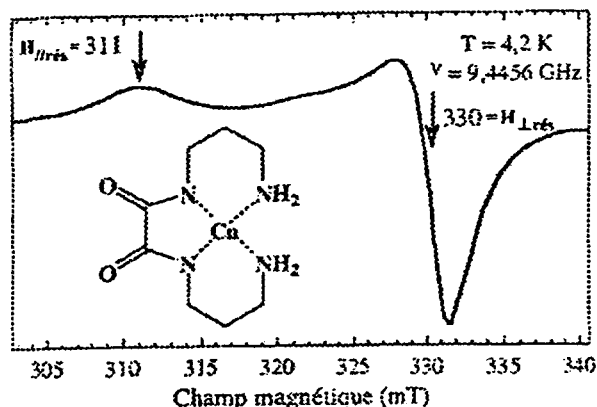


Fig. 3.7.6 Spectre RPE sur poudre du complexe [Cu(oxpn)]. $g_{\parallel}=2.170$ et $g_{\perp}=2.045$.

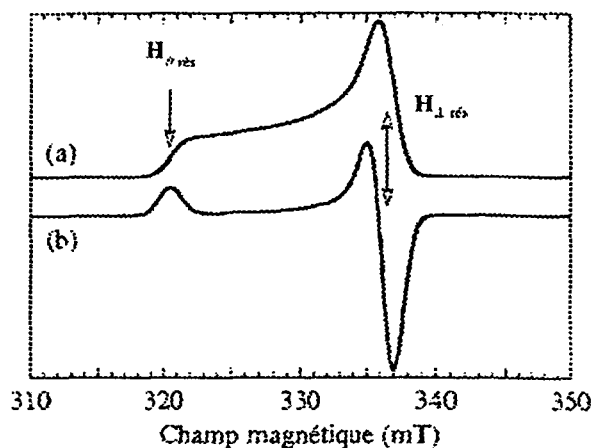


Fig. 3.7.7 Spectre RPE ($\nu=9.42$ GHz, signal et dérivée) d'un système de spin $\frac{1}{2}$ avec $g_{\parallel}=2.10$ et $g_{\perp}=2.00$.

D'après [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996].

Dans l'exemple précédent, on avait $g_{\parallel} > g_{\perp}$. Cependant, le cas inverse peut se produire également. On le voit donc, les valeurs de $g_{\parallel}$ et de $g_{\perp}$ sont un indice précieux de la structure électronique d'un composé.

Le couplage spin orbite dont nous avons déjà parlé possède deux conséquences principales sur le tenseur $[g]$:

- d'une part, la valeur de g s'écarte de celle de l'électron libre g_e . Pour un métal de transition, on démontre que $g > g_e$ si la couche est à demi-remplie ou plus (d^n , $5 \leq n \leq 9$) et $g < g_e$ sinon.
- D'autre part, pour des couches à demi-remplies ou plus, la théorie des champs cristallins montre que l'on a $g_{\parallel} > g_{\perp}$ si l'électron célibataire se situe dans une orbitale de type $d_{x^2-y^2}$ ou d_{xy} et $g_{\parallel} < g_{\perp}$ si l'électron célibataire est cette fois dans une orbitale de type d_{z^2} , d_{xz} ou d_{yz} .

Des spectres montrant une telle anisotropie peuvent aussi être obtenus pour des composés en solution gelée.

3.7.1.2.3. L'interaction hyperfine.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 3.7.1.1.5. il existe un couplage entre le spin électronique et le spin nucléaire lorsque la densité de spin est portée par un noyau de spin nucléaire non nul (Hydrogène, Azote).

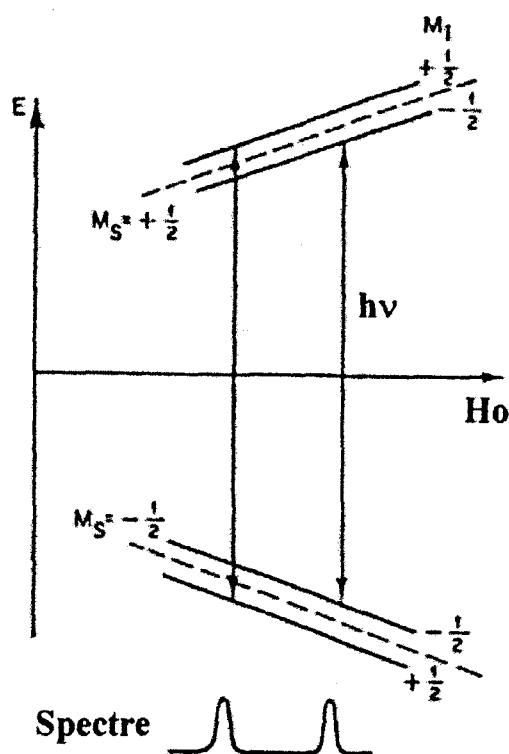


Fig. 3.7.8 : Niveaux énergétiques d'un système de spin électronique $S=1/2$ et de spin nucléaire $I=1/2$ en fonction du champ magnétique.

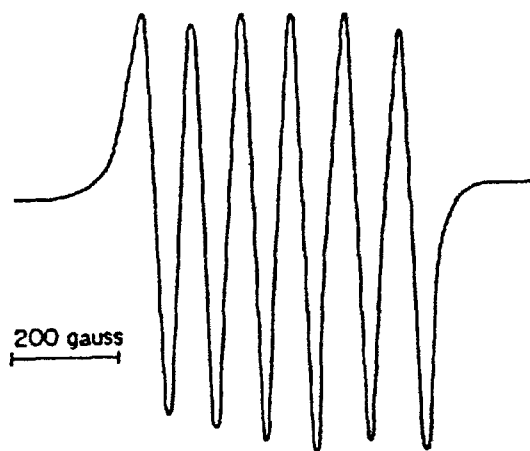


Fig 3.7.9 : Spectre de l'ion manganèse en solution aqueuse à 25°C ($I=5/2$). 1 Gauss = 10^{-4} T.

D'après [Ayscough P.B., 1967] .

Dès lors, dans un système isotrope, les niveaux d'énergie résultant de l'application d'un champ magnétique H_0 peuvent s'écrire :

$$E(m_S, m_I) = g \cdot \beta_e \cdot m_S \cdot H_0 + a \cdot m_S \cdot m_I$$

a est appelée la constante de couplage hyperfin.

On montre qu'une transition entre deux niveaux ainsi définis ne peut avoir lieu que pour $\Delta m_S = \pm 1$ et $\Delta m_I = 0$.

Le nombre de raies obtenues pour un tel système est égal à $2I + 1$ (Fig. 3.7.8). Ainsi, pour l'ion manganèse, de spin nucléaire $5/2$, 6 raies sont observables en solution aqueuse (système isotrope, Fig. 3.7.9).

Le couplage entre le spin électronique et le spin nucléaire peut avoir lieu avec un noyau adjacent au centre radicalaire. C'est le cas, par exemple, des atomes d'hydrogène directement liés au centre portant le radical (par liaison σ ou délocalisation dans un système π), que l'on nomme protons α , ou dans une moindre mesure, par ceux séparés par deux liaisons σ , que l'on nomme protons β (Fig. 3.7.10).

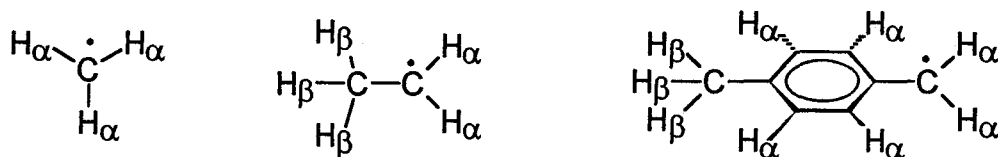


Fig. 3.7.10 : Exemple de protons α et β conduisant à un couplage hyperfin.

Si le spin électronique est couplé avec plusieurs spins nucléaires provenant de noyaux de types différents et de spin $I_1, I_2, \text{etc.}$, le nombre de pics visibles en RPE est égal à $(2I_1+1)(2I_2+1)\dots$. Toutes les raies ont alors la même intensité (Fig. 3.7.11).

De même si le spin électronique est couplé avec plusieurs spins nucléaires provenant de noyaux équivalents, le nombre de raies visibles est égal à $(2nI+1)$, tandis que l'intensité de chacun d'entre eux peut être calculée par les coefficients du polynôme $(x + x^2 + x^3 + \dots + x^m)^n$ où n est égal au nombre de noyaux et $m=2I+1$, de sorte que si le spin nucléaire est égal à $\frac{1}{2}$ (cas du proton), les intensités sont données par le triangle de Pascal (Fig 3.7.12).

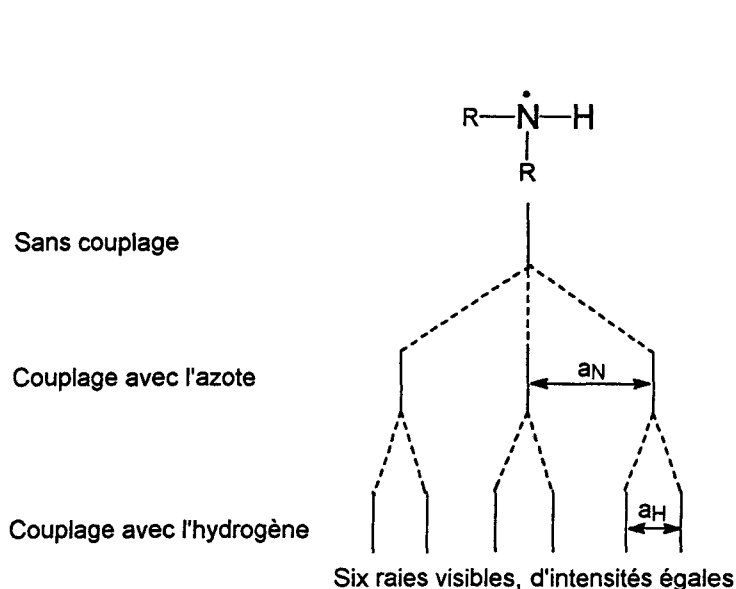
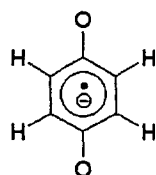
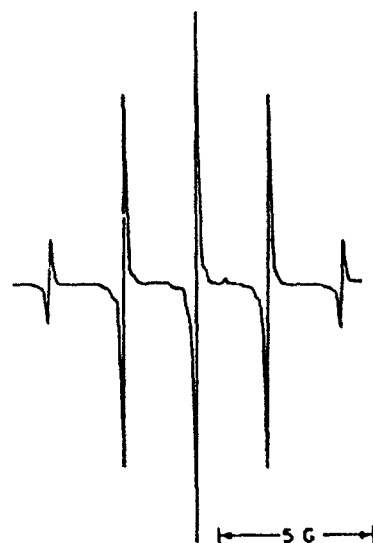


Fig. 3.7.11 : Exemple de couplage hyperfin avec des noyaux différents ($I_N=1$ et $I_H=1/2$). Spectre isotrope.



4 Protons α équivalents:
5 raies d'intensité
1 4 6 4 1

Fig. 3.7.12 : Spectre RPE du radical anion p-benzosemiquinone en solution éthanolique alcaline.
D'après [Ayscough P.B., 1967] .

Dans le cas d'un système anisotrope, nous avons déjà vu que le facteur g devait être considéré comme un tenseur $[g]$. Il en est de même pour la constante de couplage hyperfin, a , qui est alors exprimée sous la forme d'un tenseur hyperfin $[a]$.

Deux phénomènes sont importants dans l'interaction hyperfine. Il existe, d'une part, un terme de contact de Fermi responsable de la partie isotrope du tenseur $[a]$ et, d'autre part, une interaction dipôle nucléaire – dipôle électronique responsable de la partie anisotrope du couplage hyperfin. La structure électronique, liée à la géométrie du composé, étant par conséquent cruciale quant à l'anisotropie des tenseurs $[g]$ et $[a]$, il est très fréquent de pouvoir les prendre coaxiaux. Ainsi, dans l'exemple d'un système de symétrie axiale, on peut écrire [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996]:

$$[g] = \begin{pmatrix} g_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & g_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & g_{\parallel} \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad [a] = \begin{pmatrix} a_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & a_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & a_{\parallel} \end{pmatrix}$$

C'est le cas pour l'atome de Cu(II) au centre actif de la plastomycine (Fig. 3.7.13 et Fig. 3.7.14).

Sur la figure 3.7.11., on peut voir que les quatre raies associées à $g_{\parallel}$ sont mieux résolues que celles associées à $g_{\perp}$, car l'interaction hyperfine est quatre fois plus importante dans le plan xOy que dans la direction Oz :

$$\begin{array}{ll} g_{\perp} = 2.053 & \text{et} \quad g_{\parallel} = 2.226 \\ \frac{|a_{\perp}|}{hc} = 17.10^{-4} \text{ cm}^{-1} & \text{et} \quad \frac{|a_{\parallel}|}{hc} = 63.10^{-4} \text{ cm}^{-1} \end{array}$$

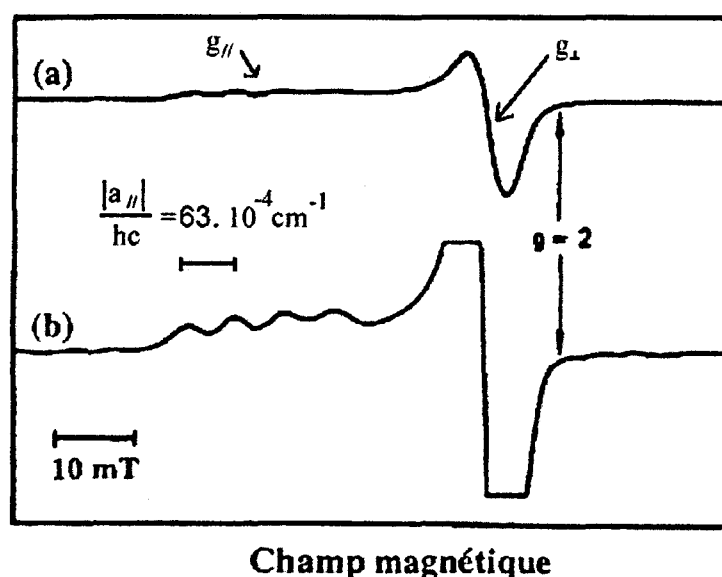
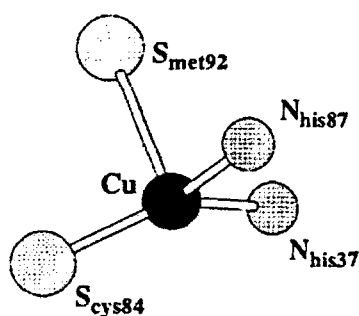


Fig. 3.7.13 : Site actif de la plastomycine.

Fig. 3.7.14 Spectre RPE en à 77 K. Le spectre (b) a été enregistré avec un gain supérieur à celui du spectre (a) de façon à mieux résoudre les raies hyperfines.

D'après [Blondin G. and Frapart Y.-M., 1996].

Dans la plupart des cas, on préfère exprimer le couplage hyperfin en champ. On introduit alors la valeur A , égale à:

$$A = \frac{|a|}{g \cdot \beta_e}$$

où a représente le couplage hyperfin, exprimé en énergie et défini tel que ci-dessus, et A représente ce même couplage hyperfin, mais exprimé cette fois en champ (Tesla ou Gauss).

3.7.1.3. Le marquage de spin. Spin-Trapping.

3.7.1.3.1. Principe.

La limite en concentration de radicaux qu'il est possible de détecter par RPE est de l'ordre de la nM. Cependant, dans les cas où il est nécessaire de résoudre les couplages hyperfins, la limite de détection atteint la μM . Il n'est donc possible d'étudier directement que des radicaux capables d'atteindre de telles concentrations, comme par exemple des radicaux semi-quinoniques, le sel de Fremy et le DPPH, ou encore des systèmes stables possédant un spin électronique non nul, comme des complexes de métaux de transitions [Rosen G.M. and Rauckman E.J., 1984].

Cependant, beaucoup de radicaux sont trop réactifs pour pouvoir être détectés directement. C'est le cas par exemple des radicaux hydroxyle, qui, comme nous l'avons déjà vu (§ 1.1.5.), réagissent avec la plupart des molécules organiques à des vitesses contrôlées par la seule diffusion.

Pour étudier de telles espèces, il est possible de geler la solution très rapidement après leur formation, avant que les réactions de dégradations n'aient eu le temps de les rendre indétectables. Cependant, cette technique possède le désavantage de supprimer la fluidité du milieu, et de faire apparaître un effet anisotropique pouvant rendre l'étude du spectre difficile. De plus, la durée nécessaire pour geler la solution peut s'avérer trop grande pour piéger ainsi le radical. Enfin, cette méthode ne peut s'appliquer qu'à des radicaux pouvant atteindre rapidement des concentrations très élevées [Rosen G.M. and Rauckman E.J., 1984].

Pour palier à ces inconvénients, la technique de marquage de spin a été mise au point. Celle-ci consiste à ajouter dans le milieu un composé appelé marqueur de spin ou plus communément spin trap, capable de se lier de façon covalente à un radical instable et de former ainsi un nouveau radical (appelé adduit ou spin adduct), stable et observable à température ambiante:

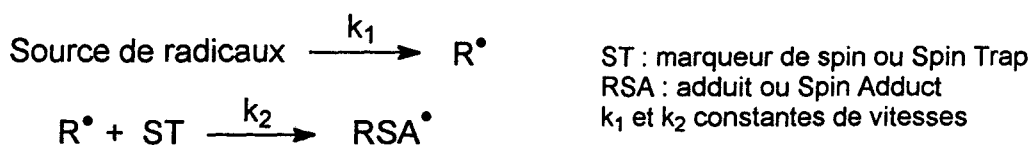


Fig. 3.7.15 : Principe du marquage de spin.

On voit donc, grâce à la figure ci-dessus, que le marquage de spin est une méthode intégrative, à savoir que les radicaux sont accumulés au cours de la réaction et peuvent facilement atteindre des concentrations permettant l'étude des composés formés [Janzen E.G., 1984].

En l'absence de réactions "parasites" et en utilisant l'approximation des états quasi stationnaires, il est possible d'écrire:

$$\frac{d[R^\bullet]}{dt} = 0 = k_1 [\text{source_de_radicaux}] - k_2 [R^\bullet][ST] \quad \text{et} \quad \frac{d[RSA^\bullet]}{dt} = k_2 [R^\bullet][ST]$$

soit:

$$\frac{d[RSA^\bullet]}{dt} = k_1 [\text{source_de_radicaux}]$$

Le signal RPE apparaît donc comme étant directement proportionnel, dans ces conditions idéales, au nombre de radicaux produits.

Cependant, des réactions parallèles peuvent exister dans le milieu. Par exemple, en présence d'un composé YH pouvant réagir avec le radical initialement produit, on peut avoir:

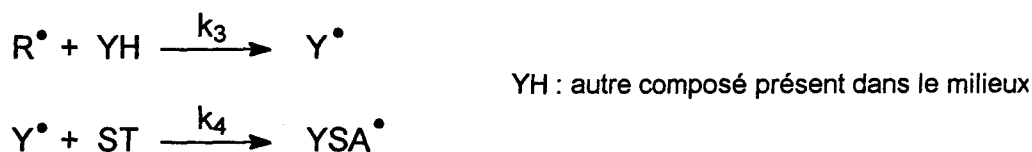


Fig. 3.7.16.: Réactions secondaires possibles lors d'une expérience de marquage de spin.

L'adduit ainsi produit peut être observé par RPE. En utilisant l'approximation des états quasi stationnaires, on trouve:

$$\frac{d[RSA^\bullet]/dt}{d[YSA^\bullet]/dt} = \frac{k_2 [ST]}{k_3 [YH]}$$

Ce type de réaction peut devenir très important dans le cas où le radical initial $R^\bullet$ est très réactif comme le radical hydroxyle $HO^\bullet$ et/ou dans le cas où le composé "supplémentaire" YH réagit lui-même facilement avec des radicaux, comme par exemple un alcool (§ 3.7.3.1.).

Les composés de type nitroxe et nitroso constituent les marqueurs de spins les plus utilisés. Ceux-ci sont en effet capables de réagir de façon covalente avec les radicaux pour former des adduits de type nitroxyde ($N^{\bullet}-O$):



Fig. 3.7.17: Exemple de marqueurs de spin.

Le spectre du radical nitroxyde montre un triplet caractéristique qui peut présenter un couplage hyperfin en fonction de son environnement. A moins qu'un système conjugué ne soit présent, aucun couplage hyperfin ne peut être facilement observable au delà de trois liaisons covalentes du centre radicalaire nitroxyde. Ainsi, en ce qui concerne le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxide), seuls, dans la plupart des cas, l'azote et le proton appelé H_{β} (Fig. 3.7.17) seront à l'origine de la structure fine du spectre. Une exception importante est, comme nous le verrons, celle constituée par l'adduit DMPO-OOH, provenant de la réaction du DMPO avec le radical superoxyde [Rosen G.M. and Rauckman E.J., 1984].

3.7.1.3.2. Marquage de spin des radicaux hydroxyle et superoxyde.

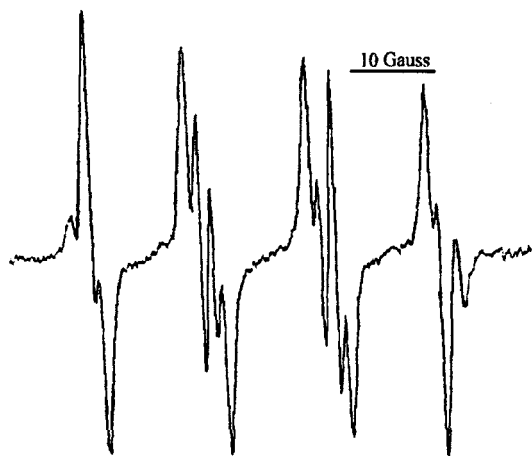
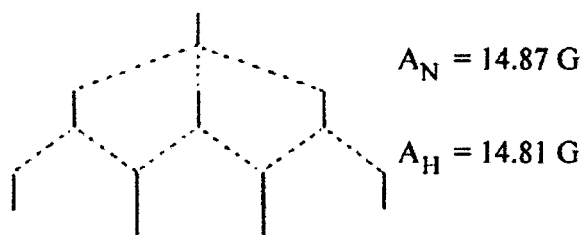
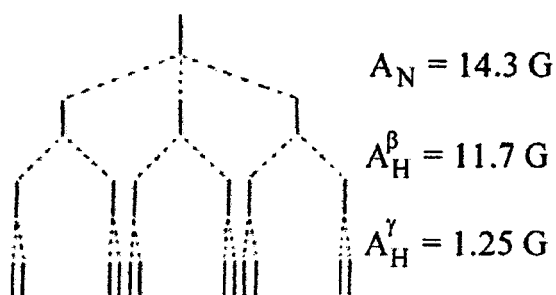


Fig. 3.7.17: Couplage hyperfin et spectre de l'adduit DMPO-OOH.

D'après [Rosen G.M. and Rauckman E.J., 1984] et [Floyd R.A. *et al.*, 1984].

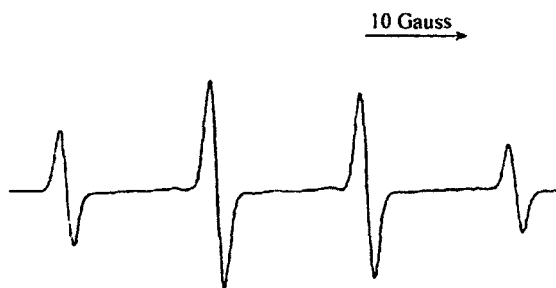


Fig. 3.7.18: Couplage hyperfin et spectre de l'adduit DMPO-OH.

Les spectres obtenus par marquage de spin des radicaux hydroxyle et superoxyde sont représentés dans les figures 3.7.17 et 3.7.18.

3.7.2. Couplage RPE – Electrochimie.

3.7.2.1. Principe de l'expérience.

Afin de mettre en évidence la formation éventuelle d'un radical intermédiaire lors de l'oxydation électrochimique des 4-mercaptoimidazoles, une expérience de couplage entre la RPE et l'électrochimie a été mise au point.

Le principe de celle-ci était d'utiliser les résultats obtenus par voltammétrie cyclique, à savoir que les molécules possédant un groupement attracteur en position 2 ou 5, et les plus actives dans le test du DPPH, présentent un potentiel d'oxydation de la fonction thiol en disulfure de l'ordre de 0.30 V, tandis que pour les molécules ayant un groupement donneur en position 1 ou 5 et inactives dans le test du DPPH, il est de l'ordre de 1.0V.

Il est possible de vérifier ces résultats et de les étendre par RPE en se plaçant à un potentiel légèrement supérieur à 0.30 V et en suivant la formation d'éventuels radicaux. En effet, si l'oxydation de la fonction thiol produit un radical intermédiaire celui-ci pourrait être détecté par marquage de spin. Au potentiel choisi, conformément aux résultats de voltammétrie cyclique, ce signal ne pourrait être obtenu que pour les molécules possédant un groupement attracteur en positions 2 ou 5.

3.7.2.2. Mode opératoire.

Les spectres RPE de toute cette partie ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre VARIAN E-109 en bande X, opérant avec une modulation de 100 kHz à température ambiante (20°C).

Le couplage entre l'électrochimie et la RPE a été réalisé en utilisant une cavité TM et une cellule plate en quartz de 0.1 cm. Les électrodes anodiques et cathodiques de platine étaient connectées au potentiostat SOLEA TACUSSEL PJT 120 afin de suivre le potentiel imposé. L'électrode de calomel fut utilisée en référence.

L'expérience fut menée dans une solution de DMPO (distillé avant emploi, Sigma Aldrich Co), à 32 mM dans le DMSO, en présence de 1 mM de 4-mercaptoimidazoles.

Les spectres simulés ont été obtenus à l'aide des logiciels WINSIMFONIA de Bruker ® et de WINEPR [Dulling D.R., 1994].

3.7.2.3. Résultats.

La figure 3.7.19. (a) montre le spectre obtenu par imposition d'un potentiel de +0.50 V dans les conditions opératoires décrites précédemment pour le 1-méthyl-2-[2-chlorophényl]-4-mercaptoimidazole 7. Rappelons que le potentiel d'oxydation de ce composé en dissulfure selon la réaction 3' (§ 3.5.4.) est de +0.36 V.

On voit nettement l'apparition d'un radical qui se traduit par un adduit possédant deux constantes hyperfines: $A_N=13.9$ G et $A_H=11.8$ G. Celui-ci peut être attribué au radical thiyle.

Ces valeurs sont en effet en accord avec des résultats antérieurs obtenus par Josephy *et al.* [Josephy *et al.*, 1984] sur des thionitrites.

La figure 3.7.19 (b) montre le spectre simulé du système.

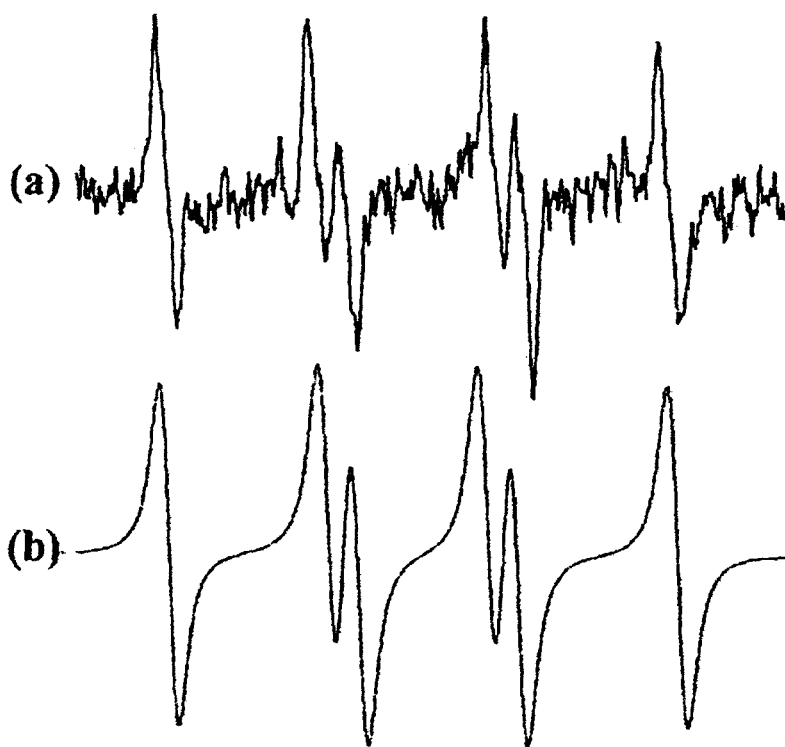


Fig. 3.7.19: Spectre RPE de l'adduit DMPO/radical thiyle produit par imposition d'un potentiel de +0.50 V à une solution de 1 mM du composé 7 dans le DMSO (a), et spectre simulé avec les constantes de couplage hyperfin $A_N=13.9$ G et $A_H=11.8$ G (b). Puissance de l'onde électromagnétique: 10 mW, amplitude de modulation de 1 G et gain de $2 \cdot 10^4$.

Des spectres similaires, avec des constantes de couplage hyperfin identiques ont été obtenus pour tous les composés possédant un groupement attracteur en position 2 ou 5 et ayant un potentiel d'oxydation pour la réaction 3' (voir § 3.5.4.) inférieur à 0.50 V. A contrario, aucun signal de radical thiyle n'a pu être détecté pour les composés possédant un potentiel d'oxydation pour la même réaction supérieur à 0.50 V.

Cette expérience confirme donc les résultats obtenus par voltammétrie cyclique concernant les potentiels d'oxydation des thiols en disulfures pour les 4-mercaptoimidazoles. De plus, il apparaît que lors d'un processus électrochimique, l'oxydation de la fonction thiol des 4-mercaptoimidazoles passe par radical thiyle intermédiaire (Fig. 3.7.20) pouvant être mis en évidence par marquage de spin.

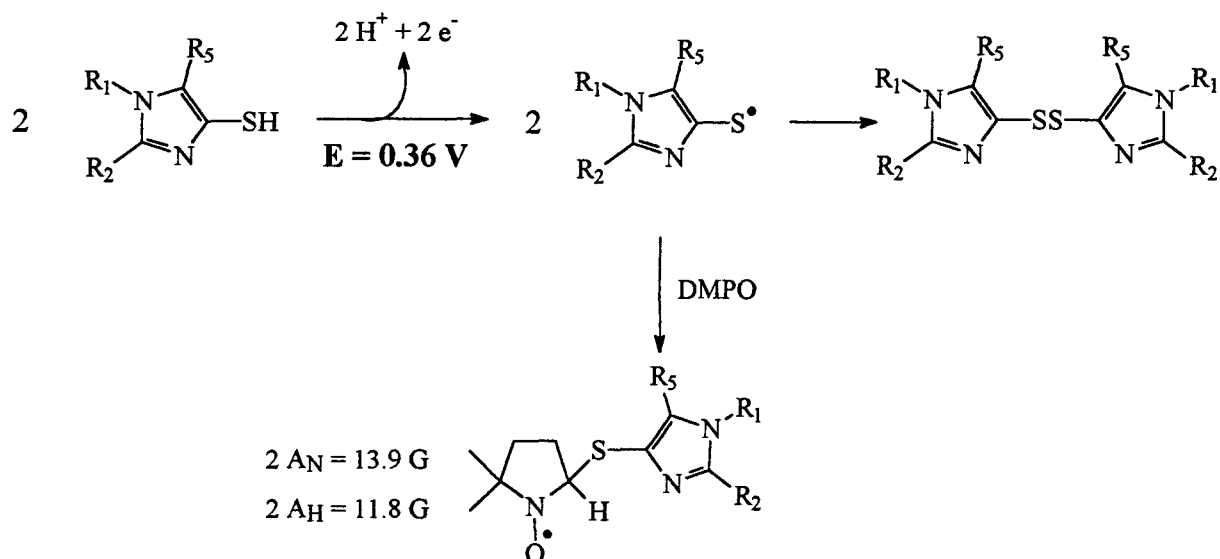


Fig. 3.7.20: Couplage RPE et voltammétrie. Mise en évidence d'un radical thiyle intermédiaire.

3.7.3. Piégeage des radicaux hydroxyle.

3.7.3.1. But et principe.

Comme nous l'avons vu au § 1.3., le radical hydroxyle est une espèce activée de l'oxygène des plus dangereuses. Hautement actif, il est capable de réagir avec la presque totalité des molécules organiques, à des vitesses proches de celles de la diffusion.

Le but de la présente expérience était d'évaluer la capacité des 4-mercaptoimidazoles à piéger le radical hydroxyle HO•. Pour ce faire, une méthode employant la technique de la RPE fut utilisée.

Le principe consistait à mettre en évidence la quantité de radicaux formés dans une solution de DMPO, contenant ou non un 4-mercaptoimidazole, lorsqu'on y produit une quantité donnée d'HO•.

Le radical hydroxyle était généré à l'aide du mécanisme de Fenton, faisant intervenir le Fe(II) et l'eau oxygénée (Fig. 3.7.21).

Les 4-mercaptoimidazoles étant pour la plupart insolubles dans l'eau, il était nécessaire de les dissoudre préalablement dans de l'éthanol. L'éthanol ainsi ajouté dans le système pouvait lui-même réagir avec le radical hydroxyle afin de former le radical α -hydroxyéthyle $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$, détectable par marquage de spin [Finkelstein E. *et al.*, 1980; Leautic A. *et al.*, 1986; Johnson C.R. *et al.*, 1988].

Le système étudié pouvait donc conduire aux deux espèces radicalaires détectables par marquage de spin: $\text{HO}^\bullet$ ($A_N = A_H = 14.5$ G dans le solvant de l'expérience) et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ ($A_N = 15.7$ G et $A_H = 23.0$ G dans le solvant de l'expérience).

