



## THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Organique

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Consuelo PETROCCHI**

**Synthèse de nouvelles nitrones  $\beta$ -phosphorylées (PPNs) dérivées de la PBN  
et leurs analogues vectorisés pour le ciblage mitochondrial.  
Evaluation par RPE et mesure de l'activité antioxydante et vasorelaxante  
dans un modèle d'endothélium aortique**

**Laboratoire de rattachement :** Equipe Sondes Moléculaires en Biologie et Stress Oxydant, Institut de  
Chimie Radicalaire, SMBSO/UMR-CNRS 7273 – Université d'Aix-Marseille

Soutenue le 29 Septembre 2015

Composition du jury :

**M. Damian Miles BAILEY**, Professeur, Université de Glamorgan, UK  
**M. Thierry LE GALL**, Chercheur, CEA Saclay  
**M. Bernard LARDY**, Maître de conférence-Praticien Hospitalier, CHU Grenoble  
**M. Hervé KOVACIC**, Professeur, Université d'Aix-Marseille  
**M. Marcel CULCASI**, Chargé de Recherche CNRS, Marseille  
**Mme Sylvia PIETRI** : Directrice de Recherche au CNRS

**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Président**  
**Co-encadrant**  
**Directrice de thèse**



*"Sono qui perché se mi arrendo questa volta  
mi arrenderò tutta la vita..."*

Alessandro Baricco

*"Science is but a perversion of itself unless it has as its ultimate goal  
the betterment of humanity."*

Nikola Tesla



## *Remerciements*

---

Commencer la rédaction de cette page indique pour moi la fin d'une expérience personnelle et professionnelle. Elle fut enrichissante et a contribué à éclairer mon futur, c'est pour cela que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont accompagné tout au long de mon parcours et ont contribué à la réalisation de ce projet de trois années de doctorat.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements au Pr. Damian Bailey et au Dr. Thierry Le Gall pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon travail. Je remercie également les membres de ce jury le Pr. Hervé Kovacic et le Dr. Bernard Lardy qui me font l'honneur d'assister à cette thèse et d'examiner ce travail.

Je remercie ma directrice de thèse, le Dr. Sylvia Pietri de m'avoir donné la possibilité de réaliser mon travail de recherche au sein de l'équipe SMBSO (Sondes Moléculaire en Biologie et Stress Oxydant), dans un contexte pluridisciplinaire, ainsi que d'avoir dirigé et supervisé les travaux biologiques présentés.

Merci également à mon co-encadrant, le Dr. Marcel Culcasi pour son apport scientifique à mon travail, en particulier lors des expériences de RPE et pour les corrections méticuleuses qu'il a apporté à ce manuscrit.

Je voudrais remercier aussi tous les membres de l'équipe SMBSO, Claude Arzouyan, Patrick Bernasconi, Anh Tuan Lormier, Anne Mercier, Hidayat Rahmouni, Emilie Ricquebourg, Pierre Stocker, Nicolas Vidal, qui ont été impliqués dans ce projet, chacun contribuant de près, ou d'un peu plus loin, aux travaux des autres. Merci également au Dr. Sophie Thétiot-Laurent pour avoir dédié du temps à la relecture, à la correction de la partie chimique de ce manuscrit et aux tests de détection de NO<sup>•</sup>. Merci à Mathieu Cassien, doctorant, pour sa collaboration dans la réalisation des tests biologiques et biochimiques.

Je tiens à dire un grand merci au Dr. Maxime Robin et au Dr. Valérie Pique qui ont suivi la réalisation de la partie de synthèse et m'ont guidé avec leurs enseignements tout au long de ce parcours. Merci pour vos conseils précieux et pour la passion que vous m'avez communiqué, merci pour la confiance que vous m'avez toujours accordé et surtout merci pour votre optimisme et votre appui avec lesquels vous m'avez soutenu et encouragé dans les moments les plus difficiles de ma thèse. Je ne pourrai jamais vous remercier assez.

J'aimerais remercier le Dr. Robert Faure pour son aide experte dans la caractérisation RMN de mes produits et pour sa disponibilité à répondre à mes questions afin d'éclaircir mes doutes.

Un grand merci aussi à tous les doctorants, post-docs et stagiaires que j'ai eu le plaisir de rencontrer pendant ces trois années et avec lesquels j'ai partagé cette expérience, en particulier Jean-Claude, ma "Coniglietta" Marion, Chloé et Seb. Merci à vous tous pour m'avoir supporté dans les périodes difficiles et pour votre constant soutien moral, merci pour tous les bons moments partagés ensemble, riches en bonne humeur, sourires et générosité. Votre amitié à été essentielle pour m'aider à mener ma thèse jusqu'au bout.

Ma gratitude va également au Directeur de l'ICR (Institut de Chimie Radicalaire) le Dr. Didier Gigmes pour son soutien et ses conseils pendant ces 3 années, ainsi qu'aux deux Directeurs successifs de l'école doctorale Frédéric Fages et Thierry Constantieux qui ont été constamment attentifs au suivi du déroulement de la thèse.

Merci également à Mme Corinne Esquiva pour ses qualités humaines d'écoute et de compréhension, toujours disponible pour apporter son soutien moral aux doctorants.

Pour finir, je tiens à remercier le Pr. Pierluigi Stipa et le Pr. Lucedio Greci qui m'ont orientée vers un doctorat avec leurs enseignements et leur soutien.

Merci encore à vous tous et à ceux que j'ai, peut-être, oublié de mentionner.

Un ringraziamento speciale va senza dubbio alle persone che mi sono più care che, sebbene lontane, non mi hanno mai fatto mancare il loro sostegno e il loro affetto in questi tre anni. Senza queste persone oggi non sarei arrivata a questo traguardo e non sarei la persona che sono.

Il ringraziamento più grande va ai miei genitori che ancora una volta hanno assecondato le mie aspirazioni accettando la mia "trovata" di partire all'estero per tre anni. Grazie per tutto quello che avete sempre fatto per me e per avermi insegnato ad essere forte e a non abbassare mai la testa di fronte a niente e a nessuno, perchè se la vita è dura noi dobbiamo esserlo di più. E' solo grazie a voi e ai vostri insegnamenti se sono riuscita a superare tutte le difficoltà che ho incontrato lungo questo percorso e ad essere qui oggi, a mettere il punto finale di questo ciclo della mia vita, personale e professionale. E sarà solo grazie a voi che avrò la capacità di affrontare il mio futuro con determinazione, senza arrendermi e senza rinunciare ai miei sogni.

Grazie a tutto il resto della mia famiglia: a mia sorella Giada che mi stima più di quanto probabilmente faccia io stessa, a mio nonno Agostino, così come agli altri nonni che non ci sono più, che si è preso cura di me da quando sono nata e che continua a farlo tuttora con i suoi continui "rimproveri" e con la sua saggezza tipica dei nonni. Grazie a tutti i miei zii e i miei cugini e in particolare a mia zia Giovanna che è sempre stata vicina e partecipa al mio percorso professionale trasmettendomi fin da piccola la passione per la cultura e per lo studio, che mi ha aiutata ad orientarmi verso il cammino che poi ho scelto e che, ancora più importante, ha contribuito alla mia crescita personale facendomi da vice-mamma.

Un ringraziamento immenso va a Paolo che ha rappresentato il mio punto fermo in questi tre anni. Grazie di aver accettato la mia decisione di espatriare per poter realizzare le mie aspirazioni, e di non aver mai dubitato, nemmeno per un attimo, sul fatto che potevamo farcela! Beh..avevi ragione, e se è vero che: *"...è nella separazione che si sente e si capisce la forza con cui si ama..."* allora probabilmente avremo ancora un lungo cammino davanti a noi da fare insieme. Grazie per aver sempre creduto in me e nelle mie capacità anche nei momenti in cui io ho dubitato di tutto, grazie per aver saputo trovare le parole giuste a risollevarmi il morale e a trasmettermi forza e sicurezza nei momenti di sconforto. Grazie

per essermi stato vicino anche quando sembrava impossibile e non esserti mai arreso, continuando sempre a credere in me e in noi. Questo giorno segna la fine di un capitolo della nostra vita e l'inizio di un altro, nel quale spero di poter realizzare tutti i nostri progetti futuri insieme.

Infine un grazie anche a tutti gli amici di sempre, ormai sparpagliati per l'Italia e per il mondo, con i quali ho condiviso diversi periodi della mia vita e che in un modo o in un altro mi sono stati vicini regalandomi momenti speciali. Grazie per il vostro sostegno e la vostra amicizia che non sono mai mancati e grazie per aver sempre trovato il tempo di organizzarvi e partecipare alle rimpatriate ogni volta che reintravo in Italia, nonostante gli impegni di ciascuno di noi.

Grazie ancora a tutti...in questa tesi c'è un pò di ognuno di voi...



## LISTE DES COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

*New alicyclic phosphorylated nitrones with antioxidant potential and their use as free radical detectors in a model of acute joint inflammation.* **Petrocchi, C;** Robin, M; Pique, V.; Rahmouni, H.; Thetiot-Laurent, S.; Pietri, S.; Culcasi, M. 7<sup>ème</sup> Journée Franco-Italiennes de Chimie (GIFC, 5-6 Mai 2014, Turin, Italie)

*Design of new  $\beta$ -phosphorilated nitrones with natural antioxidant framework and their use as free radical detectors in a model of isolated rat aortic rings undergoing oxidative stress.* **Petrocchi, C.;** Cassien, M.; Riquebourg, E.; Thetiot-Laurent, S.; Pique, V.; Robin, M.; Pietri S.; Culcasi, M. 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants ( ISANH, 23-24 Juin 2015, Paris, France)

## COMMUNICATION ORALE

*New  $\beta$ -phosphorylated PBN-type nitrones with antioxidant potential and some derivatives designed for specific mitochondria targeting.* **Petrocchi, C.;** Cassien, M.; Robin, M.; Pique, V.; Thetiot-Laurent, S.; Pietri, S.; Culcasi, M. 5<sup>ème</sup> Rencontre scientifique des Doctorants en Chimie de Marseille (23-24 Avril 2015, Marseille, France)

## PRESENTATION D'UN ATELIER INTERACTIF POUR SCOLAIRE ET TOUT PUBLIC

Atelier en formulation cosmétique : « *Secret des crèmes et émulsions cosmétiques* » 23<sup>ème</sup> Fête de la Science, 3-5 Octobre 2014, Village de science de Forcalquier.

Atelier chimie des parfums, Souk des Sciences 25 septembre 2013 Marseille, l'Alcazar- Cours Belsunce.



## ABBREVIATIONS

<b>AAPH:</b>	2,2'-azo-bis (2-aminopropane) dihydrochloride
<b>Abs:</b>	Absorbance
<b>ascH</b>	Acide Ascorbique
<b>AUC:</b>	Area Under Curve
<b>AGPI:</b>	Acide Gras Polyinsaturé
<b>BMPO</b>	5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline N-oxide
<b>CHCl<sub>3</sub>:</b>	Chloroforme
<b>CH<sub>3</sub>CN :</b>	Acétonitrile
<b>DCE :</b>	Dichloroéthane
<b>DCM :</b>	Dichlorométhane
<b>DEPMPO :</b>	5-(diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline <i>N</i> -oxyde
<b>DMPO :</b>	5,5-diméthyl 1-pyrroline <i>N</i> -oxyde
<b>DMSO :</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DPPH :</b>	2,2-diphénylpicrilhydrazyle
<b>DTPA :</b>	Acide diethylenetriaminepenta acetique
<b>EC<sub>50</sub>:</b>	median Effective Concentration
<b>EDTA :</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EMPO :</b>	2-éthoxycarbonyl-2-méthyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrole-1-oxyde
<b>eq:</b>	Equivalent
<b>Eq:</b>	Equation
<b>Et<sub>2</sub>O :</b>	Ether diethylique
<b>EtOH :</b>	Ethanol
<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry
<b>HY :</b>	Hypoxanthine
<b>Hz :</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	half maximal inhibitory concentration
<b>LDH:</b>	Lactate Dehydrogénase
<b>MGD:</b>	N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate
<b>MeOH :</b>	Methanol
<b>m.p. :</b>	melting point (temperature de fusion)
<b>MS (ESI)</b>	Mass Spectrometry (Electrospray Ionisation)
<b>MTT</b>	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium

<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NO<sup>•</sup>:</b>	oxyde nitrique
<b>ORAC :</b>	Oxygen Radical Absorbance Capacity
<b>PBS :</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PBN :</b>	N-tert-butyl- $\alpha$ -phénylnitronne
<b>PE</b>	phényléphrine
<b>POPh<sub>2</sub> :</b>	diphenylphosphoryle
<b><sup>+</sup>PPh<sub>3</sub> :</b>	Cation triphénylphosphonium
<b>PPN</b>	N-benzylidène-2-(diéthoxyphosphoryl)propan-2-amine oxyde
<b>ppm :</b>	Partie Par Million
<b>Rdt :</b>	Rendement
<b>RMN:</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RNS:</b>	Reactive Nitrogen Species
<b>ROS:</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RPE:</b>	Résonance Paramagnétique Electronique
<b>RX:</b>	Rayons X
<b>SNP</b>	nitroprusside de sodium
<b>SOD:</b>	SuperOxyde Dismutase
<b>ST-RPE</b>	couplage Spin Trapping/RPE
<b>T<sub>amb</sub> :</b>	Temperature ambiante
<b>TE :</b>	Trolox Equivalent
<b>TRAP:</b>	Total Radical-trapping Antioxidant Parameter
<b>Tris :</b>	trishydroxymethylaminomethane
<b>TPP:</b>	Triphénylphosphine
<b>X/XO :</b>	Xanthine / Xanthine Oxydase
<b>XO :</b>	Xanthine Oxydase

## AVANT-PROPOS

Ce projet de thèse intitulé "*Synthèse de nouvelles nitrones  $\beta$ -phosphorylées (PPNs) dérivées de la PBN et leurs analogues vectorisés pour le ciblage mitochondrial.*

*Evaluation par RPE et mesure de l'activité antioxydante et vasorelaxante dans un modèle d'endothélium aortique*" à été développé au sein de l'équipe SMBSO; il s'inscrit dans le cadre de l'étude du stress oxydant par détection des radicaux libres en vu du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

En conditions physiologiques les radicaux libres sont produits de manière régulière dans l'organisme et ne constituent pas une condition pathologique car ils sont neutralisés par les systèmes de défense endogènes. Lorsque la production de ces espèces réactives devient trop importante, ou lorsque les capacités de défenses antioxydantes diminuent on assiste à un déséquilibre entre formation et élimination des radicaux libres en faveur de leur production; cette condition est appelée stress oxydant.

Le stress oxydant étant impliqué dans le développement de différentes pathologies, telles que l'athérosclérose, l'hypertension, les maladies neurodégénératives, etc., fait que la recherche dans ce domaine est en constante évolution. Par conséquent, les chercheurs se focalisent de plus en plus sur de nouvelles stratégies afin de limiter les effets nocifs de ce phénomène sur l'organisme. Une de ces stratégies consiste à renforcer en particulier le système de défense endogène par l'administration d'antioxydants naturels ou synthétiques.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont consisté à poursuivre cette thématique en développant de nouvelles nitrones, composés très connus pour leur capacité antiradicalaires, utilisables comme sondes pour l'évaluation du stress oxydant ainsi que comme agents thérapeutiques dans des systèmes biologiques.

Afin d'atteindre les objectifs, nous avons suivi deux axes principaux en développant deux différentes classes de nouvelles nitrones.

La première partie du travail a concerné le développement d'une nouvelle série de nitrones  $\beta$ -phosphorylées (PPNs) dérivées de la PBN. Dernièrement, on a assisté à un développement important des applications thérapeutiques de certaines nitrones de la famille PBNs, avec de possibles retombées pour l'industrie pharmaceutique.

Dans cette perspective, le but de ce travail a été de tirer parti de l'effet stabilisateur du groupement diéthoxyphosphoryle en position beta sur la persistance des adduits et de développer ainsi de nouvelles nitrones contenant un fragment phénolique tel que celui que l'on retrouve dans certains antioxydants naturels. L'objectif de cette première partie est d'évaluer l'effet de la synergie entre le caractère antioxydant du groupement phénolique et la capacité de la fonction nitroène à piéger les radicaux dans un modèle cellulaire du stress oxydant. Nous nous sommes intéressés également à la propriété de donneurs de  $\text{NO}^\bullet$  de ces molécules, et nous avons examiné leur impact pharmacologique dans un modèle d'endothélium aortique dans lequel  $\text{NO}^\bullet$  a un rôle prépondérant.

Des PPNs substituées avec des groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs sur le cycle aromatique ont également été synthétisées afin de moduler l'électrophilie sur le carbone de la fonction nitroène et d'évaluer ainsi l'influence des effets électroniques des substituants sur les caractéristiques du piégeage.

La deuxième partie du projet a été orientée sur la vectorisation de certaines des nitrones synthétisées dans la première partie du travail, dans l'optique d'améliorer leur biodisponibilité en leur assurant un meilleur ciblage.

La cible choisie est la mitochondrie en tant que principale source endogène de production de radicaux libres au niveau biologique. La vectorisation de composés avec activité antiradicalaire, capables de cibler de manière spécifique la mitochondrie, permet de neutraliser les radicaux libres directement à partir de la source avant qu'ils ne réagissent avec d'autres molécules. La capacité à piéger les radicaux libres de cette série de nitrones sera évaluée par une étude RPE, ce qui permettra de choisir les plus intéressantes pour les tester dans un modèle biologique.

Le manuscrit se développe sur 5 chapitres et une partie expérimentale.

Le premier chapitre de ce manuscrit s'articule autour d'un exposé bibliographique qui présente les différentes techniques de synthèse des nitrones développées au cours des années, ainsi que les avancées scientifiques concernant leur utilisation comme piégeurs des radicaux pour la détection RPE et comme agents thérapeutiques.

Le second chapitre présente le développement de la synthèse de la première classe des PPNs, contenant un groupement aromatique polysubstitué avec des fonctions antioxydantes ou avec effet électronique.

Le troisième chapitre détaille les stratégies de synthèses utilisées pour l'obtention de la seconde classe de nouvelles nitrones vectorisées pour le ciblage mitochondrial. Il est divisé en deux sous-parties: la première expose une étude bibliographique sur les stratégies de ciblage mitochondrial et sur les différents composés décrits dans la littérature, la seconde partie concerne le développement de la synthèse de nouvelles sondes mitochondriales.

Le quatrième chapitre consiste en l'étude RPE de toutes les nitrones synthétisées. Les résultats obtenus lors de l'étude du piégeage de plusieurs radicaux libres d'intérêts biologiques (tels que  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ , plusieurs types de radicaux centrés sur le carbone etc.) sont discutés dans ce chapitre.

Le cinquième chapitre expose les résultats concernant la partie biologique de ce travail. Les tests antioxydants effectués sur les nitrones sont expliqués et les résultats commentés. Ensuite, une discussion sur l'application *ex vivo* des composés ayant montré les caractéristiques les plus intéressantes est développée.

Enfin, une partie expérimentale est décrite afin de récapituler tous les réactifs et les méthodes utilisées tout au long de ce travail.





# SOMMAIRE

## CHAPITRE 1

### **LES NITRONES : GENERALITES**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 VOIES GENERALES DE SYNTHÈSE DES NITRONES</b>	<b>3</b>
1.1.1 METHODES OXYDATIVES	3
1.1.1.1 Oxydation d'imines	3
1.1.1.2 Oxydation d'amines secondaires	7
1.1.1.3 Oxydation des hydroxylamines <i>N,N</i> -disubstituées	11
1.1.2 METHODES NON-OXYDATIVES	12
1.1.2.1 Condensation entre une hydroxylamine <i>N</i> -monosubstituée et un dérivé carbonylé	12
1.1.2.2 <i>N</i> -alkylation d'oximes	14
<b>1.2 APPLICATIONS NON SYNTHETIQUES DES NITRONES</b>	<b>15</b>
1.2.1 GENERALITES : RPE ET SPIN TRAPPING	15
1.2.1.1 Principe de la RPE	16
1.2.1.2 Principe du piégeage des radicaux libres (spin trapping)	16
1.2.1.3 Considérations cinétiques sur le caractère informatif du spin trapping	19
1.2.1.4 Design de nitrones adaptées au spin trapping biologique	22
1.2.2 NITRONES ADAPTEES AU PIEGEAGE DU RADICAL SUPEROXYDE	31
1.2.2.1 Spin trapping de $O_2^{\bullet-}$ dans les familles DMPO et PBN	31
1.2.2.2 Stabilisation des adduits superoxyde par introduction de groupes électron attracteurs en position $\beta$ d'une nitrone cyclique	33
1.2.2.3 Stabilisation des adduits superoxyde sur les dérivés $\beta$ -phosphorylés de la PBN	42
<b>1.3 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES PBNS</b>	<b>45</b>
1.3.1 ASPECTS THERAPEUTIQUES DES PBNS	45
1.3.2 DECOMPOSITION SPONTANEE DES PBNS LIBERANT NO	47

## CHAPITRE 2

### **NOUVELLES NITRONES HYBRIDES DERIVEES DE LA PPN**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>51</b>
<b>2.1 OBJECTIFS</b>	<b>52</b>
2.1.1 EFFET ANTIOXYDANT DES COMPOSES MONO-PHENOLIQUES	53

2.1.2	EFFETS ELECTRONIQUES DES SUBSTITUANTS D'UN CYCLE AROMATIQUE	58
<b>2.2</b>	<b>SYNTHESE DE NOUVELLES PPNS</b>	<b>59</b>
2.2.1	PPNS POSSEDANT UN MOTIF ANTIOXYDANT DE TYPE PHENOLIQUE	65
2.2.2	NITRONES SUBSTITUEES PAR UN GROUPEMENT DONNEUR OU ATTRACTEUR D'ELECTRONS	68

## **CHAPITRE 3**

### **NOUVELLES NITRONES CIBLANT LA MITOCHONDRIE**

---

<b>3.1</b>	<b>OBJECTIFS</b>	<b>77</b>
<b>3.2</b>	<b>METHODES POUR LE CIBLAGE MITOCHONDRIAL : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>78</b>
3.2.1	CATIONS LIPOPHILES	79
3.2.1.1	Composés antioxydants vectorisés avec le cation triphénylphosphonium	81
3.2.1.2	Nitroxydes vectorisés avec le cation TPP	85
3.2.2	VECTEURS DE TYPE PEPTIDIQUE	88
<b>3.3</b>	<b>NITRONES VECTORISEES PAR LE CATION TPP</b>	<b>91</b>
<b>3.4</b>	<b>SYNTHESE DE NOUVELLES NITRONES CIBLANT LA MITOCHONDRIE</b>	<b>95</b>
3.4.1	ANALYSE RETROSYNTHETIQUE	97
3.4.2	CHOIX DE LA VOIE DE SYNTHESE	98
3.4.3	SYNTHESES EN UTILISANT LA VOIE B	106
3.4.3.1	Synthèse des différents intermédiaires TPP	107
3.4.3.2	Synthèse de nouvelles nitrones vectorisées à longueurs de chaînes variables	110
3.4.3.3	Synthèse de nouvelles nitrones vectorisées en position méta	120