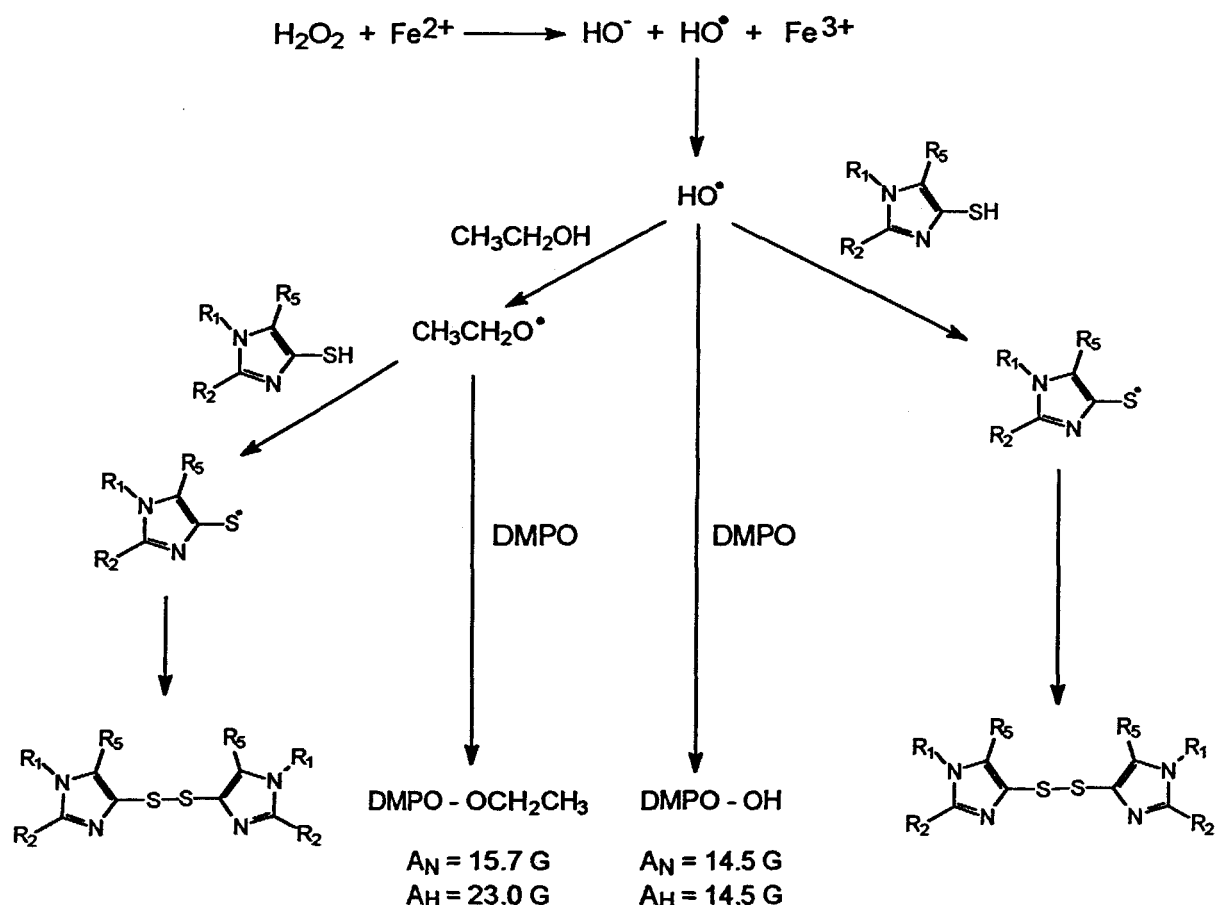


Fig. 3.7.21: Expérience de piégeage du radical hydroxyle par les 4-mercaptoimidazoles.

De nombreuses réactions pouvant avoir lieu entre les différentes espèces présentes dans le système (Fig. 3.7.21), il n'était pas possible d'établir l'expression de la cinétique de la réaction. La constante de vitesse de la réaction de piégeage du radical hydroxyle par les 4-mercaptoimidazoles n'a donc pas pu être établie par de simples considérations de cinétique, à cause de la présence d'autres inconnues (constante de vitesse de réaction entre le radical éthanolique et les 4-mercaptoimidazoles, constante de vitesse de formation du disulfure à

partir du radical thiyle), et du fait que l'approximation des états quasi stationnaires peut difficilement être écrit pour le radical hydroxyle.

Le spectre observé est un spectre composite, où l'on retrouve le spectre de l'adduit DMPO/radical hydroxyle et celui-ci de l'adduit DMPO/radical α -hydroxyéthyle (Fig. 3.7.22.).

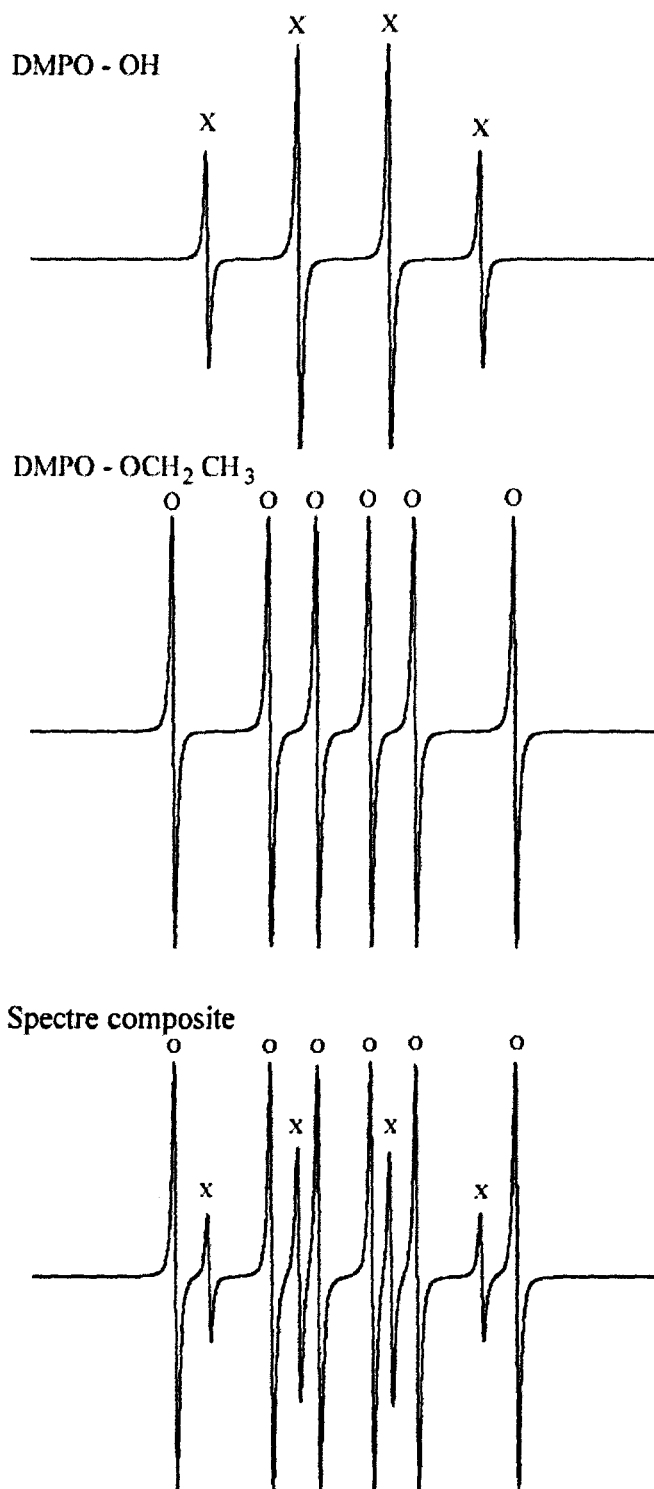


Fig. 3.7.22: Spectre composite simulé des adduits DMPO - OH et DMPO - OCH₂CH₃.

3.7.3.2. Mode opératoire.

Le piégeage du radical hydroxyle par les 4-mercaptoimidazoles a été mis en évidence dans une solution à pH 7.4 contenant du DETAPAC (Acide diéthylènetriaminepentaacétique, agent chélatant), 8 mM de DMPO (distillé avant emploi, Sigma Aldrich Co), 1 mM de 4-mercaptoimidazole et 1.71 M d'éthanol (solvant de dissolution des imidazoles). Le radical hydroxyle a pu être généré par la réaction de Fenton obtenue grâce à l'adjonction de 0.1 mM de FeSO_4 et d' H_2O_2 . L'ajout de l'eau oxygénée, qui déclenche la production de radicaux hydroxyle, est effectué en dernier.

La solution de référence est identique (présence d'éthanol), si ce n'est qu'elle ne contient pas de 4-mercaptoimidazole.

Les spectres de RPE ont été réalisés en utilisant une cavité TM et une cellule plate en quartz de 0.1 cm tandis que le spectre de RMN ^1H a été acquis à l'aide d'un spectromètre Bruker AC300 (déplacement chimique rapporté au tétraméthylsilane).

3.7.3.3. Résultats.

La figure 3.7.23 montre les spectres expérimentaux obtenus grâce au mode opératoire décrit ci-dessus. Ils peuvent être comparés aux spectres simulés de la figure 3.7.22.

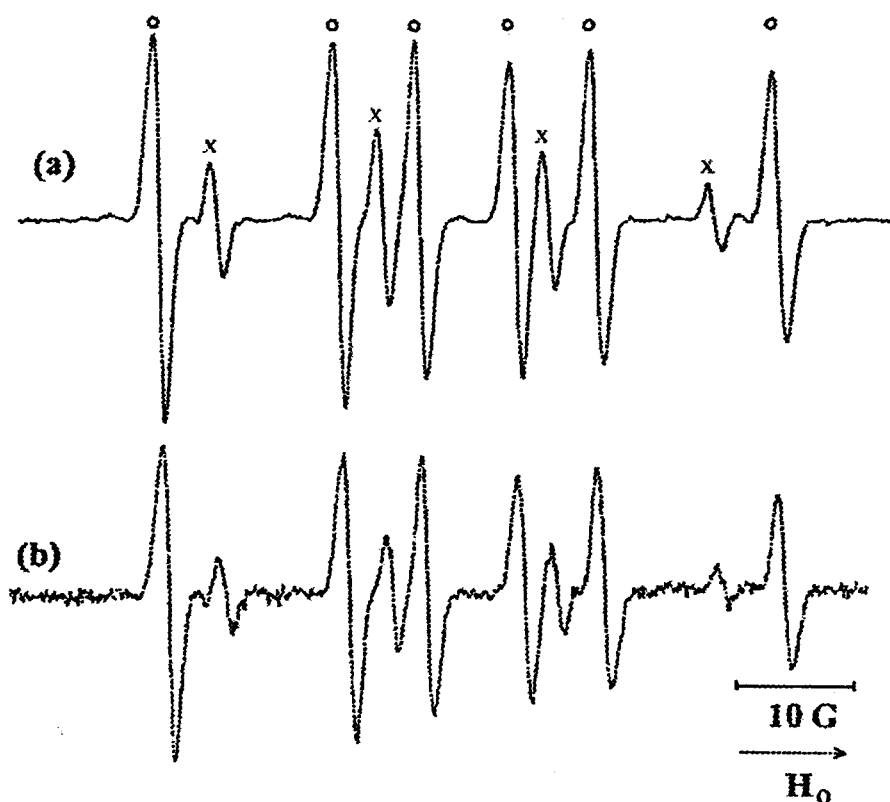


Fig. 3.7.23: Spectres RPE expérimentaux obtenus par marquage de spin d'une solution contenant 1.71 M d'éthanol et 8 mM de DMPO en l'absence (a) ou en présence (b) de 1 mM de 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole 9, suite à la production de radicaux hydroxyle par la réaction de Fenton (0.1 mM d' H_2O_2 et de FeSO_4). Les gains avec lesquels les spectres ont été acquis sont respectivement de $6.3 \cdot 10^3$ (a) et $1.6 \cdot 10^4$ (b).

(O) adduit DMPO-hydroxyle, (X) adduit DMPO- α -hydroxyéthyle.

Le spectre de la figure 3.7.23(a) indique la formation concomitante de radicaux hydroxyle et de radicaux α -hydroxyéthyle tous deux piégés par le DMPO. La figure 3.7.23(b) montre le spectre obtenu dans les mêmes conditions, mais en présence cette fois de 1 mM de 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole 9. En notant que le gain utilisé pour acquérir le spectre (b) est deux fois plus élevé que celui utilisé pour le spectre (a), on peut remarquer une forte baisse de l'intensité des signaux des radicaux hydroxyle et α -hydroxyéthyle, indiquant le piégeage de ceux-ci par le 4-mercaptoimidazole.

La figure 3.7.24 montre, pour les composés les plus représentatifs (4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14), la diminution des signaux des radicaux hydroxyle et α -hydroxyéthyle en présence de 1 mM de 4-mercaptoimidazole, calculé par rapport au même système sans piègeur de radical (noté "Fenton" sur le graphique).

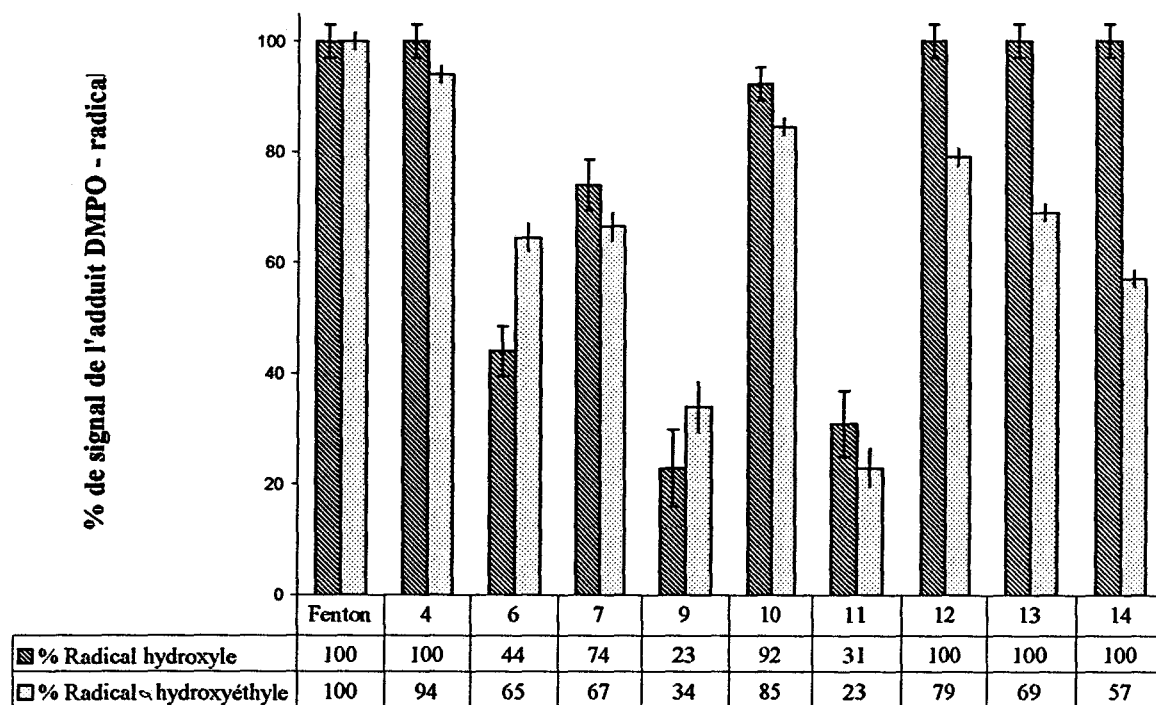


Fig. 3.7.24: Diminution du signal des adduits DMPO-hydroxyle et DMPO- α -hydroxyéthyle en présence d'un piègeur de radical dans la solution.

On retrouve dans la figure les ordres de réactivité que nous avons déjà relevés pour les différents autres tests de piégeage des radicaux.

Les composés 6, 7, 9 et 11, possédant tous des groupements électro-attracteurs en position 2 ou 5 présentent une forte activité dans ce test, se traduisant par une baisse simultanée de l'intensité des adduits des radicaux hydroxyle et α -hydroxyéthyle avec le DMPO.

Le composé 4, à savoir le 1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole qui possède un groupement donneur en position 1, ne présente pratiquement aucune activité.

Les composés 12, 13 et 14 montrent une décroissance prononcée de l'adduit DMPO-radical α -hydroxyéthyle, mais aucune modification du signal DMPO-radical hydroxyle par rapport à la référence. Il semble que ces composés puissent réagir rapidement avec le radical α -hydroxyéthyle, sans toutefois diminuer la concentration en radicaux hydroxyle. On peut supposer que, pour le rapport de concentration utilisé, leur vitesse de réaction avec le radical hydroxyle est inférieure à celle de l'éthanol avec ce même radical. Le piégeage de radicaux par ces 4-mercaptoimidazoles n'est donc effectué que par l'intermédiaire du radical α -hydroxyéthyle (Fig. 3.7.21 "voie de gauche").

Il est bon de relever la très forte réactivité des 4-mercaptoimidazoles vis-à-vis du radical hydroxyle. En effet, il ne faut pas oublier que ceux-ci sont présents à des concentrations 1700 fois inférieures à celle de l'éthanol, mais qu'ils arrivent pourtant à rentrer en compétition avec ce dernier vis-à-vis du radical hydroxyle (Fig. 3.7.21 "voie de droite") et pour certains d'entre eux, même, à inhiber fortement la formation du radical α -hydroxyéthyle. Rappelons pourtant que la constante de vitesse de l'éthanol avec le radical hydroxyle est déjà très élevée: $k = 1.8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Finkelstein E. *et al.*, 1980]. On peut donc raisonnablement penser que, pour les plus actifs d'entre eux, la vitesse de réaction des 4-mercaptoimidazoles avec le radical hydroxyle est contrôlée uniquement par la diffusion ($k \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Afin de mettre en évidence quel groupement fonctionnel du 4-mercaptoimidazole est impliqué dans le piégeage du radical hydroxyle, une chromatographie sur couche mince de la solution finale (sans DMPO) a été réalisée. Celle-ci présente pour seule composante une tache dont la position, la couleur et la forme sont identiques à celles du disulfure du 4-mercaptoimidazole.

Le produit final fut retiré de la phase organique résultant d'une extraction par un mélange d'eau et de dichlorométhane, puis séché et la phase organique évaporée, afin de permettre l'obtention du spectre de RMN ^1H de celui-ci dans CDCl_3 . Le spectre RMN apparaît identique à celui du 4-mercaptoimidazole, à ceci près que le pic large vers 2 ppm correspondant à la fonction thiol (§ 4.10.) disparaît presque complètement. La figure 3.7.25 montre un tel spectre pour le 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole 9.

Ces données semblent indiquer la seule implication de la fonction thiol dans le piégeage du radical hydroxyle dans les conditions de l'expérience.

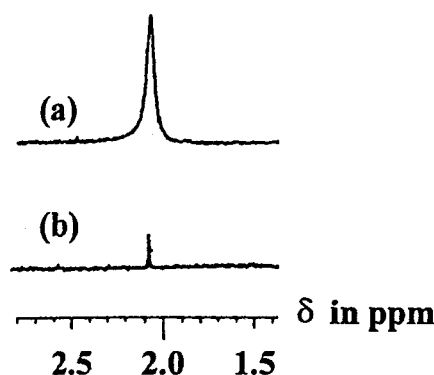


Fig. 3.7.25: Spectre RMN ^1H dans la région du pic large de la fonction thiol du 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole **9**, avant (a) et après (b) formation du radical hydroxyle en solution par la réaction de Fenton.

3.7.4. Etude par RPE du complexe 4-mercaptoimidazole / Cu^{2+} .

La capacité des 4-mercaptoimidazoles à former un éventuel complexe avec le cuivre II, Cu^{2+} , a été étudiée par RPE. Cette technique est, en effet, une méthode de choix pour l'étude des complexes de Cu^{2+} , espèce possédant un spin électronique non nul (§3.7.1.2.2. et §3.7.1.2.3.).

3.7.4.1. Mode opératoire.

Afin d'acquérir le spectre du cuivre II libre, une certaine quantité de CuSO_4 fut mise en solution dans un tampon phosphate, PBS, afin d'obtenir une concentration de 1 mM. Cette solution fut ensuite gelée à la température de l'azote liquide, à savoir 77K. Le spectre RPE obtenu est reporté dans la figure 3.7.26(B).

Le spectre du cuivre II en présence de 4-mercaptoimidazole fut obtenu, dans l'exemple présenté ici, par ajout de 5 mM de 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, **9**, dans la solution précédente. Dans les mêmes conditions expérimentales, on obtient le spectre RPE de la figure 3.7.26(A).

3.7.4.2. Résultats.

On voit que le spectre RPE de la figure 3.7.26(B) est un spectre isotrope de cuivre non complexé, possédant un facteur de Landé g de 2.036.

Après ajout du 4-mercaptoimidazole **9**, la RPE laisse apparaître un spectre anisotrope très différent du précédent, et caractéristique d'un complexe de cuivre II (§ 3.7.1.2.2. et 3.7.1.2.3.). Le traitement du spectre indique que $g_{\parallel}$ possède une valeur de 2.14, tandis que la constante de couplage hyperfin $A_{\parallel}$ est de 115 gauss. L'utilisation des abaques de Peisach et Blumberg [Peisach J. and Blumberg W.E., 1974] à l'aide de ces deux valeurs nous permet d'affirmer que des atomes de soufre sont directement liés à l'atome de cuivre.

On en déduit que les 4-mercaptoimidazoles sont capables de complexer le cuivre II, et que cette complexation fait intervenir les atomes de soufre des ligands.

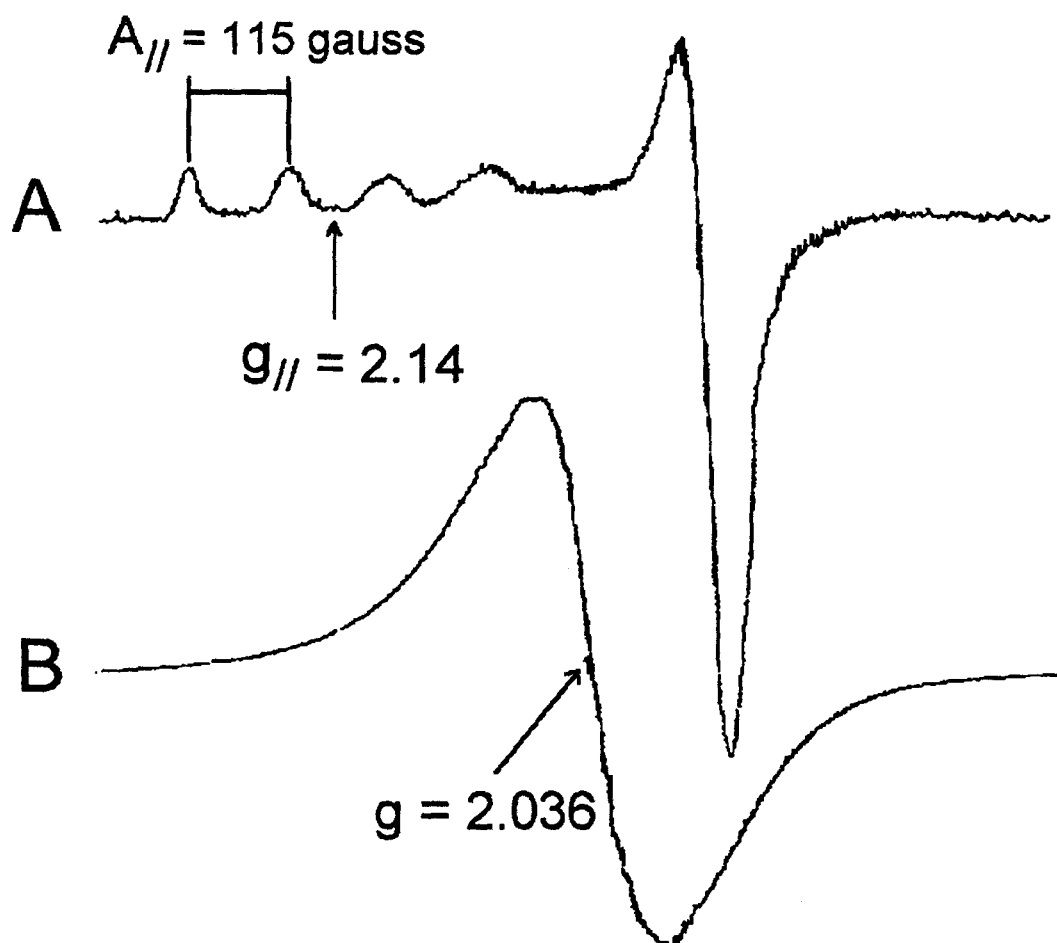


Fig. 3.7.26 : Spectre RPE d'une solution gelée à 77 K de 1 mM de CuSO_4 dans un tampon PBS (B), et spectre RPE d'une solution gelée à 77 K de 1 mM de CuSO_4 et de 5 mM de 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole, 9 (A).

3.8. Oxydation des lipoprotéines de basse densité.

3.8.1. Rôle, composition et structure des LDL.

Les lipoprotéines de basse densité sont le plus souvent appelées par leur acronyme anglais LDL (pour Low Density Lipoprotein). Il s'agit d'un des composants du système moléculaire de transport d'acide gras et de cholestérol du foie vers les tissus périphériques. La concentration des LDL dans le sang humain est de l'ordre de 3 mg/ml. Ils transportent environ 60% du cholestérol présent dans le sérum [Esterbauer H. *et al.*, 1992].

Les LDL humaines sont définies comme la fraction des lipoprotéines pouvant être isolée par ultracentrifugation dans l'intervalle de densité allant de 1.019 à 1.063 g/ml. Ils se présentent sous la forme de particules sphériques d'un diamètre de 19 à 25 nm, et d'une masse de $2.8 \cdot 10^6$ g/mol. Ils contiennent en moyenne 1600 molécules de cholesterylester (ester de cholestérol et d'acide gras) et 170 molécules de triglycérides dans le coeur lipophile. Celui-ci est entouré d'environ 700 molécules de phospholipides (phosphatidylcholine, sphingomyéline et lysophosphatidylecholine) et de 600 molécules de cholestérol libres. Les têtes polaires des phospholipides sont placées à la surface de la particule assurant ainsi la solubilité de l'ensemble en phase aqueuse. La cohérence de ce système est assurée par des apolipoprotéines, comme l'apo B (Fig. 3.8.1) [Esterbauer H. *et al.*, 1992].

On considère qu'une LDL, est ainsi composée, en masse et en moyenne, de 22% de phospholipides, 6% de triglycérides, 10% de cholestérol libre, 42% de cholestérol estérifié et enfin de 20% de protéines et de molécules diverses [Esterbauer H. *et al.*, 1992].

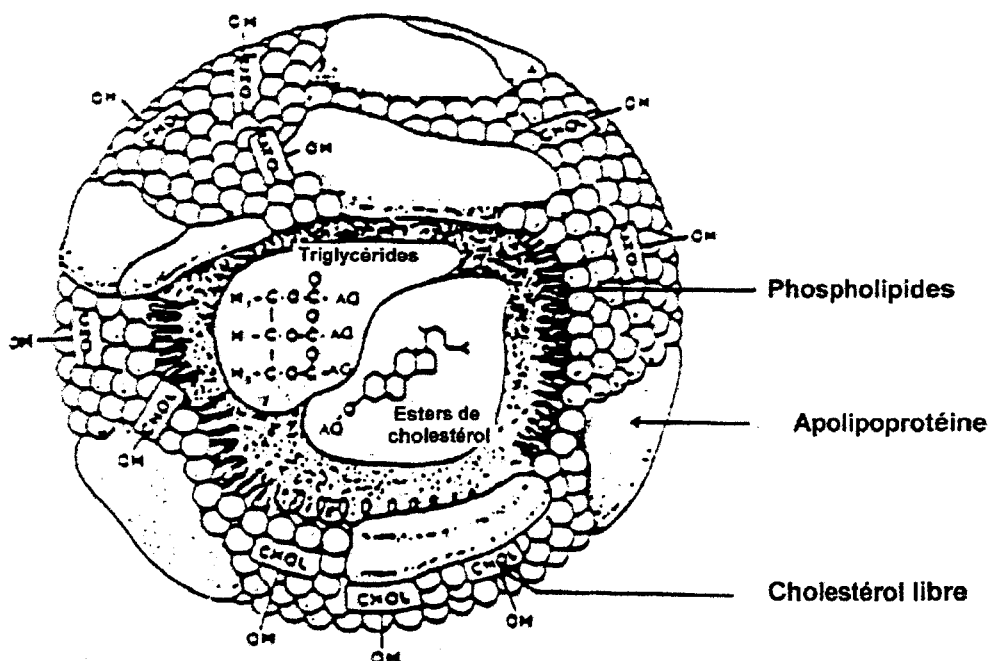


Fig. 3.8.1 : Structure d'une lipoprotéine de basse densité.

Comme nous l'avons vu au § 1.3.2., les lipides sont sujet à l'oxydation. De fait, les LDL contiennent des molécules antioxydantes capables de piéger les radicaux susceptibles d'être produits au cours d'une réaction de peroxydation des lipides, et d'en stopper ainsi le mécanisme en chaîne. Ces piègeurs de radicaux sont essentiellement composé d' α -tocophérol, mais on trouve aussi du γ -tocophérol, du β -carotène ou encore de l'ubiquinol Q10 (§ 1.4.3.) [Esterbauer H. *et al.*, 1992].

Cependant, quand le potentiel antioxydant constitué par ces composés est épuisé, les LDL sont soumises au processus de peroxydation des lipides, avec toutes les conséquences que cela comporte (§ 1.5.2.)

3.8.2. Mécanisme d'oxydation des LDL.

L'initiation du mécanisme de peroxydation lipidique est encore mal connu. Cependant, il apparaît que la présence d'ions métalliques est nécessaire pour qu'il ait lieu. En effet, des expériences ont montré que les LDL ne subissent aucune modification en présence d'EDTA, chélateur de métaux. Par contre, l'oxydation a lieu si l'on rajoute des ions cuivriques Cu^{2+} [Steinbrecher U.P., 1984]. Enfin, on remarque qu'en présence de Fe^{2+} ou Fe^{3+} l'oxydation des LDL n'atteint que 20% de celle que l'on obtient en présence de Cu^{2+} [Esterbauer H. *et al.*, 1992].

De même l'ajout d'ebseen et de glutathion dans le milieu inhibe les réactions d'oxydation. Comme l'ebseen est capable de réduire les fonctions peroxydes (LOOH) en fonctions alcool (LOH), on en déduit que la présence de peroxydes est nécessaire au mécanisme d'oxydation des LDL [Esterbauer H. *et al.*, 1992].

On pense donc que la peroxydation des lipides par le cuivre nécessite la présence de peroxydes préformés, ou celle d'agents capables de réduire les ions métalliques sous leur forme active, ou bien encore les deux à la fois (Fig. 3.8.2).

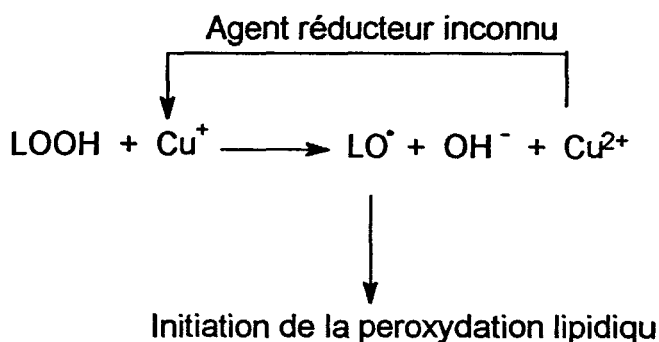


Fig. 3.8.2 : Mécanisme proposé pour l'initiation de la peroxydation lipidique par le cuivre
D'après Esterbauer H. *et al.*, 1992.

Quel que soit le mécanisme d'initiation, il est clair que l'oxydation des LDL suit un processus en plusieurs étapes successives: perte des défenses antioxydantes, peroxydation des lipides et enfin transformation des hydroperoxydes lipidiques en aldéhydes et autres produits de dégradation (Fig. 3.8.3).

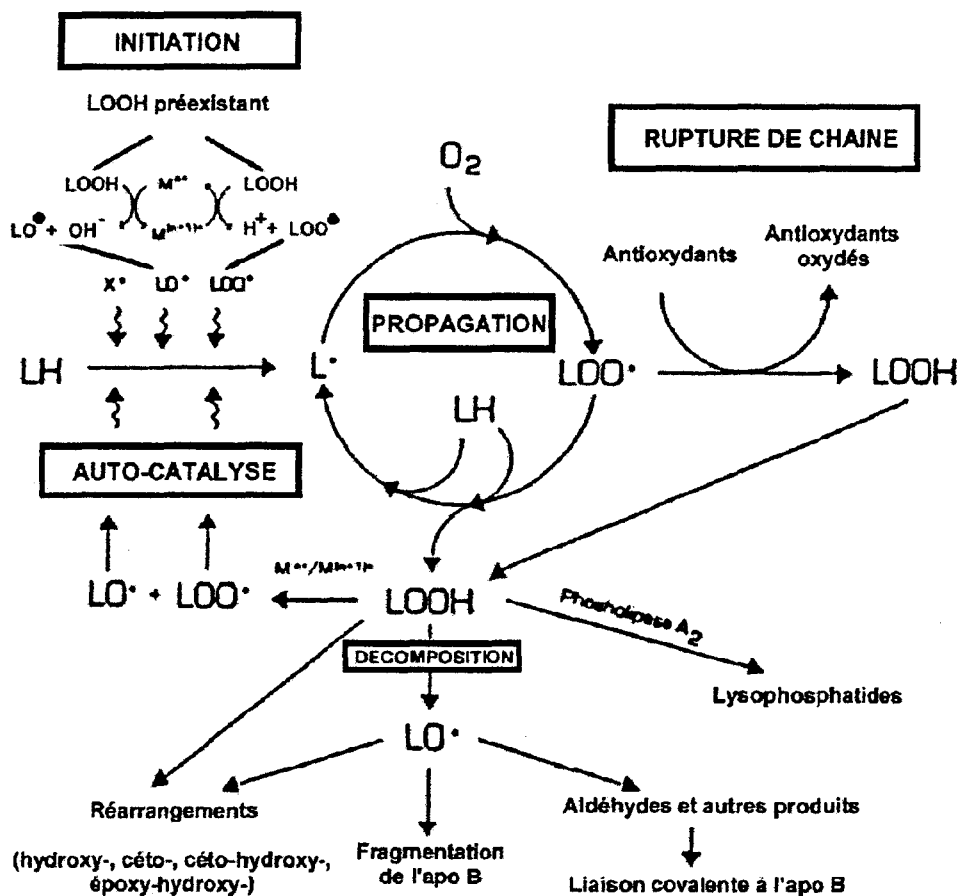


Fig. 3.8.3 : Mécanisme de peroxydation lipidique générée par un ion métallique.
D'après Esterbauer H. *et al.*, 1992.

3.8.3. Suivi de l'oxydation des LDL *in vitro*.

Il existe de nombreuses méthodes pour suivre l'oxydation des LDL. On peut par exemple étudier la quantité de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (comme le malondialdéhyde (§ 1.3.2.)), la quantité de peroxydes lipidiques présents par iodométrie ou chromatographie liquide, la variation de la fluidité par fluorométrie, ou encore l'évolution de la quantité d'antioxydants présents dans le milieu (Fig. 3.8.4).