## **CHAPITRE 4**

### **CARACTERISATION RPE DES ADDUITS NITROXYDES PAR LA TECHNIQUE DE SPIN-TRAPPING**

---

<b>INTRODUCTION</b>	<b>127</b>	
<b>4.1</b>	<b>PRODUCTION <i>IN VITRO</i> DES ADDUITS</b>	<b>128</b>
<b>4.2</b>	<b>RESULTATS DU PIEGEAGE PAR LES NOUVELLES PPNS HYBRIDES</b>	<b>131</b>
4.2.1	PIEAGE DES RADICAUX CENTRE SUR LE CARBONE ( $\bullet\text{CH}_3$ , $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ , $\text{CH}_3\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ , $\bullet\text{CO}_2$ )	131
4.2.2	PIEAGE DES RADICAUX CENTRE SUR L'OXYGENE ( $\text{O}_2\bullet^-$ , $\bullet\text{OH}$ , $\bullet\text{OR}$ )	138
4.2.3	AUTRE RADICAUX ( $\bullet\text{N}_3$ , $\text{SO}_3\bullet^-$ , $\text{H}\bullet$ )	143
<b>4.3</b>	<b>RESULTATS DU PIEGEAGE PAR LES DERIVES DE PPN VECTORISEES POUR LA MITOCHONDRIE (MITO-PPNs)</b>	<b>146</b>
<b>4.4</b>	<b>EVALUATION DU NIVEAU DE CONSERVATION DES ADDUITS METHYLE AND METHOXY DANS L'AZOTE LIQUIDE</b>	<b>156</b>
<b>4.5</b>	<b>DETECTION D'OXYDE NITRIQUE LIBERE LORS DE L'HYDROLYSE PHOTOLYTIQUE DE DERIVES PPN</b>	<b>158</b>

4.5.1	METHODE RPE POUR LA DETECTION NO <sup>•</sup>	158
4.5.2	NO <sup>•</sup> LIBERE PAR LES NITRONES DE TYPE PPN	161

## **CHAPITRE 5**

### **EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES PPNS ET ETUDE DE L'EFFET PROTECTEUR DANS UN MODELE D'ENDOTHELIUM AORTIQUE**

---

<b>5.1</b>	<b>MESURE DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE DES NOUVELLES NITRONES</b>	<b>169</b>
5.1.1	MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT PAR LE TEST DPPH	170
5.1.2	MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT PAR LES TESTS TRAP ET ORAC	171
5.1.2.1	Principe du test TRAP	172
5.1.2.2	Principe du test ORAC	173
5.1.3	MESURE DU POUVOIR ANTIOXYDANT PAR L'INHIBITION DE LA XANTHINE OXYDASE ET DU QUENCHING DU SUPEROXYDE	175
5.1.3.1	Principe du test d'inhibition de la xanthine oxydase	175
5.1.3.2	Principe du test du quenching du superoxyde	176
5.1.4	INTERPRETATION DES RESULTATS	178
<b>5.2</b>	<b>EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE</b>	<b>183</b>
5.2.1	TEST MTT	184
5.2.2	TEST DE LA LACTATE DESHYDROGENASE (LDH)	185
5.2.3	INTERPRETATION DES RESULTATS	185
<b>5.3</b>	<b>EVALUATION DE L'ACTIVITE PROTECTRICE ET VASORELAXANTE DANS UN MODELE D'ENDOTHELIUM AORTIQUE</b>	<b>187</b>
5.3.1	EFFET VASORELAXANT DES NITRONES	187
5.3.2	EFFET PROTECTEUR DES NITRONES EN PRESENCE DE STRESS OXYDANT	189

### **CONCLUSION GENERAL**

---

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

---

<b>I.</b>	<b>SYNTHESE ET CARACTERISATION DE PRODUITS</b>	<b>201</b>
I.1	MATERIELS ET METHODES	201
I.2	MODE OPERATOIRE ET CARACTERISATION	202
<b>II.</b>	<b>PARTIE RPE</b>	<b>237</b>
II.1	FORMATION DES ADDUITS DE PIEGEAGE DETECTES PAR RPE (TECHNIQUE DU SPIN-TRAPPING)	237
II.2	CONSERVATION DES ADDUITS METHYLE ET METHOXY DANS L'AZOTE LIQUIDE	240
II.3	DETECTION DU NO LIBERE PAR LES NITRONES	241

<b>III. PARTIE BIOLOGIQUE</b>	<b>243</b>
III.1 TESTS ANTIOXYDANTS	243
III.1.1 Protocole expérimental du test DPPH	243
III.1.2 Protocole expérimental du test TRAP	244
III.1.3 Protocole expérimental du test ORAC-FL	245
III.1.4 Protocole expérimental du test d'inhibition de la xanthine oxydase	246
III.1.5 Protocole expérimental du test du quenching du superoxyde	247
III.2 CULTURES CELLULAIRES ET TESTS DE CYTOTOXICITE	248
III.2.1 Protocole de mise en culture et exposition des cellules A549	249
III.2.2 Protocole du test MTT	250
III.2.3 Protocole du test de LDH	251
III.3 EVALUATION DES EFFETS VASCULAIRE ET PROTECTEUR DANS DES ANNEAUX AORTIQUES	251
III.3.1 Mesure de la vasorelaxation des anneaux aortiques	251
III.3.2 Evaluation de la protection contre le superoxyde	252

## **ANNEXES**

---

<b>ANNEXE 1: THEORIE RPE</b>	<b>255</b>
------------------------------	------------

---

<b>ANNEXE 2: RELATION DE HELLER-MCCONNELL</b>	<b>261</b>
---	------------

---

# CHAPITRE I

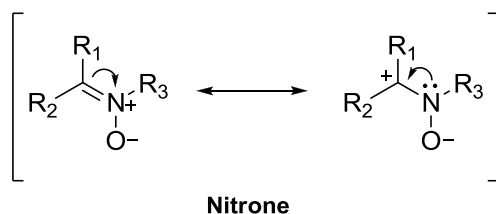
Les nitrones : généralités



## Introduction

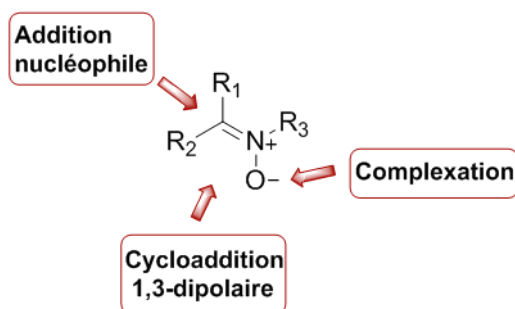
Les nitrones sont des composés caractérisés par la présence d'une fonction du type -X-CH=NO-Y, comportant une double liaison carbone-azote et une liaison covalente entre l'azote et l'oxygène. La première description de composés ayant la fonction nitrone C=N(+)-O(-) remonte à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. La présence simultanée, dans la même molécule, d'un atome d'oxygène chargé négativement et d'une double liaison carbone-azote polarisée confère à ces composés un caractère soit nucléophile, soit électrophile.

La structure électronique de la fonction nitrone rappelle celle des anions allyliques et des énols. Comme ces derniers, elles sont stabilisées par résonance (Schéma 1).



**Schéma 1** : Formes de résonance de la fonction nitroène

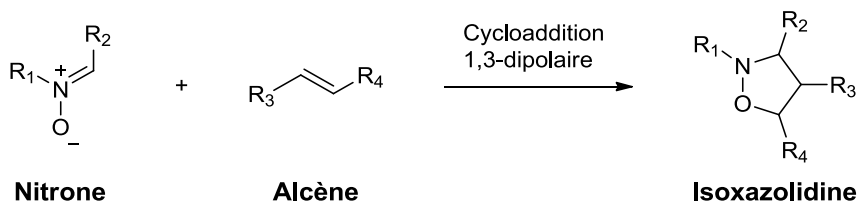
Cette structure confère ainsi aux nitrones à la fois la réactivité des 1,3-dipôles, mais aussi celle des composés électrophiles de type imines caractérisés par la présence d'une double liaison C=N<sup>1</sup>. Le Schéma 2 visualise les sites réactifs de la fonction nitroène, en rappelant que la charge négative portée par l'oxygène peut donner lieu à des réactions de chélation sur des métaux. Cette dernière propriété a une importance essentielle dans l'utilisation des nitrones en tant que piègeurs de spin dans les milieux biologiques (*vide infra*).



**Schéma 2** : Sites réactifs de la nitroène

<sup>1</sup>(a) Gothlief, K. V.; Jorgensen, A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863–909. (b) Merino, P.; C. R. *Chimie* **2005**, *8*, 775–788.

Le fort caractère 1,3-dipolaire des nitrones permet de les utiliser dans de nombreuses réactions de cycloaddition (un exemple est donné dans le Schéma 3). Ce type de réactions constitue une importante voie d'accès aux composés azotés fonctionnalisés, ce qui entraîne une utilisation fréquente des nitrones pour la synthèse d'espèces à activité biologique telles que des antibiotiques  $\beta$ -lactames<sup>2</sup>, des antimycosiques<sup>3</sup>, des analogues de nucléosides<sup>4</sup> ou de sucres<sup>5</sup>, ou encore des alcaloïdes<sup>6</sup>.



**Schéma 3:** Cycloaddition 1,3-dipolaire entre une nitronne et un alcène

La propriété chimique la plus remarquable des nitrones est leur aptitude à réagir avec les radicaux libres, pour former une nouvelle espèce radicalaire de persistance accrue (on parle alors de piégeage), telle qu'elle permet une détection par **Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)**. Diffusé à la fin des années 1960<sup>7</sup>, le piégeage des radicaux libres (*spin trapping*) a été à l'origine de nombreuses avancées dans les connaissances de la structure et de la réactivité des radicaux libres<sup>8</sup>. A partir de la fin des années 1970, l'utilisation du **couplage spin trapping/RPE (ST-RPE)** a permis des progrès décisifs dans la compréhension des divers processus radicalaires, normaux ou pathologiques intervenant dans les milieux biologiques, ce qui a motivé le développement intensif de nitrones spécifiques pour ce type d'applications<sup>9</sup>. Les aspects principaux du couplage ST-RPE seront présentés au § 1.2. Dans ce qui suit, nous rappelons les principales voies synthétiques d'accès aux nitrones.

<sup>2</sup> Michalak, M.; Stodulski, M.; Stecko, S.; Woznica, M.; Staszewska-Krajewska, O.; Kalicki, P.; Furman, B.; Frelek, J.; Chmielewski, M. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 10806–10817.

<sup>3</sup> Aggarwal, V. K.; Roseblade, S. J.; Barrell, J. K.; Alexander, R. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1227–1229.

<sup>4</sup> Romeo, G.; Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Merino, P. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3337–3370.

<sup>5</sup> Oukani, H.; Pellegrini-Moise, N.; Jackowski, O.; Chrétien, F.; Chapleur, Y. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 205–214.

<sup>6</sup> Brandi, A.; Cardona, F.; Cicchi, S.; Cordero, F. M.; Goti, A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7808–7821.

<sup>7</sup> Janzen, E. G. *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 31–40.

<sup>8</sup> (a) Wahl, R. U. R.; Zeng, L.; Madison, S. A.; DePinto, R. L.; Shay, B. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2009–2017. (b) Hawkins, C. L.; Davies, M. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 1937–1945.

<sup>9</sup> Rosen, G. M.; Finkelstein, E. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* **1985**, *1*, 345–375.



## 1.1 Voies générales de synthèse des nitrones

La synthèse de nitrones a donné lieu à plusieurs revues<sup>10</sup>; deux stratégies de synthèse sont généralement mises en œuvre: les méthodes oxydatives, généralement à partir de composés aminés, et les méthodes qui n'impliquent pas d'oxydation. L'accessibilité du composé précurseur est l'élément principal pour choisir l'une de ces méthodes.

### 1.1.1 Méthodes oxydatives

Des nombreuses méthodes utilisées pour la synthèse de nitrones sont basées sur l'oxydation de composés aminés. Les produits précurseurs les plus utilisés sont les imines, les amines secondaires et les hydroxylamines (Schéma 4).

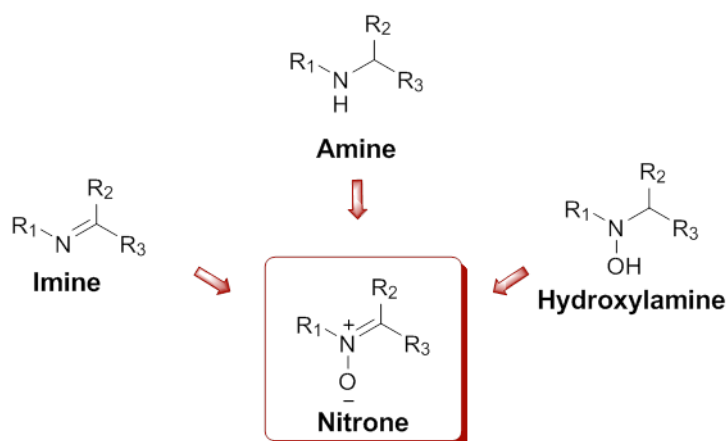
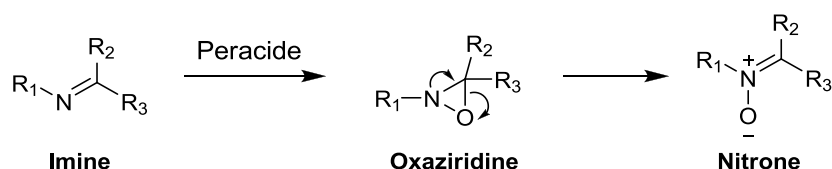


Schéma 4 : Précurseurs de nitrones par voie oxydative

#### 1.1.1.1 Oxydation d'imines

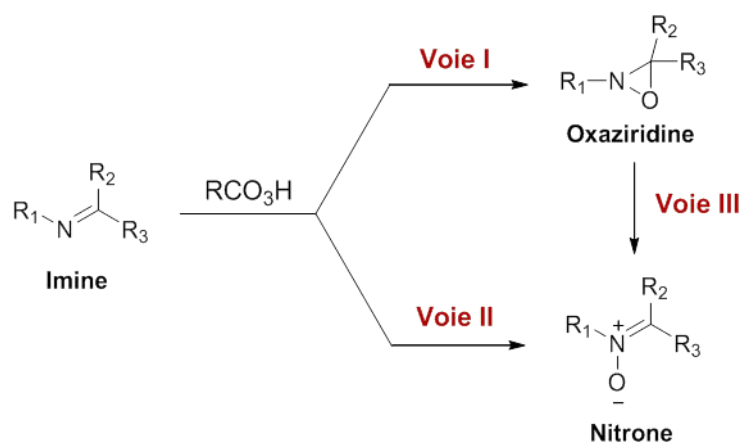
La manière la plus immédiate pour oxyder les imines est l'utilisation de **peracides**  $\text{RCO}_3\text{H}$ , notamment l'acide *meta*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA;  $\text{R} = 3\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$ ). Cette réaction conduit très souvent à des oxaziridines pouvant subir un réarrangement pour donner la nitroxe correspondante (Schéma 5).

<sup>10</sup>(a) Hamer, J.; Macaluso, A. *Chem Rev.* 1964, 64, 473-495. (b) Delpierre, G. R.; Lamchen, M. Q. *Quart. Rev.* 1965, 19, 329-348. (c) Grigor'ev, I. A. In *Nitrile Oxides, Nitrones, and Nitronates in Organic Synthesis. Novel Strategies in Synthesis*; 2nd edition, Feuer H., Ed Wiley, 2008 pp. 129-435 et références citées.



**Schéma 5 :** Mécanisme général de la formation d'une nitronne à partir d'une imine

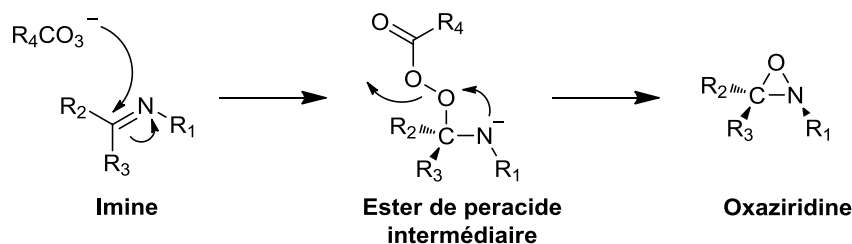
Le mécanisme d'oxydation des imines par un peracide procède généralement via la formation primaire d'une oxaziridine<sup>11</sup> (Schéma 6, voie I), la formation directe de la nitronne n'ayant lieu que dans une minorité de cas (Schéma 6, voie II).



**Schéma 6 :** Produits obtenus lors de l'oxydation d'une imine par un peracide

### Voie I

Le mécanisme de la formation de l'oxaziridine a lieu en deux étapes : la première étape implique l'attaque nucléophile du peracide sur l'atome de carbone iminique qui conduit ensuite à une cyclisation intramoléculaire (Schéma 7)<sup>12</sup>. Il a été démontré que cette voie est particulièrement favorisée quand le carbone est substitué par un groupement alkyle.



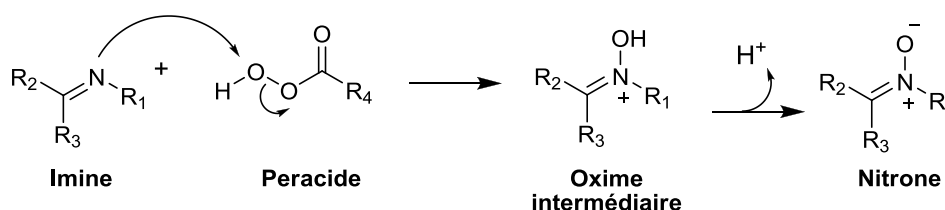
**Schéma 7 :** Mécanisme de l'attaque du peracide sur le carbone de l'imine

<sup>11</sup>Boyd, D. R.; Coulter, P. B.; Sharma, N. D.; Jennings, W. B.; Wilson, V. E. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1673–1676.

<sup>12</sup>Boyd, D. R.; Coulter, P. B.; McGuckin, M. R.; Sharma, N. D.; Jennings, W. B.; Wilson, V. E. *J. Chem. Soc., Perkins Trans* **1990**, 301–307.

**Voie II**

La formation des nitrones se produit suite à l'attaque nucléophile de l'azote sur le peracide<sup>13</sup>. Généralement, la présence de groupements électron-donneurs sur les composés carbonylés augmente la nucléophilie de l'azote et permet de favoriser la formation de la nitrone (Schéma 6, voie II). Cette voie est également favorisée quand une gêne stérique empêche l'attaque sur le carbone iminique. De ce fait, le peracide réagit avec l'atome le plus disponible, à savoir l'azote (Schéma 8)<sup>14</sup>.



**Schéma 8** : Mécanisme de l'attaque nucléophile de l'azote sur un peracide

**Voie III**

Une autre voie d'obtention de la nitrone est l'ouverture du cycle de l'oxaziridine formée *via* l'oxydation de l'imine soit avec un peracide soit avec d'autres types d'oxydants comme l'**oxone** KOSO<sub>2</sub>OOH<sup>15</sup>. L'ouverture du cycle et la libération de la fonction nitrone à partir de l'oxaziridine (Schéma 6, Voie III) est rarement spontanée. Elle est très souvent activée par un traitement thermique, photochimique ou catalysée par des acides<sup>16</sup>.

D'autres réactifs permettent d'oxyder directement les imines en nitrone sans passer par la formation de l'oxaziridine intermédiaire. Il s'agit de l'oxydation par le **dimethyldioxirane** (DMD; C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)<sup>12</sup>, de l'oxydation avec l'ion permanganate <sup>17</sup>(MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>) ou encore de l'oxydation photochimique<sup>18</sup>.

L'oxydation par l'ion permanganate est réalisée dans un mélange DCM-H<sub>2</sub>O en condition de transfert de phase<sup>19</sup> et se produit selon deux voies différentes (Schéma 9). La voie I, montre la formation de l'intermédiaire 1 avec une cycloaddition [3+2] de l'imine avec deux oxygènes du ligand MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>; cet intermédiaire peut donner la nitrone

<sup>13</sup>Ogata, Y.; Sawaki, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4692–4698.

<sup>14</sup>Christensen, D. J.; Jorgensen, K. A.; Hazell, R. G. *J. Chem. Soc., Perkins Trans 1* **1990**, 2391–2397.

<sup>15</sup>Thomas, C. E.; Bernardelli, P.; Bowen, S. M.; Chaney, S. F.; Friedrich, D.; Janowick, D. A.; Jones, B. K.; Keeley, F. J.; Kehne, J. H.; Ketteler, B.; Ohlweiler, D. F.; Paquette, L. A.; Robke, D. J.; Fevig, T. L. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4997–5004.

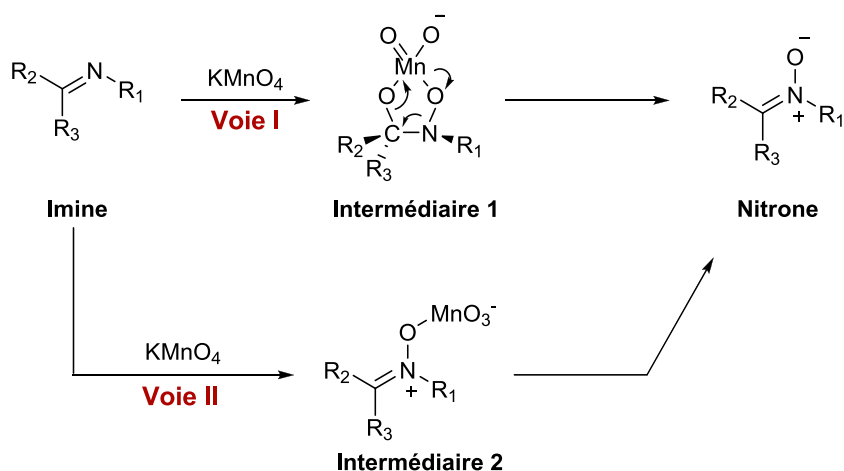
<sup>16</sup>Lin, Y. M.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8282–8285.

<sup>17</sup>Larsen, J.; Jorgensen, K. A.; Christensen, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1991**, 1187–1190.

<sup>18</sup>Somasundaram, N.; Srinivman, C. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3547–3550.