Une autre méthode consiste à suivre la quantité de diènes conjugués formés au cours du processus d'oxydation. En effet, comme nous l'avons vu au § 1.3.2., les LDL contiennent des acides gras polyinsaturés (acronyme utilisé: PUFA pour l'anglais PolyUnsaturated Fatty Acids). Ces molécules contiennent des doubles liaisons isolées. Or, la formation des hydroperoxydes lipidiques entraîne l'apparition de doubles liaisons conjuguées (Fig. 1.3.2).

Ces dernières ont la propriété d'absorber dans l'UV à 234 nm, et leur formation peut donc être suivie très simplement. Comme, les LDL normales et oxydées sont solubles dans l'eau, la mesure de la quantité de diènes présents ne nécessite pas d'extraction, et peut être menée de manière continue sur l'échantillon. La figure 3.8.5 montre le type de courbe obtenue.

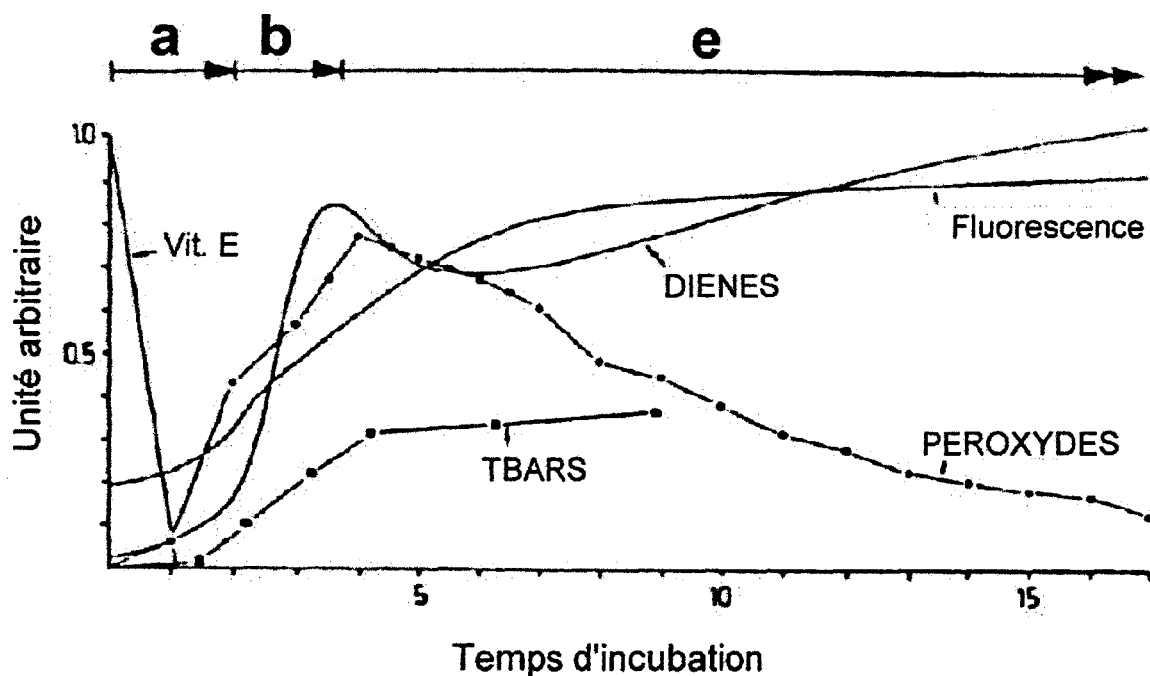


Fig. 3.8.4: Suivi de l'oxydation des LDL (induit par Cu^{2+}) par différentes méthodes.
D'après Esterbauer H. *et al.*, 1992.

On voit nettement sur la figure 3.8.5 que l'oxydation des LDL, telle qu'on peut la suivre par absorbance des diènes à 234 nm, comporte 3 étapes. Dans la première, notée "a", les LDL sont protégées de l'oxydation par les antioxydants encore présents dans le système. (courbe de la vitamine E. fig. 3.8.4). Cette première période est appelée phase de latence. Durant celle-ci, on peut voir qu'il se forme très peu de produits réactifs à l'acide barbiturique ou de peroxydes lipidiques (Fig 3.8.4). Cependant, les molécules antioxydantes finissent par être entièrement consommées, et on arrive alors à la deuxième étape, la phase de propagation notée "b". Durant cette période, les lipides sont laissés "à la merci de l'oxygène" [Brown M.S. and Goldstein J.L., 1990], et subissent une oxydation autocatalysée qui accélère de façon exponentielle jusqu'à atteindre une vitesse d'oxydation de 3 molécules lipidiques par minute dans chaque particule de LDL [Esterbauer H. *et al.*, 1992]. On peut voir qu'au cours de cette période, les courbes des diènes et des peroxydes varient de manière identique (Fig. 3.8.4). Cette phase de propagation se termine lorsque 70 à 80% des acides gras polyinsaturés se retrouvent oxydés. On arrive alors à la phase de dégradation, notée "e". A ce stade, la dégradation des peroxydes devient prédominante, bien que la formation de ceux-ci continue. En conséquence, la quantité de diènes présents, de même que celles des peroxydes, décroît (Fig. 3.8.4).

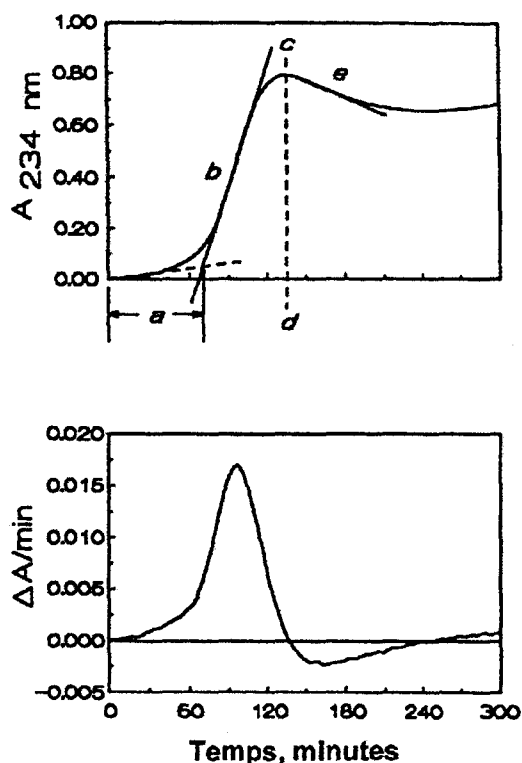


Fig. 3.8.5: Courbe type de l'évolution de la quantité de diènes formés lors de l'oxydation des LDL générée par Cu^{2+} et suivie par mesure par l'absorbance à 234 nm. Celle-ci est corrigée de l'absorbance initiale mesurée au temps 0.

D'après Puhl H. *et al.*, 1994.

Dans la méthode des diènes conjugués, la durée de la phase de latence est définie comme l'abscisse de l'intersection de la tangente en b, et de la droite extrapolée pour la réaction lente a (Fig. 3.8.5).

La vitesse maximale de formation des diènes est déduite de la pente de la tangente en b, ou de l'ordonnée du pic de la dérivée de l'absorbance en fonction du temps ($\Delta A/\text{min}$), par la loi de Beer-Lambert, sachant que l'absorbance molaire des diènes conjugués est de $29500 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Ainsi la vitesse en $\mu\text{M}.\text{min}^{-1}$, est donnée par $33.8 \times (\Delta A/\text{min})$.

La concentration maximale de diènes avant le début de la phase de dégradation est obtenue grâce à l'ordonnée du maximum d'absorbance (c-d, Fig. 3.8.5) [Puhl H. *et al.*, 1994].

3.8.4. Mode opératoire.

3.8.4.1. Préparation des LDL.

Des LDL humaines sont isolées de sang fraîchement obtenu de donneurs sains, possédant un taux de lipides sanguins normal. De l'EDTA est ajouté aux échantillons de sang collectés et le plasma est séparé des cellules sanguines par centrifugation à basse vitesse. Les LDL, d'une densité allant de 1.019 à 1.063 g/ml, sont recueillies par ultracentrifugation séquentielle à gradient de densité [Havel R.J. *et al.*, 1955]. Les LDL sont ensuite dialysées par

une solution saline de tampon phosphate (pH=7.2) contenant 0.01% d'EDTA, stérilisées par filtration à travers un filtre à pores de 0.22 μm puis stockées à 4°C sous azote.

La concentration des LDL est déterminée par la méthode de Peterson [Peterson G.A., 1977], en utilisant de l'albumine de sérum de bœuf comme standard.

3.8.4.2. Induction de l'oxydation des LDL.

Le plasma est conservé en présence de 0.1% d'EDTA. Celui-ci sert à la fois d'anticoagulant et d'antioxydant. Comme nous l'avons vu au paragraphe 3.8.2., l'EDTA inhibe la peroxydation lipidique. Il est donc nécessaire, avant d'effectuer le test, d'en éliminer toute trace en dialysant les LDL, sous atmosphère d'azote, contre 100 fois leur volume de tampon phosphate (0.01M, pH=7.2-7.4), changé trois fois pendant 24 heures [Puhl H. *et al.*, 1994].

Les LDL sont alors diluées à l'aide d'une solution saline de tampon phosphate afin d'obtenir une concentration de 125 $\mu\text{g/ml}$. Les 4-mercaptoimidazoles, quant à eux, sont mis en solution dans l'éthanol à 10^{-2}M , puis dilués avec une solution saline de tampon phosphate afin d'établir une gamme de concentrations allant de 10^{-3} à 10^{-5}M . Enfin, on réalise une solution de sulfate de cuivre, CuSO_4 , à 16.6 μM , toujours dans du tampon phosphate, qui servira à initier la peroxydation lipidique.

On introduit alors 800 μl de la solution de LDL, 100 μl de la solution du produit à tester et 100 μl de la solution de cuivre dans une cellule de quartz de 1 ml. Les concentrations finales dans la cellule sont donc de 100 $\mu\text{g/ml}$ de LDL, 1.66 μM en Cu^{2+} et 10^{-4} à 10^{-6}M en 4-mercaptoimidazole. La concentration en éthanol ne dépasse jamais 1% en volume.

La référence comprend de l'éthanol, mais en absence de 4-mercaptoimidazole.

L'oxydation est suivie à 30°C, à 234 nm, pendant 8 heures, à raison d'une lecture toutes les 10 minutes pour chaque concentration. Le tracé de la courbe absorbance en fonction du temps permet de suivre l'apparition des diènes conjugués, et de déterminer pour chacune d'elles le temps de latence comme explicité au paragraphe 3.8.3.

La dose inhibitrice 50, IC_{50} , est définie comme étant la concentration nécessaire en antioxydant pour obtenir un allongement de la phase de latence de 50% par rapport à celle obtenue pour la référence.

3.8.5. Résultats.

La figure 3.8.6 montre les courbes de formation des diènes conjugués obtenues en utilisant le composé 7 comme antioxydant.

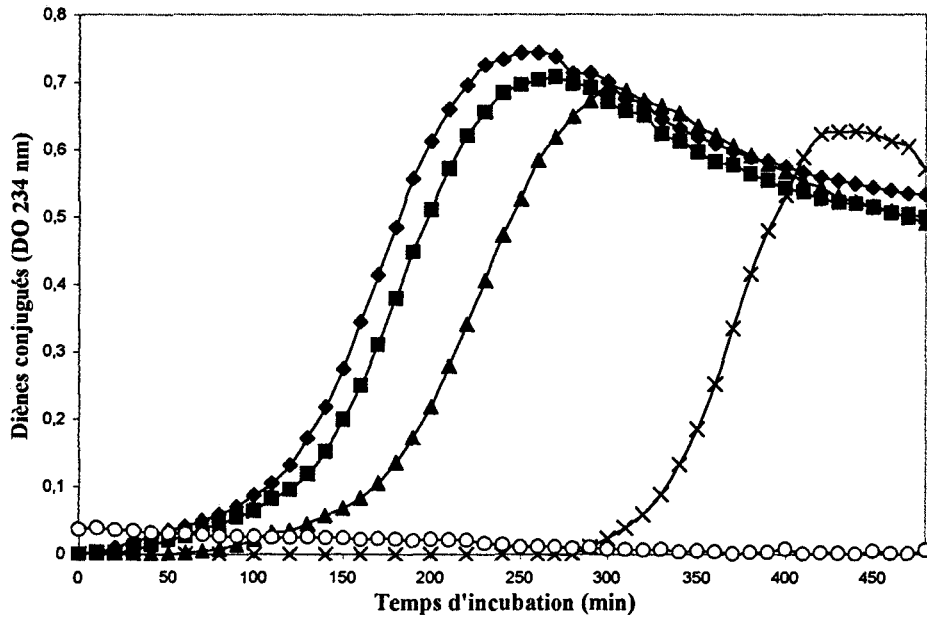


Fig. 3.8.6 : Inhibition de la peroxydation des LDL par différentes concentrations de 1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 7: 0 μM (◆), 1 μM (■), 2,5 μM (▲), 5,0 μM (×) et 7,5 μM (○).

Le tableau suivant indique les valeurs d' IC_{50} obtenues pour certains des 4-mercaptoimidazoles (Tableau 3.8.1).

Antioxydant	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a
2	3,4-diMeO-Ph	H	H	-
5	Me	4-Cl-Ph	H	3.8
6	Me	3-Cl-Ph	H	5.8
7	Me	2-Cl-Ph	H	2.7
9	Me	3-CF ₃ -Ph	H	6.2
10	Me	H	2-CF ₃ -Ph	50.0
11	Me	H	2-Cl-Ph	5.5
12	Me	H	3-Cl-Ph	-
14	Me	CF ₃	2-MeO-Ph	60.0
Vitamine E				10
Mélatonine				79
Glutathion				1.1
Quercétine				0.3

Tableau 3.8.1 : Résultats du test d'oxydation des LDL.

^a Concentration de 4-mercaptoimidazole nécessaire pour augmenter de 50% la durée de la phase de latence de l'oxydation des LDL initiée par Cu^{2+} , par la méthode des diènes conjugués.

On peut donc voir que certains des 4-mercaptoimidazoles étudiés s'avèrent être de bons inhibiteurs de la peroxydation lipidique, en accroissant de façon significative le temps de latence de l'apparition des diènes conjugués, à l'instar de thiols aliphatiques comme l'acide dihydrolipoïque [Lodge J.K. *et al.*, 1998], le captopril ou la N-acétylcystéine [Zieden B. *et al.*, 1995; Godfrey E.G. *et al.*, 1994].

Les résultats du tableau 3.8.1 montrent que les molécules possédant un groupement électro-attracteur en position 2 (5, 6, 7, 9) sont les inhibiteurs de l'oxydation des LDL les plus actifs, avec des IC_{50} de 2.7 à 6.2 μM . Leurs activités sont supérieures à celle de la mélatonine (79 μM) et de la vitamine E (10 μM), tout en restant inférieures à celle du glutathion (1.1 μM).

Les composés substitués en position 1 ou 5 sont inactifs (2, 12), à l'exception du composé 11, et dans une moindre mesure des composés 10 et 14 (qui ont des activités de l'ordre de grandeur de celle de la mélatonine). Rappelons tout de même que ce dernier est substitué en position 2 par un groupement électro-attracteur.

On peut noter que la fonction thiol est absolument nécessaire à l'activité des 4-mercaptoimidazoles puisque les disulfures correspondant ne présentent aucune activité.

Certains 4-mercaptoimidazoles montrent des activités pro- ou anti-oxydantes selon la concentration testée. Ainsi les composés 3 et 10 augmentent la peroxydation lipidique à faibles concentrations (< 3 μM), alors qu'à concentrations plus élevées, au contraire, ils protègent les LDL de l'oxydation. Cette activité pro-oxydante à faible concentration est probablement due à la formation de radicaux thiyle et d'anions superoxyde, faisant intervenir une espèce métallique, comme l'a montré l'étude de Heinecke [Heinecke J.W. *et al.*, 1993]:

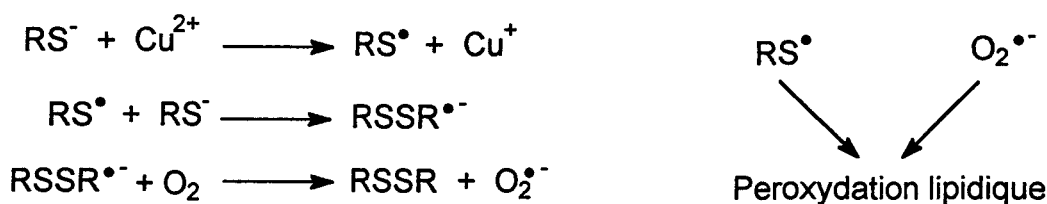


Fig. 3.8.7 : Mécanismes pro-oxydants, SOD-dépendants ou -indépendants, présentés par les thiols à faible concentration.

Adapté de Heinecke J.W., 1993.

Ce type d'activité pro-oxydante à faible concentration avait déjà été remarqué pour d'autres thiols, comme l'acide dihydrolipoïque [Lodge J.K. *et al.*, 1998], et des thiols physiologiques [Lynch S.M. and Frei B, 1997].

A concentrations plus élevées les propriétés antioxydantes des 4-mercaptoimidazoles prennent le pas sur ces mécanismes.

L'activité inhibitrice des 4-mercaptoimidazoles vis-à-vis de l'oxydation des LDL peut être expliquée en partie par leur capacité à piéger les radicaux produits au cours des phases d'initiation et de propagation (§ 3.3. et 3.4.1.) Mais une étroite corrélation ne peut être établie entre ces deux propriétés. Ainsi, les composés 6, 7, 9 et 11, présentent à la fois une forte activité en tant que piègeurs du radical DPPH (§ 3.3.1.) et en tant qu'inhibiteurs de la peroxydation lipidique. Cependant, les composés 12 et 14, qui possèdent des activités similaires vis-à-vis du DPPH, montrent une efficacité moindre dans l'inhibition de la peroxydation des LDL.

En fait, la capacité démontrée des 4-mercaptoimidazoles à complexer le cuivre (§ 3.6.) intervient probablement dans leur activité en tant qu'inhibiteur de la peroxydation lipidique. En effet, il a déjà été proposé que la complexation du cuivre par des thiols, comme le captopril [Misik V. *et al.*, 1993] ou l'acide dihydrolipoïque [Lodge J.K. *et al.*, 1998] empêcherait celui-ci de se lier à certains sites des LDL nécessaires à la formation des radicaux initiant la peroxydation.

Afin de vérifier cette hypothèse, les composés les plus actifs, à savoir les molécules 6, 7, 9 et 11, ont été à nouveau testés pour leur activité inhibitrice de la peroxydation lipidique, mais en utilisant cette fois le 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH, fig. 3.8.8) à la place du cuivre pour initier le mécanisme. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues dans cette expérience sont plus élevées que les précédentes: 67, 11.4, 27 et 100 µM respectivement pour les composés 6, 7, 9 et 11. Ces activités, mises en évidence dans un mécanisme d'initiation de la peroxydation lipidique indépendant de la présence d'un métal, tendent à prouver que la capacité des 4-mercaptoimidazoles à inhiber l'oxydation des LDL est en partie due à leur propension à complexer le cuivre et le rendre ainsi indisponible pour initier la peroxydation lipidique.

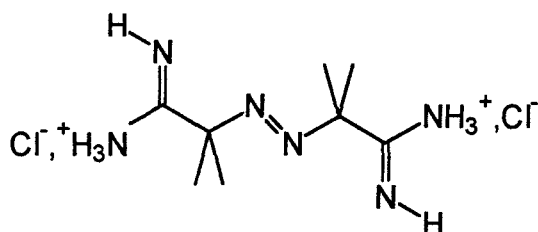


Fig. 3.8.8 : Structure du AAPH. Aussi connu comme initiateur de polymérisation radicalaire.

En conclusion, les 4-mercaptoimidazoles présentent, pour certains d'entre eux, une bonne activité en tant qu'inhibiteur de la peroxydation lipidique qui peut s'expliquer par la combinaison de leurs capacités à piéger les radicaux et à complexer le cuivre.

3.9. Modélisation moléculaire et QSAR.

3.9.1. Présentation rapide du QSAR.

3.9.1.1. Principes.

Nous allons dans un premier temps expliquer le principe et l'objectif d'une étude QSAR, ainsi que les moyens mis en œuvre. Ce domaine de recherche restant très actif et le nombre de méthodes mises au point étant très important, il ne nous sera pas possible de faire une revue complète du QSAR. Aussi, nous nous contenterons d'exposer uniquement, et de façon succincte, les moyens mis en œuvre dans cette étude, moyens qui sont par ailleurs parmi les plus répandus en QSAR.

Le QSAR, ou Quantitative Structure Activity Relationship a pour but de déduire l'activité biologique d'une série de molécules à partir de leur structure [Stute M.S., 1990]. Il repose sur deux principes fondamentaux:

1. Il existe une relation implicite F entre la structure de la molécule et son activité, telle que: $\text{Activité} = F(\text{Structure})$.
2. Cette fonction F peut être approchée par des fonctions plus simples à partir d'une étude statistique menée sur un ensemble de molécules d'activité connues.

La relation F est qualifiée de mathématiquement implicite car elle ne peut toujours être explicitée à l'aide d'une fonction simple. Un des buts du QSAR est alors de chercher des fonctions usuelles qui pourront s'approcher au mieux de la vraie fonction F . Ces fonctions simples sont le plus souvent choisies de forme polynomiale, pour leur maniement et leurs interprétations simples. Cependant, il est possible d'avoir recours à des fonctions plus compliquées, voire même à une interprétation de la relation sous forme de réseau neuronal [So S.-S. and Karplus M., 1996 et 1997a], de façon à approcher au mieux la fonction F .

Quand une fonction explicite f , représentative de la vraie fonction implicite F est trouvée, celle-ci peut être utilisée afin de déterminer le mécanisme d'action des molécules ou, si elle est suffisamment performante, calculer *a priori* l'activité d'une nouvelle molécule.

Ce type d'approche possède maintenant plus de trente ans d'existence [Hansch C. *et al.*, 1962] et est, de nos jours, largement répandu [So S.-S. and Karplus M., 1997b]. La technique n'a désormais plus à faire ses preuves et des revues détaillent l'apport du QSAR dans des domaines de recherche aussi importants et variés que le cancer [Hansch C. *et al.*, 1995], les anti-inflammatoires [Zoete V. *et al.*, 1999], les médicaments du système nerveux central, les antiviraux, et même les pesticides [Hansch C. and Leo A., 1995].

3.9.1.2. Les descripteurs moléculaires.

Un descripteur moléculaire est une variable dépendant de la structure de la molécule et qui permet, dans une certaine mesure, de donner une vue partielle de celle-ci. Il ne serait pas possible de passer en revue l'ensemble des descripteurs possibles dans cette introduction. Aussi, on se contentera d'en présenter les grands principes.

Il existe deux types de descripteurs: les continus et les discrets.

Un descripteur discret est une variable qui ne peut prendre qu'un nombre restreint de valeurs. L'exemple le plus courant de ce type de descripteur est l'"indicator variable". Il s'agit en fait d'une variable booléenne prenant les valeurs 1 ou 0 selon, par exemple, la présence ou l'absence d'un substituant donné sur la molécule.

Un descripteur continu est une variable représentative de la structure ou des propriétés physico-chimiques de la molécule, qui prend ses valeurs dans l'ensemble des réels. Un tel descripteur peut être mesuré ou calculé. On y trouve, par exemple, les constantes de Hammett, le pKa, la lipophilie, l'énergie des orbitales frontières, la charge d'un atome, l'angle d'une liaison, le moment dipolaire, la chaleur de formation, des paramètres stériques comme le Stérimol, etc... [Taylor R., 1991; Hansch C. and Leo A., 1995].

Les descripteurs sont presque en nombre infini. Avant toute étude QSAR, il convient donc de sélectionner ceux qui, selon le chimiste, auront le plus de chance d'intervenir dans la relation structure-activité.

3.9.1.3. Approche de Hansch.

C'est Hansch [Hansch *et al.*, 1962] qui, le premier, a systématisé l'approche QSAR en proposant l'emploi de la formule type suivante:

$$\log(A) = k_0 + \sum k_i X_i \quad \text{où } A \text{ représente l'activité.}$$

Le plus souvent, dans le cas d'études de pharmacochimie pour lesquelles on disposerait d'activités exprimées en concentration inhibitrice IC_{50} , A est écrit comme étant l'inverse de cet IC_{50} et on obtient alors:

$$\log(1/IC_{50}) = k_0 + \sum k_i X_i$$

Les X_i représentent les descripteurs, tandis que les k_i représentent les contributions de chacun de ceux-ci à l'activité. **C'est une équation de ce type que nous utiliserons dans la suite (§ 3.9.4.).**

Afin de déterminer les k_i , il est nécessaire d'effectuer une régression linéaire multiple. Ainsi, si l'on a sélectionné q descripteurs pour un lot de n molécules ($n > q$), on obtient le système d'équations suivant:

$$\begin{aligned} Y_1 &= k_0 + k_1 X_{11} + k_2 X_{12} + \dots + k_q X_{1q} \\ Y_2 &= k_0 + k_1 X_{21} + k_2 X_{22} + \dots + k_q X_{2q} \\ &\dots\dots\dots \\ Y_n &= k_0 + k_1 X_{n1} + k_2 X_{n2} + \dots + k_q X_{nq} \end{aligned}$$

Ce système peut bien entendu s'écrire sous forme matricielle:

$$Y = X.K$$

K est le vecteur contenant les contributions des descripteurs. Ceux-ci sont regroupés dans la matrice X . Y est le vecteur contenant les valeurs d'activité des molécules. Les coefficients k_i peuvent être obtenus par la relation suivante [Pleiss M.A. and Unger S.H., 1990]:

$$K = ({}^t X.X)^{-1} . {}^t X.Y \quad \text{où } {}^t X \text{ est la transposée de } X.$$

En pratique, l'activité ne varie pas toujours linéairement avec une propriété physico-chimique. Par exemple, il est souvent possible de trouver une relation polynomiale entre l'activité et la lipophilie, notée $\log(P)$ [Dearden J.C., 1985]. *En effet, il existe parfois une valeur optimale pour la lipophilie en deçà de laquelle la molécule ne peut diffuser au travers des membranes pour accéder au site de son activité et au-delà de laquelle elle est, au contraire, piégée dans la membrane.*

3.9.1.4. Choix des paramètres.

Un danger pour les équations QSAR provient du fait que les descripteurs peuvent être intercorrélés, c'est-à-dire qu'il existe déjà une relation mathématique entre eux. Par exemple, dans le cas d'une série homogène qui ne varie que par l'augmentation de la taille d'une chaîne alkyle, le volume et la lipophilie seront fortement corrélés. En effet, l'augmentation de la taille du groupement alkyle va avoir pour effet d'augmenter simultanément le volume de la molécule et sa lipophilie.

L'utilisation de descripteurs intercorrélés peut aboutir à l'obtention d'une relation non pertinente et à une mauvaise interprétation du mécanisme de la réaction. Par exemple, pour reprendre le cas du paragraphe précédent, on ne pourra pas savoir, de la lipophilie ou du volume, lequel de ces deux paramètres est important pour l'activité.

Il faut donc retirer, avant même l'établissement des équations, tous les paramètres de moindre importance qui sont fortement corrélés avec d'autres dont on estime qu'ils sont plus pertinents pour l'étude.

3.9.1.5. Validation des équations.

3.9.1.5.1. Le coefficient de corrélation.

Le coefficient de corrélation représente la fraction de la variance qui est expliquée par la corrélation. C'est le plus simple et le plus direct des moyens de validation. Plus le coefficient de corrélation R est élevé, meilleure est la corrélation. Dans le domaine du QSAR, la validité d'un modèle commence à être jugée satisfaisante pour un coefficient R supérieur à 0.8 [Pleiss M.A. and Unger S.H, 1990].

Cette valeur de 0.8 peut paraître très faible et c'est souvent un reproche aux équations QSAR. En effet, nous sommes plutôt habitués aux coefficients de l'ordre de 0.99 obtenus pour des droites d'étalonnage, par exemple. Un coefficient de 0.80, semblant très faible, pourrait alors choquer. Cependant, le problème est ici totalement différent. Pour une droite d'étalonnage, la loi exacte de la relation est connue... puisqu'il s'agit assurément d'une droite. De plus, les variables sont mesurées avec une grande précision. La seule inconnue reste donc les paramètres de la droite, et il est alors normal de trouver une équation linéaire presque parfaite.

Dans les relations QSAR le problème est tout autre. Tout d'abord, rappelons que la relation calculée n'est qu'une valeur approchée d'une fonction implicite inconnue. Il y a de plus une infime probabilité pour que cette fonction implicite soit linéaire en fonction de tous ses paramètres. Ce nombre de paramètres, par ailleurs, est inconnu du chercheur QSAR qui doit se contenter de sélectionner ceux qui lui semblent les meilleurs. La relation structure-activité implicite est théoriquement fonction de la totalité des descripteurs de la molécule, avec plus ou moins d'importance pour chacun. La relation QSAR, elle, ne peut en choisir que quelques-unes.

Il peut toutefois arriver que pour une étude QSAR on obtienne un coefficient de l'ordre de 0.97 à 0.99. Cependant, il s'agit la plupart du temps d'une étude menée sur un nombre restreint de molécules (5 ou 6), sur une propriété physico-chimique très simple (comme une constante d'acidité) dont on sait qu'elle est en relation linéaire avec un descripteur. Par exemple, beaucoup d'études montrent un coefficient de corrélation de l'ordre de 0.99 pour une loi constantes d'acidité/constantes de Hammett (*le contraire eût été étonnant puisque ces constantes de Hammett furent justement définies et calculées à partir de pK_a ...*).

3.9.1.5.2. Le test de Fischer.

Ce test est très répandu dans le domaine du QSAR. Le test de Fischer, ou F-Test, a pour objet de déterminer la pertinence d'une relation QSAR [Pleiss M.A. and Unger S.H., 1990]. En effet, une relation de ce type peut très bien avoir un coefficient de corrélation élevé et pourtant être due au hasard. Afin de se prémunir contre ce problème, on calcule pour la

corrélation en question la valeur de son F , qui est ensuite comparée à une valeur théorique que l'on trouve dans une table de Fischer-Snedcor.

Pour une équation donnée, la valeur calculée de F est fonction des résidus entre les activités mesurées et calculées, ainsi que de la variance. La valeur théorique tabulée $F_{0.99}$, quant à elle, est fonction du nombre de points et du nombre de paramètres dans l'équation; elle est constante pour toutes les corrélations du même type (même nombre de points et de paramètres).

La valeur F est ensuite comparée à la valeur théorique $F_{0.99}$. Par exemple, supposons que nous ayons établi une équation QSAR à trois paramètres pour 10 molécules. Pour toute équation à trois paramètres et 10 points, on lit dans les tables que la valeur de $F_{0.99}$ est de 9.78. Si la valeur du F d'une équation de ce type est supérieure à 9.78, alors il y a 99% de chance qu'elle ne soit pas due au hasard. On peut aussi utiliser $F_{0.975}$ ou $F_{0.95}$. En général, si pour une équation on obtient $F < F_{0.95}$, alors celle-ci est rejetée.

3.9.1.5.3. La cross validation.

Un autre test permet encore de vérifier la validité d'une relation QSAR. Il s'agit de la cross validation. Cette technique consiste à retirer, à tour de rôle, une des molécules de l'ensemble, puis à redéfinir la corrélation avec les molécules restantes. L'équation ainsi obtenue est alors utilisée afin d'estimer la valeur de l'activité de la molécule qui avait été retirée [So S.-S. and Karplus M., 1996]. Cette étape de retrait d'une molécule, redéfinition de la corrélation et calcul de l'activité de la molécule retirée doit être effectuée pour tous les composés de l'ensemble étudié.

Comme on peut le voir, cette méthode permet d'estimer le pouvoir prédictif d'une corrélation. En effet, elle teste sa capacité à calculer l'activité d'une molécule qui n'a pas été utilisée pour la définir.

La comparaison entre les valeurs d'activité évaluées de cette façon, et les valeurs mesurées permet de calculer un coefficient de corrélation appelé coefficient de cross-validation. Plus celui-ci est élevé (proche de 1), plus la corrélation possède un pouvoir prédictif.

3.9.2. Optimisation de la géométrie des composés.

Il n'est pas possible, de décrire brièvement les méthodes de calculs quantiques, semi-empiriques ou classiques utilisables en modélisation moléculaire. Le lecteur pourra toutefois se reporter avec bonheur aux nombreux ouvrages de référence existant dans le domaine [Hirst D.M., 1990; Hinchliffe A., 1988].

3.9.2.1. Méthode de calcul.

Afin d'optimiser la géométrie, puis de calculer les différents descripteurs pour l'étude QSAR, il a été choisi d'utiliser une méthode semi-empirique. En effet, les nombreux calculs nécessaires à l'étude complète de la géométrie des molécules et à l'obtention des enthalpies des réactions étudiées (§ 3.9.3.1.), ainsi que le nombre parfois important d'atomes présent dans les 4-mercaptoimidazoles, rendaient l'emploi d'une méthode *ab initio* beaucoup trop coûteuse en temps de calcul et par la même inutilisable.

Les calculs ont donc été menés à bien à l'aide de la méthode semi-empirique AM1 [Dewar M.J.S. *et al.*, 1985] en utilisant MOPAC 6 ou Spartan® Plus 5.0. Les angles et longueurs de liaisons standards furent utilisés comme point de départ des calculs de géométries. Pour MOPAC, les mots clefs AM1, PRECISE et GNORM=0.01 furent introduits comme paramètres.

3.9.2.2. Géométrie des 4-mercaptoimidazoles.

Les 4-mercaptoimidazoles synthétisés contiennent peu de degrés de liberté quant à leur géométrie. En effet, l'aromaticité des cycles imidazole et phényle rend leur structure rigide. Seule la valeur de l'angle dièdre φ provenant de la libre rotation de la liaison entre les deux cycles reste à déterminer (Fig. 3.9.1):

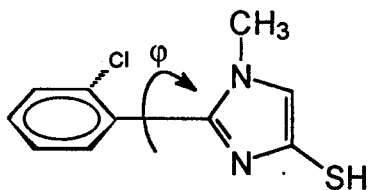


Fig. 3.9.1: Libre rotation autour de la liaison entre les deux cycles du 4-mercaptoimidazoles.

Afin de déterminer les valeurs que pouvait prendre l'angle dièdre φ défini par les deux cycles aromatiques, un premier calcul fut mené à bien. Il consistait à faire varier par pas successifs la valeur de cet angle et à calculer l'énergie de la molécule ainsi obtenue.

Les figures 3.9.2 à 3.9.7 montrent les diagrammes d'énergie conformationnelle obtenus pour trois molécules représentatives des différentes géométries rencontrées, ainsi que la géométrie la plus stable pour chacune d'entre elles.