<sup>19</sup>Christensen, D.; Joergensen, K. A. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 126–131.

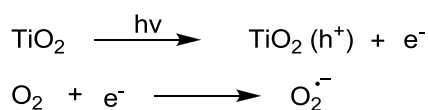
suite à la coupure de la liaison carbone-oxygène et de celle entre l'atome de manganèse et l'atome d'oxygène lié à l'azote.



**Schéma 9** : Oxydation des imines en présence de  $\text{KMnO}_4$

L'autre chemin réactionnel passe par la formation de l'intermédiaire 2 (voie II). Dans ce cas, le doublet électronique de l'azote attaque un des oxygènes de l'ion permanganate. La nitron résulte de la coupure de la liaison Mn-O.

L'oxydation photochimique concerne les aldimines et l'utilisation de  $\text{TiO}_2$  dans l'acétonitrile en présence d'oxygène<sup>18</sup>. L'irradiation du  $\text{TiO}_2$  génère l'excitation d'un électron dans la bande de conduction (BC) et en conséquence un trou électronique dans la bande de valence (BV)<sup>20</sup>. En présence d'oxygène, la formation du **radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )** suite au piégeage de l'électron dans la BC est observée (Schéma 10).



**Schéma 10** : Réduction du dioxygène en radical superoxyde par  $\text{TiO}_2$

L'imine réagit avec le  $\text{TiO}_2(h^+)$  en défaut d'électron et le résultat est la formation d'un radical imine. Ce radical réagit ensuite avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pour donner un intermédiaire radicalaire. A ce moment, une autre molécule d'imine réagit avec l'intermédiaire et

<sup>20</sup>Augugliaro, V.; Bellardita, M.; Loddo, V.; Palmisano, G.; Palmisano, L.; Yurdakalb, S. J. *Photochem. Photobiol. C. Photochem. Rev.* **2012**, *13*, 224–245

après un réarrangement, deux molécules de nitronne sont formées. Le chemin réactionnel est résumé dans le Schéma 11.

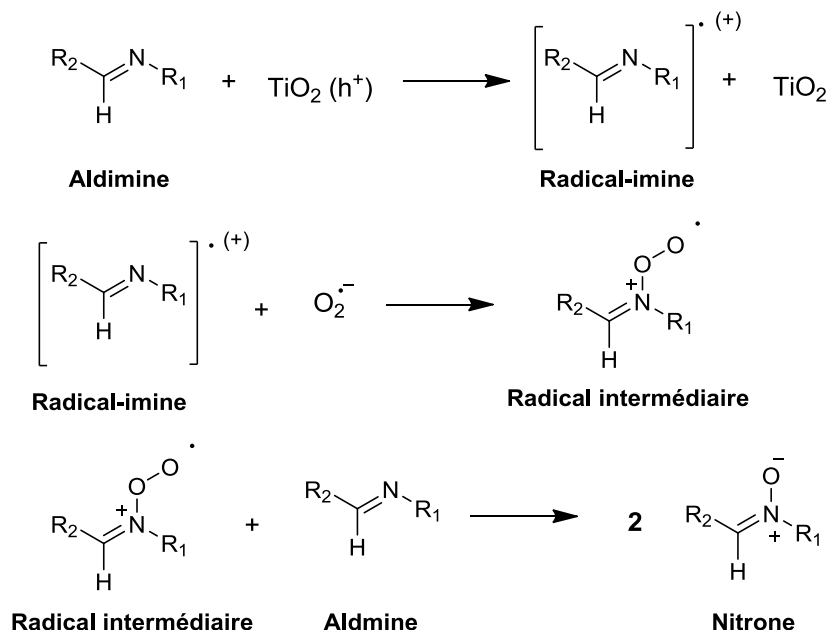


Schéma 11 : Mécanisme de l'oxydation photochimique des imines

Plus récemment, une méthode d'oxydation quantitative des imines par le **peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** a été décrite, utilisant le methyltrioxorhenium comme catalyseur<sup>21</sup>.

### 1.1.1.2 Oxydation d'amines secondaires

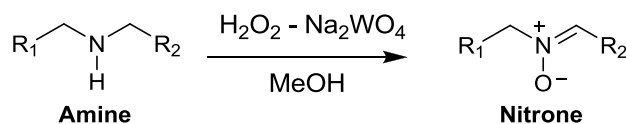
L'oxydation d'amines secondaires est la méthode de préparation des nitrones la plus utilisée<sup>22</sup>, la réaction débutant par la réduction de l'imine correspondante lorsque l'amine n'est pas disponible.

L'agent oxydant habituellement utilisé est H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution à 30 % en présence d'un catalyseur métallique (Mo(VI), W(VI)) ou SeO<sub>2</sub>. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le tungstate de sodium avec des rendements allant jusqu'à 95 %<sup>23</sup> (Schéma 12).

<sup>21</sup>Soldaini, G.; Cardona, F.; Goti, A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 473–476.

<sup>22</sup>Katritzky, A. R.; Cui, X.; Long, Q.; Yang, B.; Wilcox, A. L.; Zhang, Y. K. *Org. Prep. Proced. Int.* **2000**, *35*, 175–183.

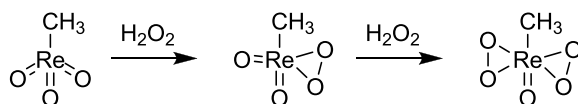
<sup>23</sup>(a) Mitsui, H.; Zenki, S.; Shiota, T.; Murahashi, S. I. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 874–875. (b) Murahashi, S. I.; Mitsui, H.; Shiota, T.; Tsuda, T.; Watanabe, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1736–1744.



**Schéma 12** : Oxydation des amines secondaires catalysée par  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (d'après Mitsui et al.)<sup>23a</sup>

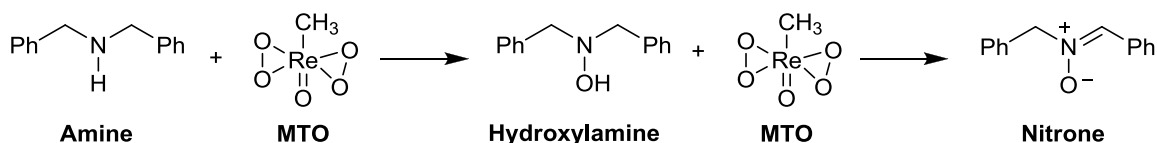
Une alternative à l'emploi de  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrée est l'utilisation de peroxyde d'hydrogène complexé à une base comme dans le cas de l'**UHP** (complexe **Urée-Peroxyde d'Hydrogène**), toujours en présence d'un catalyseur métallique. Tout comme dans la méthode générale, les meilleurs résultats ont été obtenus avec  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ <sup>24</sup>.

L'oxydation des amines secondaires, avec de bons rendements, peut aussi être réalisée avec le système methyltrioxorhénium-peroxyde d'hydrogène (**MTO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**). Le MTO en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  donne deux adduits (Schéma 13) montrant un comportement chimique similaire à celui du DMD<sup>25</sup>.



**Schéma 13** : Adduits du MTO en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$

L'hydroxylamine est le premier produit d'oxydation de la réaction. La deuxième forme oxydée correspond à la nitronne (Schéma 14).



**Schéma 14** : Mécanisme d'oxydation des amines secondaires par le MTO (d'après Murray et Iyanar)<sup>25</sup>

Le système MTO fonctionne, avec de bons rendements, même quand le complexe UHP est utilisé comme source de  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>26</sup>.

Par ailleurs, l'application du MTO à l'oxydation des composés aminés a permis de développer une méthode oxydative impliquant l'utilisation de l'oxygène moléculaire

<sup>24</sup>Marcantoni, E.; Petrini, M.; Polimanti, O. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3561–3562.

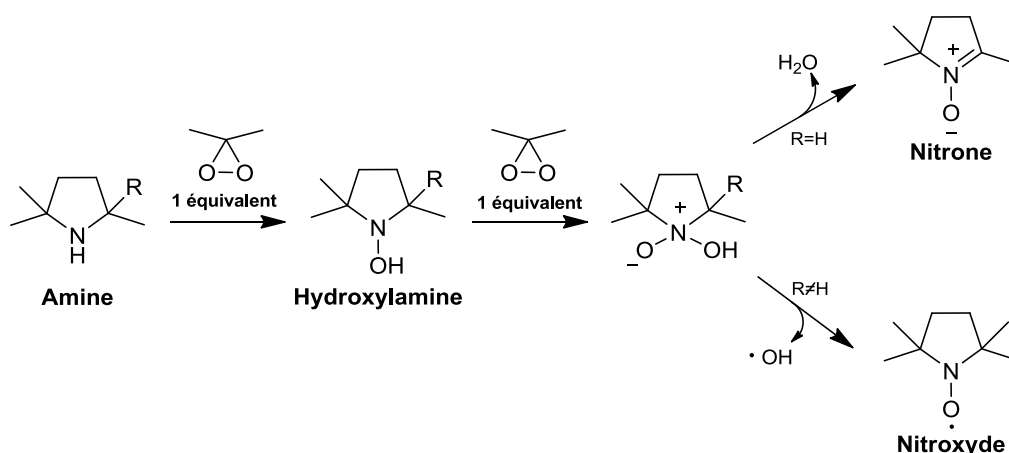
<sup>25</sup>Murray, R. W.; Iyanar, K. J. *Org. Chem.* **1996**, *61*, 8099–8102.

<sup>26</sup>Goti A.; Nannelli, L. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6025–6028.

au lieu de  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>27</sup>. Le système MTO/ $\text{O}_2$  permet de convertir assez rapidement les amines secondaires en nitrones correspondantes avec des rendements proches de 100%.

D'autres oxydants permettent d'oxyder les amines secondaires sans utiliser de métaux : le DMD, le réactif de Davis et l'oxone.

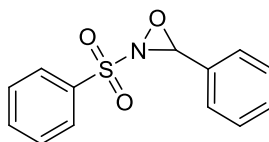
Le DMD est un oxydant, généralement, préparé *in situ* à partir d'un mélange d'oxone et d'acétone<sup>28</sup>. Pour obtenir la forme nitrone, il est nécessaire que l'amine secondaire possède un hydrogène en position  $\alpha$ . Dans le cas contraire, le produit d'oxydation sera un radical nitroxyde<sup>29</sup> (Schéma 15).



**Schéma 15** : Mécanisme d'oxydation des amines secondaires par le DMD (d'après Murray)<sup>29</sup>

L'utilisation d'une quantité équimolaire d'amine et de DMD conduit à l'hydroxylamine. En revanche, avec l'utilisation de deux équivalents de DMD, la réaction se poursuit jusqu'à la formation de la nitrone.

Une autre type d'oxydant hétérocyclique, le 2-phénylsulfonyl-3-phényloxaziridine (**Réactif de Davis** ; Figure 1) est souvent utilisé pour obtenir les nitrones à partir d'amines secondaires.



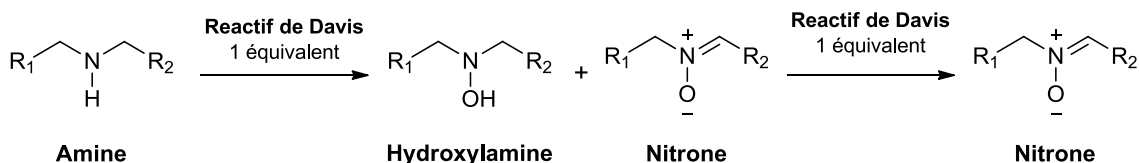
**Figure 1** : Réactif de Davis

<sup>27</sup>Sharma, V. B.; Jain, S. L.; Sain, B. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3235–3237.

<sup>28</sup>Murray, R. W.; Singh, M. J. *Org. Chem.* **1990**, *55*, 2954–2957.

<sup>29</sup>Murray R. W. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1187–1201.

Le mécanisme réactionnel (Schéma 16) est similaire à celui montré pour le DMD, et il est également nécessaire d'utiliser deux équivalents d'oxydant pour obtenir la nitrone (Table 1)<sup>30</sup>.



**Schéma 16** : Mécanisme de l'oxydation d'une amine secondaire par le réactif de Davis

**Table 1** : Oxydation d'amines par le réactif de Davis et comparaison des produits obtenus avec un équivalent et deux équivalents d'oxydants (d'après Davis)<sup>30b</sup>

Equivalents réactif de Davis	Produits (rendement %)		
	Amine	Hydroxylamine	Nitrone
1	(5%)	(70%)	(15%)
2	(0%)	(0%)	<b>(80%)</b>
1	(5%)	(65%)	(20%)
2	(0%)	(0%)	<b>(85%)</b>

A l'inverse du DMD qui n'est stable que quelques jours, le réactif de Davis peut se conserver<sup>31</sup>. Toutefois, le coût élevé de ce dernier limite son utilisation.

L'oxydation des amines secondaires en nitrones utilisant l'oxone nécessite de se placer en milieu basique<sup>32</sup>. Le principal intérêt de cette technique, simple à mettre en œuvre et peu coûteuse, est son caractère écologique (absence de métaux, de composé ou solvants halogénés souvent présents dans les autres méthodes). Par ailleurs, l'oxone

<sup>30</sup>(a) Zajac, W. W., Jr.; Walters T. R.; Darcy, M. G. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5856–5860. (b) Davis, F. A.; Sheppard, A. C. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5703–5742.

<sup>31</sup>Davis, A. F.; Lamendola, J., Jr.; Nadir, U.; Kluger, E. W.; Sedergran, T. C.; Panunto, T. W.; Billmers, R.; Jenkins, R., Jr.; Turchi, I. J.; Watson, W. H.; Chen, J. S.; Kimura, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2000–2005.

<sup>32</sup>Gella, C.; Ferrer, E.; Alibés, R.; Busqué, F.; de March, P.; Figueredo, M.; Font, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6365–6367.

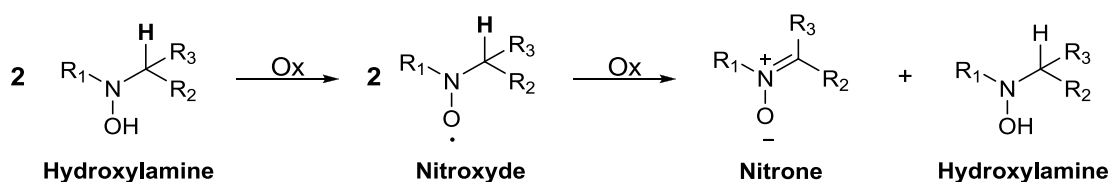


n'interagit pas avec les autres groupements présents sur la molécule et préserve les centres asymétriques<sup>32</sup>.

### 1.1.1.3 Oxydation des hydroxylamines *N,N*-disubstituées

L'oxydation d'une hydroxylamine en nitronne représente une méthode d'application simple et met généralement en œuvre des conditions douces. Parfois, l'air (oxygène) en présence d'un catalyseur est suffisant pour réaliser l'oxydation<sup>33</sup> et obtenir la nitronne correspondante.

La réaction procède via la formation primaire du radical nitroxyde correspondant, qui subit ensuite une réaction de dismutation en nitronne et hydroxylamine de départ, cette dernière étant de nouveau oxydée si l'oxydant est en excès<sup>10C</sup> (Schéma 17). La réaction de dismutation nécessite la présence d'au moins un hydrogène sur un carbone en  $\alpha$  de la fonction nitroxyde.



**Schéma 17** : Mécanisme général de l'oxydation d'une hydroxylamine en nitronne

Parmi les oxydants les plus utilisés dans cette réaction, l'oxyde mercurique (HgO) s'est révélé être un agent doux et sélectif. Cependant, sa toxicité aigüe et les quantités élevées nécessaires pour assurer l'oxydation complète, ont conduit à l'élaboration d'autres stratégies synthétiques. Le dioxyde de manganèse (MnO<sub>2</sub>)<sup>34</sup> est un substitut de choix de HgO pour l'oxydation des hydroxylamines. Sa sélectivité étant comparable à celle de HgO, MnO<sub>2</sub> présente l'avantage d'être moins toxique. Il existe aussi une version énantiosélective de cette réaction qui implique l'utilisation de complexes de Mn(III) avec des ligands chiraux<sup>35</sup>.

L'hypochlorite de sodium représente un autre système<sup>36</sup> écologique et peu coûteux (Schéma 18).

<sup>33</sup>Brown, R. F. C.; Clark, V. M.; Sutherland, I. O.; Todd, S. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1959**, 2109–2116.

<sup>34</sup>Chicchi, S.; Corsi, M.; Goti, A. *J. Org. Chem.* **2001**, *42*, 6503–6505.

<sup>35</sup>Chicchi, S.; Cardona, F.; Brandi, A.; Corsi, M.; Goti, A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1989–1992.

<sup>36</sup>Chicchi, S.; Corsi, M.; Goti, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7243–7245.

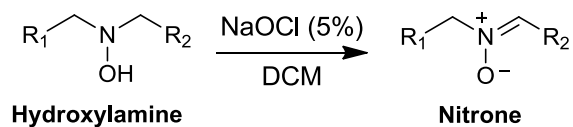


Schéma 18 : Oxydation des hydroxylamines par l'hypochlorite de sodium

La réaction conduite sur des hydroxylamines asymétriques montre une régiosélectivité qui varie de partielle (Table 2, composé c) à complète (Table 2, composé d).

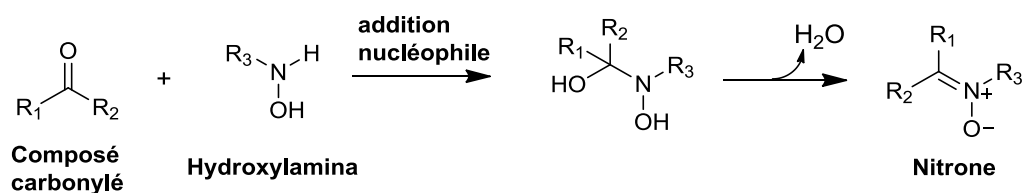
**Table 2:** Exemples de conversion d'hydroxylamines en nitrones et régiosélectivité (d'après Chicchi et al.)<sup>36</sup>

	Hydroxylamine	Produits	Rendement %
a			85
b			68
c			60 (1 : 1)
d			73

## 1.1.2 Méthodes non-oxydatives

### 1.1.2.1 Condensation entre une hydroxylamine *N*-monosubstituée et un dérivé carbonylé

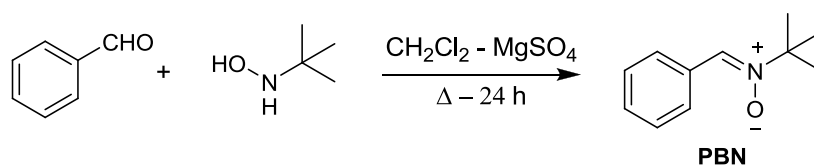
La réaction de condensation entre une hydroxylamine et un aldéhyde ou une cétone (Schéma 19) est une méthode très utilisée pour la synthèse des nitrones. Elle permet l'accès à une grande variété de nitrones grâce à la disponibilité d'un grand nombre de composés carbonylés aromatiques et aliphatiques différemment substitués.



**Schéma 19** : Réaction de condensation entre un composé carbonylé et une hydroxylamine

La réaction se fait plus facilement et avec de meilleurs rendements sur les aldéhydes que sur les cétones à cause d'un encombrement stérique mineur et de la différence d'électrophilie du carbone. Toutefois, la réactivité peut être augmentée en présence d'un agent desséchant ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , etc...) <sup>37</sup> ou d'un acide de Lewis <sup>38</sup>.

Cette méthode de synthèse est largement utilisée pour obtenir les nitrones linéaires comme la ***N-tert-butyl- $\alpha$ -phénylnitronne (PBN)*** <sup>39</sup> (Schéma 20) et tous ses dérivés diversement substitués.



**Schéma 20** : Synthèse de la PBN

Une méthode alternative fait intervenir des composés bi-fonctionnalisés comportant à la fois un groupement nitro et une fonction carbonyle. Cette réaction one-pot permet l'obtention de nitrones par la formation *in situ* de l'hydroxylamine suite à la réduction du groupement nitro et sa cyclisation intramoléculaire avec la fonction carbonyle. Cette réduction s'effectue en présence de Zn et d'un acide faible comme  $\text{NH}_4\text{Cl}$  <sup>40</sup> ou  $\text{AcOH}$  <sup>41</sup>. Les nitrones pyrroliniques comme la DMPO (*vide infra*) et ses dérivés <sup>42</sup> sont synthétisés en employant cette méthode (Schéma 21).

<sup>37</sup>Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, F.; Merchà, F.; Merino, P.; Tejero, T. *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2537–2550.

<sup>38</sup>Franco, S.; Merchà, F.; Merino, P.; Tejero, T. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 2275–2284.

<sup>39</sup>Hinton, R.; Janzen, E. G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2646–2651.

<sup>40</sup>Bonnett, R.; Brown, R. F. C.; Clark, V. M.; Sutherland, I. O.; Todd, A. J. *Chem. Soc.* **1959**, 2094–2102.

<sup>41</sup>Haire, D. L.; Hilborn, J. W.; Janzen, E. G. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4298–4300.

<sup>42</sup>Black, D. S.; Edwards, G. L.; Evans, R. H.; Keller, P. A.; Laaman, S. M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1889–1897.

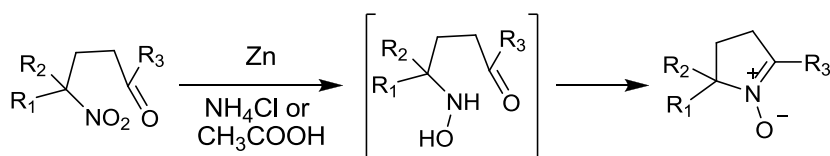


Schéma 21: Synthèse de la nitronne DMPO (d'après Black et al.)<sup>42</sup>

Bien que cette procédure puisse aussi conduire à la synthèse de nitrones linéaires<sup>43</sup> (Schéma22), elle reste généralement l'approche préférentielle pour la synthèse de nitrones cycliques.

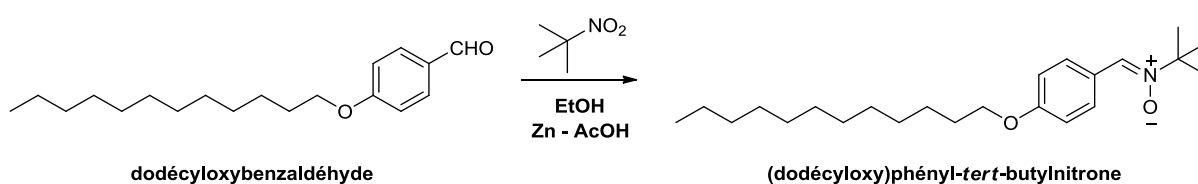


Schéma22 : Synthèse d'un dérivé lipophile de la PBN par formation *in situ* de l'hydroxylamine (d'après Huie et Cherry)<sup>43</sup>

### 1.1.2.2 N-alkylation d'oximes

La synthèse à partir des oximes est une autre voie permettant d'obtenir les nitrones sans l'utilisation d'oxydants. La réaction est une alkylation de l'atome d'azote de l'oxime avec des alcènes électrophiles activés par un groupement électron-attracteur. Cette méthode a peu d'intérêt car conduisant à la formation simultanée de produits d'O-alkylation qui sont difficilement séparables<sup>44</sup> (Schéma 23). La nature de l'oxime utilisée peut influencer la régiosélectivité de la réaction : les aldoximes favorisent la formation de la nitronne, alors que les cétoximes, pour des raisons stériques, favorisent l'O-alkylation.

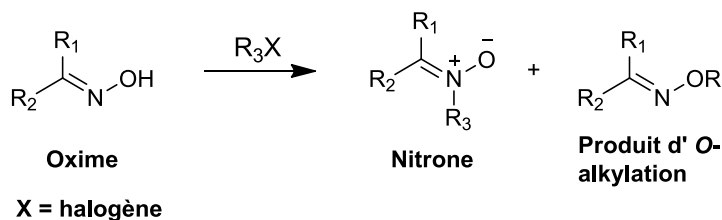
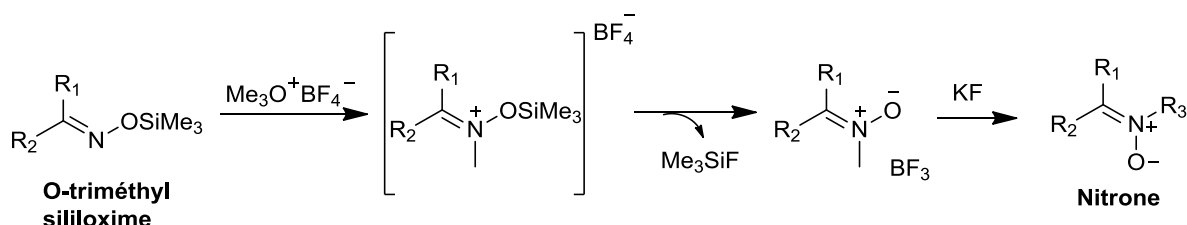


Schéma 23 : Produits dérivés de l'oxydation d'oxime

<sup>43</sup>Huie, R.; Cherry, W. R. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1531–1532.

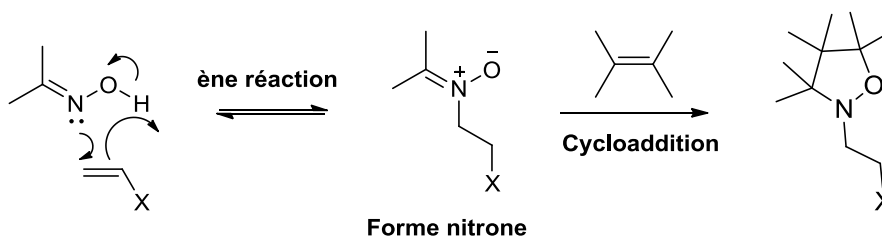
<sup>44</sup>Buehler, E. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 261–265.

Pour surmonter ce problème, il est possible de convertir les oximes en *O*-triméthylsilyloximes qui permettent d'obtenir facilement la nitrone correspondante grâce à l'utilisation de tétrafluoroborate de trialkyloxonium ou des triflates d'alkyle<sup>45</sup> (Schéma 24).



**Schéma 24:** Formation d'une nitrone à partir d'une *O*-triméthylsilyloxime (d'après LeBel et Balasubramanian)<sup>45</sup>

Malgré cette dernière possibilité, cette méthode n'est pas la plus utilisée pour la synthèse de nitrones. Elle est plutôt employée dans la réaction de Grigg<sup>46</sup> (Schéma 25) pour obtenir des structures cycliques suite à la formation intermédiaire de la nitrone qui agit comme un 1,3-dipôle.



**Schéma 25 :** Réaction de Grigg

## 1.2 Applications non synthétiques des nitrones

### 1.2.1 Généralités : RPE et Spin Trapping

En parallèle aux nombreuses applications synthétiques des nitrones que nous venons de résumer, la grande popularité de ces composés provient du fait que l'addition des radicaux libres préférentielle sur le carbone électrophile de la double liaison de la fonction nitrone conduit à de nouveaux radicaux persistants. Cette réaction ne cesse d'être exploitée sous le nom de **spin trapping (ST)** et le couplage ST-RPE a permis de grandes avancées dans la connaissance de la structure des radicaux libres, la maîtrise de leur réactivité et la découverte de leur rôle dans le métabolisme et certaines

<sup>45</sup>LeBel, N. A.; Balasubramanian, N. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4331–4334.

<sup>46</sup>Grigg, R.; Markandu, J.; Perrior, T.; Surendrakumar, S.; Warnock, W. J. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6929–6952.

pathologies. Depuis deux décennies, cette affinité des nitrones pour les radicaux libres a défini le champ d'applications thérapeutiques antioxydantes possibles pour certains de ces composés.

Dans ce qui suit, nous rappelons les principes de base de la RPE et du ST et décrivons ensuite les principales familles de nitrones utilisées dans cette technique. Un paragraphe traitera ensuite brièvement du champ d'application thérapeutique des nitrones linéaires.

### 1.2.1.1 Principe de la RPE

La RPE est la seule technique spectroscopique permettant de détecter et d'identifier les espèces chimiques ayant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires), tels que les radicaux libres ou certains complexes de métaux de transition. Le phénomène de RPE a été découvert à Kazan (URSS) par Zavoisky en 1945 lors de l'étude de cristaux paramagnétiques de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à 133 MHz<sup>47</sup>. Depuis cette date, les fondements théoriques, instrumentaux et les applications de la RPE dans un grand nombre de domaines de la physique et chimie radicalaires ont fait l'objet de nombreuses publications, monographies et ouvrages dont nous donnons quelques titres<sup>48</sup>. En Annexe 1, nous présentons quelques rappels sur la spectroscopie de RPE.

### 1.2.1.2 Principe du piégeage des radicaux libres (spin trapping)

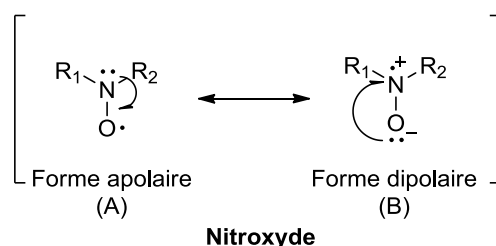
En raison de son électrophilie, le carbone de la fonction nitroène est l'un des sites privilégiés de l'addition des radicaux libres et le produit de cette réaction est un radical de type **nitroxyde** (ou *aminoxyle*). Nous avons vu que les radicaux nitroxyde sont des intermédiaires de l'oxydation des hydroxylamines (et aussi des amines secondaires) ou de la réduction des nitrones (Schéma 17). Les nitroxydes  $\text{R}_1\text{-N}(\text{O}^\bullet)\text{-R}_2$ , découverts au début du 20<sup>ème</sup> siècle, constituent la classe de radicaux libres la plus étudiée en raison de la grande variété des structures synthétisables et de la possibilité pour ces espèces de présenter une grande persistance en l'absence de possibilité de dismutation (Cf.

---

<sup>47</sup>Zavoisky, E. K.J. *Phys. USSR* **1945**,9, 211–216.

<sup>48</sup>Nous indiquons ici quelques ouvrages auxquels on pourra se référer: théorie (a) Hudson, A. in *Electron spin resonance, Specialistperiodical report*, Symons, M. C. R., Ed, Royal Chemical Society (London), **1988**, 11A, 55–76. Instrumentation (b) Poole, C. P., Jr. in *Electron spin resonance A comprehensive treatise on experimental techniques*, Wiley, Ed (New York) **1983**. Monographies: (c) Weil, J. A.; Bolton, J. R.; Wertz, J. E. in *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*, Wiley-Interscience, Ed (New York) **1994**. Applications biologiques (d) Eaton, S. S.; Eaton, G. R.; Berliner, L. J. Eds in *Biomedical EPR*, Kluwer Academic/Plenum Publishers (New York) **2004**. (e) Berliner, L. J. in *In vivo EPR (ESR): theory and applications*, Baker and Taylor, Eds (Charlotte, NC) **2004**.

Schéma 17)<sup>49</sup>. Concernant les radicaux stables ou très persistants<sup>50</sup>, leur caractère paramagnétique confère aux nitroxydes des propriétés physicochimiques (magnétométrie, photochimie, sondes du pH, oxymétrie), synthétiques (catalyseurs d'oxydation, polymérisation radicalaire contrôlée), biochimiques (marquage de spin) et thérapeutiques (superoxyde dismutase mimics, antioxydants) remarquables et dont l'exploitation est en plein essor<sup>51</sup>. Le facteur de stabilisation électronique des nitroxydes provient de l'existence d'une liaison  $\pi_{N-O}$  à trois électrons résultant du recouvrement des  $2p_z(N)$  et  $2p_z(O)$ . Dans le radical, la densité de spin est distribuée entre N et O, avec une contribution supérieure pour O. Pour cette raison, on écrit usuellement la fonction nitroxyde  $N-O^\bullet$  (forme A) mais il faut en fait considérer que la forme mésomère dipolaire  $N^{+\bullet}-O^-$  (forme B) intervient également dans la structure électronique totale (Schéma26). L'existence de la forme de résonance B permet en particulier d'expliquer l'existence d'un couplage hyperfin à l'azote dans les spectres de RPE des nitroxydes et sa variation avec la polarité du solvant (*vide infra*).



**Schéma 26** : Formes de résonance de la fonction nitroxyde

Leur relative persistance dans les conditions standard rend les nitroxydes détectables par RPE et il s'ensuit que le piégeage des radicaux non détectables directement (typiquement pour lesquels  $t_{1/2} < 1$  s) sur les nitrones<sup>7</sup> constitue une excellente méthode analytique dans les situations où ces espèces peuvent se former (Schéma 27). Ce concept de couplage ST-RPE est général et il est illustré dans le Schéma 27.

<sup>49</sup>Des familles d' $\alpha$ -H nitroxydes persistants ou stables pour lesquels la dismutation est empêchée stériquement et/ou électroniquement ont été décrites en série linéaire ou cyclique : Cf. Amar, M.; Bar, S.; Iron, M.A.; Toledo, H.; Tumanskii, B.; Shimon, L. J. W.; Botoshansky, M.; Fridman, N.; Szpilman, A. M. *Nat. Commun.* **2015**, doi:10.1038/ncomms7070 et références citées

<sup>50</sup>Nous reprenons la notion de stabilité/persistance définie pour la première fois par Griller et Ingold : Griller, D.; Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 13–19. Pour ces auteurs, un radical est stable s'il est isolable et persistant si sa demi-vie  $t_{1/2}$  n'est pas inférieure à 1 s en solution à température ambiante.

<sup>51</sup>Parmi l'abondante littérature consacrée à ces sujets, le lecteur pourra se reporter aux récents ouvrages suivants : Aspects généraux : (a) Likhtenshtein, G. I.; Yamauchi, J.; Nakatsuji, S.; Smirnov, A. I.; Tamura, R. in *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*, Wiley VCH, Weinheim, **2008**. (b) Hicks, R. G., Ed. in *Stable Radicals. Fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds*, Wiley, **2010**. (c) Kokorin, A. I., Ed. in *Nitroxides. Theory, experiment and applications*, InTech, **2012**. (d) Polymérisation radicalaire contrôlée : Tebben, L.; Studer, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *23*, 5034–5068. (e) Aspects thérapeutiques : Soule, B. P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K. I.; Simone, N. L.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B. *Antiox. Redox Signal.* **2007**, *9*, 1731–1744.

En théorie, le spectre de RPE de l'adduit nitroxyde formé peut ensuite fournir des informations sur la nature de  $R^\bullet$  et, si l'on contrôle la concentration en piège au cours de l'expérience, l'évolution de sa concentration  $[R^\bullet]$  au cours du temps.

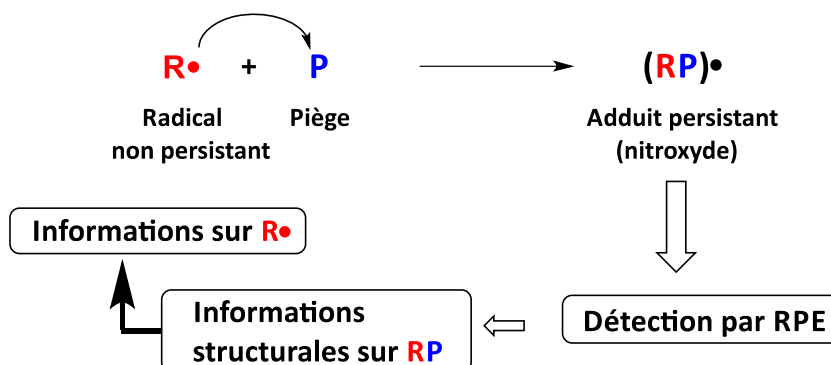


Schéma 27 : Principe général du couplage ST-RPE

D'autre part, les **composés nitrosés**  $R-N=O$ , qui constituent une autre famille permettant d'obtenir des nitroxydes par addition radicalaire, sont également des pièges de choix dans le couplage ST-RPE<sup>49</sup>. Dans le Schéma 28, qui illustre la réaction de ST sur un composé nitrosé et une nitrone, il apparaît que, dans le nitroxyde adduit, le fragment R correspondant au radical piégé est en position  $\alpha$  du centre radicalaire lorsque le piège est un nitroso (réaction a) et plus éloigné (en position  $\beta$ ) pour une nitrone.

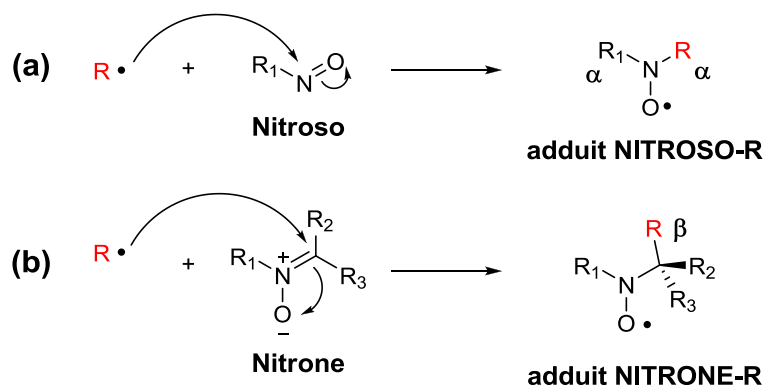


Schéma 28: Piégeage d'un radical  $R^\bullet$  sur un composé nitroso (a) et une nitrone (b) : formation des adduits respectifs NITROSO-R et NITRONE-R.

Si le groupement R contient des noyaux couplant en RPE, le spectre de l'adduit NITROSO-R pourra contenir des informations sur le radical piégé. Ceci ne sera généralement pas le cas lorsque le piège sera une nitrone (réaction b). Cependant, l'utilisation des nitroso en ST est limitée par leur instabilité thermique et



photochimique (de nature à former des nitroxydes artéfactuels), leur tendance à former des dimères inactifs (Schéma 29), leur faible hydrosolubilité et leur relative toxicité dans les milieux biologiques.

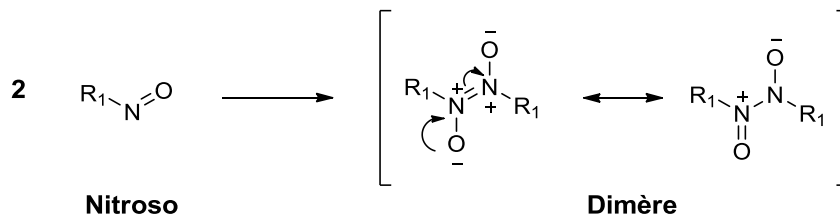


Schéma 29: Dimérisation d'un composé nitroso

### 1.2.1.3 Considérations cinétiques sur le caractère informatif du spin trapping

Fondés sur des réactions d'addition radicalaire, le succès et l'interprétation d'une expérience de ST dépendent des diverses cinétiques réactionnelles mises en jeu. Globalement, l'observation d'un signal de RPE ne sera possible que si le piégeage de  $R^\bullet$  est plus efficace que l'ensemble des réactions possibles, qu'elles forment des espèces diamagnétiques (par exemple, la dimérisation  $2 R^\bullet \rightarrow R-R$ ) ou paramagnétiques différentes de l'adduit attendu. Les milieux biologiques étant riches en cibles potentielles de l'attaque radicalaire et les réactions mises en jeu étant peu sélectives, la situation peut être complexe. Nous illustrons cette complexité dans le Schéma 30 où les *constantes de vitesse* des réactions sont désignées par  $k$  et où quelques exemples remarquables<sup>52</sup> sont donnés à titre de comparaison. Dans ce Schéma, outre le radical résultant du piégeage du radical primaire  $R^\bullet$  (adduit attendu), nous avons fait figurer d'autres radicaux secondaires possibles dans un encadré gris. Parmi les réactions ayant lieu dans les milieux biologiques produisant des radicaux secondaires, les abstractions d'hydrogène à partir de groupes hydroxy, de H allyliques ou benzyliques, ou d'aminoacides conduisent toutes à des radicaux carbonés qui, en présence d'oxygène, sont susceptibles d'initier des chaînes de peroxydation lipidique. De même, les doubles liaisons dans les acides gras polyinsaturés sont des substrats pour l'addition radicalaire, initiant des réactions en chaîne (radicaux *alkoxyle*  $RO^\bullet$  et *peroxyle*  $ROO^\bullet$ ). Pour un grand nombre de réactions radicalaires secondaires *in vivo*, les

<sup>52</sup>Nous avons extrait les valeurs de  $k$  de la référence 51b et de: (a) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513–886. (b) Neta, P.; Huie, R. E.; Ross, A. B. *ibid* **1990**, *19*, 413–513. (c) von Sonntag, C.; Schuchmann, H. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1229–1253. (d) Acworth, I. N. in *The Handbook of Redox Biochemistry*, ESA Inc., Ed., Chelmsford, USA, **2003**. (e) Pratt, D. A.; Tallman, K. A.; Porter, N. A. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 458–467.

cinétiques de piégeage sont contrôlées par la diffusion des espèces, à des constantes de vitesse bimoléculaires  $k_{ST} \geq 10^9 \times M^{-1}s^{-1}$ . De telles valeurs ne sont atteintes que dans le cas des réactions impliquant le **radical hydroxyle (HO•)**, y compris celles relatives à son piégeage sur les nitrones. Ce sont donc les adduits correspondants (NITRONE-OH) qui ont le plus de chances d'être détectés dans une expérience biologique. Nous indiquons dans le Schéma 30 deux voies de formation d'adduits NITRONE-OH, indépendantes de toute formation primaire de HO•: la décomposition de DMPO-OH et l'addition nucléophile d'eau en présence d'ions métalliques. Nous reviendrons sur ces mécanismes plus loin.

Le Schéma 30 montre aussi que la détection du radical  $O_2^{\bullet-}$  n'est pas favorisée cinétiquement dans une expérience de ST en présence de nitrones car, même pour les pièges les plus sensibles connus, les valeurs de  $k_{ST}$  restent relativement faibles. Les meilleures stratégies de mise en évidence du radical  $O_2^{\bullet-}$  ont consisté à augmenter la persistance de son adduit NITRONE-OOH en synthétisant des nitrones appropriées (*vide infra*). Dans une première conclusion, le Schéma 30 montre que, du point de vue de l'identification, l'application du couplage ST-RPE n'apporte pas toujours une preuve formelle de la formation majoritaire d'un radical donné. A l'inverse, la non observation de l'adduit (RP)• n'impliquera pas toujours que R• n'est pas formé dans le système, en particulier si  $k_{ST} \ll \{k_{ST1-4}, k_{add}, k_{ab}, k_d, k_{ox}, \text{etc.}\}$ .

Afin de compléter notre analyse critique du caractère informatif du couplage ST-RPE, nous rappelons dans le Schéma 30 que, du fait de la position  $\beta$  du radical piégé dans l'adduit (Schéma 28), il n'est presque jamais possible de discriminer des radicaux de même famille; ici l'exemple donné est celui des radicaux carbonés méthyle  $H_3C^{\bullet}$  et  $\alpha$ -hydroxyéthyle  $H_3CHC(^{\bullet})OH$  dont le piégeage sur la nitrone DMPO conduit en milieu aqueux à des signaux de RPE dont l'allure (ils ont tous deux 6 raies) et les constantes de couplage sont similaires (respectivement:  $a_N = 16,40-16,56$  vs  $16,0-16,1$  G et  $a_{H\beta} = 23,4-23,7$  vs  $22,8-23,3$  G)<sup>53</sup>.