Il apparaît nettement que la forme plane de la molécule, correspondant à un angle dièdre de 0° ou de 180°, est défavorisée de plusieurs kcal/mol par rapport à une géométrie possédant un angle dièdre non nul entre les deux cycles aromatiques. Ceci est dû à la gêne stérique occasionnée par les groupements adjacents au site de liaison des deux cycles: hydrogènes, méthoxy, méthyles, doublets libres de l'azote N3, chlore, etc... On en déduit que les molécules ne sont pas planes et que les effets des substituants sur les différentes activités que nous avons rencontrées sont donc, selon toute vraisemblance, plus dus à des effets inducteurs qu'à des effets mésomères.

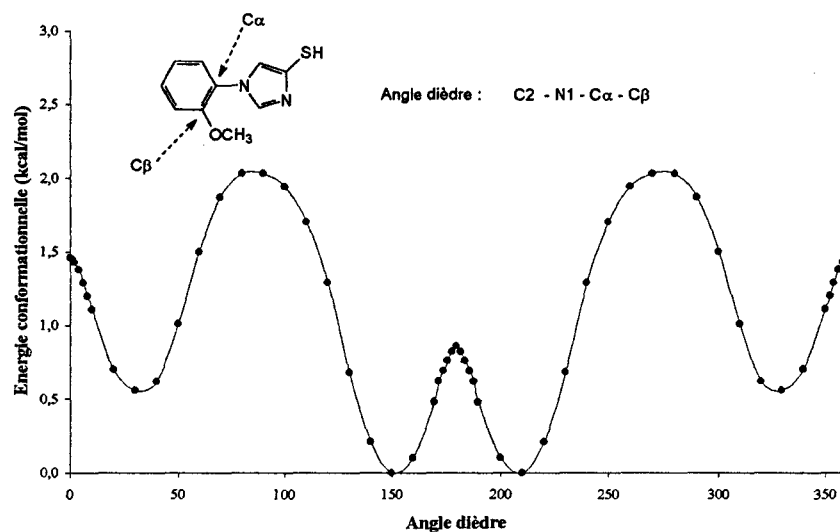


Fig. 3.9.2 : Diagramme d'énergie conformationnelle du 1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptimidazole, 4.

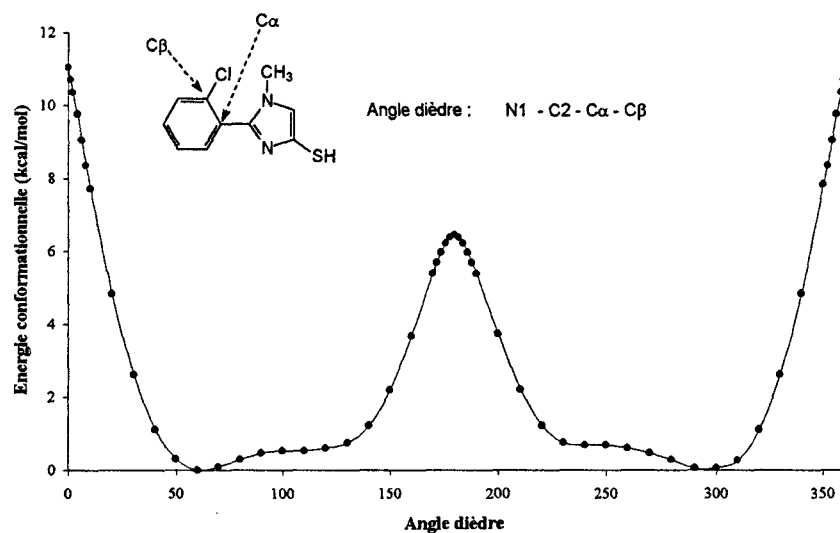


Fig. 3.9.3 : Diagramme d'énergie conformationnelle du 1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptimidazole, 7.

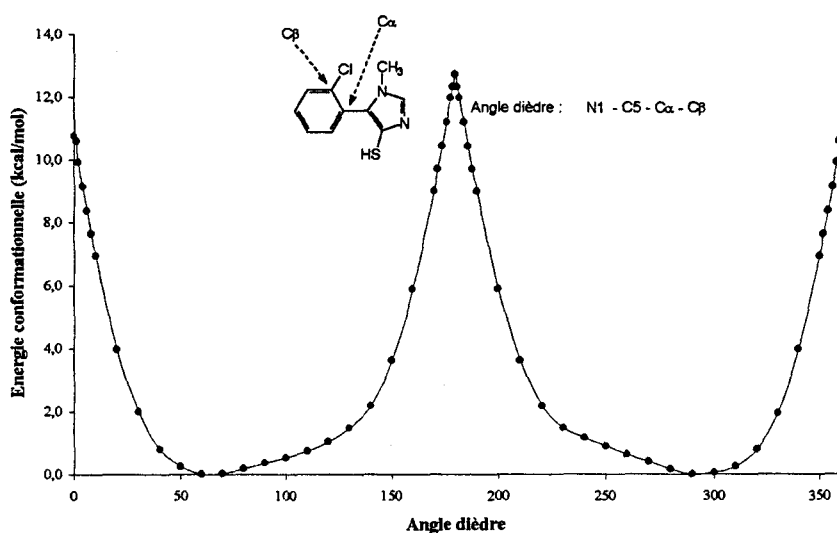


Fig. 3.9.4 : Diagramme d'énergie conformationnelle du 1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptimidazole, 11.

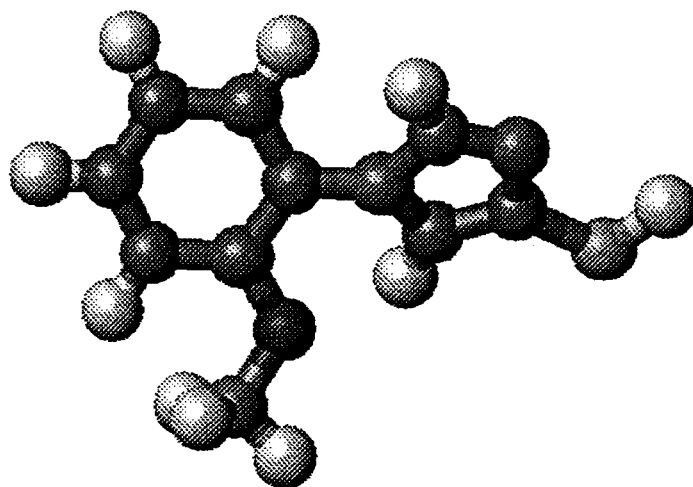


Fig. 3.9.5 : Géométrie optimisée par AM1 du 1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 4.

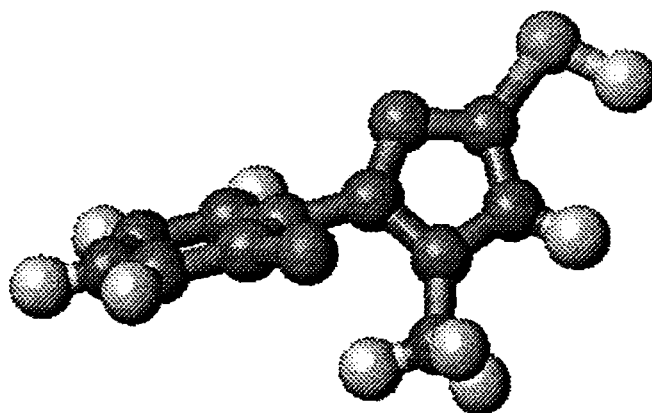


Fig. 3.9.6 : Géométrie optimisée par AM1 du 1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 7.

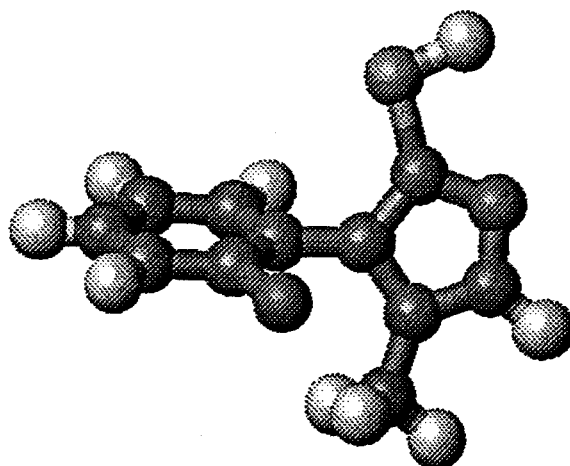


Fig. 3.9.7 : Géométrie optimisée par AM1 du 1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 11.

3.9.3. Calcul des descripteurs.

3.9.3.1. Energies d'activation et enthalpies de réaction.

Afin de décrire le mécanisme de piégeage du DPPH par les 4-mercaptoimidazoles (§ 3.3.1.) en tenant compte des résultats de la voltammétrie cyclique (§ 3.5.2.) et de RPE (§ 3.7.2.3.), nous allons suivre deux réactions: d'une part, l'arrachement d'un atome d'hydrogène de la fonction thiol, et, d'autre part, la formation d'un pont disulfure à partir de deux radicaux thiyle (Figure 3.9.8).

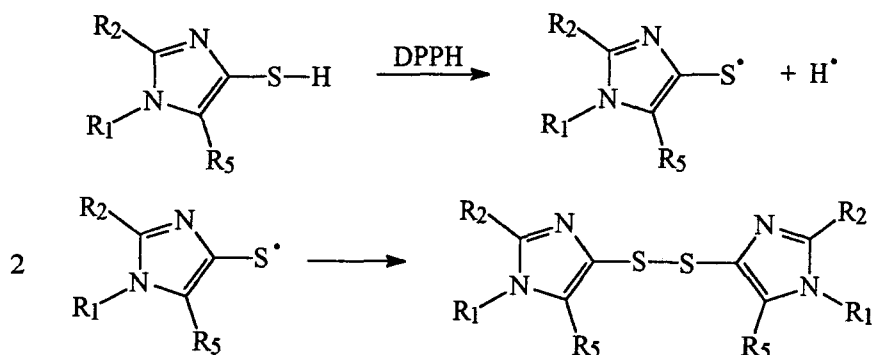


Fig. 3.9.8 : Réaction de piégeage du radical DPPH par les 4-mercaptoimidazoles.

La façon la plus simple de représenter le mécanisme réactionnel d'arrachement d'un atome d'hydrogène consiste en la technique des coordonnées réactionnelles. Dans le cas présent, une seule coordonnée est nécessaire: la distance séparant l'atome d'hydrogène porté par le soufre de ce dernier. Nous appellerons cette distance dS-H. La méthode consiste à faire varier la coordonnée réactionnelle dans un intervalle suffisamment large pour recouvrir toute la réaction et de recalculer, pour chacune des valeurs prises, la chaleur de formation de la molécule (Figure 3.9.9).

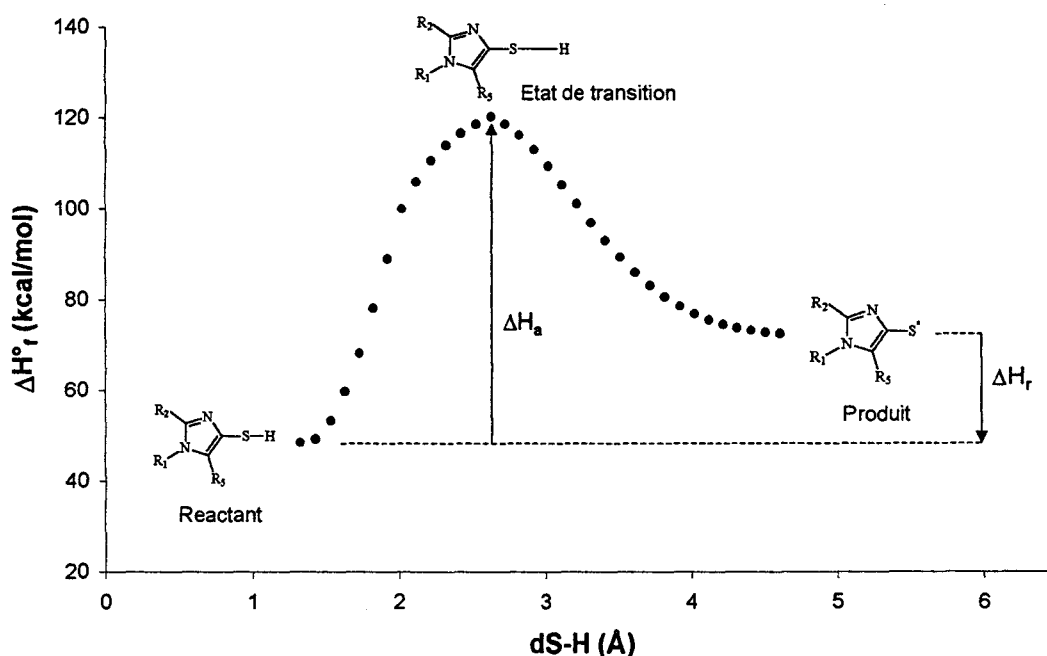


Fig. 3.9.9 : Profil énergétique de la réaction d'arrachement d'un électron.

Ce profil laisse apparaître deux valeurs importantes: l'enthalpie de la réaction, ΔH_r , différence entre la chaleur de formation du radical et celle du thiol, et l'énergie d'activation, ΔH_a , différence entre la chaleur de formation de l'état de transition et celle du thiol. Nous verrons plus tard (Tableau 3.9.1) que ΔH_r est positif, c'est-à-dire que le radical est moins stable que le thiol et que la réaction d'arrachement d'hydrogène nécessite un apport d'énergie.

De la même façon, pour la réaction de formation du disulfure à partir de deux radicaux, on emploiera la méthode de la coordonnée réactionnelle, en utilisant cette fois la distance entre les deux atomes de soufre comme coordonnée (Figure 3.9.10).

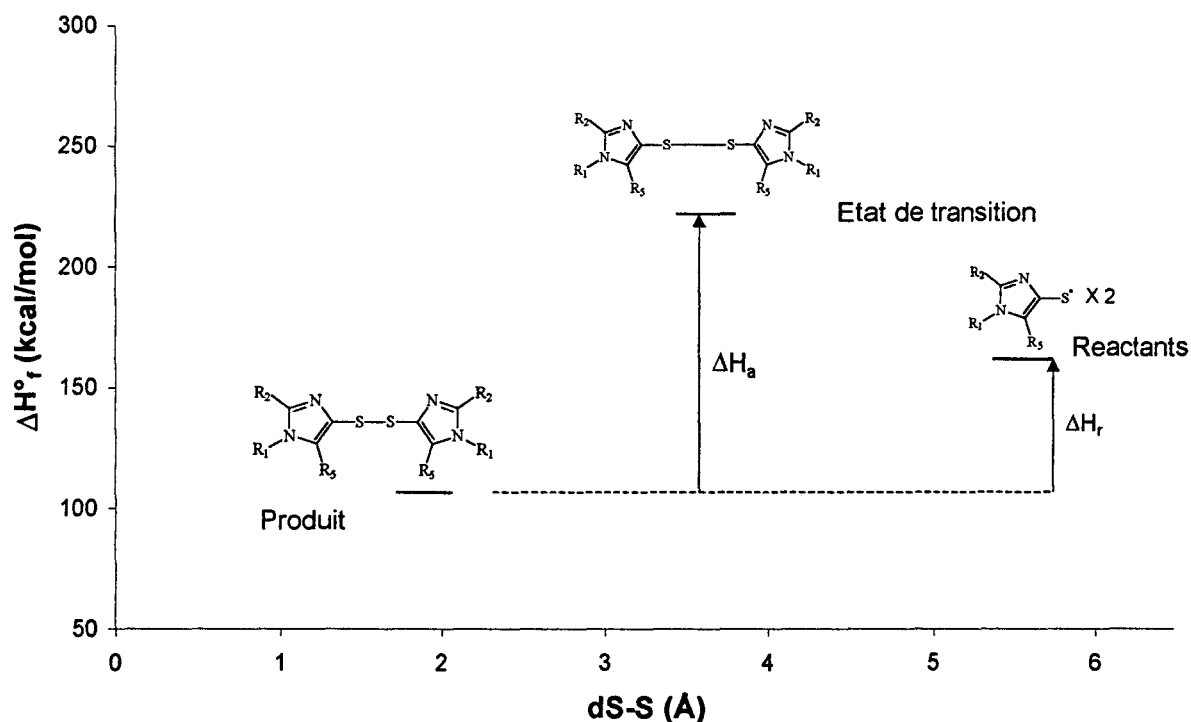


Fig. 3.9.10 Profil énergétique de la réaction de formation du disulfure.

On fera ici attention au fait que les réactants, à savoir les deux radicaux thiyle, sont à droite, tandis que le produit est à gauche. En effet, la distance entre les deux atomes de soufre est plus faible dans la forme disulfure qu'entre les deux radicaux thiyle séparés. **La réaction doit donc se suivre, dans le cas présent, de la droite vers la gauche.** A nouveau, on peut distinguer l'enthalpie de réaction, ΔH_r et l'énergie d'activation, ΔH_a . On verra dans la suite que l'enthalpie de réaction est négative, c'est-à-dire que la réaction de formation du disulfure est favorisée énergétiquement (n'oublions pas qu'il faut comparer la chaleur de formation du disulfure à celle de deux radicaux thiyle).

Les calculs ont été menés à bien en utilisant la méthode semi-empirique AM1 [Dewar M.J.S. *et al.*, 1985] implantée dans MOPAC 6. Les géométries des molécules ont été optimisées à l'aide des mots-clefs PRECISE et GNORM=0.01, à partir des géométries de

départ obtenues en employant les valeurs d'angles et de longueurs de liaisons standards. Les états de transition ont été localisés en utilisant l'algorithme TS de MOPAC.

Par analogie avec une étude précédente concernant l'arrachement d'hydrogène d'une fonction phénol [Ruiz J. *et al.*, 1996], nous pouvons constater que, comme les intermédiaires réactionnels de ces deux réactions ont un caractère biradicalaire, deux états de spin sont possibles: l'état triplet ou l'état singulet. De plus, chacun de ces états peut être étudié selon le formalisme UHF (Unrestricted Hartree Fock) ou RHF (Restricted Hartree Fock). Nous avons donc la possibilité de suivre ces réactions selon quatre voies: singulet-UHF, singulet-RHF, triplet-UHF et triplet-RHF [Ruiz J. *et al.*, 1996].

Afin de choisir le meilleur chemin possible, les quatre possibilités ont été employées pour l'une des molécules. La figure 3.9.11 montre le profil énergétique de la réaction d'arrachement d'un atome d'hydrogène du 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, 1.

On remarque tout de suite que la chaleur de formation du radical thiyle à l'état triplet est plus élevée de 60 kcal/mol que cette même formation à l'état singulet. C'est donc le chemin réactionnel singulet qui est énergétiquement favorisé.

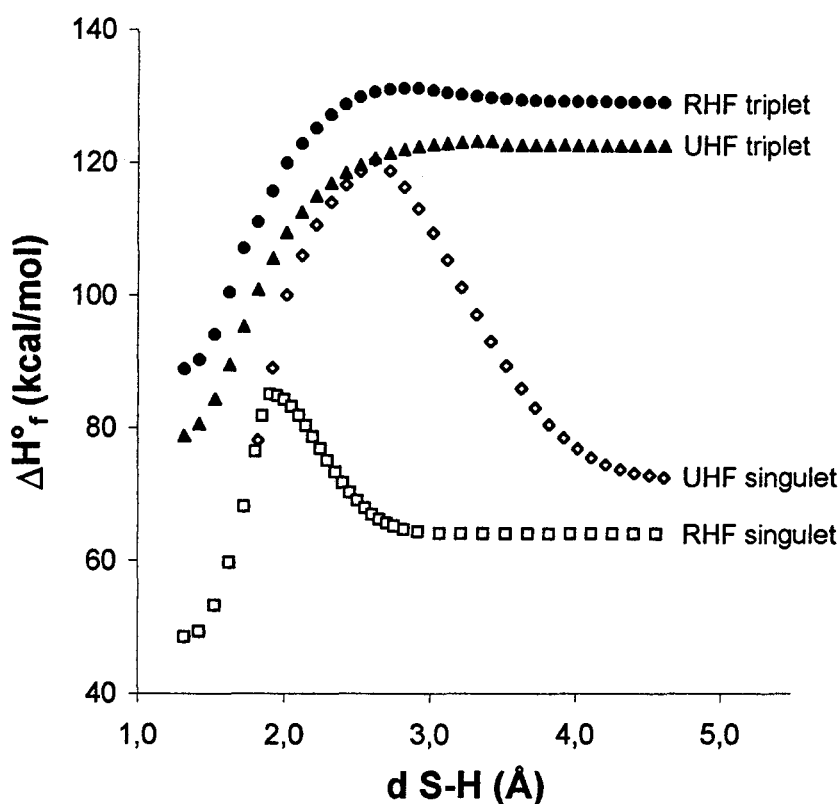


Fig. 3.9.11 : Profil énergétique de formation du radical thiyle du 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, 1, selon les quatre chemins possibles.

On peut voir, de plus, que l'énergie de l'état de transition UHF-singulet est plus élevée de 35 kcal/mol que celle de l'état de transition RHF-singulet. Cependant, on remarque que la

relaxation du chemin RHF-singulet est très rapide, tandis que celle de UHF-singulet est plus uniforme. En conséquence, le chemin UHF-singulet a été sélectionné et utilisé dans la suite des calculs.

Comme mentionné, ces résultats sont très similaires à ceux obtenus par Ruiz J. et al. pour l'arrachement d'hydrogène d'une fonction phénol [Ruiz J. *et al.*, 1996].

Le tableau suivant (Tableau 3.9.1) montre les valeurs des différentes énergies calculées pour les 14 molécules de l'étude, ainsi que leurs activités respectives dans le test du DPPH.

Composés	$\log(1/IC_{50})$	ΔH°_{ft}	ΔH°_{fr}	ΔH°_{fd}	ΔH_{a1}	ΔH_{r1}	ΔH_{r2}
1	2.538	48.03	71.94	103.09	74.47	23.91	-40.79
2	3.111	16.75	40.78	42.01	76.56	24.03	-39.55
3	2.871	51.12	75.62	111.06	76.62	24.50	-40.17
4	2.680	53.45	76.70	113.53	72.49	23.26	-39.88
5	3.297	77.76	100.32	159.98	71.67	22.56	-40.66
6	4.482	75.83	100.41	158.44	74.39	24.58	-42.38
7	4.721	77.75	102.35	162.23	73.79	24.59	-42.46
8	4.409	-68.48	-43.61	-130.12	76.28	24.87	-42.90
9	4.721	-73.21	-48.27	-139.06	74.17	24.94	-42.52
10	4.638	-68.86	-43.88	-130.10	76.81	24.97	-42.33
11	4.721	77.05	101.70	161.68	76.41	24.65	-41.73
12	4.699	74.27	98.36	155.35	76.21	24.10	-41.38
13	2.883	44.31	66.96	93.52	74.75	22.64	-40.39
14	4.638	-108.11	-83.38	-213.75	76.84	24.74	-47.00

Tableau 3.9.1 : Activités vis-à-vis du DPPH et paramètres thermodynamiques.

Dans ce tableau, les différentes énergies sont exprimées en kcal/mol. ΔH°_{ft} , ΔH°_{fr} et ΔH°_{fd} représentent respectivement les chaleurs de formation de la forme thiol, de la forme radicalaire et du disulfure. ΔH_{a1} , ΔH_{r1} représentent respectivement l'énergie d'activation de la réaction de formation du radical thiyle et l'enthalpie de cette même réaction. Enfin, ΔH_{r2} représente l'enthalpie de la réaction de formation du disulfure à partir des radicaux thiyle.

Comme annoncé précédemment, la formation du radical thiyle est désavantagée énergétiquement, avec une enthalpie de réaction de l'ordre de +24 kcal/mol. Par contre, la formation du disulfure est favorisée, avec une enthalpie de réaction de l'ordre de -41 kcal/mol.

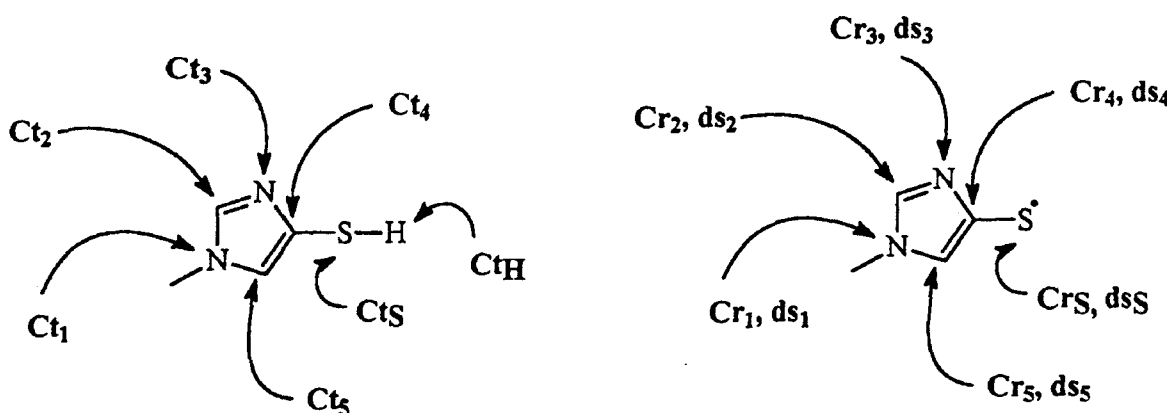
Il n'a pas été possible de calculer une valeur cohérente pour l'énergie d'activation de la réaction de formation du disulfure. Ceci est probablement dû à l'effet d'orbitales fantômes

[Hinchliffe A., 1988]: les orbitales moléculaires d'un des radicaux thiyle sont calculées, ici, en présence des orbitales de l'autre. Ceci aboutit à une valeur erronée des énergies.

3.9.3.2. Autres descripteurs.

Pour obtenir une meilleure connaissance du mécanisme, d'autres paramètres ont été calculés. Il s'agit des densités de spin sur chacun des cinq atomes du noyau imidazole ainsi que sur le soufre, pour la forme thiyle; des charges de ces mêmes atomes pour les formes thiols et radicalaires, et des énergies d'ionisation des formes thiols, radicalaires et disulfures.

Les densités de spin sont notées ds suivies d'un indice pour spécifier l'atome. Les charges des atomes du thiol sont notées Ct , et celles du radical Cr , toujours suivies d'un indice pour spécifier l'atome (Fig. 3.9.12). Les énergies d'ionisation des thiols, radicaux thiyle et disulfures sont notées respectivement EI_t , EI_r , et EI_d .



Les tableaux suivants donnent les valeurs des différents descripteurs. Les charges atomiques y sont exprimées en électron et les potentiels d'ionisation en eV.

Composés	log(1/IC ₅₀)	ds1	ds2	ds3	ds4	ds5	dsS
1	2.538	0.0044	-0.1108	0.1455	-0.2945	0.5180	0.7356
2	3.111	0.0379	-0.1454	0.1540	-0.3230	0.5170	0.7522
3	2.871	0.0374	-0.1422	0.1531	-0.3202	0.5171	0.7508
4	2.680	0.0252	-0.1236	0.1395	-0.3007	0.5049	0.7486
5	3.297	0.0341	-0.1998	0.2312	-0.3186	0.5205	0.7660
6	4.482	0.0328	-0.1975	0.2299	-0.3171	0.5183	0.7664
7	4.721	0.0292	-0.1651	0.1946	-0.3028	0.5047	0.7626
8	4.409	0.0194	-0.1567	0.1932	-0.3022	0.4975	0.7698
9	4.721	0.0262	-0.1866	0.2241	-0.3164	0.5143	0.7705
10	4.638	0.0219	-0.1500	0.1723	-0.3442	0.5566	0.7413
11	4.721	0.0090	-0.1380	0.1657	-0.3350	0.5536	0.7400
12	4.699	-0.0060	-0.1404	0.1637	-0.3424	0.5597	0.7090
13	2.883	-0.0153	-0.1237	0.1526	-0.3250	0.5513	0.7041
14	4.638	-0.0553	-0.1286	0.2088	-0.3084	0.4924	0.7595

Tableau 3.9.2 : Densités de spin des radicaux thiyle.

Composés	log(1/IC ₅₀)	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	CtS	CtH
1	2.538	-0.1562	-0.0854	-0.1473	-0.2753	-0.0854	0.1758	0.0396
2	3.111	-0.1115	-0.0710	-0.1458	-0.2742	-0.1360	0.1850	0.0403
3	2.871	-0.1089	-0.0735	-0.1453	-0.2746	-0.1358	0.1861	0.0395
4	2.680	-0.1046	-0.0843	-0.1078	-0.2890	-0.1411	0.2285	0.0003
5	3.297	-0.1418	-0.0012	-0.0999	-0.2731	-0.1763	0.2335	0.0000
6	4.482	-0.1390	-0.0038	-0.0987	-0.2739	-0.1769	0.2319	0.0000
7	4.721	-0.1310	-0.0053	-0.0948	-0.2768	-0.1746	0.2286	-0.0005
8	4.409	-0.1284	-0.0324	-0.0836	-0.2770	-0.1675	0.2317	0.0002
9	4.721	-0.1366	-0.0100	-0.0972	-0.2742	-0.1736	0.2341	0.0007
10	4.638	-0.1371	-0.0688	-0.1518	-0.2422	-0.0886	0.1944	0.0396
11	4.721	-0.1396	-0.0775	-0.1534	-0.2508	-0.0661	0.1947	0.0356
12	4.699	-0.1594	-0.0707	-0.1481	-0.2611	-0.0504	0.2055	0.0336
13	2.883	-0.1524	-0.0806	-0.1493	-0.2652	-0.0484	0.1942	0.0348
14	4.638	-0.0882	-0.1410	-0.0911	-0.2655	-0.0087	0.1994	0.0385

Tableau 3.9.3 : Charges atomiques des formes thiols.

Composés	log(1/IC ₅₀)	Cr1	Cr2	Cr3	Cr4	Cr5	CrS
1	2.538	-0.1860	-0.0562	-0.1148	-0.2238	-0.0450	0.0654
2	3.111	-0.1326	-0.0430	-0.1108	-0.2257	-0.1038	0.0868
3	2.871	-0.1322	-0.0462	-0.1107	-0.2271	-0.1016	0.0864
4	2.680	-0.1295	-0.0521	-0.1103	-0.2360	-0.0735	0.0766
5	3.297	-0.1711	0.0271	-0.0974	-0.2289	-0.1063	0.0859
6	4.482	-0.1699	0.0256	-0.0967	-0.2297	-0.1055	0.0859
7	4.721	-0.1613	0.0245	-0.0920	-0.2332	-0.1016	0.0797
8	4.409	-0.1596	-0.0022	-0.0795	-0.2372	-0.0938	0.0878
9	4.721	-0.1680	0.0201	-0.0958	-0.2319	-0.1014	0.0912
10	4.638	-0.1688	-0.0441	-0.1165	-0.1992	-0.0400	0.0894
11	4.721	-0.1705	-0.0508	-0.1194	-0.2052	-0.0190	0.0835
12	4.699	-0.1909	-0.0389	-0.1247	-0.1966	-0.0106	0.0770
13	2.883	-0.1919	-0.0423	-0.1263	-0.1994	-0.0004	0.0644
14	4.638	-0.1228	-0.1112	-0.0552	-0.2300	0.0312	0.0977

Tableau 3.9.4 : Charges atomiques des formes radicalaires.

Composés	log(1/IC ₅₀)	EI _t	EI _r	EI _d
1	2.538	7.9151	7.9973	8.0800
2	3.111	8.0527	8.1114	8.0527
3	2.871	8.0322	8.0790	7.8587
4	2.680	7.9177	7.9383	7.7069
5	3.297	8.1215	8.0967	7.8924
6	4.482	8.1162	8.0923	7.9560
7	4.721	8.0291	8.0008	7.7553
8	4.409	8.0990	8.0470	8.5170
9	4.721	8.2090	8.1833	8.6098
10	4.638	8.1190	8.1083	7.9719
11	4.721	7.9832	7.9892	7.7603
12	4.699	8.0941	8.1198	7.9522
13	2.883	7.9124	7.9913	7.7231
14	4.638	8.2040	8.2107	8.2069

Tableau 3.9.5 : Energies d'ionisation des molécules.

3.9.4. Relations QSAR.

Afin de n'oublier aucune corrélation possible, un programme informatique a été mis au point. Ce dernier est capable, pour un lot de molécules et de descripteurs donnés, et après avoir automatiquement éliminé les descripteurs corrélés avec d'autres, de passer en revue la totalité des corrélations possibles pour un nombre de paramètres variant de 1 à 6. Le programme classe ensuite ces équations suivant leur coefficient de corrélation.

3.9.4.1. Paramètres thermodynamiques.

En utilisant les paramètres ΔH_{a1} , ΔH_{r1} , et ΔH_{r2} , une corrélation se détache tout de suite. Celle-ci n'utilise que ΔH_{r2} , les autres s'avérant inutiles:

$$\log(1/IC_{50}) = -24.83 - 0.693 \Delta H_{r2}$$

$$n=13 \quad R=0.8618 \quad \sigma=0.49 \quad F=31.7 (F_{0.99}=9.65) \quad Q=0.8139$$

Ici, et pour toutes les corrélations qui vont suivre, n est le nombre de molécules utilisées pour établir l'équation, R le coefficient de corrélation, s l'écart type global, F le test de Fischer, $F_{0.99}$ la valeur limite de F pour une confiance de 99% et Q le coefficient de cross-validation.

Cette équation tendrait à prouver que l'étape limitante dans le piégeage du radical DPPH est la formation du disulfure à partir des radicaux thiyle.

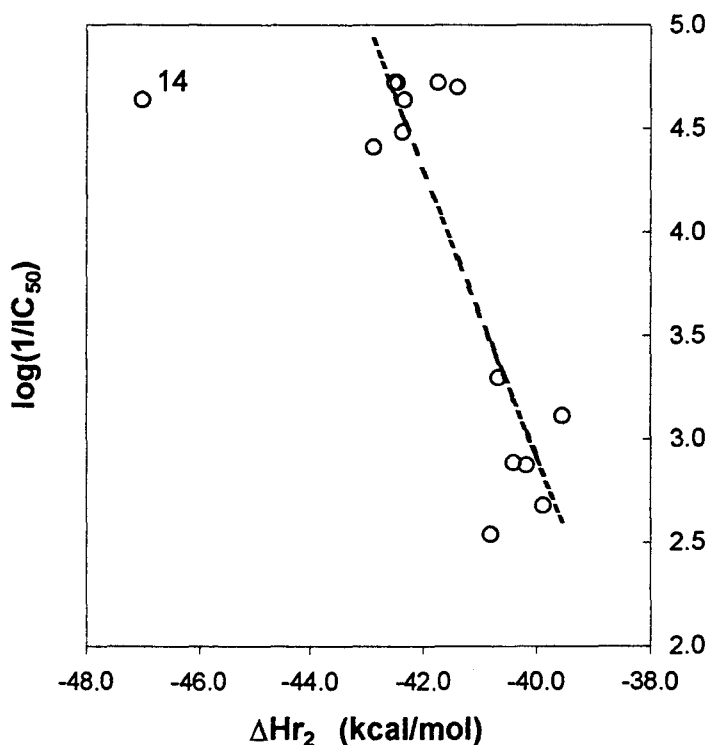


Fig. 3.9.13 : Relation activité / ΔH_{r2} .