<sup>53</sup>(a) Buettner, G. R. *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, 3, 259–303. (b) *Spin trap database* du NIEHS (Research Triangle Park, Durham, NC, USA) consultable sur le site: <http://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm>

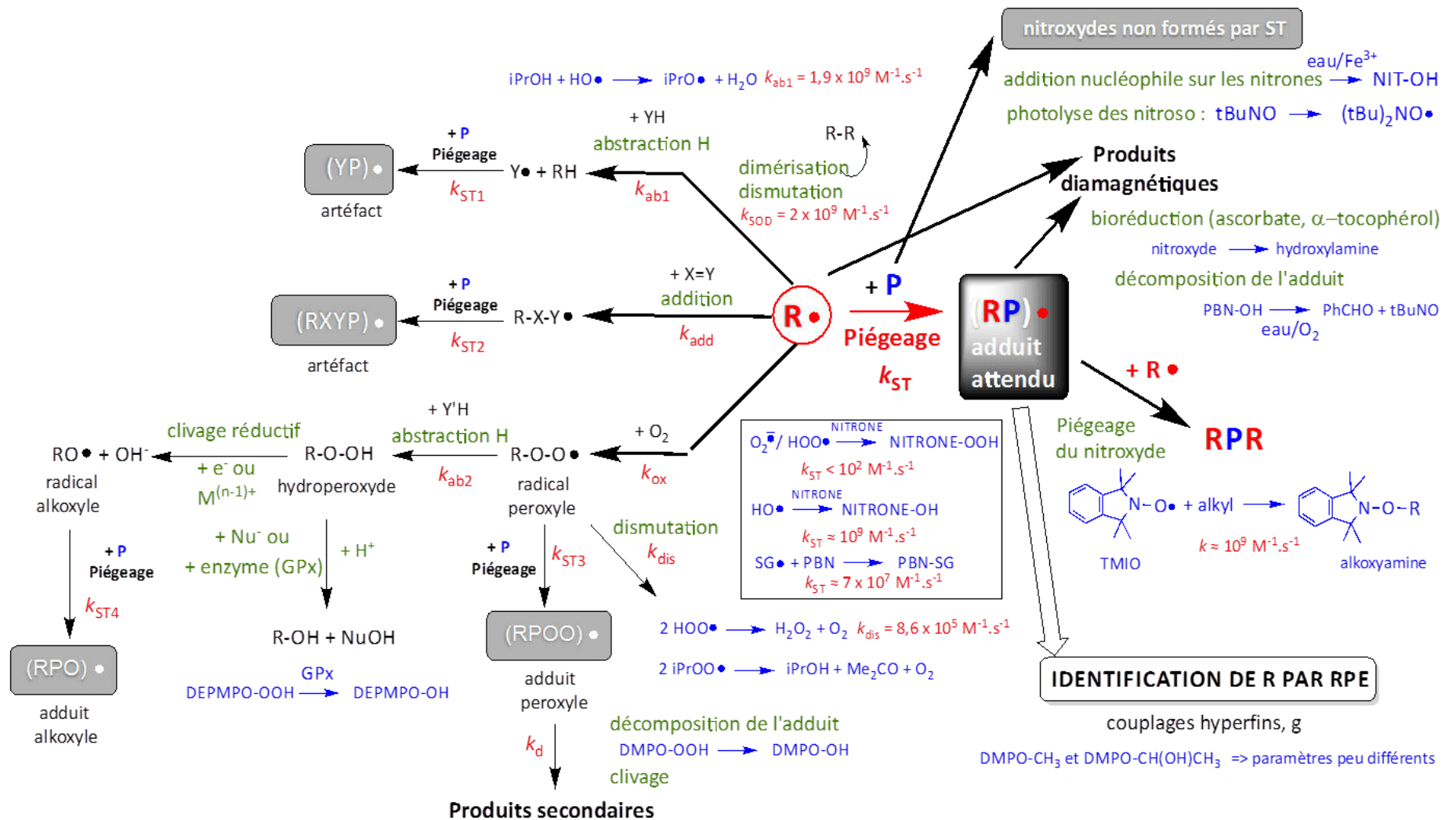


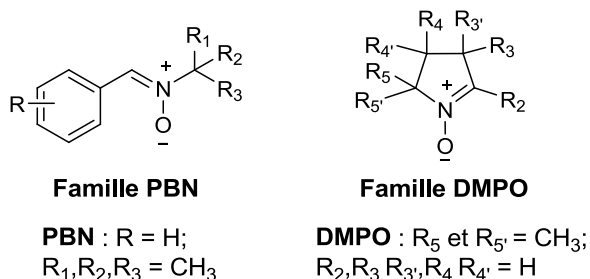
Schéma 30 : Evénements pouvant survenir dans une expérience de ST-RPE en milieu biologique : implications cinétiques.

## 1.2.1.4 Design de nitrones adaptées au spin trapping biologique

LES FAMILLES DMPO et PBN

Depuis le milieu des années 1980, l'intérêt des chercheurs en biologie, biochimie et sciences médicales vis-à-vis des radicaux libres ne cesse d'être stimulé. C'est ainsi qu'une consultation de la base de données *PubMed* du *National Institute of Health* américain (ex base *Medline*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sur les 5 dernières années recense pratiquement 60000 articles ayant *radicaux libres* parmi leurs mots-clés. Dans cette considérable masse de résultats, nous n'avons cependant compté qu'une vingtaine d'études portant sur la synthèse de nouveaux pièges, sur une période étendue à 10 ans. Cette faible proportion peut s'expliquer par le fait que, parmi les critères qu'un piège doit respecter pour pouvoir être employé dans un environnement biologique, c'est principalement celui de la persistance de l'adduit du radical  $O_2^{\bullet-}$  qui a été exclusivement exploré, ceci afin de pouvoir appliquer le couplage ST-RPE avec des chances de succès. Pour obtenir ce résultat, les efforts de synthèse ont porté sur des structures nouvelles pouvant stabiliser cet adduit électroniquement et/ou stériquement.

A l'origine, la technique du ST, introduite puis développée à partir de 1968 dans différents groupes<sup>7,54</sup>, a popularisé la nitronne acyclique aromatique PBN (Figure 2). En 1973, Janzen et coll. ont caractérisé par RPE dans le benzène une série d'adduits de la **5,5-diméthyl 1-pyrroline N-oxyde (DMPO; Figure 2)**<sup>55</sup>, nitronne à cinq chaînons de la famille des  $\Delta^1$  *pyrrolines N-oxydes*, dont la première synthèse a été décrite en 1959<sup>56</sup>.



**Figure 2** : Deux principales familles de nitrones utilisées en ST

<sup>54</sup>(a) Janzen, E. G.; Blackburn, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5909–5910. (b) Chalfont, G. R.; Perkins, M. J.; Horsfield, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7141–7142. (c) Janzen, E. G.; Blackburn, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4481–4490. (d) Lagercrantz, C. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3466–3475.

<sup>55</sup>(a) Janzen, E. G.; Liu, J. I. P. *J. Magn. Reson.* **1973**, *9*, 510–512. (b) Janzen, E. G.; Evans, C. A.; Liu, J. I. P. *J. Magn. Reson.* **1973**, *9*, 513–516. Pour toutes les nitrones mentionnées ici, nous avons conservé les acronymes de la littérature, qui sont plus explicites; en nomenclature systématique, DMPO = 2,2-diméthyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide.

<sup>56</sup>Bonnett, R.; Brown, R. F. C.; Clark, V. M.; Sutherland, I. O.; Todd, A. *J. Chem. Soc.* **1959**, 2094–2102.

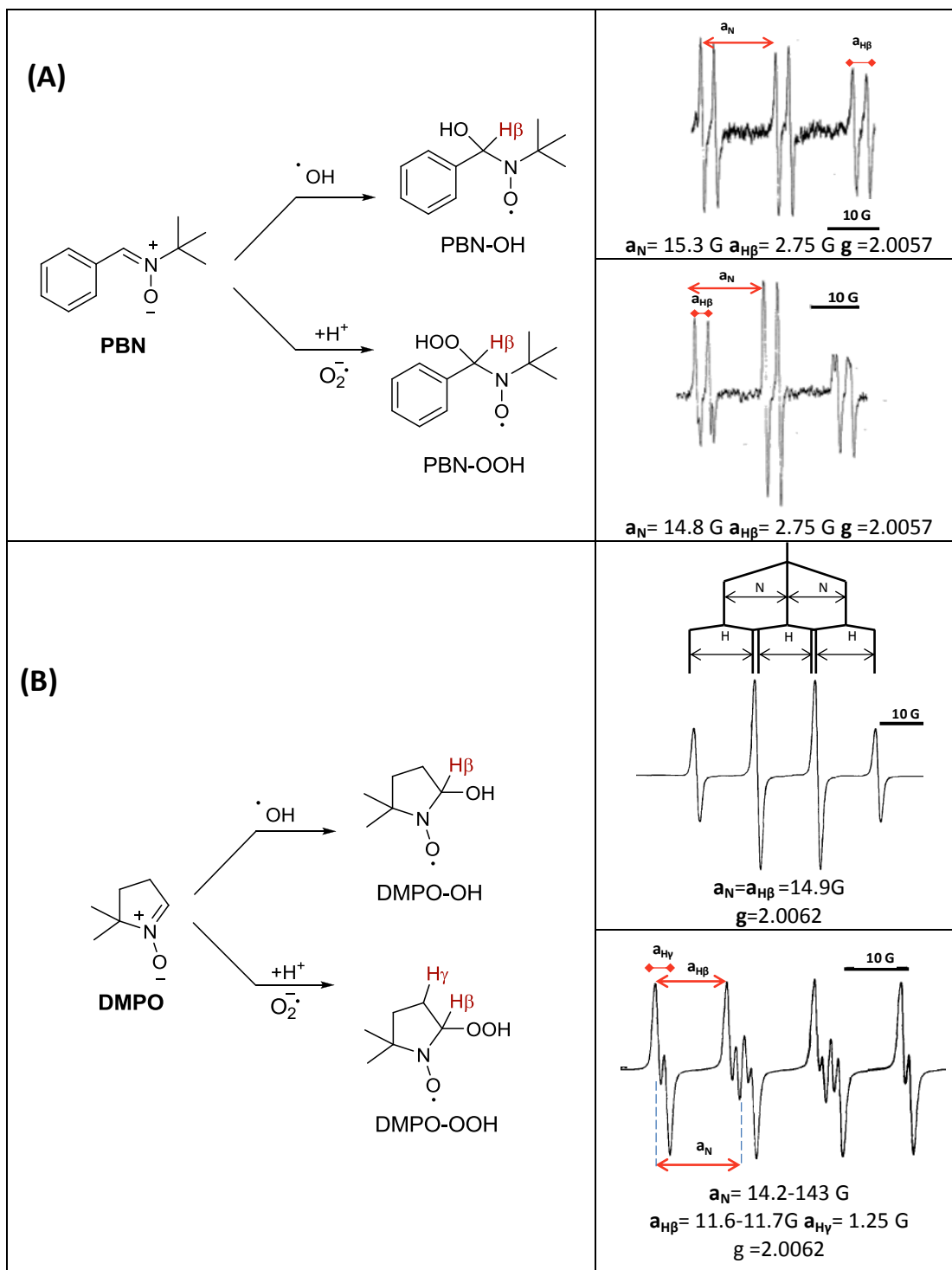
Dès 1974, le groupe de Bolton et coll. est le premier à caractériser en milieu aqueux les adduits des radicaux HO<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sur les nitrones PBN et DMPO dans des expériences de photolyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à différentes concentrations<sup>57</sup>.

Les signaux de RPE des adduits de la PBN pour les deux radicaux HO<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (respectivement appelés PBN-OH et PBN-OOH) sont des sextuplets de raies d'égale intensité, tandis que ceux obtenus sur la DMPO sont soit un quadruplet de raies d'intensités relatives 1:2:2:1 (pour DMPO-OH), soit un spectre à 12 raies d'égale intensité pour DMPO-OOH (Schéma 31). L'allure particulière du spectre de DMPO-OH reflète l'égalité des couplages à l'azote et à l'hydrogène β (en milieu aqueux, on a : a<sub>N</sub> = a<sub>Hβ</sub> ≈ 14,9 G) alors que le couplage supplémentaire à longue distance a<sub>Hγ</sub> double le sextuplet de base (quand a<sub>N</sub> ≠ a<sub>Hβ</sub>) dans le spectre de DMPO-OOH (Schéma 31). L'attribution du couplage à longue distance dans DMPO-OOH comme provenant d'un seul des deux hydrogènes en position γ (couplage en W) a été confirmée par Clément et coll.<sup>58</sup> qui ont observé que le spectre de RPE de l'adduit (2*d*-3-C)-DMPO-OOH ne comporte que les 6 raies attendues pour les seuls couplages a<sub>N</sub> et a<sub>Hβ</sub><sup>58</sup> (Schéma 31). Dans le cadre d'études en milieu biologique, cette propriété de pouvoir distinguer les adduits HO<sup>•</sup> des adduit O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par le nombre de raies des spectres de RPE a favorisé le développement de la famille DMPO au détriment de la famille PBN.

---

<sup>57</sup>Harbour, J. R.; Chow, V.; Bolton, J. R. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 3549–3553.

<sup>58</sup>Clément, J. L.; Ferré, N.; Siri, D.; Karoui, H.; Rockenbauer, A ; Tordo, P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1198–1203. Pour le deutérium <sup>2</sup>H, le spin nucléaire est I = 1 et, en théorie, on devrait observer des couplages au deutérium dans un triplet de raies. En raison de la très faible abondance de spin pour <sup>2</sup>H (égale à 0,015%) et de sa position lointaine par rapport au centre radicalaire, le deutériation entraîne en réalité la suppression du couplage de RPE du <sup>3</sup>H substitué et constitue une technique expérimentale d'attribution des couplages. Ici, la structure de (2*d*-3-C)-DMPO est donnée dans la Figure 2 (structure de la DMPO où R<sub>3</sub> = R<sub>γ</sub> = <sup>2</sup>H).



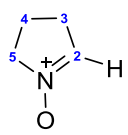
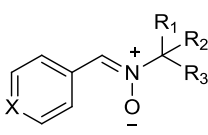
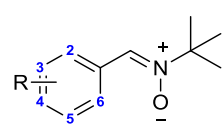
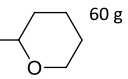
**Schéma 31 :** Formation des adduits des radicaux  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sur la PBN (A) (d'après Harbour et al.)<sup>57</sup> et la DMPO (B) (d'après Finkelstein et al.)<sup>59</sup> et spectres de RPE correspondants (avec l'analyse sous la forme d'un stick diagram) en milieu tampon phosphate, pH 7.4.

Comparée à celle de la PBN, on a considéré la plus grande hydrophilie de la DMPO comme un handicap à surmonter pour accéder aux régions lipophiles des systèmes biologiques (en diffusant à travers les membranes cellulaires) où se forment

<sup>59</sup>Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J.; Paxton, J. *Mol. Pharmacol.* **1979**, *16*, 676–685.

préférentiellement les radicaux issus de la peroxydation lipidique. Dans les deux familles de nitrones, on a cherché à augmenter la lipophilie en greffant une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées de longueur variable et/ou des substituants alkyle de grande taille sur le cycle benzénique (*famille PBN*) ou à diverses positions du cycle pyrrolidinique (*famille DMPO*). Dans la suite, nous adopterons le terme général DMPOs et PBNs pour désigner l'ensemble des dérivés de substitution de la DMPO et la PBN. La Table 3 recense quelques structures de DMPOs et PBNs (voir Figure 2) obtenues par cette stratégie.

**Table 3** : Dérivés lipophiles et hydrophiles dans les familles DMPO et PBN<sup>60</sup>.

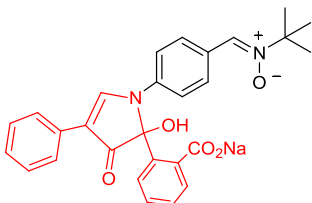
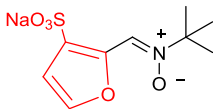
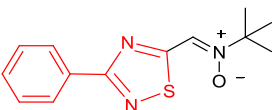
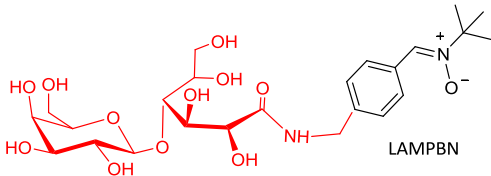
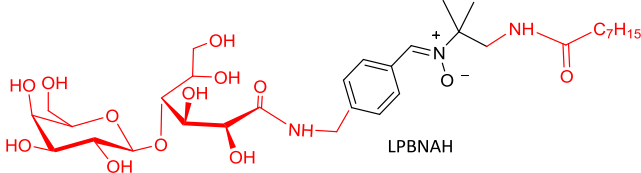
Famille DMPO		Famille PBN	
			
Acronyme	Substitution	Acronyme	Substitution
DMPO	5,5'-Me	PBN	R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> = Me; X = C
BuMPO	5-Me-5'-nBu <sup>60a</sup>	<i>dérivés plus hydrophiles</i>	
M <sub>4</sub> PO	3,3',5,5'-Me <sup>60b</sup>	(HO) <sub>3</sub> PBN	R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH <sup>60h</sup> ; X = C
DPPO	5,5'-nPr <sup>60a</sup>	—————	R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> = OBz <sup>60h</sup> ; X = C
DeMPO	5-Me-5'-C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> <sup>60b</sup>	4-PyOBN (4-POBN)	R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> = Me; X = N <sup>+</sup> -O <sup>-</sup>
M <sub>3</sub> POC <sub>n</sub>	3,3',5-Me-5'-C <sub>n</sub> H <sub>2n+1</sub> <sup>60c</sup>	<i>dérivés plus lipophiles</i>	
	(n = 7, 12, 16, 18)	4-LaurylPyBN	R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> = Me; X = N <sup>+</sup> C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> <sup>60i</sup>
—————	3,3',5-Me-4-CO <sub>2</sub> Et-5'-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> <sup>60d</sup>	4-DOPBN	R = 4-OC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> <sup>60j</sup>
—————	3-[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et]-5,5'-Me <sup>60e</sup>	4-tBPBN	R = 4-tBu <sup>60k</sup>
—————	4-[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Et]-3,3',5,5'-Me <sup>60f</sup>	<i>dérivés plus hydrophiles</i>	
—————	3,5,5'-Me-4-CO <sub>2</sub> Et-3'-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> <sup>60f</sup>	n-MePyBN	R = n-N <sup>+</sup> -Me ; MeOSO <sub>3</sub> <sup>-60i</sup>
PMMPPPO	5-Me-5'-CH <sub>2</sub> O-  <sup>60g</sup>		(n = 1-3)
		2-SSPBN	R = 4-SO <sub>3</sub> Na <sup>60k</sup>
		(MO) <sub>3</sub> PBN	R = 2,4,6-OMe <sup>60l</sup>

<sup>60</sup>(a) Turner, M. J. III; Rosen, G. M. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2439–2444. (b) Haire, D. M.; Janzen E. G. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1514–1522. (c) Barker, P.; Beckwith, A. L. J.; Cherry, W. R.; Huie, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **1985**, 1147–1150. (d) Dehnel, A.; Griller, D.; Kanabus-Kaminska, J. M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1566–1567. (e) Zhang, Y. K.; Lu, D. H.; Xu, G. Z. *Z. Naturforsch.* **1990**, *45b* 1075–1083. (f) Arya, P.; Stephens, C.; Griller, D.; Pou, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2297–2301. (g) Stolze, K.; Rohr-Udilova, N.; Patel, A.; Rosenau, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 985–993. (h) Janzen, E. G.; Zawalski, R. C. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1900–1903. (i) Janzen, E. G.; Dudley, R. I.; Shetty, R. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 243–245. (j) Walter, T. H.; McIntire, G. L.; Bancroft, E. E.; Davis, E. R.; Gierasch, L. M.; Blount, H. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *102*, 1350–1357. (k) Janzen, E. G.; Coulter, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1962–1968. (l) McCay, P. B.; Lai, E. K.; Poyer, J. L.; DuBose, C. M.; Janzen, E. G. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2135–2143.

Pour les DMPOs, nous n'avons choisi que des exemples où  $R_2 = H$  (Figure 2), nitrones pour lesquelles la réaction de ST n'est pas ralentie par des effets stériques. D'autre part, nous avons séparé les PBNs selon que leur lipophile est plus ou moins grande par rapport à la PBN elle-même (*vide infra*).

Plus récemment, la littérature a rapporté la préparation de PBNs amphiphiles (ayant une partie hydrophobe et une queue polaire) ou de PBNs substituées par des ligands possédant des propriétés physicochimiques remarquables ou/et conférant à l'ensemble des effets thérapeutiques. La Table 4 indique quelques exemples de tels composés fonctionnalisés, qui illustrent quel type de greffage on peut obtenir avec les aldonitrones dérivées de la PBN<sup>61</sup>.

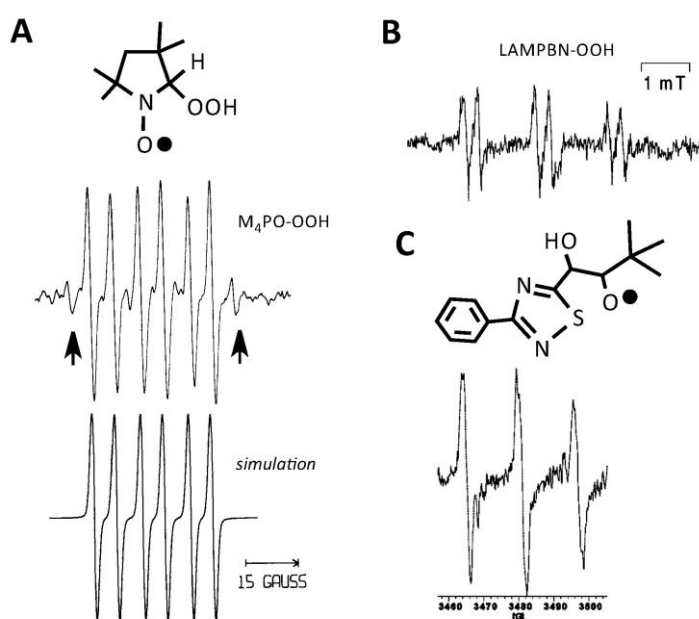
Table 4: PBNs fonctionnalisées

Composé	Fragment greffé	Ref.
	dérivé de la PBN + fluorophore	61a
	furyl-PBN	61b
	thiadiazolyl-PBN	61c
	glycosyl-PBN	61d
	glycosyl-PBN substituée	61e

<sup>61</sup>(a) Pou, S.; Bhan, A.; Bhadi, V. S.; Wu, S. Y.; Hosmane, R. S.; Rosen, G. M. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1085–1090. (b) Kim, S.; de A. Vilela, V. M.; Bouajila, J.; Dias, A. G.; Cyrino, F. Z. G. A.; Bouskela, E.; Costa, P. R. R.; Nepveu, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3572–3578 et références citées. (c) Porcal, W.; Hernández, P.; González, M.; Ferreira, A.; Olea-Azar, C.; Cerecetto, H.; Castro, A. J. *Med. Chem.* **2008**, *51*, 6150–6159. (d) Ouari, O.; Chalier, F.; Bonaly, R.; Pucci, B.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2299–2307. (e) Durand, G.; Choteau, F.; Pucci, B.; Villamena, F. A. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12498–12509 et références citées.



Il est à noter que dans la plupart de ces études, les propriétés dans le couplage ST-RPE ont été testées sur différents radicaux générés *in vitro*. La Figure 3 montre l'allure des adduits des radicaux HO• et O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> sur la M<sub>4</sub>PO (qui est une DMPOs diméthylée) et sur deux PBNs dérivés fonctionnalisés. L'adduit M<sub>4</sub>PO-OOH (Figure 3 A) ne présente plus les couplages γ à longue distance en raison de l'absence de protons sur le C-3. En 1989, la M<sub>4</sub>PO a été utilisée dans la première étude de ST-RPE *ex vivo* avec détection en temps réel de la formation radicalaire ischémique et post-ischémique dans le cœur de rat isolé perfusé<sup>62</sup> (*vide infra*).



**Figure 3 :** Spectres de RPE des adduits des radicaux HO• et O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> sur des dérivés de la DMPO et de la PBN. Les spectres ont été obtenus en milieu tampon phosphate (A<sup>63</sup>, B<sup>61d</sup>) ou dans la pyridine (C)<sup>61c</sup>. Dans le signal A, les flèches indiquent les raies extérieures de l'adduit M<sub>4</sub>PO-OH présent comme impureté, non introduit dans la simulation par les auteurs<sup>61c</sup>.

### HYDROSOLUBILITÉ VS LIPOPHILIE

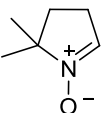
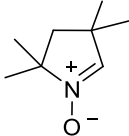
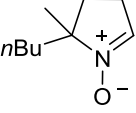
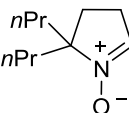
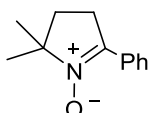
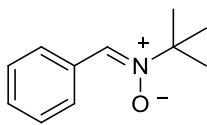
L'effet de ces modifications structurales sur le caractère hydrophobe (ou lipophile) d'un piège est habituellement évalué expérimentalement en déterminant son coefficient de partage  $K_p$  entre l'eau pure (ou un milieu tampon) et le 1-octanol, qui est non miscible. Dans la plupart des protocoles, c'est la concentration dans la phase alcoolique qui est mesurée spectrophotométriquement mais la mesure de

<sup>62</sup>Pietri, S.; Culcasi, M.; Cozzone, P. J. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 163–173.

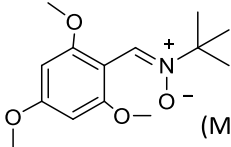
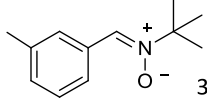
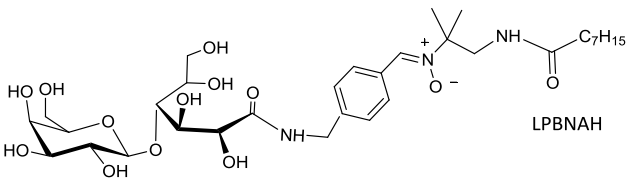
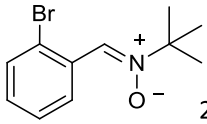
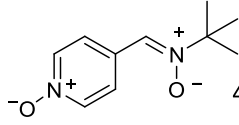
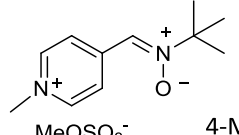
<sup>63</sup>Buettner, G. R.; Britigan, B. E. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8*, 57–60.

l'absorbance pour des composés fortement hydrophobes peut s'avérer imprécise. La Table 5 illustre cette dispersion des résultats selon les études mais permet aussi de constater une augmentation de  $K_p$  (il est à remarquer que certains auteurs préfèrent exprimer le coefficient de partage sous la forme logarithmique  $\log K_p$ , ce qui conduit à des valeurs négatives lorsque  $K_p < 1$ ) avec le nombre et l'allongement des chaînes de type alkyle ou la présence de substituants électroattracteurs ou polaires. Ces données comparées permettent d'observer que la présence du cycle aromatique dans la famille PBN augmente la lipophilie dans cette famille par rapport à la famille DMPO.

**Table 5:** Coefficients de partage  $K_p$  de dérivés substitués de PBN et DMPO ( $K_{pref}$  = valeur mesurée dans la même étude pour la nitronne de référence dans chaque famille).

Structure (acronyme)	$K_p(K_{pref})$	Réf.
 DMPO	0,02(0,02)	60a
 M <sub>4</sub> PO	0,14 (0,02)	64a
 BuMPO	0,7 (0,1)	64b
 DPPO	1,10 (0,02)	60a
 2-Ph-DMPO	4,90(0,02)	60a
<hr/>		
 PBN	10,7 (0,1)	64b
	15 (15)	64b
	10,4 (15)	64c
	16,2 (15)	64d

<sup>64</sup>(a) Rosen, G. M.; Turner, M. J., III. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 428–432. (b) Janzen, E. G.; West, M. S.; Kotake, Y.; DuBose, C. M. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1996**, *32*, 183–190 et références citées. (c) Konorev, E. A.; Baker, J. E.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 127–137. (d) Durand, G.; Poeggeler, B.; Ortial, S.; Polidori, A.; Villamena, F. A.; Böker, J.; Hardeland, R.; Pappolla, M. A.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4849–4861. (e) Durand, G.; Poeggeler, B.; Boeker, J.; Raynal, S.; Polidori, A.; Pappolla, M. A.; Hardeland, R.; Pucci, B. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3976–3979.

	15,6 (15)	64b
	38 (15)	64b
	46,5 (16,2)	64e
	320 (15)	64b
	2,5 (15)	64b
	non mesurable (15)	64b

### CYTOTOXICITE

Le développement des nitrones dans l'étude des processus radicalaires biologiques a suscité de très nombreuses études expérimentales de toxicité sur différents supports, les pièges pouvant être ajoutés à un milieu d'incubation (cultures cellulaires), de perfusion (organes isolés perfusés) ou bien administrés oralement ou par injection à des animaux. On mesure l'effet toxique de la nitronne lorsque le système biologique étudié est en fonctionnement normal : conditions aérobies (cellules), normothermiques et normoxiques (organes perfusés) ou animaux témoin nourris *ad libitum* et ne présentant pas de pathologies dans un environnement de référence. On évalue alors l'impact du piège sur une série de paramètres biochimiques, fonctionnels ou comportementaux dont on connaît les valeurs normales. Ces expériences aboutissent à la détermination des  $IC_{50}$  ou  $DL_{50}$ , doses ou concentrations provoquant l'inhibition ou la mort de la moitié de l'échantillon ou population de départ. Parmi les

principales études dans les familles DMPO et PBN, on peut citer les mesures de la dose létale ( $DL$ ) chez le rat<sup>65a</sup>, d' $IC_{50}$  sur cultures de cellules endothéliales<sup>65b</sup> et de la fonction contractile ( $EC_{50}$ , concentration réduisant de 50% la fonction cardiaque contractile) sur le cœur de rat isolé perfusé (modèle de Langendorff) en présence du piège<sup>64c</sup>. La Table 6 (dans laquelle une valeur plus faible de l'indice montre une toxicité plus faible) illustre un aspect général de la toxicité PBNs vs DMPOs, qui est toujours supérieure dans la série PBN et qui augmente avec le caractère lipophile du piège et/ou le nombre de substituants.

**Table 6:** Toxicité comparée *in vitro* et *in vivo* dans les familles DMPO et PBN.

Nitronne	DL (mg/100 g poids) <sup>65a</sup> injecté chez le rat	$IC_{50}$ (mM) <sup>65b</sup> sur cellules endothéliales	$EC_{50}$ (mM) <sup>64c</sup> sur cœur de rat isolé
PBN	100	9,37	11,2
4-OH-PBN <sup>i</sup>	109	—	—
4-MeO-PBN	117	—	—
(MO) <sub>3</sub> PBN	151	—	—
4-PyOBN	<100	5,41	74,6
DMPO	<62	138,34	> 250
M <sub>4</sub> PO	139	46,96	—
2-Ph-DMPO	120	—	—

<sup>i</sup>Les structures des nitrones dans les familles DMPO et PBN sont telles que définies dans les formules générales de la Table 3.

Généralement, les  $DL_{50}$  et  $IC_{50}$  restent supérieures aux concentrations ayant été utilisées pour le couplage ST-RPE appliqué au stress oxydant, qui résultent d'un compromis entre absence de toxicité et efficacité de la réaction de piégeage pour fournir un signal de RPE détectable.

Dès le milieu des années 1980, l'étude de la formation radicalaire consécutive à une séquence *d'ischémie/reperfusion myocardique* a été l'un des premiers domaines d'application des PBNs et DMPOs dans des préparations *ex vivo*. L'interruption partielle ou totale de l'oxygénation du tissu cardiaque (ischémie) suivie de la réoxygénation (reperfusion) du cœur déclenche un ensemble d'événements biochimiques et métaboliques conduisant à la formation de radicaux libres oxygénés,

<sup>65</sup>(a) Janzen, E. G.; Poyer, J. L.; Schaefer, C. F.; Downs, P. E.; DuBose, C. M. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **1995**, *30*, 239–247. (b) Haseloff, R. F.; Mertsch, K.; Rohde, E.; Baeger, I.; Grigor'ev, I. A.; Blasig, I. E. *FEBS Lett.* **1997**, *73*–75.

parmi lesquels  $O_2^{\bullet-}$  et, plus hypothétiquement,  $HO^{\bullet}$ . Il est aujourd'hui admis que les perturbations fonctionnelles observées lors de la reperfusion (arythmies) ont une composante radicalaire. Dans la mesure où une phase d'ischémie/reperfusion caractérise de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'AVC, l'infarctus du myocarde ou des protocoles thérapeutiques nécessitant l'interruption momentanée de la circulation (transplantation), l'étude de cette formation radicalaire pour des besoins pharmacologiques est nécessaire. Du fait des différences de plages de concentrations utilisables, les études de ST-RPE sur cœur isolé perfusé ont privilégié la DMPO (à des concentrations  $< 100$  mM) et ses dérivés<sup>62,66</sup> au détriment de la PBN<sup>67</sup>. En plus des considérations cinétiques et chimiques intrinsèques aux pièges (Schéma 30), il faut garder à l'esprit que la manière d'introduire la nitronne dans un milieu biologique à des doses non toxiques, sa durée de séjour dans le système, ses propriétés de pénétration transmembranaire (liées à la lipophilie et à l'existence de protéines et mécanismes de transport), l'éventuelle perturbation de systèmes enzymatiques et la formation de métabolites peuvent représenter des obstacles à l'interprétation des résultats obtenus par RPE<sup>68</sup>.

## 1.2.2 Nitrones adaptées au piégeage du radical superoxyde

### 1.2.2.1 Spin trapping de $O_2^{\bullet-}$ dans les familles DMPO et PBN

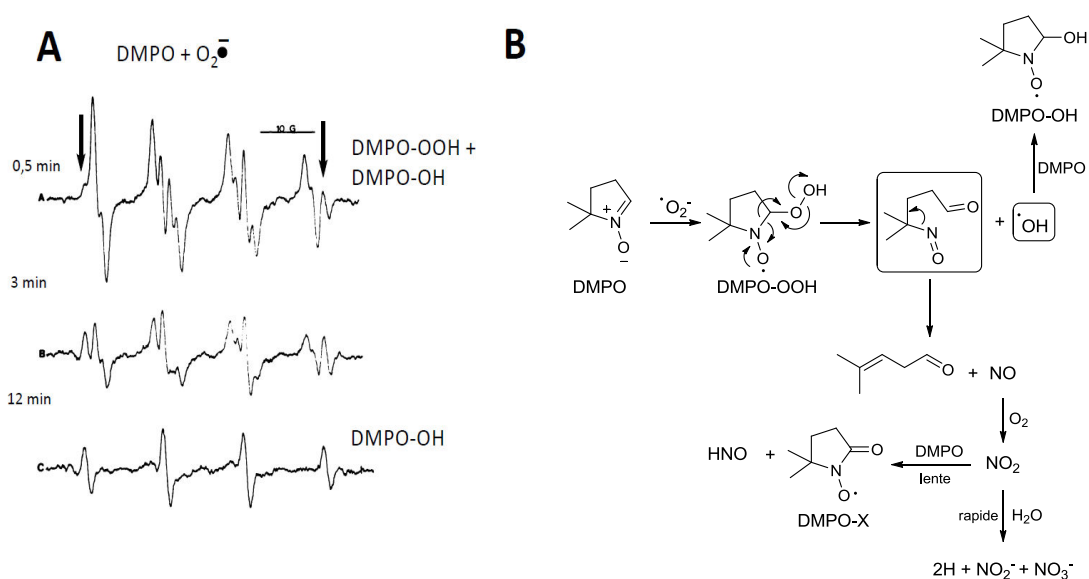
Le radical  $O_2^{\bullet-}$  est l'un des radicaux primaires formés *in vivo* : il intervient dans la respiration mitochondriale, l'inflammation, la phagocytose, les pathologies de la réoxygénation et possède une enzyme régulatrice unique, la *superoxyde dismutase* (SOD). Ce radical étant également à l'origine d'espèces oxydantes majeures telles que  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$  et l'anion *peroxynitrite*  $ONOO^-$  (par réaction avec NO), sa mise en évidence par ST-RPE a rapidement été considérée de première importance. Parmi les pièges de choix pour atteindre cet objectif, la DMPO se détachait car l'adduit correspondant DMPO-OOH présente un spectre de RPE à 12 raies très caractéristique (Schéma 31A)<sup>57</sup>.

<sup>66</sup>(a) Arroyo, C. M.; Kramer, J. H.; Dickens, B. F.; Weglicki, W. B. *FEBS Lett.* **1987**, *221*, 101–104. (b) Zweier, J. L. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1353–1357. (c) Blasig, I. E.; Lowe, H.; Ebert, B. *Biomed. Biochim. Acta* **1987**, *46*, S539–S544. (d) Pietri, S.; Maurelli, E.; Drieu, K.; Culcasi, M. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 733–742.

<sup>67</sup>(a) Bolli, R.; Patel, B. S.; Jeroudi, M. O.; Lai, E. K.; McCay, P. B. *J. Clin. Invest.* **1988**, *82*, 476–485. (b) Bolli, R.; Jeroudi, M. O.; Patel, B. S.; Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Lai, E. K.; McCay, P. B. *Circ. Res.* **1989**, *65*, 607–622. (c) Garlick, P. B.; Davies, M. J.; Hearse, D. J.; Slater, T. F. *Circ. Res.* **1987**, *61*, 757–760. Pour des revues sur l'ischémie-reperfusion cardiaque et l'emploi du couplage ST-RPE on pourra voir : (d) Bolli, R. *Circulation* **1990**, *82*, 723–738. (e) Kramer, J. H.; Misik, V.; Weglicki, W. B. *Ann. NY Acad. Sci.* **1994**, *723*, 180–196. (f) Vergely, C.; Maupoil, V.; Clermont, G.; Bril, A.; Rochette, L. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *420*, 209–216. (g) Hausenloy, D. J.; Yellon, D. M. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 92–100 et références citées.

<sup>68</sup>On pourra se reporter à Davies, M. J. *Electron Paramagnetic Resonance Detection of Radicals in Biology and Medicine* in *Electron Paramagnetic Resonance. A Practitioner's Toolkit*, Brustolon, M.; Giamello, E., Eds., Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2009**, pp. 427–450.

Dès 1978, Buettner et Oberley observaient l'instabilité de DMPO-OOH en milieu aqueux et mesuraient  $t_{1/2}$  (DMPO-OOH)  $\approx$  60 s au pH physiologique de 7,4, la décroissance étant unimoléculaire (1<sup>er</sup> ordre) et dépendante du pH<sup>69</sup>. De plus, la disparition du signal de RPE de DMPO-OOH s'accompagne de l'apparition progressive du signal de DMPO-OH ; la réaction est accélérée en présence d'ions métalliques<sup>59,70</sup>. En raison de sa plus grande persistance, DMPO-OH demeure ainsi le seul signal observé dans une expérience de ST de  $O_2^{\bullet-}$  lorsqu'on n'enregistre pas le signal de RPE très rapidement, même si la génération du radical primaire est continue (Schéma 32A).



**Schéma 32 :** (A) Evolution temporelle du signal de RPE à 25°C lors du piégeage du radical  $O_2^{\bullet-}$  (système générateur =  $(Me_4N)O_2/DMF$ ) par la DMPO (0,18 M) en milieu tampon phosphate, pH 7,8 (d'après Buettner et Oberley)<sup>69</sup>. Les flèches signalent les raies extrêmes de DMPO-OH, présent à environ 15% dans le milieu. (B) Mécanisme de décomposition de DMPO-OOH proposé par Locigno et al.<sup>71a</sup>

Sur la base d'expériences de RPE et de calculs théoriques (employant la méthode des fonctionnelles de la densité, DFT), un mécanisme de décomposition de DMPO-OOH impliquant la libération de  $HO^{\bullet}$  et d'oxyde nitrique ( $NO^{\bullet}$ ) a été proposé<sup>71</sup> (Schéma 32B), permettant d'expliquer la formation de DMPO-OH. Enfin, la constante de vitesse du piégeage de  $O_2^{\bullet-}$  sur la DMPO est  $k_{STDMPO+O_2^{\bullet-}} \approx 60 M^{-1}.s^{-1}$  à pH 7 et de seulement 30

<sup>69</sup>Buettner, G. R.; Oberley, L. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *83*, 69–74.

<sup>70</sup>(a) Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *200*, 1–16. (b) Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Mol. Pharmacol.* **1982**, *21*, 262–265.

<sup>71</sup>(a) Locigno, E. J.; Zweier, J. L.; Villamena, F. A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3220–3227. (b) Villamena, F. A.; Merle, J. K.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 6089–6098.

$M^{-1}.s^{-1}$  à pH physiologique<sup>72</sup>. En pratique, ceci impose des valeurs de  $C_{DMPO} \geq 10$  mM pour que le piégeage de  $O_2^{\bullet-}$  puisse être en compétition favorable avec sa dismutation spontanée ( $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ;  $k_{dism} \approx 2 \times 10^5 M^{-1}.s^{-1}$  à pH 7,4) ou catalysée par la SOD ( $k_{SOD} \approx 2 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$ ; Schéma 30) si l'on se place dans un milieu cellulaire. En tenant compte de ces différents facteurs, on doit s'attendre à des concentrations de DMPO-OOH  $\ll 10 \mu M$  pour le ST de  $O_2^{\bullet-}$  en milieu biologique, se situant aux limites de la détection par RPE en bande X.

Sur le plan de la stabilité, l'utilisation de la PBN et de dérivés tels que la 4-PyOBN dans le couplage ST-RPE pour  $O_2^{\bullet-}$  apparaît encore plus défavorisée en raison de la très faible persistance des adduits formés dans les milieux aqueux ou tamponnés (dans l'eau :  $t_{1/2}(PBN-OOH) < 40$  s)<sup>73</sup>. Roubaud et al.<sup>74</sup> ont estimé  $t_{1/2}(4-PyOBN-OOH) \approx 19$  s en milieu tampon phosphate (pH 5,8) avec des conditions de génération de  $O_2^{\bullet-}$  où  $t_{1/2}(DMPO-OOH) \approx 67$  s.

### 1.2.2.2 Stabilisation des adduits superoxyde par introduction de groupes électron attracteurs en position $\beta$ d'une nitrone cyclique

#### LA FAMILLE DEPMPO

Dans le but d'obtenir des adduits du radical  $O_2^{\bullet-}$  plus persistants, une stratégie immédiate consiste à envisager un mécanisme de stabilisation dans lequel (i) l'approche du centre radicalaire et/ou (ii) la dismutation (Schéma 17) ou la décomposition intramoléculaire (Schéma 32) seraient gênées stériquement. C'est dans l'investigation de la voie (ii) que l'équipe de P. Tordo (laboratoire SREP, Marseille) a obtenu les résultats les plus intéressants en développant une nouvelle famille de  $\Delta^1$  pyrrolines *N*-oxydes comportant un ou plusieurs substituants phosphorylés en position  $\beta$  de la fonction nitrone. Le premier élément de cette famille, la **5-(diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline *N*-oxyde (DEPMPO, Table 7)** a été obtenue en 1994 et ses propriétés dans le couplage ST-RPE ont été décrites en 1995<sup>75</sup>.

<sup>72</sup>(a) Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4994–4999. (b) Villamena, F. A.; Xia, S.; Merle, J. K.; Lauricella, R.; Tuccio, B.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8177–8191 et références citées.

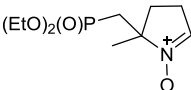
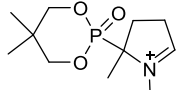
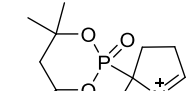
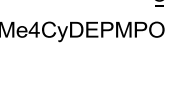
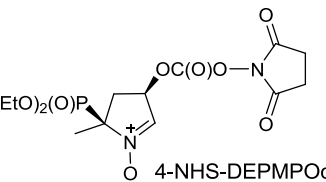
<sup>73</sup>(a) Janzen, E. G.; Nutter, D. E., Jr.; Davis, E. R.; Blackburn, B. J.; Poyer, J. L.; McCay, P. B. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2237–2242. (b) Janzen, E. G.; Kotake, Y.; Hinton, R. D. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *12*, 169–173. (c) Pou, S.; Ramos, C. L.; Gladwell, T.; Renks, E.; Centra, M.; Young, D.; Cohen, M. S.; Rosen, G. M. *Anal. Biochem.* **1994**, *217*, 76–83.

<sup>74</sup>Roubaud, V.; Lauricella, R.; Tuccio, B.; Bouteiller, J. C.; Tordo, P. *Res. Chem. Intermed.* **1996**, *22*, 405–416.

<sup>75</sup>(a) Fréjaville, C.; Karoui, H.; Le Moigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tuccio, B.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1793–1794. (b) Fréjaville, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; Le Moigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tordo, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 258–265.

De manière remarquable, l'adduit de  $O_2^{\bullet-}$  sur la DEPMPO (noté DEPMPO-OOH) présente une exceptionnelle persistance  $t_{1/2} \approx 17$  min en milieu tampon (pH 7,4) et aucun autre signal de RPE n'apparaît au cours de sa décroissance.

**Table 7:** Structure des DEPMPOs et stabilité des adduits DEPMPOs-OOH<sup>76</sup>.

Acronyme ou structure	Substitution			$t_{1/2}$ (min)	$K_p$	Ref.
	C cycle	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>			
<b>DEPMPO</b>	<b>5-Me</b>	<b>Et</b>	<b>Et</b>	<b>17</b>	<b>0,06–0,1</b>	<b>75b</b>
DIPPMPO	5-Me	<i>i</i> Pr	<i>i</i> Pr	21	1,2–2,1	76a
DBPMPO	5-Me	<i>n</i> Bu	<i>n</i> Bu	8	13	76b
—————	5-Me	Me	Ph	10,5	0,7	76c
DEPPPO	5-Ph	Et	Et	13	2,4	76d
DEPPEPO	CH <sub>2</sub> Bz	Et	Et	13,4	7,6	76e
3-Ph-DEPMPOc <sup>a</sup>	3-Ph-5-Me	Et	Et	2	—	76f
4-Ph-DEPMPOc <sup>a</sup>	4-Ph-5-Me	Et	Et	14.5	—	76g
4-HMDEPMPOc <sup>a</sup>	4-CH <sub>2</sub> OH-4'-Me	Et	Et	21	—	76h
				2,25	—	76i
DEP(CH <sub>2</sub> )MPO				10,2	0,09	76j1
CyDEPMPO				26,4	2,23	76j2
Me4CyDEPMPO						
				20	—	76h

<sup>a</sup> Configuration *cis* entre le substituant sur C-3 ou C-4 et le groupement phosphorylé.