Un 4-mercaptoimidazole est un piègeur de DPPH d'autant plus performant que l'enthalpie de formation du disulfure à partir des radicaux, ΔH_{t2} , est importante et négative, c'est-à-dire que la formation du disulfure est énergétiquement favorisée.

Il convient de noter que le 1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, 14, a dû être écarté de la régression. Ce composé possède en effet un ΔH_{t2} très inférieur aux autres composés, ce qui lui procurerait une valeur d'IC₅₀ calculée largement inférieure à 25 μM , ce qui est expérimentalement impossible. Rappelons en effet que l'activité d'une molécule en tant que piègeur de DPPH est limitée, par l'expérience, à une IC₅₀ de 25 μM , à l'erreur expérimentale près (§ 3.3.1.1.).

3.9.4.2. Les densités de spin.

Les densités de spin et ΔH_{t2} n'étant pas corrélées entre elles, il est possible de déterminer des relations QSAR, si elles existent, entre l'activité et les densités de spin.

On remarque que l'électron célibataire du radical est principalement réparti sur l'atome de soufre et sur les carbones 4 et 5 du noyau imidazole. De plus, on peut voir (Tableau 3.9.2) que ds4 est fortement corrélé à dsS ($R=0.85$). En conséquence, seuls dsS et ds5 ont été utilisés dans la recherche d'une équation QSAR.

Afin de tenir compte du fait que l'activité ne varie pas forcément de façon linéaire avec les densités de spin, les carrés de celles-ci, dsS² et ds5², ont été introduits dans le lot de paramètres possibles. De plus, pour tenir compte d'une éventuelle interaction, le terme croisé dsS.ds5 a aussi été rajouté.

On constate, après calcul, que le meilleur compromis entre la pertinence de l'équation et son coefficient de corrélation est obtenu lorsqu'on utilise trois paramètres dans la corrélation. Les trois meilleures équations sont:

$$\log(1/IC_{50}) = -283.9 + 692.2 \text{ dsS} + 887.5 \text{ dsS}^2 - 1210 \text{ ds5.dsS}$$

n=14 R=0.8855 $\sigma=0.48$ F=12.1 ($F_{0.99}=6.55$) Q=0.7697

$$\log(1/IC_{50}) = 415.0 + 30.83 \text{ dsS}^2 - 1658.6 \text{ ds5} - 1602.5 \text{ ds5}^2$$

n=14 R=0.8585 $\sigma=0.53$ F=9.34 ($F_{0.99}=6.55$) Q=0.7415

$$\log(1/IC_{50}) = 398.5 + 45.20 \text{ dsS} - 1658.8 \text{ ds5} - 1602.4 \text{ ds5}^2$$

n=14 R=0.8548 $\sigma=0.54$ F=9.04 ($F_{0.99}=6.55$) Q=0.7378

Un moyen pour tirer le meilleur profit sans exploiter un nombre trop important de paramètres, consiste à employer comme relation QSAR la moyenne de ces trois équations [So S.-S. and Karplus M., 1996].

Etant donné qu'il existe ici deux paramètres, dsS et $ds5$, il n'est pas possible de représenter clairement cette relation sur le même modèle que le précédent. Aussi, on utilise comme représentation graphique les points ayant pour abscisse l'activité expérimentale et pour ordonnée l'activité calculée. Sur ce type de graphe, la diagonale principale correspond à une corrélation parfaite, puisque son équation n'est autre que *activité-calculée* = *activité-mesurée*. Aussi, pour cette représentation graphique, une corrélation QSAR sera d'autant meilleure que les points correspondants suivront la diagonale.

Le graphe suivant (Figure 3.9.14) donne donc une représentation de la relation QSAR, moyenne des trois équations ci-dessus:

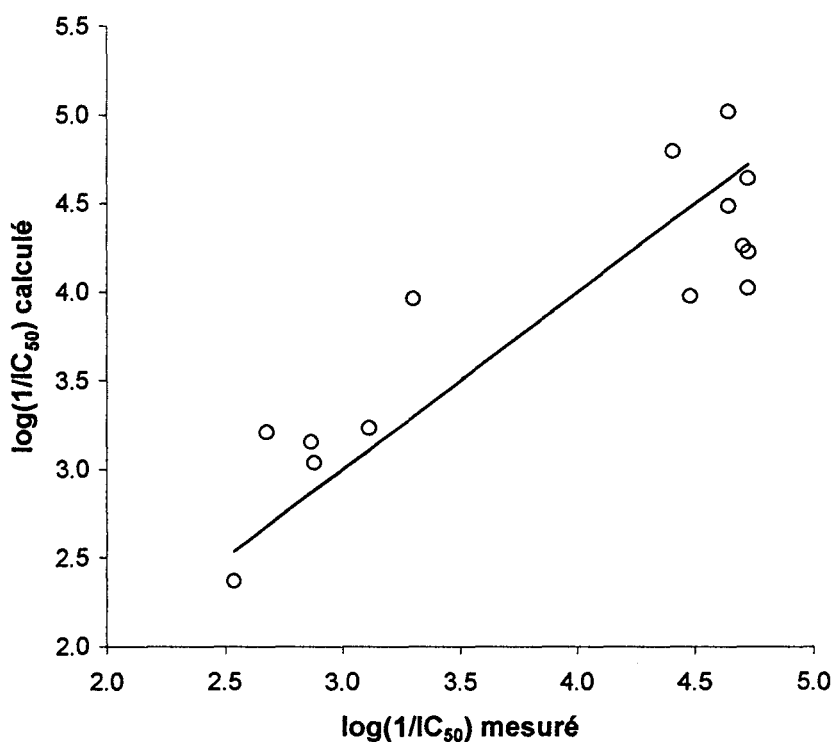


Fig. 3.9.14 : Relation activité / densité de spin.

Afin de déterminer l'influence sur l'activité de chacun des paramètres, il convient de fixer l'un des deux et de suivre l'évolution de l'IC₅₀ en fonction du deuxième. Ainsi, la figure 3.9.15 montre l'évolution de l'activité en fonction de la densité de spin sur le soufre, lorsque la densité de spin sur le carbone C5 est fixée à 0.52. De même, la figure 3.9.16 montre l'évolution de l'activité en fonction de la densité de spin sur le carbone C5, lorsque la densité de spin sur le soufre est fixée à 0.74.

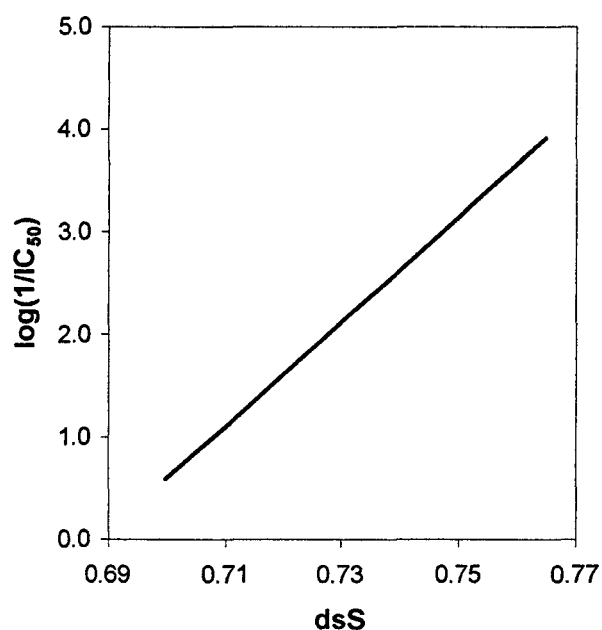


Fig. 3.9.15 : Evolution de l'activité en fonction de la densité de spin sur le soufre, la densité de spin sur le carbone C5 étant fixée à 0.52.

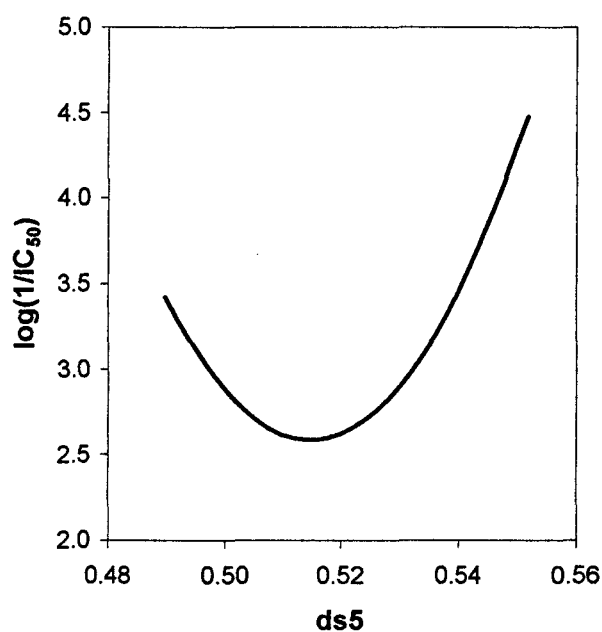


Fig. 3.9.16 : Evolution de l'activité en fonction de la densité de spin sur le carbone C5, la densité de spin sur le soufre étant fixée à 0.74.

Comme on peut le voir, la relation activité/densité de spin sur le soufre est essentiellement linéaire. On remarque qu'une molécule sera d'autant plus active dans le test du DPPH qu'elle aura une densité de spin élevée sur le soufre de la forme radicalaire.

La relation activité/densité de spin sur le carbone C5, quant à elle, est de forme parabolique. Elle admet un minimum qui dépend de la densité de spin sur le soufre, ici vers 0.515.

Il serait dangereux de vouloir extrapoler ces résultats pour une molécule dont les densités de spin n'appartiendraient pas aux domaines étudiés, à savoir [0.49 ; 0.56] pour ds5 et [0.70 ; 0.77] pour dsS. En effet, ce n'est que dans ces gammes que les équations ont été établies et "étalonnées".

3.9.4.3. Les autres descripteurs.

Les charges atomiques de la forme thiol et de la forme radicalaire sont fortement corrélées aux densités de spin. Il n'a donc pas été possible d'établir des corrélations pertinentes en utilisant ces paramètres.

Les énergies d'ionisation des différentes formes de nos molécules ne sont pas corrélées avec d'autres paramètres. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre elles et les activités.

3.9.4.4. Corrélation globale.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les densités de spin et l'enthalpie de la réaction de formation du disulfure ne sont pas mathématiquement liées. Il est donc possible de les unir dans une seule corrélation. On obtient l'équation suivante:

$$\log(1/IC_{50}) = -152.1 - 0.406 \Delta H_{r2} + 324.4 \text{ dsS} + 419.6 \text{ ds5}^2 - 559.0 \text{ ds5} \cdot \text{dsS}$$

n=13 R=0.9423 $\sigma=0.38$ F=15.9 ($F_{0.99}=7.01$) Q=0.8058

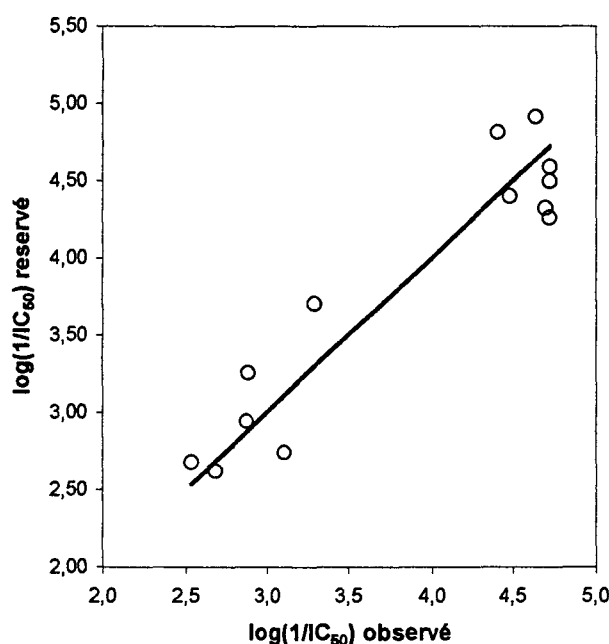


Fig. 3.9.17 : Corrélation globale entre l'activité, ΔH_{r2} et les densités de spin sur les atomes de soufre et C5.

Comme on peut le voir, l'utilisation simultanée de ces 3 descripteurs de la molécule permet une nette amélioration de la corrélation. Cette dernière équation aboutit au graphe de la figure 3.9.17.

A nouveau, et pour la raison citée précédemment, le 1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole, **14**, a dû être écarté de l'établissement de l'équation.

3.9.5. Conclusions de la modélisation moléculaire.

L'étude de la géométrie des composés a montré que les molécules ne sont pas planes, mais forment au contraire un angle dièdre de l'ordre de 30 à 70° entre les deux cycles aromatiques. Les substituants du noyau imidazole exercent donc de toute évidence leur influence sur les différentes activités des composés essentiellement par effet inductif électro-donneur ou électro-attracteur.

Le calcul des densités de spin sur les formes radicalaires des 4-mercaptoimidazoles a mis en évidence la forte présence de l'électron célibataire sur l'atome de soufre et les atomes de carbone adjacents des positions 4 et 5 du noyau imidazole. En outre, il apparaît que l'électron célibataire n'est pas localisé sur l'atome d'azote de la position 1, comme l'avaient proposé Holler et Hopkins [Holler T.P. and Hopkins P.B., 1990b]. La stabilisation du radical ne peut donc provenir d'un effet capto-datif sur la position 1, mais plutôt d'une délocalisation de l'électron célibataire sur le noyau imidazole (Fig. 3.9.18) [Marjanovic B. *et al.*, 1995].

Enfin, l'étude QSAR de l'activité des 4-mercaptoimidazoles en tant que piègeurs du radical DPPH a montré une corrélation entre cette activité et la facilité avec laquelle le 4-mercaptoimidazole peut former une liaison disulfure à partir du radical thiyle. Il apparaît en outre qu'un 4-mercaptoimidazole sera un piègeur de DPPH d'autant plus efficace que la densité de spin sur l'atome de soufre sera élevée. Ces résultats sont en accord avec les résultats de voltammétrie cyclique et de RPE qui ont montré que les molécules les plus actives dans le test du DPPH avaient la particularité de posséder un potentiel de demi-réaction d'oxydation du thiol en disulfure très faible (0.3 V au lieu de 1.0 V pour les inactives, voir § 3.5.2.), et que cette demi-réaction fait intervenir un intermédiaire thiyle radicalaire (§ 3.7.2.3.). On peut en effet faire l'hypothèse que la formation d'une liaison disulfure nécessite simultanément que le radical soit suffisamment stabilisé par délocalisation sur le cycle imidazole (ds_5 élevé, § 3.4.9.2.) pour que sa durée de vie permette la rencontre de deux molécules, et que la présence de l'électron célibataire sur le soufre soit prépondérante (ds_S élevé, § 3.4.9.2.) afin de faciliter la formation de la liaison soufre – soufre.

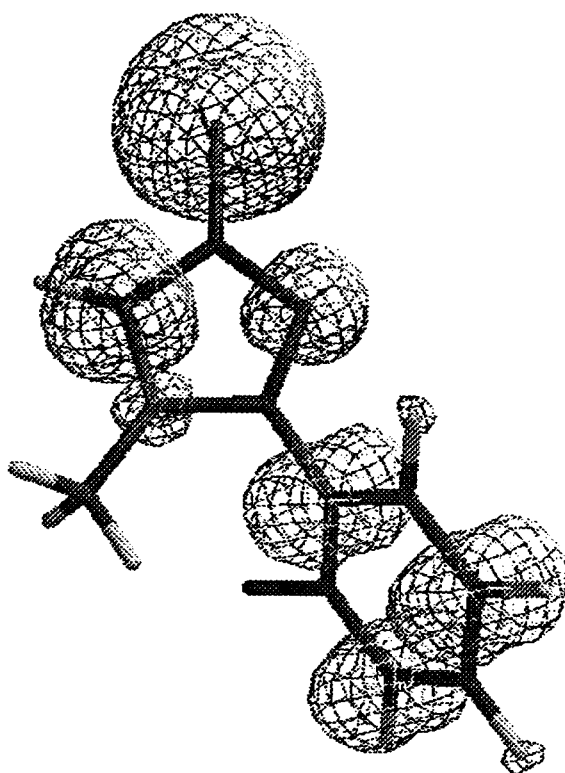


Fig. 3.9.18 : Densité de spin sur le radical thiyle dérivé du 1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 7.

3.10. Etude de l'activité glutathion peroxydase-like.

3.10.1. Objectif et méthode.

3.10.1.1. Objectif.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.1.4., les ovothiols présentent une activité de type glutathion peroxydase (GPx) à leur concentration physiologique dans les œufs d'oursin de mer (de l'ordre du mM), l'enzyme étant remplacée par la molécule d'ovothiol (Fig. 2.1.9) [Turner E. *et al.*, 1988; Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991; Shapiro B.M., 1991; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995]. Cette propriété antioxydante essentielle permettrait aux ovothiols de détoxifier la cellule de l'œuf de la forte concentration en H_2O_2 présente lors de la fécondation et ainsi de l'en protéger [Turner E. *et al.*, 1988; Shapiro B.M. and Hopkins P.B., 1991; Holler T.P. and Hopkins P.B., 1995].

Il était donc intéressant d'étudier l'existence éventuelle d'une telle propriété pour les 4-mercaptoimidazoles synthétisés, car celle-ci renforcerait encore le caractère antioxydant de ces composés.

3.10.1.2. Mode opératoire.

La méthode utilisée vise à effectuer un suivi en continu du processus. Celui-ci peut-être réalisé grâce au couplage de la réaction à la glutathion réductase. En effet, le cofacteur de celle-ci, le NADPH, absorbe en UV à 340 nm, contrairement à sa forme oxydée, le NADP^+ . Il est donc possible de suivre la formation de GSSG par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm (Fig. 3.10.1) : le glutathion oxydé, GSSG, est réduit en continu par un excès de glutathion réductase en présence de NADPH. Ceci permet de maintenir la concentration de glutathion à son niveau initial et d'obtenir une vitesse de réaction linéaire.

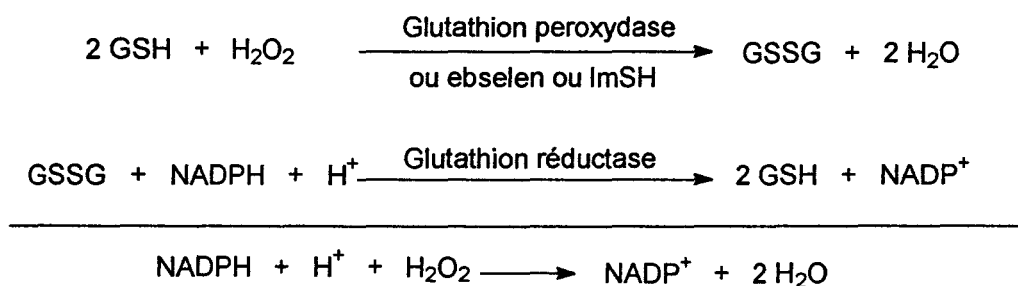


Fig. 3.10.1 : Disparition du NADPH et apparition concomitante de NADP^+ lors du suivi d'une activité glutathion peroxydase-like.

L'oxydation du NADPH, observée par spectrophotométrie UV à 340 nm, est donc une mesure de l'activité glutathion peroxydase [Turner E. *et al.*, 1988].

Le mode opératoire retenu est celui décrit par Müller A. *et al.* [Müller A. *et al.*, 1984] qui réalise le suivi de la réaction par spectrophotométrie UV à 366 nm, plutôt qu'à 340 nm.

Ceci permet d'éviter l'interférence éventuelle avec certains des 4-mercaptoimidazoles absorbant dans la zone des 340 nm.

La solution tampon (Tris.HCl : Tris à 50mM, EDTA à 0.1 mM, NaN_3 à 1 mM, pH 7.6), la glutathion réductase (1 U), le glutathion réduit (1 mM) et le NADPH (280 μM) sont successivement ajoutés dans une cuve en quartz de 1 ml. La solution du composé à tester est alors additionnée en utilisant une solution mère de 0.1 M à 0.01 M afin d'obtenir la concentration visée, puis l'absorbance à 366 nm est enregistrée pendant une durée de 4 minutes. La réaction est enfin déclenchée par ajout de peroxyde d'hydrogène (concentration initiale dans la cuve de 1 mM) et l'on continue la mesure de l'absorbance. Les concentrations des solutions mères ont été calculées de façon à utiliser environ 950 μl de tampon pour un volume total de 1 ml, tout en permettant l'obtention des concentrations souhaitées dans la cuve.

L'incubation de 4 minutes précédant l'ajout du peroxyde d'hydrogène permet de quantifier la consommation spontanée de NADPH. L'activité non enzymatique, observée après ajout de peroxyde d'hydrogène mais en absence de composé à tester, a été mesurée et retranchée de la consommation de NADPH obtenue en présence du composé testé, afin d'obtenir l'activité propre de ce dernier (mesurée en variation d'absorbance par unité de temps : $\Delta\text{DO}/\text{min}$).

3.10.2. Résultats.

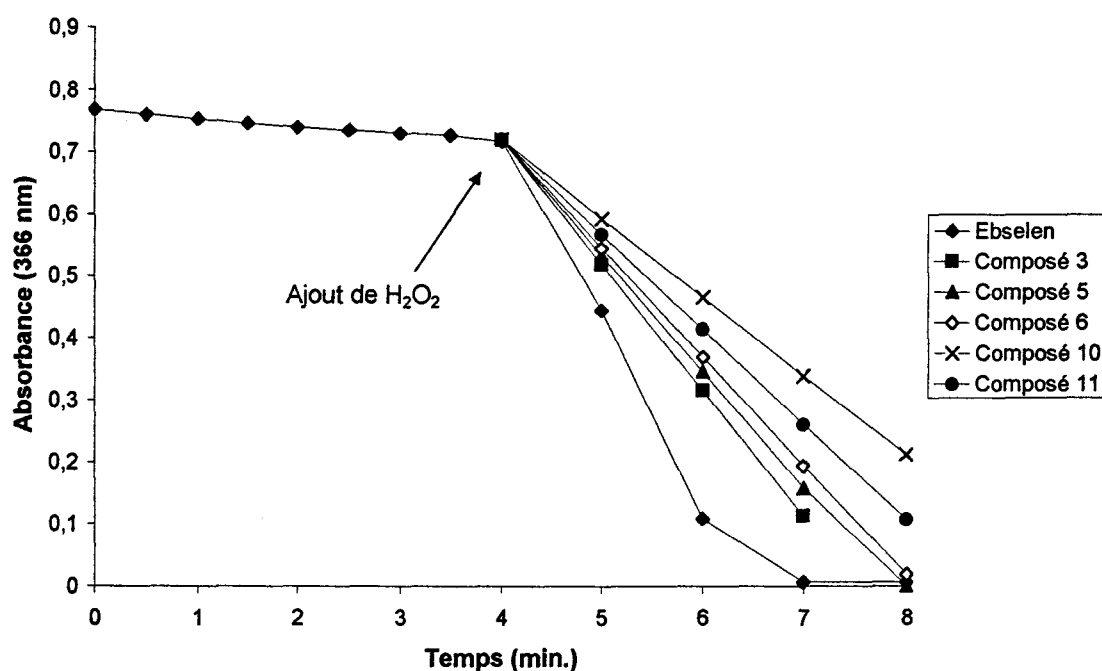


Fig. 3.10.2 : Etude de l'activité glutathion peroxydase-like de l'ebselen et des 4-mercaptoimidazoles par mesure de l'absorbance UV à 366 nm.

Concentrations initiales : glutathion réductase 1 U, GSH 1 mM, NADPH 280 μM , 4-mercaptoimidazole 1 mM. Ajout de 1 mM de H_2O_2 au temps $t=4$ min.

La figure 3.10.2 montre la variation d'absorbance à 366 nm enregistrée lors du suivi de l'activité GPx-like de l'ebbselen et de certains 4-mercaptoimidazoles.

La diminution de l'absorbance à 366 nm avant ajout de H_2O_2 reste négligeable. La réaction spontanée non enzymatique (mesurée par ajout de H_2O_2 en absence d'ebbselen et de 4-mercaptoimidazole) a été évaluée à 0.0859/min. Cette valeur a été retranchée de celles mesurées en présence des composés à tester afin d'obtenir les activités GPx-like des molécules regroupées dans le tableau 3.10.1.

Composés	$\Delta\text{DO}/\text{min}$ (250 μM)	$\Delta\text{DO}/\text{min}$ (500 μM)	$\Delta\text{DO}/\text{min}$ (1 mM)
3	0.0467	0.0847	0.1161
5	0.0318	0.0585	0.1010
6	0.0313	0.0537	0.0893
7	0.0252	0.0597	0.0995
9	0.0375	0.0614	0.0938
10	0.0161	0.0311	0.0411
11	0.0215	0.0379	0.0673
12	0.0347	0.0606	0.0946
13	0.0427	0.0620	0.1044

Tableau 3.10.1 : Activité GPx-like des 4-mercaptoimidazoles, pour des concentrations de 250 μM , 500 μM et 1 mM, exprimée par variation de l'absorbance UV à 366 nm.

L'ensemble des résultats obtenus montre que les 4-mercaptoimidazoles possèdent une activité glutathion peroxydase-like comparable à celle des ovothiols (Fig. 2.1.10) [Turner E. *et al.*, 1988.]. En effet, bien que les conditions expérimentales soient différentes (0.16 mM de NADPH, 0.2 mM de GSH, 1.3 mM de H_2O_2 et tampon tris-Hepes 20 mM pH 7.2 à 30 °C pour l'expérience de Turner E. *et al.*) on constate qu'il est nécessaire d'employer des concentrations de l'ordre du mM en 4-mercaptoimidazole ou en ovothiol afin de pouvoir observer une activité notable.

Cependant, cette activité reste très inférieure à celle de l'ebbselen, servant de référence dans ce domaine (§ 1.6.2.3.). En effet, l'activité de ce dernier a été mesurée dans le présent test à $\Delta\text{DO}/\text{min}=0.1613$ pour une concentration de seulement 12.5 μM .

L'activité GPx-like des 4-mercaptoimidazoles augmente avec leur concentration. En effet, cette augmentation entraîne une plus grande quantité de 4-mercaptoimidazole réduit disponible, et donc une plus grande vitesse de réaction avec le peroxyde d'hydrogène.

3.10.3. Réduction des 4-mercaptoimidazoles oxydés par le glutathion.

3.10.3.1. Présentation du problème.

Afin de déterminer si le glutathion est effectivement capable de réduire les 4-mercaptoimidazoles oxydés, permettant ainsi l'existence du cycle catalytique, une expérience supplémentaire a été menée à bien.

L'évolution du spectre UV de 4-mercaptoimidazoles oxydés en présence de glutathion a, en effet, été suivie. Il a pu être constaté que l'ajout de glutathion dans une solution de 4-mercaptoimidazole oxydé entraîne une modification rapide du spectre du mélange. Celui-ci reste inchangé après deux minutes d'incubation. (Fig. 3.10.3).

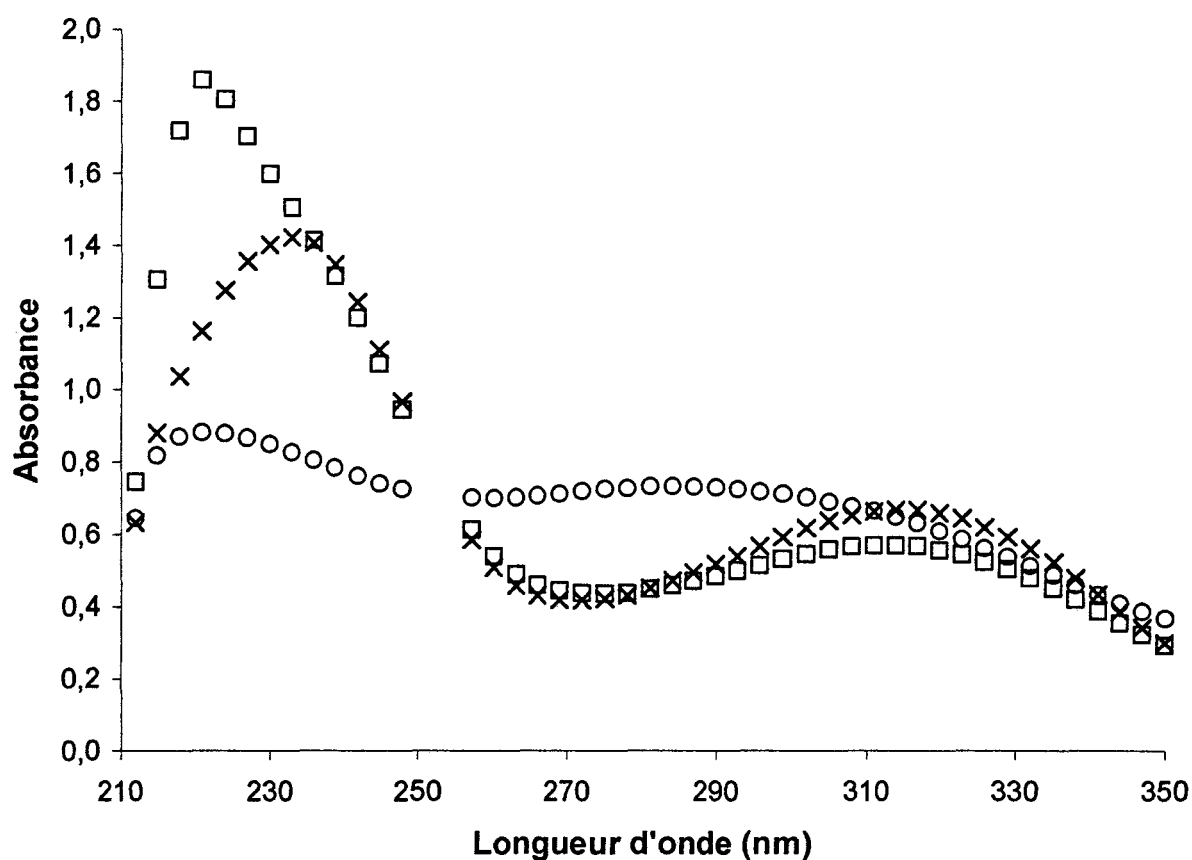


Fig. 3.10.3 : Spectre UV à 37 °C dans un tampon à pH 7.6 du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 5, sous forme oxydée (O, 50 mM), sous forme réduite (X, 100 μM), et spectre UV d'une solution de 50 μM de 5 oxydé en présence de 1 mM de glutathion (□).

On constate toutefois que la réduction des 4-mercaptoimidazoles par le glutathion n'est pas totale puisque le spectre obtenu diffère de celui du 4-mercaptoimidazole réduit dans la région 250-350 nm (région où les formes oxydée et réduite du glutathion n'absorbent pas), et ceci malgré le large excès de glutathion utilisé.

On en déduit donc que la réaction de réduction des 4-mercaptoimidazoles oxydés par le glutathion, telle qu'elle est écrite ci-dessous (Fig. 3.10.4), n'est totale ni dans un sens, ni dans l'autre, mais qu'il s'agit au contraire d'un équilibre dans les conditions utilisées. Nous verrons par la suite que cet équilibre est en fait dirigé dans le sens de la réduction du glutathion oxydé par les 4-mercaptoimidazoles réduits. En conséquence, il est nécessaire de mettre un large excès de glutathion sous forme thiol afin de réduire une fraction importante du 4-mercaptoimidazole oxydé.

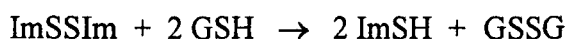


Fig. 3.10.4 : Réduction des 4-mercaptoimidazoles oxydés par le glutathion.

Afin d'évaluer la quantité de glutathion oxydé GSSG formée lors de la réduction des 4-mercaptoimidazoles oxydés, cette réaction a été couplée au système de la glutathion réductase. La quantité de NADPH consommée au cours de ce mécanisme, et qui peut être mesurée par UV, permet, comme nous allons maintenant le démontrer, de doser indirectement la quantité de 4-mercaptoimidazole qui a été réduite.

Composés	ΔDO (366 nm)	$\Delta\text{DO} / \Delta\text{DO}_{\text{GSSG}}$ (%)
3	0.4340	76
5	0.2157	38
6	0.2867	50
7	0.2861	50
9	0.1704	30
10	0.3152	55
11	0.3038	53
12	0.2919	68
13	0.4203	74

Tableau 3.10.2: Mesure de la consommation de NADPH à 20°C dans une solution contenant initialement 200 μM de 4-mercaptoimidazole oxydé et 1 mM de glutathion réduit (ΔDO), et rapport de cette consommation à celle mesurée en présence de 200 μM de glutathion oxydé ($\Delta\text{DO}_{\text{GSSG}}$). Les deux solutions contenaient initialement 280 μM de NADPH.

Un témoin a été obtenu en mesurant la consommation de NADPH en présence de glutathion oxydé (200 μ M, $\Delta\text{DO}_{\text{GSSG}}$) et de NADPH (280 μ M). Cette même variation d'absorbance a ensuite été déterminée pour un mélange de 4-mercaptoimidazole oxydé (200 μ M) et de glutathion réduit GSH (1 mM) incubé pendant 4 minutes à 20°C en présence de 280 μ M de NADPH et de 1 U de glutathion réductase (ΔDO). Les résultats sont regroupés dans le tableau 3.10.2.

La réduction des 4-mercaptoimidazoles oxydés par le glutathion a donc bien lieu dans les conditions de l'expérience de mesure de l'activité GPx-like, à savoir en présence d'un large excès de glutathion. On constate en effet que 30 à 76% des 4-mercaptoimidazoles oxydés sont réduits en présence de 5 équivalents de glutathion.

Cette dernière expérience permet en outre de calculer les potentiels d'oxydoréduction des 4-mercaptoimidazoles. En effet, pour chacune des réactions suivantes (Fig. 3.10.5):

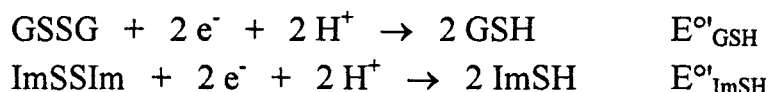


Fig. 3.10.5 : Couples rédox mis en jeu lors de la réduction d'un 4-mercaptoimidazole oxydé par le glutathion.

il est possible d'écrire la loi de Nernst, pour une température de 20°C au pH physiologique:

$$E_{\text{GSH}} = E^{\circ'}_{\text{GSH}} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \right)$$

$$E_{\text{ImSH}} = E^{\circ'}_{\text{ImSH}} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[\text{ImSH}]^2}{[\text{ImSSIm}]} \right)$$

où E_{GSH} et $E^{\circ'}_{\text{GSH}}$ sont respectivement le potentiel d'une solution de glutathion aux concentrations $[\text{GSH}]$ et $[\text{GSSG}]$, et le potentiel standard du système GSSG/GSH au pH physiologique (voir remarque suivante). De même E_{ImSH} et $E^{\circ'}_{\text{ImSH}}$ sont respectivement le potentiel d'une solution de 4-mercaptoimidazole aux concentrations $[\text{ImSH}]$ et $[\text{ImSSIm}]$, et le potentiel standard du système ImSSIm/ImSH au pH physiologique.