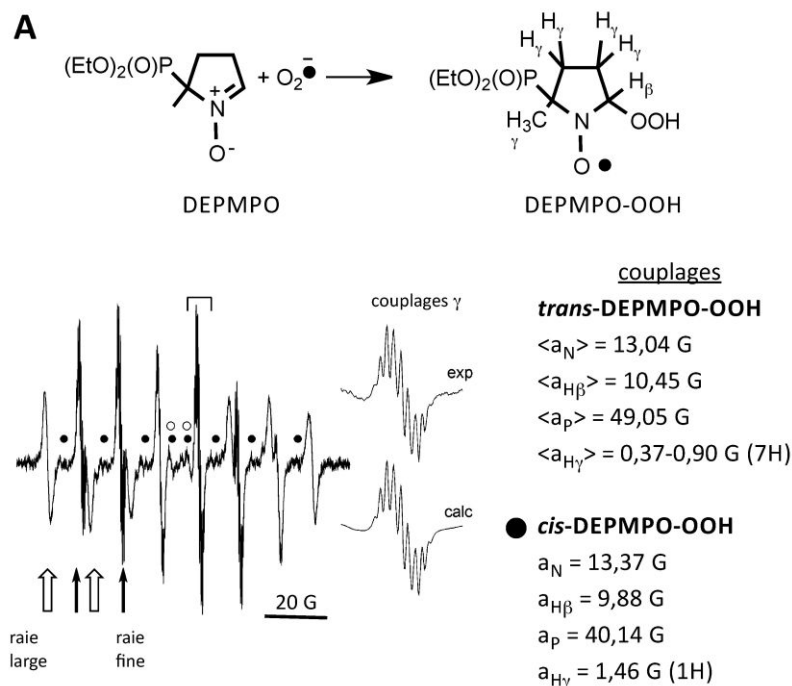
<sup>76</sup>(a) Chalier, F.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 2110–2117. (b) Stolze, K.; Udilova, N.; Nohl, H. *Free radic. Biol. Med.* **2000**, 29, 1005–1014. (c) Shioji, K.; Tsukimoto, S.; Tanaka, H.; Okuma, K. *Chem. Lett.* **2003**, 32, 604–605. (d) Karoui, H.; Nsanzumuhire, C.; Le Moigne, F.; Tordo, P. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1471–1477. (e) Xu, Y. K.; Chen, Z. W.; Sun, J.; Liu, K.; Chen, W.; Shi, W.; Wang, H. M.; Liu, Y. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7624–7630. (f) Nsanzumuhire, C.; Clément, J. L.; Ouari, O.; Karoui, H.; Finet, J. P.; Tordo, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 6385–6389. (g) Hardy, M.; Chalier, F.; Finet, J. P.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2135–2142. (h) (h1) Chalier, F.; Hardy, M.; Ouari, O.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7886–7892. (h2) Chalier, F.; Clément, J. L.; Hardy, M.; Tordo, P.; Rockenbauer, A. *RSC Adv.* **2014**, 4, 11610–11623. (i) Roubaud, V.; Mercier, A.; Olive, G.; Le Moigne, F.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 1827–1830. (j) (j1) Kamibayashi, M.; Oowada, S.; Kameda, H.; Okada, T.; Inanami, O.; Ohta, S.; Ozawa, T.; Makino, K.; Kotake, Y. *Free Radic. Res.* **2006**, 40, 1166–1172. (j2) Gosset, G.; Clément, J. L.; Culcasi, M.; Rockenbauer, A.; Pietri, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2218–2230.



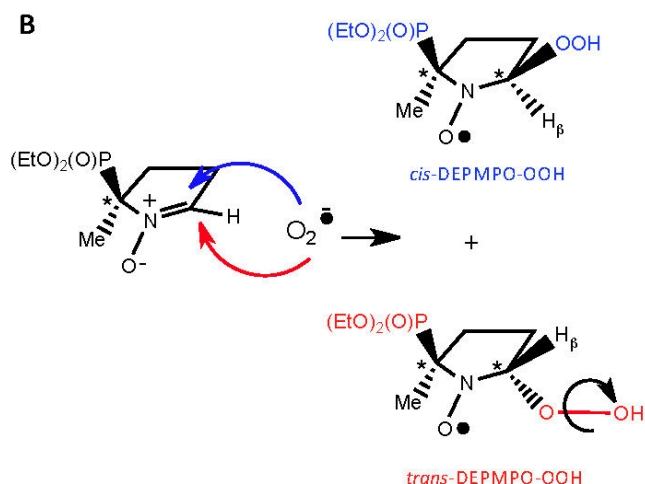
A la suite de ces travaux, le laboratoire *SREP* et d'autres groupes de recherche ont développé des DEPMPPOs diversement substituées pour déterminer les facteurs de stabilisation de DEPMPPOs-OOH ou pour moduler ses propriétés lipophiles. La Table 7 présente quelques DEPMPPOs caractéristiques, avec les valeurs de  $t_{1/2}$  et  $K_p$  (si mesuré) des DEPMPPOs-OOH correspondants<sup>77</sup>.

EXISTENCE DE DEUX ROTAMÈRES EN ÉCHANGE LENT DANS DEPMPPOs-OOH

Le Schéma 33A illustre le spectre de RPE de l'adduit DEPMPPO-OOH en milieu tampon phosphate (pH 7,4) dans des conditions d'hyper-résolution, où tous les couplages  $\gamma$  à longue distance sont visibles. Le signal principal, qui comporte 12 raies comme attendu dans le cas du couplage de l'électron célibataire avec les noyaux  $^{14}\text{N}$ ,  $^1\text{H}_\beta$  et  $^{31}\text{P}$  (soit  $3 \times 2 \times 2$  raies; Cf. Annexe 1), présente une alternance de raies larges (non résolues) et fines (avec structure hyperfine) que l'on retrouve aussi dans tous les adduits de type DEPMPPOs-OOR (R = H, alkyle).



<sup>77</sup>Rockenbauer, A.; Clément, J. L.; Culcasi, M.; Mercier, A.; Tordo, P.; Pietri, S. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4950–4957.



**Schéma 33 :** (A) Spectre de RPE détecté à 25°C lors du piégeage de  $O_2^{\bullet}$  sur la DEPMPO (tampon phosphate, pH 7,4). La simulation est compatible avec un mélange des diastéréoisomères *cis*- (•) et *trans*-DEPMPO-OOH (8:92%). On note pour le diastéréoisomère *trans* une alternance entre raies larges et fines; l'hyper-résolution des massifs de raies fines conduit aux valeurs des couplages  $a_{HY}$ <sup>77</sup>. Pour l'adduit *trans*-DEPMPO-OOH, les couplages indiqués sont des valeurs moyennes tenant compte de l'échange conformationnel (rotamères). Le symbole o repère les raies centrales du spectre de l'adduit minoritaire du radical  $HO^{\bullet}$  (DEPMPO-OH). (B) Origine de la diastéréoisométrie *cis/trans* et de l'échange conformationnel entre rotamères dans l'adduit *trans*-DEPMPO-OOH.

Ce phénomène inhabituel (rappelons qu'on devrait avoir 12 raies d'égale largeur) résulte de l'échange chimique lent entre deux rotamères issus de la rotation autour de la liaison peroxyde O-O, en interaction avec la pseudo-rotation du cycle pyrrolidinique (Schéma 33B). L'échange conformationnel (d'une durée  $\tau \approx 5-8$  ns) élargit sélectivement les raies, les 2 rotamères ayant des couplages de RPE  $a_{H\beta}$  et  $a_p$  légèrement différents<sup>77</sup>.

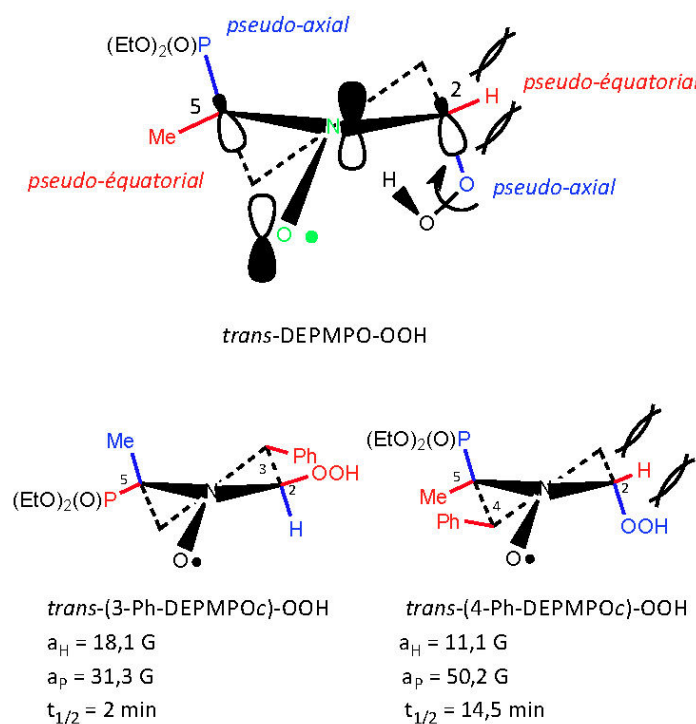
#### DIASTÉROISOMÉRIE DES ADDUITS DES DEPMPOS

Dans les DEPMPOs, le C-5 est chiral et, de ce fait, le piégeage de  $R^{\bullet}$ , s'il n'est pas stéréospécifique, forme un mélange d'adduits présentant une diastéréoisomérie *cis/trans* (Schéma 33B). Les valeurs des angles dièdres  $\theta_{H\beta}$  et  $\theta_p$  de la relation de McConnell (Cf. Annexe 2) étant différentes dans *cis*- et *trans*-DEPMPOs-R, les couplages correspondants  $a_{H\beta}$  et  $a_p$  sont différentes dans chaque diastéréoisomère et le spectre total résulte d'un mélange (*cis+trans*)-DEPMPOs-R. Pour DEPMPO-OOH, la simulation indique que l'isomère *cis*-DEPMPO-OOH forme 7-8% du mélange total

(Schéma 33A)<sup>75b,77</sup>, suggérant un contrôle cinétique de l'addition radicalaire de  $O_2^{\bullet-}$  sur la DEPMPO (attaque par la face la moins encombrée privilégiée).

#### ORIGINE DE LA PERSISTANCE DES ADDUITS DEPMPOs-OOH : L'EFFET ANOMÈRE

La nature de l'effet stéréoélectronique impliqué dans la grande stabilité vs DMPOs-OOH des adduits du radical  $O_2^{\bullet-}$  sur certaines DEPMPOs a été explorée expérimentalement par Tordo et coll. qui ont observé les  $t_{1/2}(\text{DEPMPOs-OOH})$  les plus élevées dans les nitrones donnant les valeurs de  $a_p$  les plus grandes et les  $a_{H\beta}$  les plus faibles. Dans ces adduits DEPMPOs-OOH, la liaison  $\sigma(C_5-P)$  occupe donc une position davantage pseudo-axiale dans le cycle pyrrolidinique (plus faible  $\theta_p$ ) tandis que la liaison  $\sigma(C-H_\beta)$  occupe une position plus pseudo-équatoriale (Figure 4).



**Figure 4 :** Au-dessus : un des deux rotamères de l'adduit *trans*-DEPMPO-OOH (la flèche figure l'axe présumé de rotation) montrant le recouvrement des liaisons  $\sigma(C_5-P)$  et  $\sigma(C_2-OOH)$  avec le système  $\pi/\pi^*(N-O^{\bullet})$ ; dans cette géométrie le  $H_\beta$  est protégé stériquement de l'approche de réactifs. Au-dessous : géométries comparées des adduits *trans*-OOH des nitrones 3-Ph- et 4-Ph-DEPMPOc (où les phényles sont en position *cis* par rapport à P) permettant d'expliquer les différences des persistances (paramètres d'après<sup>76f,g</sup>).

Cette géométrie favorise l'hyperconjugaison du système  $\pi/\pi^*(N-O^{\bullet})$  décrivant l'électron célibataire avec d'une part la  $\sigma(C_5-P)$  et, d'autre part, la  $\sigma(C_2-OOH)$ , cette

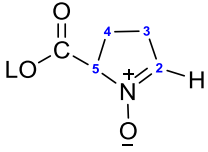
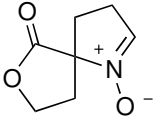
dernière étant en position éclipsée. Cet *effet anomère*, commun aux hétérocycles ayant un groupement électron-attracteur en position  $\beta$ , prévoit une préférence pour la conformation *axiale* vs la conformation *équatoriale*, pourtant moins encombrée stériquement<sup>78</sup>. A cause de l'effet anomère, la position pseudo-équatoriale du H $\beta$  de DEPMP(O)s-OOH se trouve alors plus protégée vs la position pseudo-axiale vis-à-vis de l'approche de réactifs : la réaction de dismutation est ralentie et l'adduit est plus stable. Ceci explique pourquoi les nitrones DEP(CH<sub>2</sub>)MPO et 3-Ph-DEPMPOc ont des adduits -OOH peu persistants vs la DEPMP(O) et la 4-Ph-DEPMPOc (voir structures Table 7) : dans le premier cas, le phosphore est éloigné en  $\gamma$  du groupe nitroène et dans l'autre cas le groupe *cis*-Ph occupe préférentiellement la position pseudo-axiale, laissant la liaison C<sub>5</sub>-P en position pseudo-équatoriale et la C-H $\beta$  en position pseudo-axiale, plus accessible à l'abstraction (Figure 4).

#### LA FAMILLE EMPO ET SES HOMOLOGUES

Mettant en œuvre un mécanisme de stabilisation de l'adduit de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par effet anomère, on a développé par la suite d'autres familles de  $\Delta^1$ pyrrolines N-oxyde comportant des groupes attracteurs en  $\beta$  tels que les esters ou les amides. La famille ayant fourni le plus de dérivés est celle de la nitroène 5-éthoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde (**EMPO**; 2-éthoxycarbonyl-2-méthyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline-1-oxyde) où le groupe électron-attracteur est un ester. La Table 8 présente une sélection de EMPOs substituées sur la fonction ester et/ou sur le cycle pyrrolidinique, avec les valeurs de  $t_{1/2}$ (EMPOs-OOH) et de  $K_p$  correspondantes. S'agissant du piégeage de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, plusieurs nitrones de la famille EMPO sont cristallisées et présentent des  $t_{1/2}$  significativement supérieures aux persistances les plus élevées mesurées pour les DEPMP(O)s mais les valeurs de la Table 8 doivent être pondérées par la concentration en nitroène et le système générateur radicalaire utilisé.

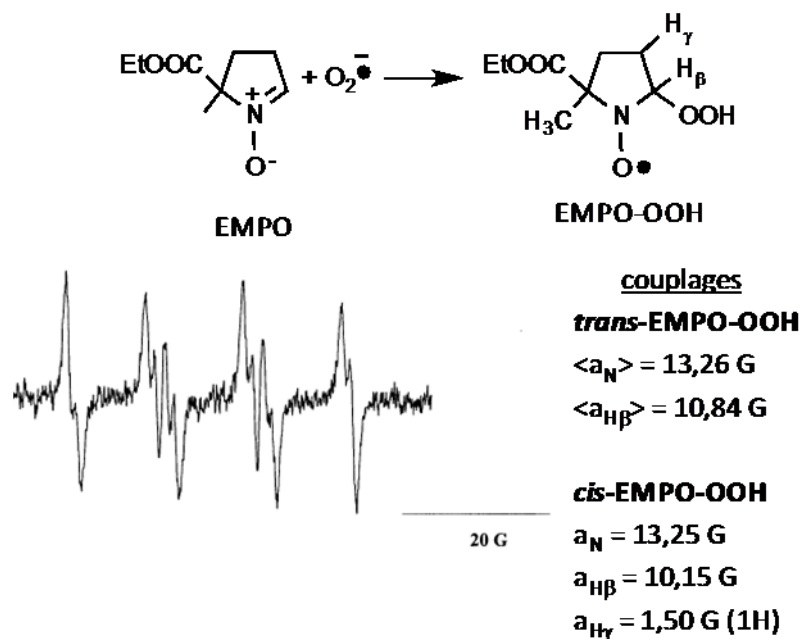
<sup>78</sup>se reporter à Zhang, Y. K.; Janzen, E. G.; Kotake, Y. *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, S154-S159 et références citées

Table 8: Structure des EMPOs et stabilité des adduits EMPOs-OOH<sup>79</sup>

Acronyme ou structure	Substitution		$t_{1/2}$ (min)	$K_p$	Ref.
	C cycle	L			
					
<b>EMPO</b>	<b>5-Me</b>	<b>Et</b>	<b>4,8–9,5</b>	<b>0,15</b>	79a,b
BuMPO	5-Me	<i>n</i> Bu	1,1	1,32	79b,c
OcMPO	5-Me	<i>n</i> C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	0,25	42	79b
—	5-Me	CH <sub>2</sub> CHMe <sub>2</sub>	21	—	79d
HMMPO	5-Me	CH <sub>2</sub> OH	3,5	0,04	60g
PrEPO	5- <i>n</i> Pr	Et	20	0,78	79b
DECPO	5-Et	Et	5	—	79e
EPhPO	5-Ph	Et	16,1	1,79	79f
3,5-DiPPO	5-Me-3-Me	iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	55	1,12	79g
BEMPO-3	5- <i>n</i> Bu-3-Me	Et	47,2	10,84	79h
CPCOMPO			2,4	—	79i

Comme dans le cas des signaux de RPE de DEPMPOs-OOH, les spectres obtenus à partir des EMPOs-OOH ont des largeurs de raie alternées résultant de la combinaison entre la pseudo-rotation du cycle et la rotation autour de la liaison O–O. En l'absence de groupe phosphorylé, les signaux de RPE des EMPOs-OOH présentent toutefois 12 raies (Schéma 34), soit un sextuplet de doublets d'allure similaire à celle de DMPO-OOH (Cf. Schéma 32A).

<sup>79</sup> (a) Olive, G.; Mercier, A.; Le Moigne, F.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 403–408. (b) Stolze, K.; Udilova, N.; Nohl, H. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 493–500. (c) Stolze, K.; Udilova, N.; Nohl, H. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 813–820. (d) Tsai, P.; Ichikawa, K.; Mailer, C.; Pou, S.; Halpern, H. J.; Robinson, B. H.; Nielsen, R.; Rosen, G. M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7811–7817. (e) Karoui, H.; Clément, J. L.; Rockenbauer, A.; Siri, D.; Tordo, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 149–152. (f) Stolze, K.; Rohr-Udilova, N.; Rosenau, T.; Hofinger, A.; Kolarich, D.; Nohl, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3368–3376. (g) Rohr-Udilova, N.; Stolze, K.; Sagmeister, S.; Parzefall, W.; Marian, B.; Nohl, H.; Schulte-Hermann, R.; Grasl-Kraupp, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5698–5703. (h) Stolze, K.; Udilova, N.; Rosenau, T.; Hofinger, A.; Nohl, H. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 297–305. (i) Han, Y.; Tuccio, B.; Lauricella, R.; Rockenbauer, A.; Zweier, J. L.; Villamena, F. A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2533–2541.



**Schéma 34** : Spectre de RPE détecté à 25°C lors du piégeage de  $O_2^{\bullet-}$  sur la nitronne EMPO (tampon phosphate, pH 7,0; d'après<sup>79a</sup>). La simulation est compatible avec un mélange des diastéréoisomères *trans/cis*-EMPO-OOH (96:6%) et pour l'adduit majoritaire *trans*-EMPO-OOH, les couplages indiqués sont des valeurs moyennes tenant compte de l'échange entre rotamères autour de la liaison O–O<sup>80</sup>.

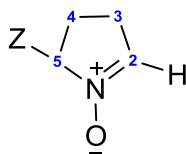
L'EMPO présentant 2 faces diastéréotopiques, le piégeage forme un couple de diastéréoisomères *cis/trans* qui n'apparaissent pas sur le spectre de RPE (Schéma 34) aussi nettement que dans le cas de DEPMPO-OOH (Cf. Schéma 33A) mais seule cette hypothèse permet d'obtenir une bonne simulation du signal<sup>80</sup> et a été validée par un calcul DFT<sup>81</sup>.

A la suite de l'EMPO, d'autres nitrones cycliques à substituants électron-attracteurs en  $\beta$  ont été synthétisées, sur la base d'acides carboxyliques, d'esters encombrés, d'amides ou d'un groupe alkyle perfluoré (Table 9)<sup>82</sup>.

<sup>80</sup>Culcasi, M.; Rockenbauer, A.; Mercier, A.; Clément, J. L.; Pietri, S. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1524–1538.

<sup>81</sup>(a) Villamena, F. A.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 1662–1674. (b) Villamena, F. A.; Liu, Y.; Zweier, J. L. *ibid* **2008**, *112*, 12607–12615.

<sup>82</sup>(a) Tasai, P.; Elas, M.; Parasca, A. D.; Barth, E. D.; Mailer, C.; Halpern, H. J.; Rosen, G. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 875–880. (b) Zhao, H.; Joseph, J.; Zhang, H.; Karoui, H.; Kalyanaraman, B. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 599–606. (c) Villamena, F. A.; Zweier, J. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **2002**, 1340–1344. (d) Villamena, F. A.; Rockenbauer, A.; Gallucci, J.; Velayutham, M.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7994–8004. (e) Stolze, K.; Rohr-Udilova, N.; Hofinger, A.; Rosenau, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8082–8089. (f) Stolze, K.; Rohr-Udilova, N.; Hofinger, A.; Rosenau, T. *ibid* **2009**, *17*, 7572–7584. (g) Karoui, H.; Nsanzumuhire, C.; Le Moigne, F.; Hardy, M.; Siri, D.; Derat, E.; Rockenbauer, A.; Ouari, O.; Tordo, P. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4064–4071.

**Table 9:** Autres  $\Delta^1$  pyrrolines *N*-oxyde  $\beta$ -substituées par un groupe électron-attracteur Z et stabilité des adduits du radical superoxyde<sup>82</sup>

Acronyme	Substitution		$t_{1/2}$ (min)	Ref.
	C cycle	Z		
—	5-Me	CO <sub>2</sub> H	—	82a
BMPO	5-Me	O <sup>t</sup> Bu	9	82b,c
AMPO	5-Me	H <sub>2</sub> NC(O)	8,3–8,6	82d,e
CaPtPO	5- <i>n</i> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H <sub>2</sub> NC(O)	11,1	82e
DMMCAPO	3-Me-5-Me	MeNHC(O)	11,2	82f
5-TFDMPO	5-Me	CF <sub>3</sub>	4,5	82g

On observe que l'effet anomère induit par le groupe Z stabilise les adduits –OOH pour tous ces composés (à l'exception de l'acide carboxylique qui ne semble pas piéger O<sub>2</sub><sup>•</sup><sup>82a</sup>). Cependant, les nitrones DEPMPO, l'EMPO et la BMPO (ces deux dernières dans une moindre mesure) restent les pièges les plus employées dans le couplage ST-RPE en milieu biologique, d'autant plus qu'elles sont commercialisées.