Remarque:

Ici, et dans la suite de cette étude, nous utilisons la nomenclature des biochimistes qui veut que pour la réaction : $\text{Ox} + n e^- + n' \text{H}^+ \rightarrow \text{Red}$

on écrive : $E = E^o - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Red]}{[Ox][H^+]^{n'}} \right) = E^{o'} - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[Red]}{[Ox]} \right)$

avec $E^{o'} = E^o - 0.06.(n/n').pH$

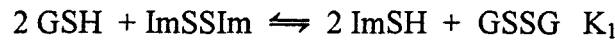
Bien entendu, lorsque les deux couples rédox sont mis en solution, on a à l'équilibre $E_{GSH} = E_{ImSH}$. D'où:

$$E_{GSH}^{o'} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[GSH]^2}{[GSSG]} \right) = E_{ImSH}^{o'} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[ImSH]^2}{[ImSSIm]} \right)$$

et donc :

$$K_1 = \frac{[ImSH]^2 [GSSG]}{[ImSSIm] [GSH]^2} = 10^{\left(\frac{E_{ImSH}^{o'} - E_{GSH}^{o'}}{0.0290} \right)}$$

où K_1 est la constante d'équilibre de la réaction :



De même, pour les réactions faisant intervenir le glutathion, GSH, et le NADPH (Fig. 3.10.6), on trouve:

$$E_{NADPH} = E_{NADPH}^{o'} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[NADPH]}{[NADP^+]} \right)$$

A l'équilibre, lorsque les deux couples rédox sont mis en solution, on a:

$$E_{GSH}^{o'} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[GSH]^2}{[GSSG]} \right) = E_{NADPH}^{o'} - \frac{0.0581}{2} \log \left(\frac{[NADPH]}{[NADP^+]} \right)$$

et donc :

$$K_2 = \frac{[GSH]^2 [NADP^+]}{[GSSG] [NADPH]} = 10^{\left(\frac{E_{GSH}^{o'} - E_{NADPH}^{o'}}{0.0290} \right)} = 573.6$$

où K_2 est la constante d'équilibre de la réaction :

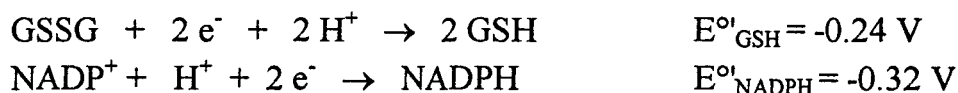


Fig. 3.10.6 : Couples rédox mis en jeu lors de la réduction du glutathion oxydé par le système glutathion réductase/NADPH.

Lorsque du glutathion réduit et du 4-mercaptoimidazole oxydé sont mis en solution en présence du système glutathion réductase/NADPH, deux équilibres s'établissent (Fig. 3.10.7):

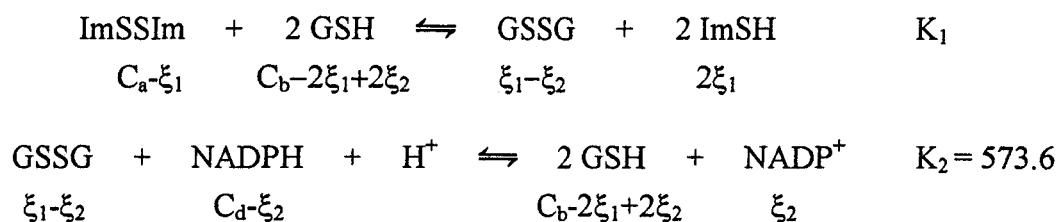


Fig. 3.10.7 : Equilibres électrochimiques s'établissant au cours de l'expérience.

Ici, C_a , C_b et C_d représentent respectivement les concentrations initiales de 4-mercaptoimidazole oxydé (200 μM), de glutathion réduit (1 mM) et de NADPH (280 μM). ξ_1 et ξ_2 représentent respectivement les avancements de la première et de la deuxième réaction.

ξ_2 est directement calculable à partir de la valeur mesurée de la densité optique (Tableau 3.10.2).

Ce système d'équations peut être très facilement résolu en remarquant que:

$$K_1 K_2 = \frac{4\xi_2 \xi_1^2}{(C_a - \xi_1)(C_d - \xi_2)} = 573.6 \frac{4\xi_1^2 (\xi_1 - \xi_2)}{(C_a - \xi_1)(C_b - 2\xi_1 + 2\xi_2)^2}$$

ξ_2 étant connu, il devient possible de calculer ξ_1 , donc K_1 et E°_{ImSH} .

3.10.3.2. Résultats

Prenons comme exemple le cas du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 5. D'après la variation d'absorbance mesurée lors de l'expérience effectuée avec ce dernier (Tableau 3.10.2), on calcule $\xi_2 = 1.52 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

On en déduit donc, par l'équation précédente, que $\xi_1 = 1.520 \cdot 10^{-5}$ mol/l, d'où l'on tire les concentrations à l'équilibre:

$$\begin{aligned} [\text{ImSH}] &= 3.04 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \\ [\text{ImSSIm}] &= 4.80 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l} \\ [\text{GSH}] &= 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} \\ [\text{GSSG}] &= 2.07 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l} \\ [\text{NADPH}] &= 1.28 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \\ [\text{NADP}^+] &= 1.52 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \end{aligned}$$

Ces concentrations permettent de calculer $K_1 = 3.99 \cdot 10^{-6}$ et l'on obtient alors le potentiel standard d'oxydo-réduction E°_5 du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole, 5 au pH physiologique :

$$E^{\circ}_5 = E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.16 \text{ V} = -0.40 \text{ V}$$

Les résultats obtenus pour les autres 4-mercaptoimidazoles sont regroupés dans le tableau 3.10.3.

Composé	Activité GPx-like ($\Delta\text{DO}/\text{min}$ à 250 μM)	E°_{ImSH}	$k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
3	0.0467	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.16 \text{ V} = -0.40 \text{ V}$	0.37 ± 0.05
5	0.0318	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.20 \text{ V} = -0.44 \text{ V}$	0.31 ± 0.04
6	0.0313	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.19 \text{ V} = -0.43 \text{ V}$	0.68 ± 0.05
7	0.0252	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.19 \text{ V} = -0.43 \text{ V}$	0.54 ± 0.04
9	0.0375	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.21 \text{ V} = -0.45 \text{ V}$	0.89 ± 0.05
10	0.0161	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.18 \text{ V} = -0.42 \text{ V}$	-
11	0.0215	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.18 \text{ V} = -0.42 \text{ V}$	0.19 ± 0.02
12	0.0347	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.16 \text{ V} = -0.40 \text{ V}$	0.13 ± 0.02
13	0.0427	$E^{\circ}_{\text{GSH}} - 0.16 \text{ V} = -0.40 \text{ V}$	0.38 ± 0.03

Tableau 3.10.3 : Activité glutathion peroxydase, potentiels standards d'oxydoréduction au pH physiologique et constantes de vitesse avec le peroxyde d'hydrogène des 4-mercaptoimidazoles.

Remarque: en généralisant aux autres molécules le fait que $\xi_1 \approx \xi_2$, comme nous l'avons démontré pour le composé 5, on obtient une méthode de résolution plus facile du système d'équations.

3.10.4. Conclusion.

On le voit donc, le potentiel standard d'oxydo-réduction des 4-mercaptoimidazoles apparaît inférieur de 0.16 à 0.21 Volts à celui du glutathion. Ceci confirme les expériences précédentes qui ont démontré que les 4-mercaptoimidazoles constituent de meilleurs réducteurs que les thiols aliphatiques (§ 3.3.2., § 3.4.1. et § 3.4.2.). Ces résultats vont aussi dans le sens de ceux de la voltammétrie cyclique qui avait montré que les 4-mercaptoimidazoles, notamment ceux substitués par des groupements électro-attracteurs en position 2 ou 5 (5, 6, 7, 9, 10, 11) possèdent un potentiel de demi-réaction d'oxydation inférieur à celui de la NAC (un thiol aliphatique aux propriétés proches de celles du glutathion, § 3.5.4.). On remarque de surcroît que les molécules substituées en position 1 ou 5 par des groupements électro-donneurs (3, 13) possèdent un potentiel standard d'oxydoréduction légèrement supérieur à ceux des molécules substituées par des groupements électro-attracteurs (à l'exception du composé 12). Ces différences de potentiel restent faibles, mais entraînent des modifications importantes, d'un composé à l'autre, de la concentration finale en 4-mercaptoimidazole réduit lors de la mise en présence du 4-mercaptoimidazole oxydé avec le système glutathion/glutathion réductase (Tableau 3.10.2).

Ces résultats diffèrent de beaucoup de ceux qui avaient été obtenus pour les ovothiols [Shapiro B.M. and Turner E., 1988; Weaver K.H. and Rabenstein D.L., 1995]. En effet, les ovothiols possèdent des potentiels d'oxydo-réduction supérieurs à ceux du glutathion de 84 à 170 mV, permettant à ce dernier de réduire les ovothiols oxydés et de favoriser l'activité glutathion peroxydase-like de ceux-ci. Cette différence de comportement pourrait s'expliquer par le fait que les 4-mercaptoimidazoles étudiés sont substitués par des groupements aromatiques, contrairement aux ovothiols.

L'équilibre existant entre le glutathion et les 4-mercaptoimidazoles est donc déplacé en faveur d'une réduction du glutathion oxydé par les 4-mercaptoimidazoles réduits ($K_1 \ll 1$). Ceci pouvait déjà être déduit du fait qu'un large excès de glutathion réduit (5 équivalents) ne permet de réduire qu'une partie des 4-mercaptoimidazoles oxydés (§ 3.10.3.1.).

Cependant, la fraction des 4-mercaptoimidazoles réduite par le système glutathion/glutathion réductase est suffisante pour obtenir une activité glutathion peroxydase-like des composés étudiés comparable à celle de l'ovothiol (Fig. 2.1.10) [Turner E. *et al.*, 1988]. Cette activité nécessite tout de même des concentrations très élevées en 4-mercaptoimidazole (de l'ordre du mM, à savoir l'ordre de grandeur de la concentration cellulaire en ovothiol dans les œufs d'oursin de mer) et reste très largement inférieure à l'activité de

l'ebiselen (§ 3.10.2.). Les vitesses de réaction relativement peu élevées des 4-mercaptoimidazoles avec le peroxyde d'hydrogène pourraient expliquer cet état de fait.

L'influence du potentiel d'oxydo-réduction des 4-mercaptoimidazoles sur leur activité glutathion peroxydase-like ne devrait toutefois pas être négligée. Comme on peut le voir dans le tableau 3.10.3, les molécules substituées par des groupements électro-donneurs (**3**, **13**), possédant de fait un potentiel d'oxydo-réduction plus élevé que les autres composés, montrent une activité glutathion peroxydase-like plus importante que celles substituées par des groupements électro-attracteurs. Cette différence de potentiel d'oxydo-réduction leur permet en effet de bénéficier d'une réduction plus importante de leur forme oxydée par le système glutathion/glutathion réductase (Tableau 3.10.2), accroissant par conséquent leur vitesse de réaction avec H_2O_2 .

Il est difficile de trouver une relation entre la structure et l'activité glutathion peroxydase-like des 4-mercaptoimidazoles. Toutefois, quelques tendances peuvent être dégagées. Ainsi, la substitution du noyau imidazole par un groupement électro-donneur en position 1 ou 5 permet d'augmenter le potentiel d'oxydo-réduction du composé accroissant ainsi l'activité GPx (composés **3** et **13**). Une substitution en position 2 par un groupement électro-attracteur diminue le potentiel d'oxydo-réduction et par conséquent l'activité GPx de la molécule (composés **5**, **6**, **7**). Cependant, une telle substitution a aussi pour effet d'augmenter la constante de vitesse de réaction avec H_2O_2 (§ 3.4.1.4.) ce qui peut compenser en partie l'effet négatif de la diminution du potentiel (composé **9**). Enfin, la substitution de la position 5 du noyau imidazole par un groupement électro-attracteur possède le double désavantage de diminuer le potentiel d'oxydo-réduction du 4-mercaptoimidazole ainsi que sa constante de vitesse avec le peroxyde d'hydrogène, aboutissant donc à une diminution de l'activité GPx de la molécule (composés **10** et **11**, et dans une moindre mesure, composé **12**. Ce dernier possède en effet un potentiel d'oxydo-réduction plus élevé que les composés **10** et **11**).

CONCLUSION

La voie de synthèse adaptée de la littérature, qui fut utilisée lors de cette étude, a permis d'obtenir une famille de 4-mercaptoimidazoles présentant une grande diversité de substitution du noyau imidazole. Mis à part la dernière étape, qui a présenté quelques difficultés, cette stratégie de synthèse a permis l'obtention des produits souhaités avec un rendement relativement élevé, en un nombre restreint d'étapes et à partir de produits de départ très simples.

Les 4-mercaptoimidazoles ont révélé une forte activité dans le domaine du piégeage des radicaux, comme l'ont prouvé les tests du sel de Fremy et du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle. Leurs propriétés sur ce terrain sont voisines, voire supérieures à celles du glutathion et d'autres thiols aliphatiques. Les molécules les plus actives s'avèrent être celles substituées par des groupements électro-attracteurs en position 2 ou 5 du noyau imidazole. Les 4-mercaptoimidazoles ont par ailleurs démontré une importante activité en tant que piègeurs de dérivés actifs naturels de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite ou le radical hydroxyle.

Les mesures de voltammétrie cyclique et de résonance paramagnétique électronique, aidées par la modélisation moléculaire, ont montré que ces mécanismes de piégeage aboutissent à la production finale d'un disulfure *via* formation d'un radical thiyle. Les calculs ont par ailleurs montré que l'électron célibataire de ce dernier est surtout délocalisé sur les positions 4 et 5 du noyau imidazole ainsi que sur l'atome de soufre, et non sur l'atome d'azote de la position 1, comme l'avaient suggéré Holler et Hopkins. Ce résultat indique que la substitution des 4-mercaptoimidazoles doit viser à améliorer la délocalisation de l'électron célibataire sur le noyau imidazole ainsi que la formation du disulfure final, et non à permettre un éventuel effet capto-datif sur l'azote de la position 1.

L'aptitude des 4-mercaptoimidazoles à complexer le cuivre a pu être démontrée par des expériences de spectrophotométrie UV, de RPE et de spectrométrie de masse. Cette propriété, associée à leur capacité à piéger les radicaux, permet d'expliquer l'activité des 4-mercaptoimidazoles en tant qu'inhibiteurs de la peroxydation lipidique induite par le cuivre.

Comme l'ont montré les tests enzymatiques réalisés, les 4-mercaptoimidazoles présentent, à l'instar des ovothiols, une activité glutathion peroxydase-like notable pour des concentrations de l'ordre du mM.

Cette étude a donc permis de démontrer les propriétés antioxydantes notables des 4-mercaptoimidazoles résultant de leur capacité à piéger les radicaux et dérivés actifs de l'oxygène, et à complexer le cuivre. Cette activité peut être modulée par substitution du noyau imidazole. Les 4-mercaptoimidazoles pourraient présenter des propriétés intéressantes en tant qu'inhibiteurs du développement de l'athérosclérose et sont actuellement étudiés pour leurs propriétés neuroprotectrices.

Bibliographie du chapitre 3

- Ayscough P.B., in "Electron Spin Resonance in Chemistry". Methuen & Co Ltd.(1967)
- Blondin G. and Frapart Y.-M., "La résonance paramagnétique électronique". *L'Act. Chim.*, **1996**, *7*, 112-124
- Bradbury J.R., Masters A.F., McDonell A.C., Brunette A.A, Bond A.M. and Wedd A.G., "Redox Properties of Thiolate Compounds of Oxomolybdenum (V) and their Tungsten and Selenium Analogues". *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 1959-1964
- Brown M.S. and Goldstein J.L., "Scavenging for Receptors", *Nature*, **1990**, *343*, 506-507
- Dearden J. C., "Partitioning and lipophilicity in Quantitative Structure-Activity Relationships". *Environmental Health Perspectives*, **1985**, *61*, 203-228
- Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F. and Stewart J.J.P., "AM1: a new general purpose quantum mechanical model". *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 3902-3909
- Dulling D.R., "Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap ESR Spectra". *J. of Mag. Res.*, Series B, **1994**, *104*, 105-110
- Dyke S.F., Tiley E.O., White W.C. and Gale D.P., " α -Aminonitriles. I. A Simple Synthesis of Deoxybenzoins". *Tetrahedron*, **1975**, *31*, 1219-1222
- Ellman G.L., "Tissue sulfhydryl groups". *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, 70-77
- Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. and Jürgens G., "The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL", *Free Radic. Biol. Med.*, **1992**, *13*, 341-390
- Esterbauer H., Striegl G., Puhl H. and Rotheneder M., "Continuous Monitoring of in vitro Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein", *Free Rad. Res. Comm.*, **1989**, *6*, 67-75
- Fernandes A.C., Filipe P.M., Freitas J.P. and Manso C.F., "Different Effects of Thiol and Nonthiol ACE Inhibitors on Copper-Induced Lipid and Protein Oxidative Modification". *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *20*, 507-514
- Finkelstein E., Rosen G.M. and Rauckman E.J., "Spin Trapping. Kinetics of the Reaction of Superoxide and Hydroxyl Radicals with Nitrones". *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 4994-4999
- Floyd R.A., Lewis C.A. and Wong P.K., "High-Pressure Liquid Chromatography-Electrochemical Detection of Oxygen Free Radicals". *Methods in Enzymology*, **1984**, *105*, 231-237

- Godfrey E.G., Stewart J., Dargie H.J., Reid J.L., Dominiczak M., Hamilton C.A. and McMurray J., "Effects of ACE Inhibitors on Oxidation of Human Low Density Lipoprotein". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, *37*, 63-66
- Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M. and Butler J., "The Antioxydant Action of N-Acetylcysteine: its Reaction with Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radical, Superoxyde, and Hypochlorous Acid". *Free Radic. Biol. Med.*, **1989**, *6*, 593-597
- Hansch C. and Leo A., "Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology". American Chemical Society Ed. (1995)
- Hansch C., Maloney P.P. and Fujita T., "Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients". *Nature*, **1962**, *194*, 178-180
- Hansch C., Telzer B.R. and Zhang L., "Comparative QSAR in Toxicology: Examples from Teratology and Cancer Chemotherapy of Aniline Mustards". *Critical Reviews in Toxicology*, **1995**, *25(1)*, 67-89
- Havel R.J., Eder H.A. and Bragdon J.H., "The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum", *J. Clin. Invest.*, **1955**, *34*, 1345-1353
- Heinecke J.W., Kawamura M., Suzuki L. and Chait A., "Oxidation of Low Density Lipoprotein by Thiols: Superoxide-Dependent and -Independent Mechanisms". *J. Lipid Res.*, **1993**, *34*, 2051-2061
- Hinchliffe A., "Computational Quantum Chemistry". Ed. John Willey and Sons Ltd. 1988
- Hirst D.M., "A computational Approach to Chemistry". Blackwell Scientific Publications, 1990.
- Holler T.P. and Hopkins P.B., "Ovothiols as Biological Antioxidants. The thiol Groups of Ovothiol and Glutathione Are Chemically Distinct". *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 4837-4838
- Holler T.P. and Hopkins P.B., "Ovothiols as Free Radical Scavengers and the Mechanism of Ovothiol-Promoted NAD(P)H-O₂ Oxidoreductase Activity". *Biochemistry*, **1990**, *29*, 1953-1961
- Howie J.K., Houts J.J., Sawyer D.T., "Oxidation-Reduction Chemistry of DL- α -Lipoic Acid, Propanedithiol, and Trimethylene Disulfide in Aprotic and in Aqueous Media". *J. Am. Chem. Soc.* (1977), *99*, 6323-6326
- Janzen E.G., "Spin Trapping". *Methods in Enzymology*, **1984**, *105*, 188-198

Johnson C.R., Myser T.K. and Shepherd R.E., "Spin-Trapping Studies of the Reduction of O₂ and H₂O₂ by Titanium(III), Iron(II), and Ruthenium(II) Complexes". *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 1089-1095

Joseph P.D., Rehorek D. and Janzen E.G., "Electron Spin Resonance Spin Trapping of Thiyl Radicals from the Decomposition of Thionitrites". *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25(16), 1685-1688

Karplus M. and Porter R.N., in "Atomes & Molecules: An Introduction for Students of Physical Chemistry". Benjamin/Cummings Publishing Company (1970)

Kissinger P.T. and Heineman W.R., "Cyclic Voltammetry", *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 702-706

Laporte W.E., Furman C., Fouquet S., Martin-Nizard F., Levastel S., Gozzo A., Lesieur D., Fruchart J.C., Duriez P. and Tessier E. "A High Concentration of Melatonin Inhibits *in vitro* LDL Peroxidation but not Oxidized LDL Toxicity Toward Cultured Endothelial Cells". *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1998**, 32, 582-592.

Leaustic A., Babonneau F. and Livage J., "Photoreactivity of WO₃ Dispersions: Spin Trapping and Electron Spin Resonance Detection of Radical Intermediates". *J. Phys. Chem.*, **1986**, 90, 4193-4198

Lodge J.K., Traber M.G. and Packer L., "Thiol Chelation of Cu²⁺ by Dihydrolipoic Acid Prevents Human Low Density Lipoprotein Peroxidation". *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 25, 287-297

Lynch S.M. and Frei B., "Physiological Thiol Compounds Exert Pro- and Anti-Oxidant Effects, Respectively, on Iron- and Copper-Dependent Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein". *Biochem. Biophys. Acta*, **1997**, 1345, 215-221

Mabbott G.A., "An Introduction to Cyclic Voltammetry". *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 697-702.

Marjanovic B., Simic M.G. and Jovanovic S.V., "Heterocyclic Thiols as Antioxidants: Why Ovothiol C is a Better Antioxidant than Ergothioneine", *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 18, 679-685

Mellors A. and Tappel A.L., "The Inhibition of Mitochondrial Peroxydation by Ubiquinone and Ubiquinol". *J. Biol. Chem.*, **1966**, 241, 4353-4356

Misik V., Mak I.T., Stafford R.E. and Weglicki W.B., "Reactions of Captopril and Epicaptopril with Transition Metal Ions and Hydroxyl Radicals: an EPR Spectroscopy Study". *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**, 15, 611-619

Moser W. and Howie R.A., "Nitrodisulfonate. I. Fremy's salt (potassium nitrodisulfonate)". *Chem. Rev.*, **1968**, 3039

Müller A., Cadenas E., Graf P. and Sies H., "A Novel Biologically Active Seleno-Organic Compound—I. Glutathione Peroxidase-Like Activity *in vitro* and Antioxidant Capacity of PZ 51 (Ebselen)". *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, 33, 3235-3239

Murib J.H. and Ritter D.M., "Decomposition of nitrodisulfonate ion - (I) Products and mechanism of color fading in acid solution". *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 3394

Peisach J. and Blumberg W.E., "Structural Implications Derived from the Analysis of Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Natural and Artificial Copper Proteins". *Arch. Biochem. Biophys.*, **1974**, 165, 691-708

Perkampus H.H., "UV-VIS Spectroscopy and its Applications". Springer Laboratory Ed. (1992)

Peterson G.A., "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry *et al.* which is Generally Applicable", *Anal. Biochem.*, **1977**, 83, 346-356

Pleiss M.A. and Unger S.H., "The Design of Test Series and the Significance of QSAR Relationships". In "Comprehensive Medicinal Chemistry", Vol. 4, Pergamon Press Ed.(1990)

Puhl H., Waeg G. and Esterbauer H., "Methods to Determine Oxidation of Low-Density Lipoproteins", *Methods in Enzymology*, **1994**, 233, 425-441

Rosen G.M. and Rauckman E.J., "Spin Trapping of Superoxyde and Hydroxyl Radicals". *Methods in Enzymology*, **1984**, 105, 198-209

Ruiz J., Pérez A. and Pouplana R., "QSAR Study of Phenols: Relation Between the Phenoxy Radical Formation and the Antiinflammatory Activity *via* an Antioxidant Mechanism". *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1996**, 15, 219-223

Simonet J, Carriou M. and Lund H., "Electrochemically Induced Homogeneous Electron Transfer to Aromatic Disulfides". *Liebigs Ann. Chem.*, **1981**, 1665-1673

So S.-S. and Karplus M. "Evolutionary Optimization in Quantitative Structure-Activity Relationship: an Application of Genetic Neural Networks". *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1521-1530

So S.-S. and Karplus M., "Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship from Molecular Similarity Matrices and Genetic Neural Networks. I. Method and Validations". *J. Med. Chem.*, **1997a**, 40, 4347-4359

So S.-S. and Karplus M., "Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship from Molecular Similarity Matrices and Genetic Neural Networks. 2. Applications". *J. Med. Chem.*, **1997b**, 40, 4360-4371

Steinbrecher U.P., Parthasaraty S., Leake D.S., Witztul J.L. and Steinberg D., "Modification of Low Density Lipoprotein by Endothelial Cells Involves Lipid Peroxidation and Degradation of Low Density Lipoprotein Phospholipids", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 3883-3887

Stute M.S., "History and Objectives of Quantitative Drug Design". In "Comprehensive Medicinal Chemistry", Vol. 4, Pergamon Press (1990)

Tallec A., "Electrochimie organique". Masson Ed. (1993)

Taylor R., "Structure-Activity Correlation". In "Chemical Structure Systems. Computational Techniques for Representation, Searching and Processing of Structural Information", Ellis Horwood ed. (1991)

Turner E., Hager L.J. and Shapiro B.M., "Ovothiol Replaces Glutathione Peroxidase as a Hydrogen Peroxide Scavenger in Sea Urchin Eggs". *Science*, **1988**, 242, 939-941

Zieden B., Wuttge D.M., Karlberg B.E. and Olsson A.G., "Effects of *in vitro* Addition of Captopril on Copper-Induced Low Density Lipoprotein Oxidation". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1995**, 89, 201-203

Zimmer H., Lankin D.C. and Horgan S.W., "Oxidations with Potassium Nitrodisulfonate (Fremy's Radical). The Teuber Reaction". *Chem. Rev.*, **1971**, 71, 229-246

Zoete V., Bailly F., Maglia F., Rougée M. and Bensasson R.V., "Molecular Orbital Theory Applied to the Study of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Efficiency", *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 27, in press

4. MODES OPERATOIRES DES SYNTHESSES.

Quatorze 4-mercaptoimidazoles ont été obtenus en utilisant la voie de synthèse explicitée au paragraphe 2.3.3. Le tableau suivant regroupe la numérotation et la nomenclature de ces composés.

Numérotation	Molécule
1	1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole
2	1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole
3	1-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole
4	1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole
5	1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole
6	1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole
7	1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole
8	1-méthyl-2-(2-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole
9	1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole
10	1-méthyl-5-(2-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole
11	1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole
12	1-méthyl-5-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole
13	1-méthyl-5-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole
14	1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole

Tableau 4.1 : Numérotation et nomenclature des 4-mercaptoimidazoles synthétisés.

Les différents intermédiaires de synthèse sont numérotés dans leur ordre d'obtention, à partir du numéro du 4-mercaptoimidazole final ajouté d'une lettre. Par exemple, pour le 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole, noté 1, les intermédiaires seront numérotés, 1a, 1b et 1c, respectivement pour les cyanométhylamines, cyanométhylamides et thioacétamides.

4.1. Général.

Les réactifs de départ proviennent tous d'Aldrich®.

Les chromatographies sur couche mince ont été menées à bien en utilisant des plaques recouvertes de gel de silice 60F-254 de Merck® (porosité de 0.25 mm). Les taches

correspondant aux produits des réactions ont été visualisées à l'aide de lumière UV de 254 nm de longueur d'onde et par exposition à de la vapeur d'iode.

Les colonnes de chromatographie ont été réalisées avec de la silice SI 60 (référence 11567 Merck®), de granulométrie 0.04-0.063 mm pour les chromatographies flash et 0.07-0.230 mm pour les chromatographies simples.

Les spectres IR ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre 1310 de Perkin Elmer® en utilisant des pastilles de KBr anhydre.

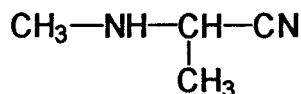
Les spectres de masse ont été déterminés à l'aide du spectromètre Ribermag® R10-10 (EI) avec une énergie cinétique de 70 eV, ou à l'aide du spectromètre Finnigan® MAT Vision 2000 (MALDI-TOF). Les spectres de masse à haute résolution ont été obtenus à l'aide d'un Kratos MS 80.

Les spectres de RMN ont été réalisés à l'aide du Brüker® AM 300 WB (300 Mhz). Les déplacements chimiques sont donnés en δ /ppm par rapport au tétraméthylsilane, utilisé comme référence. Les constantes de couplage sont données en Hz.

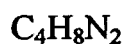
Les mesures de spectrophotométrie UV ont été obtenues à l'aide du spectromètre UVIKON® 932.

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le centre de microanalyse du CNRS.

4.2. Synthèse du 1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole.

(±) 2-(méthylamino)propionitrile 1a.

De l'acétaldéhyde (3.4 ml; 61 mmol) est ajouté goutte à goutte à 20 ml d'une solution aqueuse de cyanure de sodium (2.94 g; 59.9 mmol) et du chlorhydrate de méthylamine (4.05 g; 59.9 mmol) à 0°C. La solution est agitée pendant 3 heures à 0°C puis pendant 30 minutes à température ambiante. Après extraction à l'aide de dichlorométhane, séchage sur Na₂SO₄ et concentration *in vacuo* de la phase organique, le 2-(méthylamino)propionitrile 1a est obtenu sous forme d'une huile jaune (4.53 g; 90% de rendement).

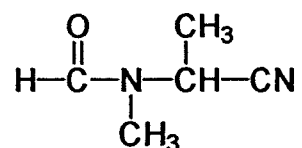


PM=84.128 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.47Spectre de masse à haute résolution :Mesuré : M⁺, 84.0683. Calculé à partir de la formule brute : M, 84.0687RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 1.2 (1H, br, s, NH), 1.42 (3H, d, J=7.0 Hz, CH₃-CH), 2.43 (3H, s, CH₃-NH) et 3.4 (1H, q, J=7.0 Hz, CH)

IR :ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3340, 3000-2800, 2230, 1450 et 1140

(±) N-(1-cyanoéthyl)-N-méthylformamide 1b.

De l'anhydride acétique (5.0 ml; 53.0 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (9.9 ml; 260 mmol) à 0°C. La solution est agitée 10 minutes à 0°C puis 1 heure à température ambiante. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 1a (1.10 g; 13.1 mmol) dans CH₂Cl₂ (10 ml) à 0°C. L'agitation est arrêtée lorsque la CCM indique la fin de la réaction (environ 1 heure). Après plusieurs lavages à l'aide de NaOH 1N et d'eau, séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le cyanoamide 1b sous forme d'une huile brune (1.08 g; 74% de rendement).

C₅H₈N₂O

PM=112.138 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.60

Spectre de masse à haute résolution :

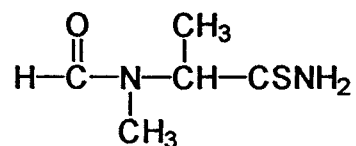
Mesuré : M⁺, 112.0648. Calculé à partir de la formule brute : M, 112.0637

RMN ¹H (D₂O) :

δ 1.25, 1.40 (3H, 2d, ratio 2:1, J=7.0 Hz, CH₃-CH), 2.68, 2.80 (3H, 2s, ratio 1:2, CH₃-NH), 4.57, 5.22 (1H, 2q, ratio 1:2, J=7.0 Hz, CH) et 7.72, 7.88 (1H, 2s, ratio 2:1, HCO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3160-2840, 2260 et 1680

(±) 2-(N-formyl-N-méthylamino)-2-méthylthioacétamide 1c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile 1b (2.32 g; 20.7 mmol) et de triéthylamine (29 ml; 210 mmol) dans l'éthanol (20 ml) jusqu'à ce que la CCM indique l'absence de nitrile (environ 20 min). Après évaporation du solvant *in vacuo*, le thioacétamide 1c est obtenu sous forme d'un solide brun foncé (2.57 g; 85% de rendement).

C₅H₁₀N₂OS

PM=146.214 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.30

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 146.0515. Calculé à partir de la formule brute : M, 146.0514

Spectre de masse :

m/z (EI) 146 (M⁺, 68), 86 (87) et 58 (100)

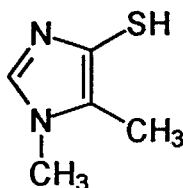
RMN ¹H (D₂O) :

δ 1.53, 1.63 (3H, 2d, ratio 1:1.5, J=7.2 Hz, CH₃-CH), 2.79, 3.05 (3H, 2s, ratio 1.5:1, N-CH₃), 4.56, 4.98 (1H, 2q, ratio 1.5:1, CH) et 8.07, 8.21 (1H, 2s, ratio 1:1.5, HCO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3400-3200, 1660 et 1225

Point de fusion : 80-82 °C

1,5-diméthyl-4-mercaptoimidazole 1.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (12.2 g; 54.8 mmol) est ajouté goutte à goutte pendant 30 minutes à une solution de thioamide 1c (2.00 g; 13.7 mmol) et de triéthylamine (11.5 ml; 83 mmol) dans CH_2Cl_2 (140 ml) à une température comprise entre -5°C et -10°C , sous argon. Après 2 heures de réaction, à une température allant de 0°C à -5°C , la solution est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et, après évaporation du solvant *in vacuo*, le résidu est soumis à une chromatographie flash dans le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2. On obtient alors l'imidazole 1 sous forme d'une huile jaune (0.79 g; 45% de rendement).

$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$

PM=128.199 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 8:2) = 0.54$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 46.9 %, H 6.3%, N 21.8% et S 25.1%. Calculé à partir de la formule brute :
C 46.8 %, H 6.3%, N 21.8% et S 25.0%

Spectre de masse :

m/z (EI) 128 (M^+ , 100), 100 (15), 68 (18), 56 (91) et 42 (22)

RMN ^1H (CDCl_3):

δ 2.31 (3H, s, N- CH_3), 3.68 (3H, s, CH_3 -C) et 8.45 (1H, s, CH-2)

IR :

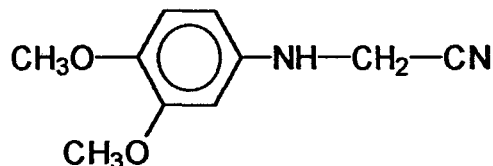
$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3120, 1260, 1150 et 1030

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 196 et 264

4.3. Synthèse du 1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.

2-(3,4-diméthoxyphénylamino)acétonitrile 2a.



Une solution de formaldéhyde à 37% (2.4 ml; 32 mmol) est ajoutée à une solution de 3,4-diméthoxyaniline (5.00 g; 32.0 mmol) dans du méthanol (40 ml) et de cyanure de sodium (1.57 g; 32.0 mmol) dans de l'eau (20 ml) à 0°C en présence de 1 équivalent d'acide chlorhydrique (5.4 ml d'une solution 6N). La solution est agitée pendant 3 heures à 0°C puis toute une nuit à température ambiante. La phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂. La phase organique ainsi obtenue est séchée sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé *in vacuo* pour donner l'acétonitrile 2a sous forme d'un solide brun (5.9 g; 96% de rendement).

C₁₀H₁₂N₂O₂

PM=192.224 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.47

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 192.0899. Calculé à partir de la formule brute : M, 192.0899

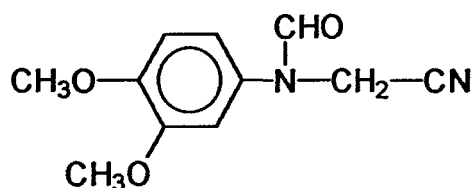
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.60 (1H, s, NH), 3.81 (6H, 2s, 2 -OCH₃), 3.98, 4.07 (2H, 2s, CH₂), 6.23-6.31 (2H, m, 2H Ar) et 6.70 et 6.79 (1H, 2s, 1H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3300, 3080-2800, 2240, 1620, 1500, 1450 et 1230

Point de fusion : 110 °C

N-(cyanométhyl)-N-(3,4-diméthoxyphényl)formamide 2b.

De l'anhydride acétique (1.0 ml; 11 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (2.3 ml; 61 mmol) à 0°C. La solution est agitée 10 minutes à 0°C puis 1 heure à température ambiante. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 2a (0.470 g; 2.45 mmol) dans CH₂Cl₂ à 0°C. Après une heure d'agitation à 0°C, la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂. La phase organique est alors lavée à deux reprises avec de la soude 1N et encore une fois avec de l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le cyanoamide 2b sous forme d'un solide brun (0.466 g; 86% de rendement).

C₁₁H₁₂N₂O₃

PM=220.234 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.80

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 220.0844. Calculé à partir de la formule brute : M, 220.0848

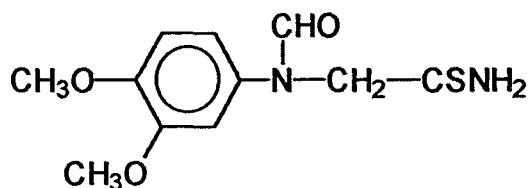
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.90 (6H, 1s, 2 -OCH₃), 4.59 (2H, s, CH₂), 6.59-6.92 (3H, m, 3H Ar) et 8.29 (1H, s, HCO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3100-2810, 2240 et 1680

Point de fusion : 100-102 °C

2-(N-formyl-N-(3,4-diméthoxyphénylamino))thioacétamide 2c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller pendant 1h15 dans une solution du nitrile 2b (0.452 g; 2.05 mmol) et de triéthylamine (2.9 ml; 21 mmol) dans de l'éthanol (25 ml). Après évaporation du solvant *in vacuo*, l'huile est reprise dans CHCl_3 et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na_2SO_4 puis évaporation *in vacuo* du solvant, le thioacétamide 2c est obtenu par cristallisation dans dans le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 sous forme d'un solide brun (2.57 g; 82% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

PM=254.310 g/mol

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) = 0.40

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M^+ , 254.0731. Calculé à partir de la formule brute : M, 254.0725

Spectre de masse :

m/z (EI) 254 (M^+ , 30), 191 (33), 160 (35), 129 (39), 83 (100) et 64 (70)

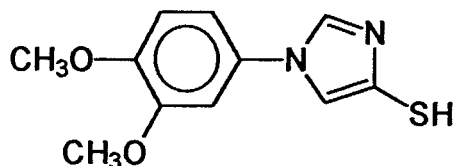
RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 3.89 (6H, s, 2 $-\text{OCH}_3$), 4.74 (2H, s, NCH_2), 6.67-6.96 (3H, m, 3H Ar), 7.60 (1H, br s, CSNH_2), 8.24 (1H, s, CSNH_2) et 8.47 (1H, s, HCO)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3340, 3150, 1635, 1510 et 1360

Point de fusion : 142 °C

1-(3,4-diméthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole 2.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (2.45 g; 11.0 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 2c (0.700 g; 2.76 mmol) et de triéthylamine (2.3 ml; 17 mmol) dans CH_2Cl_2 (28 ml) à -10°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée, la solution est lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et, après évaporation du solvant *in vacuo*, le résidu est soumis à une chromatographie flash dans le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5. Une recristallisation ultérieure dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 97:3 conduit à l'imidazole 2, qui se présente sous la forme d'un solide brun clair (0.168 g; 22% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

PM=236.295 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.37$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 55.9%, H 5.2%, N 11.8% et S 13.4%. Calculé à partir de la formule brute : C 55.9 %, H 5.1%, N 11.9% et S 13.6%

Spectre de masse :

m/z (EI) 236 (M^+ , 100), 208 (13), 164 (22), 79 (12) et 51 (15)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 1.95 (1H, br s, SH), 3.90, 3.95 (6H, 2s, 2- OCH_3), 6.80-6.95 (3H, m, 3H Ar), 7.47 (1H, s, CH-2) et 7.75 (1H, s, CH-5)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3100, 3000-2820 , 1600 et 1500

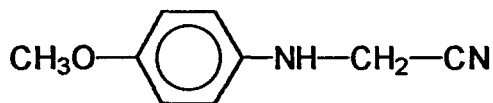
UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 199 et 244

Point de fusion : 148-150 $^\circ\text{C}$

4.4. Synthèse du 1-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.

2-(4-méthoxyphénylamino)acétonitrile 3a.

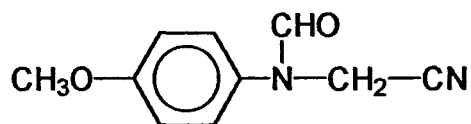


Une solution de formaldéhyde à 37% (3.0 ml; 40 mmol) est ajoutée à une solution de 4-méthoxyaniline (5.00 g; 40.6 mmol) dans du méthanol (30 ml) et de cyanure de sodium (2.39 g; 48.7 mmol) dans de l'eau (10 ml), à 0°C en présence de 1 équivalent d'acide chlorhydrique (6.8 ml d'une solution 6N). La solution est agitée pendant 3 heures à 0°C puis 3 jours à température ambiante. La solution est ensuite extraite avec CHCl_3 , puis la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant est alors évaporé *in vacuo* et le résidu est purifié par chromatographie pour donner l'acétonitrile 3a sous forme d'un solide brun (4.02 g; 61% de rendement).

 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$

PM=162.198 g/mol

 $R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.65$ Spectre de masse à haute résolution :Mesuré : M^+ , 162.0797. Calculé à partir de la formule brute : M, 162.0793RMN ^1H (CDCl_3) : δ 3.69 (1H, t, $J=7.2$ Hz, NH), 3.75 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.05 (2H, d, $J=7.2$ Hz, CH_2), 6.67 (2H, d, $J=4.3$ Hz, 2H Ar) et 6.85 (2H, d, $J=4.3$ Hz, 2H Ar)IR : $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3360, 3080-2810, 2250, 1600, 1510 et 1250Point de fusion : 72 °C

N-(cyanométhyl)-N-(4-méthoxyphényl)formamide 3b.

De l'anhydride acétique (3.2 ml; 34 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (7.8 ml; 210 mmol) à 0°C. La solution est agitée 10 minutes à 0°C puis 1 heure à température ambiante. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 3a (1.34 g; 8.27 mmol) dans CH₂Cl₂ à 0°C. La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CHCl₃/MeOH 95:5. Après 2 heures d'agitation à 0°C, la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂. La phase organique est alors lavée à deux reprises avec de la soude 1N et encore une fois avec de l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le cyanoamide 3b sous forme d'une huile brune (1.310 g; 83% de rendement).

C₁₀H₁₀N₂O₂

PM=190.208 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.80

Spectre de masse à haute résolution :

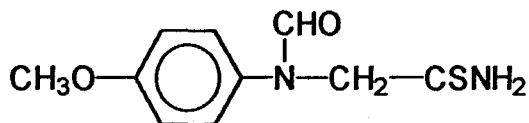
Mesuré : M⁺, 190.0744. Calculé à partir de la formule brute : M, 190.0742

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.80 (3H, s, -OCH₃), 4.60 (2H, s, NCH₂), 6.95 (2H, d, J=9 Hz, 2H Ar), 7.15 (2H, d, J=9 Hz, 2H Ar) et 8.25 (1H, s, HCO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3140-2800, 2250 et 1680

2-(N-formyl-N-(4-méthoxyphénylamino))thioacétamide 3c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile 3b (1.31 g; 68.9 mmol) et de triéthylamine (9.5 ml; 68 mmol) dans l'éthanol (30 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl_3 et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na_2SO_4 , évaporation *in vacuo* du solvant, et chromatographie avec le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5, le thioacétamide 3c est obtenu sous forme d'un solide brun (0.927 g; 60% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

PM=224.284 g/mol

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) = 0.40

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M^+ , 224.0622. Calculé à partir de la formule brute : M, 224.0619

Spectre de masse :

m/z (EI) 224 (M^+ , 40), 161 (35) et 130 (100)

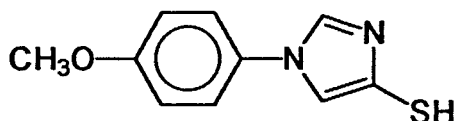
RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 3.80 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.75 (2H, s, NCH_2), 6.95 (2H, d, $J=9.0$ Hz, 2H Ar), 7.15 (2H, d, $J=9.0$ Hz, 2H Ar), 7.55 (1H, br s, CSNH_2), 8.05 (1H, br s, CSNH_2) et 8.45 (1H, s, HCO)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3320, 3170, 1640, 1510 et 1450

Point de fusion : 104 °C

1-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole 3.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (1.78 g; 80.0 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 3c (0.449 g; 2.00 mmol) et de triéthylamine (1.7 ml; 12 mmol) dans CH_2Cl_2 (20 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée le dichlorométhane est évaporé *in vacuo*. L'ajout d'acétate d'éthyle dans l'huile ainsi obtenue provoque la précipitation de l'imidazole 3 sous la forme d'un solide beige (0.161 g; 39% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$

PM=206.269 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.46$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 58.3%, H 4.8%, N 13.7% et S 15.6%. Calculé à partir de la formule brute : C 58.2 %, H 4.9%, N 13.6% et S 15.6%

Spectre de masse :

m/z (EI) 206 (M^+ , 93), 179 (10), 134 (51), 77 (36) et 64 (100)

RMN ^1H ($^2\text{H}_6$ -DMSO) :

δ 3.05 (1H, br s, SH), 3.70 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 7.07 (2H, d, $J=8.8$ Hz, 2H Ar), 7.69 (2H, d, $J=8.8$ Hz, 2H Ar), 8.15 (1H, s, CH-2) et 8.75 (1H, s, CH-5)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3110, 2980-2830, 1605 et 1510

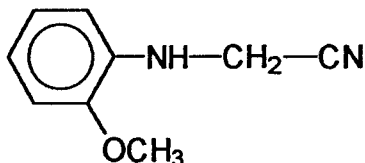
UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 198 et 246

Point de fusion : 144-145 $^\circ\text{C}$

4.5. Synthèse du 1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.

2-(2-méthoxyphénylamino)acétonitrile 4a.

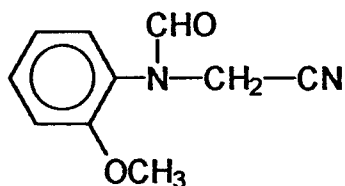


Une solution de formaldéhyde à 37% (3.0 ml; 40.0 mmol) est ajoutée à une solution de 2-méthoxyaniline (5.00 g; 40.6 mmol) dans du méthanol (15 ml) et de cyanure de sodium (1.99 g; 40.6 mmol) dans de l'eau (10 ml) à 0°C, en présence de 1 équivalent d'acide chlorhydrique (6.8 ml d'une solution 6N). La solution est agitée pendant 1 heures à 0°C puis 1.5 jours à température ambiante. La phase aqueuse est extraite avec CHCl_3 , puis la phase organique est séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant est alors évaporé *in vacuo* et le résidu est purifié par chromatographie pour donner l'acétonitrile 4a sous forme d'un solide rose (6.18 g; 94% de rendement).

 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$

PM=162.198 g/mol

 $R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.79$ Spectre de masse à haute résolution :Mesuré : M^+ , 162.0790. Calculé à partir de la formule brute : M, 162.0793RMN ^1H (CDCl_3) : δ 3.75 (3H, s, - OCH_3), 4.10 (2H, d, $J=7.0$ Hz, CH_2), 4.55 (1H, t, $J=7.0$ Hz, NH) et 6.68-6.98 (4H, m, 4H Ar)IR : $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3400, 3080-2840, 2240, 1600, 1510 et 1220Point de fusion : 68 °C

N-(cyanométhyl)-N-(2-méthoxyphényl)formamide 4b.

De l'anhydride acétique (14.5 ml; 150 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (36 ml; 960 mmol) à 0°C. La solution est agitée 10 min à 0°C puis une heure à température ambiante. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine **4a** (6.2 g; 38.0 mmol) dans CH₂Cl₂ à 0°C. La réaction est suivie par CCM en utilisant CH₂Cl₂ comme éluant. Après 3 heures d'agitation à 0°C et une journée à température ambiante, la solution est extraite avec CH₂Cl₂. La phase organique est alors lavée à deux reprises avec de la soude 1N et encore une fois avec de l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le cyanoamide **4b** sous forme d'une huile rose qui se solidifie après repos (5.06 g; 70% de rendement).

C₁₀H₁₀N₂O₂

PM=190.208 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.69

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 190.0747. Calculé à partir de la formule brute : M, 190.0742

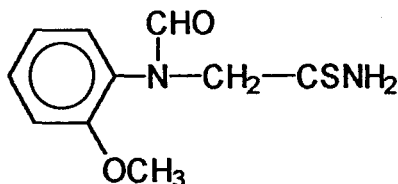
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.88 (3H, s, -OCH₃), 4.57 (2H, s, NCH₂), 7.05 (2H, m, 2H Ar), 7.18 (1H, m, 1H Ar), 7.40 (1H, m, 1H Ar) et 8.15 (1H, s, HCO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3120-2840, 2250 et 1685

Point de fusion : 62-64 °C

2-(N-formyl-N-(2-méthoxyphénylamino))thioacétamide 4c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **4b** (4.376 g; 23.0 mmol) et de triéthylamine (32 ml; 230 mmol) dans l'éthanol (80 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5. Lorsque la réaction est totale (20 minutes), le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl_3 et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na_2SO_4 , évaporation *in vacuo* du solvant, puis chromatographie à l'aide du système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5, le thioacétamide **4c** est obtenu sous forme d'un solide brun (5.09 g; 94% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

PM=224.284 g/mol

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) = 0.48

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M^+ , 224.0614. Calculé à partir de la formule brute : M, 224.0619

Spectre de masse :

m/z (EI) 224 (M^+ , 61), 161 (45) et 130 (100)

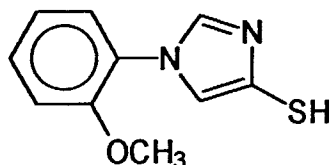
RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 3.87 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.75 (2H, s, NCH_2), 7.00-7.40 (4H, m, 4H Ar), 7.55 (1H, br s, CSNH_2), 8.20 (1H, s, HCO) et 8.27 (1H, br s, CSNH_2)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3340, 3150, 1680, 1500 et 1350

Point de fusion : 152-154 °C

1-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole 4.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (3.97 g; 17.8 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 4c (1.00 g; 4.46 mmol) et de triéthylamine (3.8 ml; 27 mmol) dans CH_2Cl_2 (44 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée (5 heures) le dichlorométhane est évaporé *in vacuo*. L'ajout d'acétate d'éthyle dans l'huile ainsi obtenue entraîne la précipitation à l'imidazole 4 sous la forme d'un solide beige (0.230 g; 25% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$

PM=206.269 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.65$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 58.3%, H 4.8%, N 13.5% et S 15.5%. Calculé à partir de la formule brute : C 58.2 %, H 4.9%, N 13.6% et S 15.6%

Spectre de masse :

m/z (EI) 206 (M^+ , 100), et 134 (65)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.10 (1H, s, SH), 3.75 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 6.90-7.34 (4H, m, 4H Ar), 7.35 (1H, s, CH-2) et 7.75 (1H, s, CH-5)

IR :

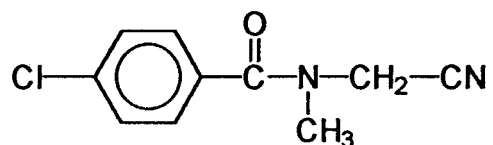
$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3100, 3030-2840, 1600 et 1515

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 197 et 215

Point de fusion : 137-138 $^\circ\text{C}$

4.6. Synthèse du 1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.

N-(cyanométhyl)-N-méthyl-4-chlorobenzamide 5b.

Du chlorure de 4-chlorobenzoyl (10.0 g; 56.3 mmol) et de la triéthylamine (8.0 ml; 58 mmol) dans du dichlorométhane (50 ml) sont ajoutés goutte à goutte, à 0°C, à une solution de chlorhydrate de (méthylamino)acétonitrile (6.08 g; 56.3 mmol) et de triéthylamine (8.0 ml; 58 mmol) dans du dichlorométhane (50 ml). Après une agitation de 2 heures à 0°C et de 2 autres heures à température ambiante, la solution est lavée successivement avec de l'acide chlorhydrique 0.1N, de la soude 0.1N et de l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄ et concentrée *in vacuo* pour donner le benzamide 5a sous forme d'un solide blanc (10.1 g; 92% de rendement).

C₁₀H₉ClN₂O

PM=208.651 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.90

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 208.0405. Calculé à partir de la formule brute : M, 208.0403

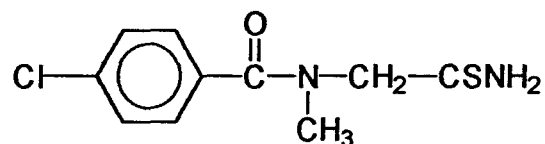
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.09 (3H, s, NCH₃), 4.38 (2H, br s, CH₂) et 7.38 (4H, m, 4H Ar).

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3140-2840, 2240 et 1640

Point de fusion : 49 °C. Littérature 42-44°C [Takahashi K., Masuda T., Ogura K. and Iida H., *Synthesis*, 1983, 12, 1043]

2-(N-(4-chlorobenzoyl)-N-méthylamino)thioacétamide 5c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **5b** (4.002 g; 19.2 mmol) et de triéthylamine (27 ml; 190 mmol) dans du méthanol (80 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, le thioacétamide **5c** est obtenu sous forme d'un solide blanc (4.19 g; 90% de rendement).

C₁₀H₁₁ClN₂OS

PM=242.727 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.36

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 242.0281. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0280

Spectre de masse :

m/z (EI) 242 (M⁺, 100), 208 (98), 182 (99), 168 (42), 156 (34), 141 (74), 111 (81), 103 (53), 87 (50), 75 (87) et 42 (90)

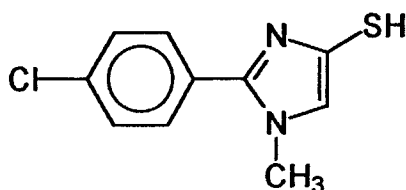
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.10 (3H, s, NCH₃), 4.50 (2H, s, NCH₂), 7.41 (4H, s, 4H Ar), 7.70 (1H, s, CSNH₂) et 8.47 (1H, s, CSNH₂)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3340, 3290, 3190, 1600, 1490 et 1405

Point de fusion : 146-148 °C

1-méthyl-2-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 5.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (3.66 g; 16.5 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 5c (1.00 g; 4.12 mmol) et de triéthylamine (3.5 ml; 25 mmol) dans CH_2Cl_2 (41 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée (2 heures à 0°C puis 5 heures à température ambiante) le dichlorométhane est évaporé *in vacuo*. Une chromatographie flash dans le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 conduit à l'imidazole 5 sous la forme d'un solide orange (0.324 g; 35% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$

PM=224.712 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.60$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 53.3%, H 4.1%, N 12.5% et S 14.3%. Calculé à partir de la formule brute : C 53.5 %, H 4.0%, N 12.5% et S 14.3%

Spectre de masse :

m/z (EI) 224 (M^+ , 100), 86 (98) et 42 (95)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.03 (1H, br s, SH), 3.69 (3H, s, CH_3), 7.12 (1H, s, CH-5), 7.30-7.39 (2H, d, $J=7.5$ Hz, 2H Ar) et 7.45-7.52 (2H, d, $J=7.5$ Hz, 2H Ar)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3100, 2920, 2820, 2690, 1605 et 1495

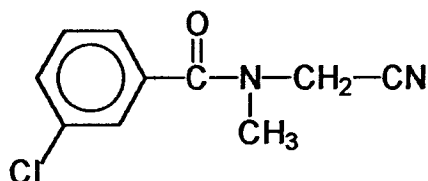
UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 195 et 258

Point de fusion : 196-198 $^\circ\text{C}$

4.7. Synthèse du 1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.

N-(cyanométhyl)-N-méthyl-3-chlorobenzamide 6b.



Du chlorure de 2-chlorobenzoyl (5.00 g; 28.2 mmol) et de la triéthylamine (4.0 ml; 29 mmol) dans du dichlorométhane (25 ml) sont ajoutés goutte à goutte, à 0°C, à une solution de chlorhydrate de (méthylamino)acétonitrile (3.04 g; 28.2 mmol) et de triéthylamine (4.0 ml; 29 mmol) dans du dichlorométhane (25 ml). L'avancement est suivi par CCM grâce au système CHCl₃/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est terminée, la solution est lavée successivement avec de l'acide chlorhydrique 1N, de la soude 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄ puis concentrée *in vacuo* pour donner le benzamide 6b sous forme d'un solide blanc (5.43 g; 91% de rendement).

C₁₀H₉ClN₂O

PM=208.651 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.40

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 208.0407. Calculé à partir de la formule brute : M, 208.0403

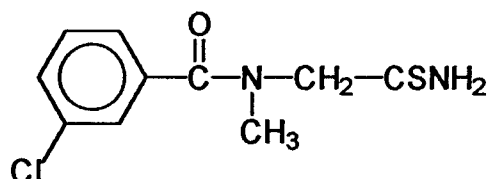
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.19 (3H, s, NCH₃), 4.43 (2H, s, NCH₂) et 7.29-7.48 (4H, m, 4H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3120-2820, 2250 et 1650

Point de fusion : 54 °C

2-(N-(3-chlorobenzoyl)-N-méthylamino)thioacétamide 6c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile 6b (5.31 g; 25.0 mmol) et de triéthylamine (35 ml; 250 mmol) dans du méthanol (100 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis recristallisation dans le système CHCl₃/MeOH 95:5, le thioacétamide 6c est obtenu sous forme d'un solide brun (5.46 g; 90% de rendement).

C₁₀H₁₁ClN₂OS

PM=242.727 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.52

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 242.0285. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0280

Spectre de masse :

m/z (EI) 242 (M⁺, 100), 208 (98), 182 (99), 168 (42), 156 (34), 141 (74), 111 (81), 103 (53), 87 (50), 75 (87) et 42 (90)

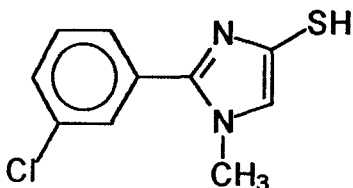
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.12 (3H, s, NCH₃), 4.50 (2H, s, NCH₂), 7.30-7.48 (4H, m, 4H Ar), 7.53 (1H, br s, CSNH₂) et 8.48 (1H, br s, CSNH₂)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3360, 3300, 3180, 1610 et 1420

Point de fusion : 109 °C

1-méthyl-2-(3-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 6.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (3.90 g; 17.5 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 6c (1.00 g; 4.38 mmol) et de triéthylamine (3.7 ml; 27 mmol) dans CH_2Cl_2 (44 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée, le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*, en veillant à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors reprise dans CH_2Cl_2 , la solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo*, en veillant à nouveau à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'ajout d'acétate d'éthyle provoque la précipitation de l'imidazole 6 pur sous la forme d'un solide beige (0.369 g; 40% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$

PM=224.712 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.58$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 53.2%, H 4.2%, N 12.4% et S 14.1%. Calculé à partir de la formule brute :
C 53.5 %, H 4.0%, N 12.5% et S 14.3%

Spectre de masse :

m/z (MALDI-TOF) 225 (M^+ , 45)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 1.91 (1H, br s, SH), 3.73 (3H, s, CH_3), 7.13 (1H, s, CH-5) et 7.29-7.50 (4H, m, 4H Ar)

IR :

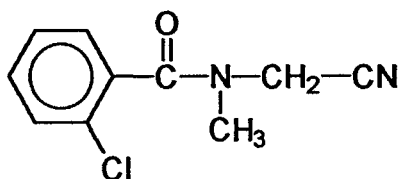
$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3120, 2900, 2800, 2690, 1592 et 1490

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 198 et 276

Point de fusion : 182-184 $^\circ\text{C}$

4.8. Synthèse du 1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.

N-(cyanométhyl)-N-méthyl-2-chlorobenzamide 7b.

Du chlorure de 2-chlorobenzoyl (5.00 g; 28 mmol) et de la triéthylamine (4.0 ml; 29 mmol) dans du dichlorométhane (25 ml) sont ajoutés goutte à goutte, à 0°C, à une solution de chlorhydrate de (méthylamino)acétonitrile (3.04 g; 28.2 mmol) et de triéthylamine (4.0 ml; 29 mmol) dans du dichlorométhane (25 ml). L'avancement est suivi par CCM grâce au système CHCl₃/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est terminée, la solution est lavée successivement avec de l'acide chlorhydrique 1N, de la soude 0.1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄ et concentrée *in vacuo* pour donner le benzamide 7b sous forme d'une huile jaune (5.54 g; 93% de rendement).

C₁₀H₉ClN₂O

PM=208.651 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.57

Spectre de masse à haute résolution :

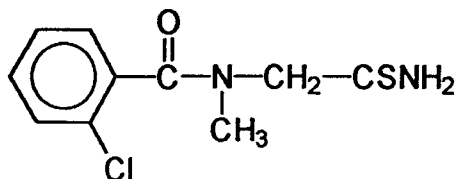
Mesuré : M⁺, 208.0404. Calculé à partir de la formule brute : M, 208.0403

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.95, 3.19 (3H, 2s, ratio 4:1, NCH₃), 4.05, 4.52 (2H, 2s, ratio 1:4, NCH₂) et 7.25-7.45 (4H, m, 4H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3140-2810, 2230 et 1650

2-(N-(2-chlorobenzoyl)-N-méthylamino)thioacétamide 7c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **7b** (4.498 g; 21.6 mmol) et de triéthylamine (30 ml; 220 mmol) dans du méthanol (80 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, le thioacétamide **7c** est obtenu sous forme d'un solide brun (4.96 g; 95% de rendement).

C₁₀H₁₁ClN₂OS

PM=242.727 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.52

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 242.0277. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0280

Spectre de masse :

m/z (EI) 242 (M⁺, 100), 208 (95), 156 (42), 141 (82), 103 (60), 75 (90) et 42 (85)

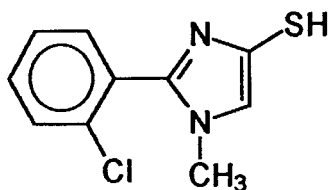
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 3.00 (3H, s, NCH₃), 4.30-4.75 (2H, m, NCH₂), 7.30-7.45 (4H, m, 4H Ar), 7.55 (1H, br s, CSNH₂) et 8.15 (1H, br s, CSNH₂)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3280, 3120, 1615, 1450 et 1400

Point de fusion : 115-117 °C

1-méthyl-2-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 7.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (3.90 g; 17.5 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 7c (1.00 g; 43.8 mmol) et de triéthylamine (3.7 ml; 27 mmol) dans CH_2Cl_2 (44 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée (3H30 à -5°C) le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*. L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors reprise dans CH_2Cl_2 , la solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo*. Une chromatographie flash dans le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 conduit à l'imidazole 7 pur, sous la forme d'un solide beige (0.277 g; 30% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$

PM=224.712 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.23$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 53.5%, H 4.1%, N 12.4% et S 14.2%. Calculé à partir de la formule brute : C 53.5 %, H 4.0%, N 12.5% et S 14.3%

Spectre de masse :

m/z (EI) 224 (M^+ , 80) et 86 (100)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.00 (1H, br s, SH), 3.50 (3H, s, CH_3), 6.88 (1H, s, CH-5) et 7.35-7.50 (4H, m, 4H Ar)

IR :

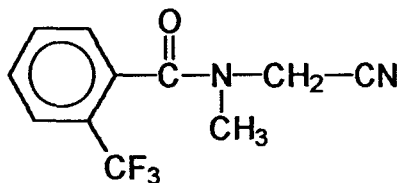
$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3140, 2890, 2790, 2650, 1610 et 1480

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 199 et 276

Point de fusion : 175-176 $^\circ\text{C}$

4.9. Synthèse du 1-méthyl-2-(2-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole.

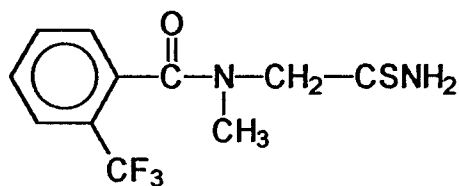
N-(cyanométhyl)-N-méthyl-2-trifluorométhylbenzamide 8b.

Du chlorure de 2-trifluorométhylbenzoyle (5.00 g; 23.7 mmol) et de la triéthylamine (3.5 ml; 25 mmol) dans du dichlorométhane (24 ml) sont ajoutés goutte à goutte, à 0°C, à une solution de chlorhydrate de (méthylamino)acétonitrile (2.55 g; 23.7 mmol) et de triéthylamine (3.5 ml; 25 mmol) dans du dichlorométhane (24 ml). L'avancement est suivi par CCM en utilisant CHCl_3 comme éluant. Lorsque la réaction est terminée, la solution est lavée successivement avec de l'acide chlorhydrique 1N, de la soude 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur Na_2SO_4 et concentrée *in vacuo* pour donner le benzamide **8b** sous forme d'une huile jaune (5.23 g; 90% de rendement).

 $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$

PM=242.212 g/mol

 $R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.42$ Spectre de masse à haute résolution :Mesuré : M^+ , 242.0674. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0667RMN ^1H (CDCl_3) : δ 2.90 (3H, s, NCH_3), 4.32-4.75 (2H, m, NCH_2) et 7.25-7.72 (4H, m, 4H Ar)IR : $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3180-2820, 2240 et 1650

2-(N-(2-trifluorométhylbenzoyl)-N-méthylamino)thioacétamide 8c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **8b** (5.80 g; 24.0 mmol) et de triéthylamine (33 ml; 240 mmol) dans du méthanol (120 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CHCl₃/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo* jusqu'à disparition totale de la TEA. Le thioacétamide **8c** est alors obtenu sous forme d'un solide beige (6.03 g; 91% de rendement).

C₁₁H₁₁F₃N₂OS

PM=276.288 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.35

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 276.0548. Calculé à partir de la formule brute : M, 276.0544

Spectre de masse :

m/z (EI) 276 (M⁺, 100%), 242 (98%)

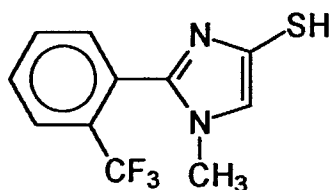
RMN ¹H (²H₆-DMSO) :

δ 2.89, 2.95 (3H, 2s, ratio 1:1, NCH₃), 4.05, 4.35 (2H, 2s, ratio 1:1, NCH₂), 7.60-7.75 (4H, m, 4H Ar), 9.25 (1H, br s, CSNH₂) et 9.80 (1H, br s, CSNH₂)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3380, 3280, 3200, 1610 et 1395

Point de fusion : 118-120 °C

1-méthyl-2-(2-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole 8.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (3.38 g; 15.2 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 8c (1.00 g; 3.80 mmol) et de triéthylamine (3.2 ml; 23 mmol) dans CH₂Cl₂ (38 ml) à -10°C, sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système CHCl₃/MeOH 9:1. Lorsque la réaction est terminée le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*. Une chromatographie flash dans le système CH₂Cl₂/MeOH 9:1, suivie d'une précipitation du produit dans l'acétate d'éthyle, conduit à l'imidazole 8 pur sous la forme d'un solide orange (0.196 g; 20% de rendement).

C₁₁H₉F₃N₂S

PM=258.273 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.12

Analyse élémentaire

Mesuré : C 51.4%, H 3.5%, N 11.0% et S 12.5%. Calculé à partir de la formule brute : C 51.2 %, H 3.5%, N 10.9% et S 12.4%

Spectre de masse :

m/z (EI) 258 (M⁺, 80), 86 (60), et 45(9)

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.10 (1H, s, SH), 3.75 (3H, s, CH₃), 6.98 (1H, s, CH-5) et 7.55-7.90 (4H, m, 4H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3110, 2910-2720, 1590 et 1480

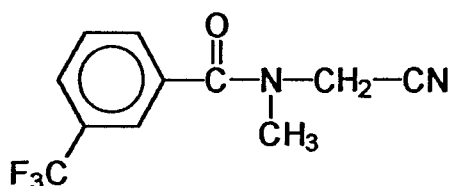
UV :

λ_{max}(H₂O)/nm : 197 et 280

Point de fusion : 176-178 °C

4.10. Synthèse du 1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole.

N-(cyanométhyl)-N-méthyl-3-trifluorométhylbenzamide 9b.



Du chlorure de 2-trifluorométhylbenzoyle (5.00 g; 23.7 mmol) et de la triéthylamine (3.5 ml; 25 mmol) dans du dichlorométhane (24 ml) sont ajoutés goutte à goutte, à 0°C, à une solution de chlorhydrate de (méthylamino)acétonitrile (2.55 g; 23.7 mmol) et de triéthylamine (3.5 ml; 25 mmol) dans du dichlorométhane (24 ml). L'avancement est suivi par CCM avec CHCl_3 comme éluant. Lorsque la réaction est terminée, la solution est lavée successivement avec de l'acide chlorhydrique 1N, de la soude 1N et de l'eau. La phase organique est alors séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo* pour donner le benzamide 9b sous forme d'une huile jaune (5.52 g; 95% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$

PM=242.212 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.70$

Spectre de masse à haute résolution :

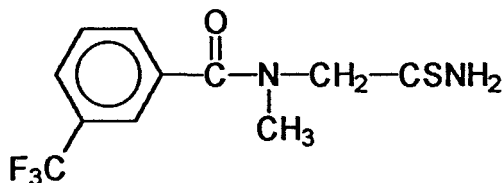
Mesuré : M^+ , 242.0665. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0667

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 3.10 (3H, s, NCH_3), 4.45 (2H, 2s, NCH_2) et 7.50-7.65 (4H, m, 4H Ar)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3120-2840, 2250 et 1650

2-(N-(3-trifluorométhylbenzoyl)-N-méthylamino)thioacétamide 9c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile 9b (5.80 g; 24 mmol) et de triéthylamine (33 ml; 240 mmol) dans du méthanol (120 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo* jusqu'à disparition totale de la TEA. Le thioacétamide 9c est alors obtenu sous forme d'un solide beige (5.63 g; 85% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$

PM=276.288 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.35$

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M^+ , 276.0541. Calculé à partir de la formule brute : M, 276.0544

Spectre de masse :

m/z (EI) 276 (M^+ , 13%), 173 (100), 145 (39) et 75 (21)

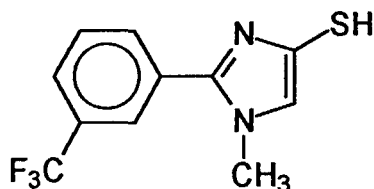
RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 3.10 (3H, s, NCH_3), 4.50 (2H, s, NCH_2), 7.42-7.60 (4H, m, 4H Ar), 7.65 (1H, br s, CSNH_2) et 8.30 (1H, br s, CSNH_2)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3350, 3300, 3180, 1610 et 1340

Point de fusion : 145 °C

1-méthyl-2-(3-trifluorométhylphényl)-4-mercaptoimidazole 9.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (3.38 g; 15.2 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 9c (1.00 g; 3.80 mmol) et de triéthylamine (3.2 ml; 23 mmol) dans CH_2Cl_2 (38 ml) à -10°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*. Le mélange est soumis à une chromatographie flash à l'aide du système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 pour obtenir l'imidazole 9 sous la forme d'un solide orange (0.392 g; 40% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{S}$

PM=258.273 g/mol

$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH } 95:5) = 0.52$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 51.3%, H 3.6%, N 10.8% et S 12.4%. Calculé à partir de la formule brute : C 51.2 %, H 3.5%, N 10.9% et S 12.4%

Spectre de masse :

m/z (EI) 258 (M^+ , 100), 173 (33), 145 (17), 86 (98), et 45(25)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.10 (1H, br s, SH), 3.75 (3H, s, CH_3), 7.32 (1H, s, CH-5), 7.53-7.94 (4H, m, 4H Ar)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3090, 2900-2710, 1585 et 1490

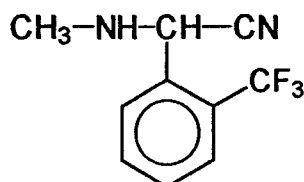
UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 197 et 280

Point de fusion : 190-192 $^\circ\text{C}$

4.11. Synthèse du 1-méthyl-5-(2-(trifluorométhyl)phényl)-4-mercaptoimidazole.

(±) 2-(méthylamino)-2-(2-trifluorométhylphényl)acétonitrile 10a.



Du chlorhydrate de méthylamine (0.697 g; 10.3 mmol) et du cyanure de sodium (0.506 g; 10.3 mmol) sont dissous dans 2 ml d'eau. La solution est ensuite refroidie à 0°C. On ajoute alors le 2-trifluorométhylbenzaldéhyde (1.50 g; 8.63 mmol) dissous dans 2 ml de méthanol. Après une heure de réaction à 0°C, la solution est agitée pendant une journée à température ambiante. Le méthanol est ensuite évaporé *in vacuo*. La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane, puis la phase organique est lavée à l'eau et séchée sur Na₂SO₄. Le solvant est alors éliminé *in vacuo* pour fournir l'acétonitrile 1j sous la forme d'une huile jaune (1.154 g; 77% de rendement).

C₁₀H₉F₃N₂

PM=214.202 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 97:3) = 0.58

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.75

Spectre de masse à haute résolution :

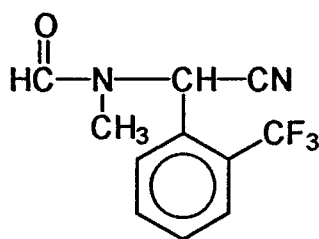
Mesuré : M⁺, 214.0724. Calculé à partir de la formule brute : M, 214.0718

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 1.71 (1H, br s, NH), 2.52 (3H, s, CH₃), 4.95 (1H, s, CH) et 7.39-7.82 (4H, m, 4H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3340, 3060-2800, 2240, 1605, 1450, 1310 et 1240

(±) N-(1-cyano-1-(2-trifluorométhylphényl)méthyl)-N-méthylformamide 10b.

De l'anhydride acétique (2.4 ml; 26 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (1.0 ml; 27 mmol) à 0°C. Après l'ajout, la solution est agitée 15 minutes à 60°C puis refroidie à nouveau à 0°C. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 10a (0.282 g; 1.17 mmol) dans CH₂Cl₂ (10 ml). L'agitation est arrêtée lorsque la CCM indique la fin de la réaction (environ 30 minutes). Après plusieurs lavages à l'aide de NaOH 1N et d'eau, séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le nitrile 10b sous forme d'une huile brune (0.258 g; 92% de rendement).

C₁₁H₉F₃N₂O

PM=242.212 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.72

Spectre de masse à haute résolution :

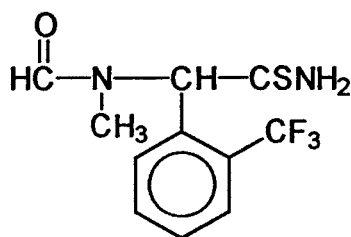
Mesuré : M⁺, 242.0668. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0667

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.71 (3H, s, CH₃), 5.50, 6.15 (1H, 2s, ratio 1:2, CH), 7.52-7.77 (3H, m, 3H Ar), 7.90 (1H, m, 1H Ar) et 8.06, 8.30 (1H, 2s, ratio 2:1, CHO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3140-2770, 2250 et 1680

(±) 2-(N-formyl-N-méthylamino)-2-(2-trifluorométhylphényl)thioacétamide 10c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **10b** (0.879 g; 3.62 mmol) et de triéthylamine (2.5 ml; 18 mmol) dans du méthanol (30 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis recristallisation dans CHCl₃, le thioacétamide **10c** est obtenu sous forme d'un solide brun (0.500 g; 50% de rendement).

C₁₁H₁₁F₃N₂OS

PM=276.288 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) = 0.24

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.33

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.55

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 276.0550. Calculé à partir de la formule brute : M, 276.0544

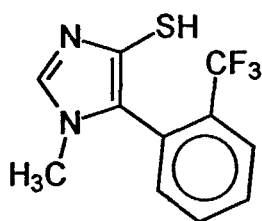
RMN ¹H (²H₆-DMSO) :

δ 2.62 (3H, s, NCH₃), 5.80, 6.30 (1H, 2s, ratio 1:2, CH), 7.57-7.83 (4H, m, 4H Ar), 7.99, 8.15 (1H, 2s, ratio 2:1, CHO), 9.30, 9.45 (1H, 2s, ratio 2:1, CSNH₂) et 10.03, 10.15 (1H, 2s, ratio 2:1, CSNH₂)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3240, 3100, 1670, 1380 et 1310

Point de fusion : 156-158 °C

1-méthyl-5-(2-(trifluorométhyl)phényl)-4-mercaptoimidazole 10.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (0.97 g; 4.4 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 10c (0.300 g; 1.09 mmol) et de triéthylamine (0.9 ml; 6.5 mmol) dans CH_2Cl_2 (20 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*, en veillant à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors reprise dans CH_2Cl_2 , la solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo*, en veillant à nouveau à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . On obtient l'imidazole 10 pur sous la forme d'un solide blanc (0.060 g; 21% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{S}$

PM=258.273 g/mol

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 98:2) = 0.29$

Analyse élémentaire

Mesuré : C 51.4%, H 3.4%, N 11.0% et S 12.3%. Calculé à partir de la formule brute : C 51.2 %, H 3.5%, N 10.9% et S 12.4%

Spectre de masse :

m/z (MALDI-TOF) 258.9 (MH^+ , 75)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.08 (1H, br s, SH), 3.35 (3H, s, CH_3), 7.34 (1H, s, CH-2), 7.52-7.68 (3H, m, 3H Ar) et 7.82 (1H, m, 1H Ar)

IR :

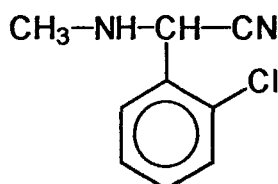
$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3150-2600, 1540 et 1315

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 200

Point de fusion : $174\text{-}176^\circ\text{C}$

4.12. Synthèse du 1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.

(±) 2-(méthylamino)-2-(2-chlorophényl)acétonitrile 11a.

Du chlorhydrate de méthylamine (2.88 g; 42.7 mmol) et du cyanure de potassium (2.78 g; 42.7 mmol) sont dissous dans 23 ml d'eau. La solution est ensuite refroidie à 0°C. On ajoute alors le 4-chlorobenzaldéhyde (5.00g; 35.6 mmol) dissous dans 45 ml de méthanol. Après une nuit de réaction à 30°C le méthanol est évaporé *in vacuo*. La solution est extraite avec du dichlorométhane, puis lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, puis le solvant est éliminé *in vacuo* pour fournir l'acétonitrile 11a sous la forme d'une huile jaune (5.84 g; 91% de rendement).

C₉H₉ClN₂

PM=180.641 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) = 0.69

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.79

Spectre de masse à haute résolution :

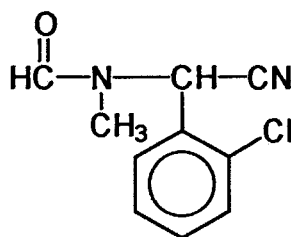
Mesuré : M⁺, 180.0451. Calculé à partir de la formule brute : M, 180.0454

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 1.62 (1H, br s, NH), 2.59 (3H, s, CH₃), 5.05 (1H, s, CH), 7.29-7.47 (3H, m, 3H Ar) et 7.60 (1H, m, 1H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3320, 3080-2720, 2190, 1600, 1450, 1310 et 1280

(±) N-(1-cyano-1-(2-chlorophényl)méthyl)-N-méthylformamide 11b.

De l'anhydride acétique (67 ml; 710 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (27 ml; 720 mmol) à 0°C. Après l'ajout, la solution est agitée 15 minutes à 60°C puis refroidie à nouveau à 0°C. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 11a (5.84 g; 32.3 mmol) dans CH₂Cl₂ (50 ml). L'agitation est arrêtée lorsque la CCM indique la fin de la réaction (environ 3 heures). Après plusieurs lavages à l'aide de KOH 1N et d'eau, séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le nitrile 11b sous forme d'une huile brune devenant amorphe au repos (4.45 g; 66% de rendement).

C₁₀H₉ClN₂O

PM=208.651 g/mol

R_f (CHCl₃) = 0.76

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) = 0.78

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.92

Spectre de masse à haute résolution :

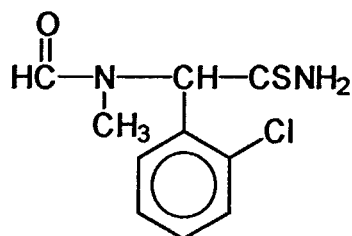
Mesuré : M⁺, 208.0403. Calculé à partir de la formule brute : M, 208.0403

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.75 (3H, s, NCH₃), 6.05, 6.89 (1H, 2s, ratio 2:3, CH), 7.35-7.49 (3H, m, 3H Ar), 7.77 (1H, m, 1H Ar) et 8.11, 8.42 (1H, 2s, ratio 3:2, CHO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3150-2790, 2245 et 1680

(±) 2-(N-formyl-N-méthylamino)-2-(2-chlorophényl)thioacétamide 11c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile 11a (4.45 g; 21.3 mmol) et de triéthylamine (15 ml; 110 mmol) dans du méthanol (100 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'HCl 1N et à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation du solvant *in vacuo*, le thioacétamide 11c est obtenu sous forme d'un solide blanc (4.31 g; 83% de rendement).

C₁₀H₁₁ClN₂OS

PM=242.727 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.57

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.59

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 242.0283. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0280

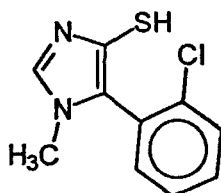
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.84 (3H, s, NCH₃), 5.85, 6.47 (1H, 2s, ratio 2:3, CH), 7.28-7.55 (4H, m, 4H Ar), 7.70 (1H, br s, CSNH₂), 7.87 (1H, br s, CSNH₂) et 8.13, 8.20 (1H, 2s, ratio 2:3, CHO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3280, 3120, 1680 et 1400

Point de fusion : 132-134 °C

1-méthyl-5-(2-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 11.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (1.10 g; 4.94 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 11c (0.300 g; 1.24 mmol) et de triéthylamine (1.0 ml; 7.2 mmol) dans CH_2Cl_2 (25 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*, en veillant à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors reprise dans CH_2Cl_2 , la solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo*, en veillant à nouveau à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . On obtient l'imidazole 11 pur sous la forme d'un solide blanc (0.070 g; 25% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$

PM=224.712 g/mol

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) = 0.40

Analyse élémentaire

Mesuré : C 53.7%, H 3.8%, N 12.5% et S 14.5%. Calculé à partir de la formule brute : C 53.5 %, H 4.0%, N 12.5% et S 14.3%

Spectre de masse :

m/z (MALDI-TOF) 225 (M^+ , 56)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.07 (1H, br s, SH), 3.49 (3H, s, CH_3), 7.34 (1H, s, CH-2) et 7.38-7.60 (4H, m, 4H Ar)

IR :

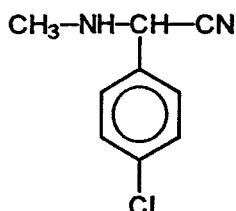
$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3155-2600, 1540 et 1485

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 201 et 255

Point de fusion : 170-171 $^\circ\text{C}$

4.13. Synthèse du 1-méthyl-5-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole.

(±) 2-(méthylamino)-2-(4-chlorophényl)acétonitrile 12a.

Du chlorhydrate de méthylamine (0.865 g; 12.8 mmol) et du cyanure de potassium (0.834 g; 12.8 mmol) sont dissous dans 7 ml d'eau. La solution est ensuite refroidie à 0°C. On ajoute alors le 4-chlorobenzaldéhyde (1.50 g; 10.7 mmol) dissous dans 14 ml de méthanol. Après une nuit de réaction à 30°C le méthanol est évaporé *in vacuo*. La solution est extraite avec du dichlorométhane, puis la phase organique est lavée à l'eau. Celle-ci est ensuite séchée sur Na₂SO₄, puis le solvant est éliminé *in vacuo* pour fournir l'acétonitrile 12a sous la forme d'une huile jaune (1.72 g; 89% de rendement).

C₉H₉ClN₂

PM=180.641 g/mol

R_f (CH₂Cl₂) = 0.70

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.73

Spectre de masse à haute résolution :

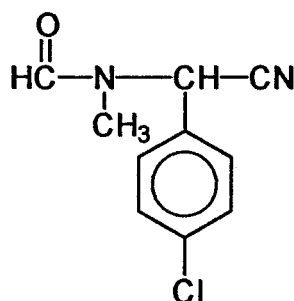
Mesuré : M⁺, 180.0455. Calculé à partir de la formule brute : M, 180.0454

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 1.58 (1H, br s, NH), 2.55 (3H, s, CH₃), 4.73 (1H, s, CH), 7.38 (2H, d, J=5.3 Hz, 2H Ar) et 7.45 (2H, d, J=5.3 Hz, 2H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3340, 3100-2800, 2240, 1600, 1590 et 1250

(±) N-(1-cyano-1-(4-chlorophényl)méthyl)-N-méthylformamide 12b.

De l'anhydride acétique (20 ml; 210 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (8.0 ml; 210 mmol) à 0°C. Après l'ajout, la solution est agitée 15 minutes à 60°C puis refroidie à nouveau à 0°C. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 12a (1.76 g; 9.75 mmol) dans CH₂Cl₂ (50 ml). L'agitation est arrêtée lorsque la CCM indique la fin de la réaction (environ 3 heures). Après plusieurs lavages à l'aide de KOH 1N et d'eau, séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le nitrile 12b sous forme d'une huile brune devenant amorphe au repos (1.932 g; 95% de rendement).

C₁₀H₉ClN₂O

PM=208.651 g/mol

R_f (CHCl₃) = 0.76

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.40

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.76

Spectre de masse à haute résolution :

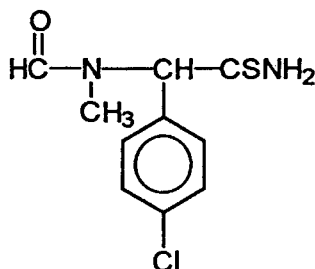
Mesuré : M⁺, 208.0409. Calculé à partir de la formule brute : M, 208.0403

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.75 (3H, s, NCH₃), 6.05, 6.88 (1H, 2s, ratio 2:3, CH), 7.38-7.49 (3H, m, 3H Ar), 7.77 (1H, m, 1H Ar) et 8.09, 8.41 (1H, 2s, ratio 3:2, CHO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3160-2800, 2245 et 1680

(±) 2-(N-formyl-N-méthylamino)-2-(4-chlorophényl)thioacétamide 12c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **12b** (2.034 g; 9.75 mmol) et de triéthylamine (7.0 ml; 50 mmol) dans du méthanol (50 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation du solvant *in vacuo*, le thioacétamide **12c** est obtenu sous forme d'un solide blanc (1.96 g; 83% de rendement).

C₁₀H₁₁ClN₂OS

PM=242.727 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.57

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.59

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 242.0288. Calculé à partir de la formule brute : M, 242.0280

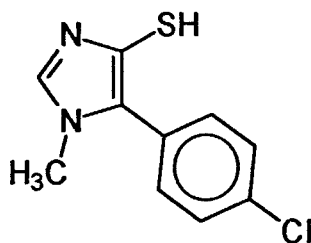
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.83 (3H, s, NCH₃), 5.85, 6.47 (1H, 2s, ratio 2:3, CH), 7.30-7.70 (4H, m, 4H Ar), 7.75 (1H, br s, CSNH₂), 7.90 (1H, br s, CSNH₂) et 8.13, 8.18 (1H, 2s, ratio 2:3, CHO),

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3280, 3120, 1680 et 1400

Point de fusion : 144 °C

1-méthyl-5-(4-chlorophényl)-4-mercaptoimidazole 12.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (1.099 g; 4.94 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 12c (0.300 g; 1.24 mmol) et de triéthylamine (1.0 ml; 7.2 mmol) dans CH_2Cl_2 (25 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée (10 à 15 minutes) le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*, en veillant à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors reprise dans CH_2Cl_2 , la solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo*, en veillant à nouveau à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . On obtient l'imidazole 12 pur sous la forme d'un solide blanc (0.083 g; 30% de rendement).

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$

PM=224.712 g/mol

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) = 0.53

Analyse élémentaire

Mesuré : C 53.6%, H 4.1%, N 12.7% et S 14.1%. Calculé à partir de la formule brute : C 53.5 %, H 4.0%, N 12.5% et S 14.3%

Spectre de masse :

m/z (MALDI-TOF) 225.2 (M^+ , 40)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 3.46 (3H, s, CH_3), 7.35 (1H, s, CH-2), 7.37-7.43 (2H, d, $J=7.0$ Hz, 2H Ar) et 7.51-7.56 (2H, d, $J=7.0$ Hz, 2H Ar)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3160-2600, 1540 et 1495

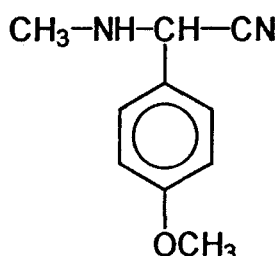
UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 198 et 260

Point de fusion : 179-182 $^\circ\text{C}$

4.14. Synthèse du 1-méthyl-5-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.

(±) 2-(méthylamino)-2-(4-méthoxyphényl)acétonitrile 13a.



Du chlorhydrate de méthylamine (0.86 g; 13.2 mmol) et du cyanure de potassium (0.861 g; 13.2 mmol) sont dissous dans 7 ml d'eau. La solution est ensuite refroidie à 0°C. On ajoute alors le 4-chlorobenzaldéhyde (1.50 g; 11.0 mmol) dissous dans 14 ml de méthanol. Après une nuit de réaction à 30°C le méthanol est évaporé *in vacuo*. La solution est extraite avec du dichlorométhane. La phase organique obtenue est ensuite lavée à l'eau et séchée sur Na₂SO₄, puis le solvant est éliminé *in vacuo* pour fournir l'acétonitrile 13a sous la forme d'une huile jaune (1.92 g; 99% de rendement).

C₁₀H₁₂N₂O

PM=176.225 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.71

Spectre de masse à haute résolution :

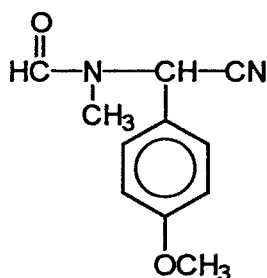
Mesuré : M⁺, 176.0954. Calculé à partir de la formule brute : M, 176.0949

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 1.58 (1H, br s, NH), 2.57 (3H, s, NCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.74 (1H, s, CH), 7.37 (2H, d, J=4.7 Hz, 2H Ar) et 7.47 (2H, d, J=4.7 Hz, 2H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3340, 3100-2800, 2230, 1600, 1460 et 1260

(±) N-(1-cyano-1-(4-méthoxyphényl)méthyl)-N-méthylformamide 13b.

De l'anhydride acétique (23 ml; 240 mmol) est ajouté goutte à goutte à de l'acide formique à 96% (9.0 ml; 240 mmol) à 0°C. Après l'ajout, la solution est agitée 15 minutes à 60°C puis refroidie à nouveau à 0°C. L'anhydride mixte est alors traité goutte à goutte par la cyanoamine 13a (1.92 g; 10.9 mmol) dans CH₂Cl₂ (50 ml). L'agitation est arrêtée lorsque la CCM indique la fin de la réaction (environ 3 heures). Après plusieurs lavages à l'aide de KOH 1N et d'eau, séchage de la phase organique sur Na₂SO₄ puis évaporation *in vacuo* du solvant, on obtient le nitrile 13b sous forme d'une huile brune devenant amorphe au repos (1.585 g; 84% de rendement).

C₁₁H₁₂N₂O₂

PM=204.235 g/mol

R_f (CHCl₂) = 0.47

Spectre de masse à haute résolution :

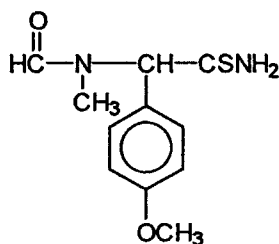
Mesuré : M⁺, 204.0896. Calculé à partir de la formule brute : M, 204.0899

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.75, 2.81 (3H, 2s, ratio 1:3, NCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃), 5.74, 6.73 (1H, 2s, ratio 1:3, CH), 6.91 (2H, d, J=5.1 Hz, 2H Ar), 7.31 (2H, d, J=5.1 Hz, 2H Ar) et 8.10, 8.35 (1H, 2s, ratio 3:1, CHO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3080-2800, 2240 et 1680

(±) 2-(N-formyl-N-méthylamino)-2-(4-méthoxyphényl)thioacétamide 13c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **13b** (5.057 g; 24.8 mmol) et de triéthylamine (18 ml; 130 mmol) dans du méthanol (100 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement à l'eau. Après séchage sur Na₂SO₄ puis évaporation du solvant *in vacuo*, le thioacétamide **13c** est obtenu sous forme d'un solide blanc (5.21 g; 89% de rendement).

C₁₁H₁₄N₂O₂S

PM=238.311 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) = 0.58

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.47

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 238.0772. Calculé à partir de la formule brute : M, 238.0776

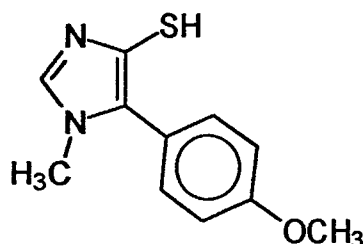
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.84, 2.90 (3H, 2s, ratio 1:3, NCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 5.48, 6.24 (1H, 2s, ratio 1:3, CH), 6.92 (2H, d, J=8.6 Hz, 2H Ar), 7.34 (2H, d, J=8.6 Hz, 2H Ar), 7.77 (1H, br s, CSNH₂), 7.92 (1H, br s, CSNH₂) et 8.18 (1H, s, CHO)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3320, 3160, 1640, 1505 et 1400

Point de fusion : 123 °C

1-méthyl-5-(4-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole 13.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (1.10 g; 5.04 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 13c (0.300 g; 1.26 mmol) et de triéthylamine (1.0 ml; 7.2 mmol) dans CH_2Cl_2 (25 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée (10 à 15 minutes) le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé au contact de l'air) sont évaporés *in vacuo*, en veillant à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors reprise dans CH_2Cl_2 , la solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 puis concentrée *in vacuo*, en veillant à nouveau à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . On obtient l'imidazole 13 pur sous la forme d'un solide blanc (0.174 g; 63% de rendement).

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$

PM=220.296 g/mol

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) = 0.45

Analyse élémentaire

Mesuré : C 60.2%, H 5.5%, N 12.8% et S 14.4%. Calculé à partir de la formule brute : C 60.0 %, H 5.5%, N 12.7% et S 14.6%

Spectre de masse :

m/z (MALDI-TOF) 221 (MH^+ , 31)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 1.80 (1H, br s, SH), 3.50 (3H, s, CH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 6.90 (2H, d, $J=8.7$ Hz, 2H Ar), 7.15 (2H, d, $J=8.7$ Hz, 2H Ar) et 7.43 (1H, s, CH-2)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3120-2950, 1610 et 1580

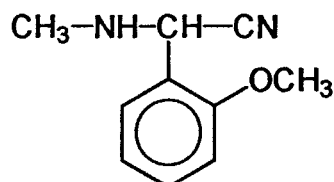
UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 199 et 245

Point de fusion : 141-144 $^\circ\text{C}$

4.15. Synthèse du 1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole.

(±) 2-(méthylamino)-2-(2-méthoxyphényl)acétonitrile 14a.



Du chlorhydrate de méthylamine (0.861 g; 13.2 mmol) et du cyanure de potassium (0.861 g; 13.2 mmol) sont dissous dans 7 ml d'eau. La solution est ensuite refroidie à 0°C. On ajoute alors le 4-chlorobenzaldéhyde (1.50 g; 11.0 mmol) dissous dans 14 ml de méthanol. Après une nuit de réaction à 30°C le méthanol est évaporé *in vacuo*. La solution est extraite avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau et séchée sur Na₂SO₄, puis le solvant est éliminé *in vacuo* pour fournir l'acétonitrile 13a sous la forme d'une huile jaune (1.84 g; 95% de rendement).

C₁₀H₁₂N₂O

PM=176.225 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.71

Spectre de masse à haute résolution :

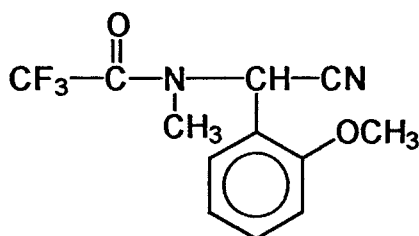
Mesuré : M⁺, 176.0958. Calculé à partir de la formule brute : M, 176.0949

RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 1.82 (1H, br s, NH), 2.59 (3H, s, NCH₃), 3.89 (3H, s, OCH₃), 4.84 (1H, d, J=9.0, CH), 6.87-7.05 (2H, m, 2H Ar) et 7.28-7.48 (2H, m, 2H Ar)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3340, 3060-2800, 2230, 1600, 1460 et 1250

(±) N-(1-cyano-1-(2-méthoxyphényl)méthyl)-N-méthyl-trifluoroacétamide 14b.

L'amine **14a** (0.384 g; 2.13 mmol) et la TEA (0.9 ml; 6.5 mmol) sont mis en solution dans 30 ml de CH_2Cl_2 . Le mélange est refroidi à 0°C puis de l'anhydride trifluoroacétique (0.54 g; 2.6 mmol) est ajouté goutte à goutte. La solution est agitée 4 heures à 0°C puis une nuit à température ambiante. La solution est ensuite lavée à l'acide chlorhydrique 1N, puis séchée sur Na_2SO_4 . Enfin, le solvant de la phase organique est évaporé *in vacuo* pour obtenir le nitrile **14b** sous forme d'une huile brune devenant amorphe au repos (0.403 g; 69% de rendement).

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$

PM=272.238 g/mol

Rf (CHCl_2) = 0.80

Rf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) = 0.92

Spectre de masse à haute résolution :

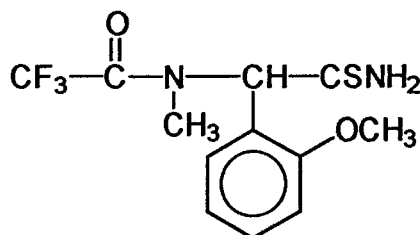
Mesuré : M^+ , 272.0775. Calculé à partir de la formule brute : M, 272.0772

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 2.89 (3H, s, NCH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 6.908 (1H, s, CH), 6.92-7.10 (2H, m, 2H Ar), 7.40-7.50 (1H, m, 1H Ar) et 7.61 (1H, m, 1H Ar)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3100-2800, 2240 et 1680

(±) 2-(N-trifluoroacétyl-N-méthylamino)-2-(2-méthoxyphényl)thioacétamide 14c.

Du sulfure d'hydrogène est mis à buller dans une solution du nitrile **14b** (1.17 g; 4.23 mmol) et de triéthylamine (3.0 ml; 22 mmol) dans du méthanol (50 ml). La réaction est suivie par CCM à l'aide du système CH₂Cl₂/MeOH 9:1. Lorsque la réaction est totale, le solvant est évaporé *in vacuo*, puis l'huile est soumise à une chromatographie flash à l'aide du système CHCl₃/MeOH 98:2. Le thioacétamide **14c** est alors obtenu sous forme d'un solide jaune clair (0.596 g; 45.3% de rendement).

C₁₂H₁₃F₃N₂O₂S

PM=306.314 g/mol

R_f (CHCl₃/MeOH 9:1) = 0.50

Spectre de masse à haute résolution :

Mesuré : M⁺, 306.0652. Calculé à partir de la formule brute : M, 306.0650

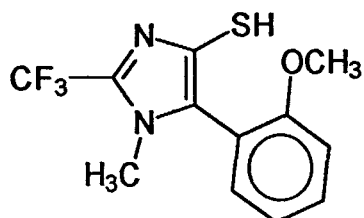
RMN ¹H (CDCl₃) :

δ 2.89 (3H, s, NCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 6.49 (1H, s, CH), 6.85-7.05 (2H, m, 2H Ar), 7.06(1H, br s, CSNH₂), 7.34-7.50 (2H, m, ArH) et 7.74 (1H, br s, CSNH₂)

IR :

ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ : 3300, 3160, 1670, 1505 et 1465

Point de fusion : 117-119 °C

1-méthyl-2-trifluorométhyl-5-(2-méthoxyphényl)-4-mercaptoimidazole 14.

Du trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (1.72 g; 7.90 mmol) est ajouté goutte à goutte à une solution de thioamide 14c (0.596 g; 1.98 mmol) et de triéthylamine (1.7 ml; 12 mmol) dans CH_2Cl_2 (20 ml) à -5°C , sous argon. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Lorsque la réaction est terminée (48 heures) le dichlorométhane, de même que l'excès de trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (hydrolysé) sont évaporés *in vacuo*, en veillant à ce que la température du bain marie ne dépasse pas 35°C . L'huile comprenant la TEA et l'imidazole est alors purifiée par chromatographie flash à l'aide du système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5. Après cristallisation dans l'acétate d'éthyle, on obtient l'imidazole 14 sous forme d'un solide jaune (0.070 g; 13% de rendement).

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$

PM=288.299 g/mol

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) = 0.86

Analyse élémentaire

Mesuré : C 50.1%, H 4.0%, N 9.7% et S 11.3%. Calculé à partir de la formule brute : C 50.0%, H 3.9%, N 9.7% et S 11.1%

Spectre de masse :

m/z (MALDI-TOF) 289 (M^+ , 34)

RMN ^1H (CDCl_3) :

δ 1.65 (1H, br s, SH), 3.50 (3H, s, CH_3), 3.80 (3H, s, OCH_3), 7.00-7.13 (2H, m, 2H Ar), 7.23 (1H, s, ArH) et 7.42-7.56 (1H, m, 1H Ar)

IR :

$\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3100-2810, 1610 et 1480

UV :

$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})/\text{nm}$: 200

Point de fusion : $85\text{-}87^\circ\text{C}$

4.16. Remarques concernant la spectrométrie de masse.

Comme on peut le voir, la spectrométrie de masse réalisée pour chacun des 4-mercaptoimidazoles confirme leur structure. Cependant, pour chaque spectre d'une molécule ASH, de masse molaire m , il apparaît un pic d'importance variable correspondant à une masse de $2(m-1)$. Ce pic est donc relatif à l'espèce ASSA. Or, dans beaucoup de cas, aucune tache pouvant correspondre au dissulfure n'est visible en chromatographie sur couche mince.

Pour résoudre cette énigme, le spectre de masse d'un mélange de deux 4-mercaptoimidazoles, ASH (2) et BSH (4), de masses molaires différentes, m_a et m_b , a été obtenu. Des pics correspondant aux masses m_a , m_b , $2(m_a-1)$ et $2(m_b-1)$ furent retrouvés, mais aussi un autre correspondant à une masse de $(m_a-1)+(m_b-1)$, c'est à dire à l'espèce ASSB. Les deux espèces ayant été mises en solution juste avant l'acquisition du spectre, et étant de surcroît peu réactives, elles ne pouvaient avoir réagi ensemble avant la mesure. Ce spectre tend donc à prouver que le pic correspondant au dissulfure, apparaissant en spectrométrie de masse, est en fait un artefact. L'espèce peut en effet être produite par la technique même de spectrométrie de masse.