La deuxième stratégie de stabilisation des adduits de piégeage consiste à ralentir, ou même empêcher, l'approche du centre radicalaire. Dans la famille DMPO, ceci peut se faire en encombrant stériquement la fonction nitroxe par introduction d'un groupe alkyle sur le C-2 (Cf. Figure 2). Cependant, les cinétiques de la réaction de ST deviennent dans ce cas très lentes et les signaux de RPE trop faibles. Au cours des dernières années, le design de nouveaux piègeurs radicalaires a bénéficié des avancées de la chimie supramoléculaire où des molécules hôtes peuvent stabiliser des molécules invitées par chélation (il ne s'agit plus ici de liaison covalentes). Une fois inclus (encapsulé) dans la cavité d'un tel hôte, le fragment nitroxyde de l'adduit bénéficie d'un accès plus réduit aux agents extérieurs et sa persistance peut augmenter, même dans un milieu réducteur. En relation avec les nitrones, ce concept a été mis en œuvre avec les *β*-cyclodextrines (*β*-CD), des macrocycles constitués de 6 à 8 unités  $\alpha$ -

(1,4)glucopyranosiques. Ainsi, la persistance intrinsèque d'adduits de  $O_2^{\bullet-}$  tels que DMPO-OOH, DEPMPO-OOH, PBN-OOH et EMPOs-OOH est significativement augmentée *in vitro* en présence d'une  $\beta$ -CD méthylée, de même que la résistance à la réduction de ces adduits en présence de glutathion peroxydase (une enzyme endogène convertissant les hydroperoxydes tels que les adduits NITRONE-OOH en alcools (ici, en nitroxydes NITRONE-OH)) ou d'ascorbate (qui réduit un nitroxyde  $N-O^{\bullet}$  en hydroxylamine diamagnétique  $N-OH$ )<sup>83</sup>. La protection observée s'explique par le fait que, dans les complexes d'inclusion NITRONE-OOH/ $\beta$ -CD, le centre radicalaire et localisé dans la région hydrophobe, donc moins accessibles aux réactifs hydrophiles. Cette protection a aussi été obtenue dans des dérivés  $\beta$ -CD-PBN,  $\beta$ -CD-DEPMPO ou  $\beta$ -CD-AMPO substitués par un ligand ayant une terminaison  $\beta$ -CD, avec des  $t_{1/2}$ (NITRONE-OOH) de l'ordre de 30 minutes<sup>84</sup>.

### 1.2.2.3 Stabilisation des adduits superoxyde sur les dérivés $\beta$ -phosphorylés de la PBN

#### LES FAMILLES PPN ET EPPN

En 1995, le concept de stabilisation des adduits NITRONE-OOH par l'introduction en position  $\beta$  de la fonction nitrone d'un substituant électron-donneur Z a été appliqué aux nitrones linéaires dérivées de la PBN et de la 4-PyOBN (Cf. Table 3), avec la synthèse de la nitrone phosphorylée **N-benzylidène-2-(diéthoxyphosphoryl)propan-2-amine oxyde (PPN; Z = (EtO)<sub>2</sub>P(O))** et une dizaine de ses dérivés<sup>85</sup>. Suivant la même démarche que dans le cas de l'EMPO, la **N-2-(2-éthoxycarbonyl-propyl)  $\alpha$ -phényl nitrone (EPPN)** et une quinzaine de dérivés (où Z = CO<sub>2</sub>Et) ont été décrits à partir de 2002<sup>86</sup>. Par rapport aux adduits correspondants, l'introduction en position  $\beta$  d'un groupe diéthoxyphosphoryle ou ester entraîne une notable augmentation de la persistance de l'adduit du radical vs PBN-OOH. La Table 10 rassemble quelques dérivés caractéristiques dans les familles PPN et EPPN avec les valeurs de  $t_{1/2}$ (PPNs-OOH) et

<sup>83</sup> (a) Karoui, H.; Rockenbauer, A.; Pietri, S.; Tordo, P. *Chem. Commun.* **2002**, 3030–3031. (b) Karoui, H.; Tordo, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1043–1045. (c) Bardelang, D.; Rockenbauer, A.; Karoui, H.; Finet, J. P.; Biskupska, I.; Banaszak, K.; Tordo, P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2874–2882.

<sup>84</sup> (a) Bardelang, D.; Charles, L.; Finet, J. P.; Jicsinszky, L.; Karoui, H.; Marque, S. R. A.; Monnier, V.; Rockenbauer, A.; Rosas, R.; Tordo, P. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9344–9354. (b) Han, Y.; Tuccio, B.; Lauricella, R.; Villamena, F. A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7108–7117.

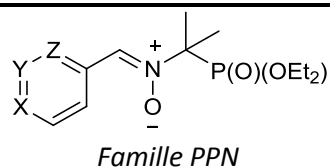
<sup>85</sup> (a) Zeghdaoui, A.; Tuccio, B.; Finet, J. P.; Cerri, V.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 2087–2089. (b) Tuccio, B.; Zeghdaoui, A.; Finet, J. P.; Cerri, V.; Tordo, P. *Res. Chem. Intermed.* **1996**, *22*, 393–404. (c) Rizzi, C.; Marque, S.; Belin, F.; Bouteiller, J. C.; Lauricella, R.; Tuccio, B.; Cerri, V.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2513–2518. (d) Liu, Y. P.; Wang, L. F.; Nie, Z.; Ji, Y. Q.; Liu, Y.; Liu, K. J.; Tian, Q. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7753–7762.

<sup>86</sup> (a) Roubaud, V.; Lauricella, R.; Bouteiller, J. C.; Tuccio, B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *397*, 51–56. (b) Stolze, K.; Udilova, N.; Rosenau, T.; Hofinger, A.; Nohl, H. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1717–1726. (c) Stolze, K.; Udilova, N.; Rosenau, T.; Hofinger, A.; Nohl, H. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 185–193. (d) Allouch, A.; Roubaud, V.; Lauricella, R.; Bouteiller, J. C.; Tuccio, B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 2458–2462. (e) Allouch, A.; Roubaud, V.; Lauricella, R.; Bouteiller, J. C.; Tuccio, B. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 593–598.

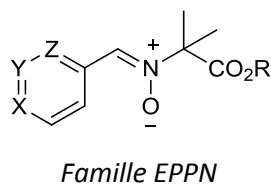


$t_{1/2}$ (EPPNs-OOH) en milieu tampon phosphate (pH = 6)<sup>87</sup> et une mesure de leur lipophilie.

**Table 10:** Dérivés  $\beta$ -phosphorylés (PPNs) et  $\beta$ -esters (EPPNs) de la PBN et stabilité des adduits du radical superoxyde<sup>85,86</sup>



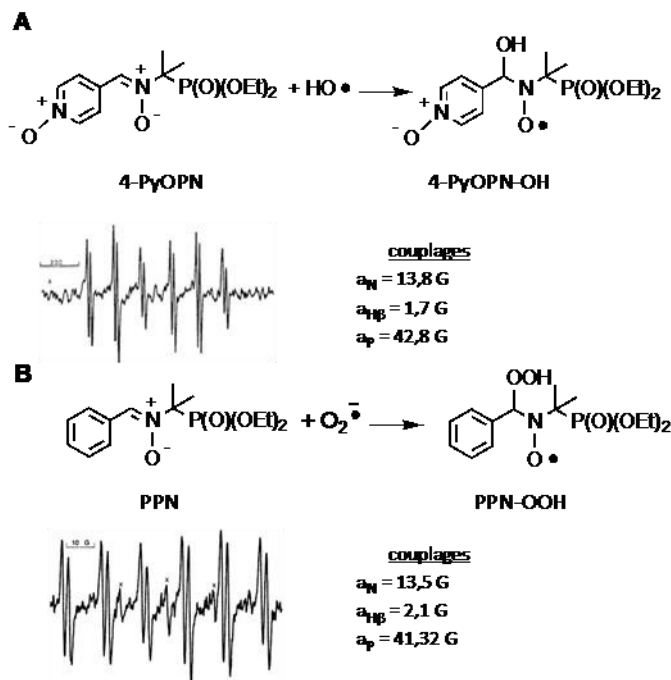
Acronyme	Substitution			$t_{1/2}$ (min)	$K_p$	Ref.
	X	Y	Z			
<b>PPN</b>	<b>CH</b>	<b>CH</b>	<b>CH</b>	<b>5,1</b>	<b>10,2</b>	85c,87
4-PyOPN	N <sup>+</sup> -O <sup>-</sup>	CH	CH	7	0,21	85c, 87
4-Cl-PPN	C-Cl	CH	CH	—	273	85c
2-PyPN	CH	CH	N	—	4,8	85c
3-PyPN	CH	N	CH	—	2,6	85c
4-NO <sub>2</sub> -PPN	C-NO <sub>2</sub>	CH	CH	—	26,9	85c
4-OH-PPN	C-OH	CH	CH	8,8	—	85d



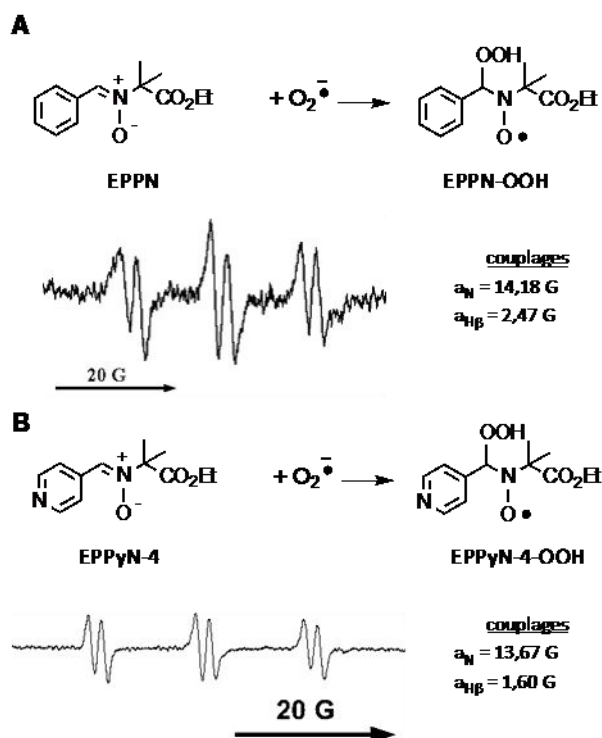
Acronyme	Substitution				$t_{1/2}$ (min)	$K_p$	Ref.
	X	Y	Z	R			
<b>EPPN</b>	<b>CH</b>	<b>CH</b>	<b>CH</b>	<b>Et</b>	<b>5,9-6,8</b>	<b>29,8</b>	86a,b
EPPyN-2	CH	CH	N	Et	5,8	7,2	86c
EPPyN-3	CH	N	CH	Et	10,7	2,4	86c
EPPyN-4	N	CH	CH	Et	7,3	3,7	86b
PPPN	CH	CH	CH	<i>n</i> Pr	3,45	57	86b
TBPPN	CH	CH	CH	<i>t</i> Bu	1	145	86b
iPPPyN-3	CH	N	CH	<i>iso</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	9,60	5,5	86c
EPPyON	N <sup>+</sup> -O <sup>-</sup>	CH	CH	Et	0,33	6,1	86e

<sup>87</sup>Roubaud, V.; Lauricella, R.; Tuccio, B.; Bouteiller, J. C.; Tordo, P. *Res. Chem. Intermed.* **1996**, *22*, 405-416.

Les adduits formés à partir des PPNs ou EPPNs ont des spectres de RPE comportant respectivement 12 (Schéma 35) et 6 (Schéma 36) raies, avec des couplages hyperfins qui varient relativement peu avec la nature du radical piégé.



**Schéma 35** : Spectres de RPE détectés à 25°C (tampon phosphate, pH 7,0) lors du piégeage de (A) HO• sur la nitronne 4-PyOPN et (B) O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sur la nitronne PPN; signaux x = nitroxyde formé par décomposition, donnant un signal de RPE triplet (d'après<sup>85a,b</sup>).



**Schéma 36** : Spectres de RPE détectés à 25°C (tampon phosphate, pH 7,0) lors du piégeage de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sur les nitrones (A) EPPN et (B) EPPyN-4<sup>86b,c</sup>.

Alors que plusieurs adduits PPNs-OH ont été obtenus et les couplages hyperfins déterminés<sup>85a-c</sup> (Cf. Schéma 35A), la génération de HO<sup>•</sup> en présence des EPPNs ne fournit pas d'adduit EPPNs-OH, les EPPNs semblant de relativement bons piègeurs de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Cf. Schéma 36)<sup>86</sup>.

## 1.3 Propriétés pharmacologiques des PBNs

### 1.3.1 Aspects thérapeutiques des PBNs

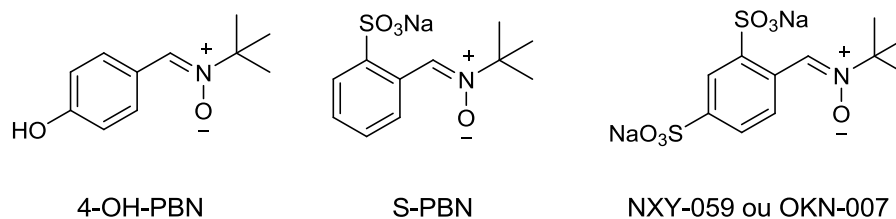
Dans des conditions pathologiques liées au stress oxydant (c'est-à-dire la formation primaire de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et/ou NO<sup>•</sup>, puis leur évolution en présence de catalyseurs endogènes et de biomatériaux), les nitrones pourraient avoir un intérêt pharmacologique. En 1986, Novelli et coll.<sup>88</sup> ont publié la première étude expérimentale chez des rats soumis à un choc traumatique, dont la survie était significativement augmentée par des injections préventives de PBN. A la suite de ces travaux, une telle utilisation thérapeutique des nitrones a été examinée dans un large spectre de situations de stress oxydant. Les résultats positifs de cette recherche, qui s'étalent sur trois décennies, ont été compilés dans un grand nombre de revues et ouvrages<sup>89</sup> desquels sont tirées les grandes lignes dans ce qui suit.

Les nitroxydes ayant une persistance intrinsèque très supérieure à celle des radicaux dont ils sont issus (par exemple, HO<sup>•</sup>) ou à celles des radicaux assurant la propagation des chaînes de peroxydation lipidique (ROO<sup>•</sup> et RO<sup>•</sup>), on peut considérer les nitrones comme des agents antioxydants favorisant la terminaison de ces chaînes. Dans le milieu intercellulaire et le cytosol, et en présence de bio-réducteurs, ces nitroxydes peuvent ensuite régénérer la nitrone de départ par dismutation (Schéma 17), un processus favorisé entropiquement. Cette désactivation catalytique des radicaux primaires est en théorie plus efficace pour les nitrones plus hydrosolubles que sont les dérivés DMPOs que pour les PBNs qui vont diffuser plus rapidement à l'intérieur des membranes cellulaires à cause de leur plus grande lipophilie. Pour cette dernière raison, cependant, le screening de nitrones à activité thérapeutique s'est presque exclusivement concentré sur la PBN, cette molécule étant disponible chez les

<sup>88</sup> Novelli, G. P.; Angiolini, P.; Tani, R.; Consales, G.; Bordi, L. *Free Radic. Res. Commun.* **1986**, *1*, 321–324.

<sup>89</sup> (a) Kotake, Y. *Antioxid. Redox Signal.* **1999**, *1*, 481–499. (b) Floyd, R. A.; Kopke, R. D.; Choi, C. H.; Foster, S. B.; Doblaz, S.; Towner, R. A. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1361–1374. (c) Durand, G. *Synthetic Antioxidants*, in *Molecular Basis of Oxidative Stress: Chemistry, Mechanisms, and Disease Pathogenesis*; Villamena, F. A., Ed., Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp. 377–406, **2013**. (d) Floyd, R. A.; Castro Faria Neto, H. C.; Zimmerman, G. A.; Hensley, K.; Towner, R. A. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *62*, 145–156

fournisseurs de réactifs de laboratoire. Le Schéma 37 montre quelques autres structures de PBNs dont les effets thérapeutiques ont été déterminés ou sont en cours d'évaluation au niveau clinique.



**Schéma 37** : Structures de PBNs évaluées pour leur activité pharmacologique.

S'agissant de l'activité pharmacologique des PBNs, si on ne peut pas complètement exclure que l'effet protecteur soit lié à un mécanisme de piégeage, celui-ci semble peu probable car les faibles vitesses de piégeage mises en jeu ( $k_{ST} < 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) imposent des concentrations efficaces en PBNs de l'ordre de 10–50 mM au niveau des sites de formation radicalaire. Aux doses non-toxiques administrables par voie orale ou intrapéritonéale chez l'animal, on ne peut pas dépasser des concentrations en PBN mille fois plus faibles. Ceci implique que seule une proportion négligeable de radicaux issus du stress oxydant peut être piégée et donc que l'effet piègeur de la PBN ne joue probablement pas un rôle prépondérant dans son effet pharmacologique. D'autres arguments expérimentaux sont en défaveur d'un effet piègeur. Ainsi, la protection demeure efficace plusieurs heures ou jours après administration de la PBN (dont la durée de vie chez l'animal ou l'homme n'excède pas 2 heures).

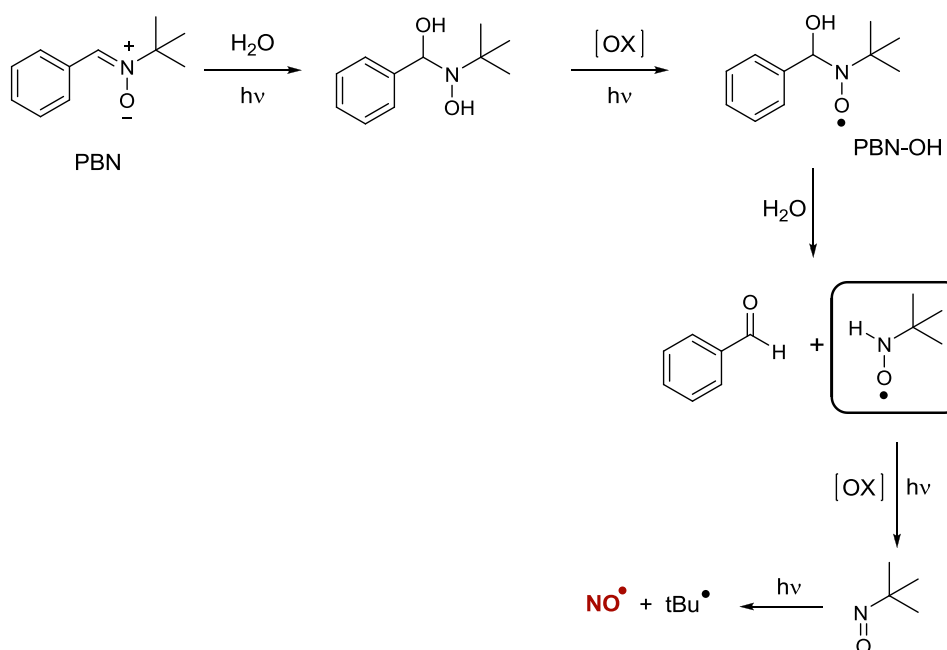
Parmi les autres mécanismes d'action, la PBN elle-même s'avère un antioxydant peu actif : il est environ mille fois moins puissant que celui du  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) ou du 2,6-ditertiobutyl-4-méthylphénol (BHT), un antioxydant alimentaire ou le Trolox (un analogue hydrosoluble de la vitamine E).

Chez l'animal, les PBNs se sont avérées efficaces dans le traitement de certains cancers (carcinome hépatocellulaire, gliome) et hépatites, les effets induits du diabète, certaines rétinites, la perte d'audition consécutive à l'exposition à des niveaux sonores élevés, le choc septique et le traitement contre les effets cardiovasculaires et l'apoptose liés à l'administration de chimiothérapies. Cependant, les pathologies les plus étudiées donnant lieu à un développement commercial sont le traitement de

l'accident vasculaire cérébral (AVC) et la prise en charge de la perte de mémoire liée à l'âge.

### 1.3.2 Décomposition spontanée des PBNs libérant NO

En 1993, Kalyanaraman et coll. ont observé une action vasodilatatrice des principales nitrones utilisées dans le couplage ST-RPE (DMPO, PBN et 4-PyOBN), lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de perfusion de cœurs de rat isolés perfusés dans des conditions normoxiques<sup>90</sup>. L'hypothèse la plus réaliste permettant d'expliquer ce phénomène pour la PBN a été élaborée dans le groupe de Mason, où il a été démontré qu'en solution aqueuse et sous l'action de la lumière, la nitronne se décompose pour libérer des espèces radicalaires, en particulier du NO<sup>•</sup> (Schéma 38)<sup>91</sup>.



**Schéma 38 :** Formation de NO<sup>•</sup> au cours de l'hydrolyse photo-assistée de la PBN (d'après Chamulitrat et al.<sup>91a</sup>)

NO<sup>•</sup> est un agent important de la signalisation cellulaire et joue un rôle régulateur dans de nombreux processus biologiques parmi lesquels la vasodilatation et la régulation de la pression sanguine<sup>92</sup>. Une récente étude vient de montrer que des flux

<sup>90</sup> Konorev, E. A.; Baker, J. E.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 127–137.

<sup>91</sup>(a) Chamulitrat, W.; Jordan, S. J.; Mason, R. P.; Saito, K.; Cutler, R. G. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11520–11527. (b) Chamulitrat, W.; Parker, C. E.; Tomer, K. B.; Mason, R. P. *Free Radic. Res.* **1995**, *23*, 1–14.

<sup>92</sup>(a) Henry, Y.; Ducrocq, C.; Drapier, J. C.; Servent, D.; Pellat, C.; Guissani, A. *Eur. Biophys. J.* **1991**, *20*, 1–15. (b) pour une revue récente centrée sur le système cardiovasculaire, se reporter à : Mangge, H.; Becker, K.; Fuchs, D.; Gostner, J. M. *World J. Cardiol.* **2014**, *6*, 462–477.

de  $\text{NO}^\bullet$  relativement importants sont libérés par la PBN ou la 4-OH-PBN consécutivement à une formation initiale de  $\text{HO}^\bullet$ <sup>93</sup>.

L'objectif de notre travail a consisté à développer une nouvelle famille de nitrones phosphorylées linéaires hybrides sur la base de la PPN et comportant des substituants oxygénés sur le cycle aromatique susceptibles de conférer à ces molécules des propriétés antioxydantes. Pour tester ces effets, nous avons choisi d'évaluer les propriétés *in vitro* de donneurs de  $\text{NO}^\bullet$  pour ces molécules et d'examiner, pour une sélection d'entre elles, leur impact pharmacologique dans un modèle *ex vivo* dans lequel  $\text{NO}^\bullet$  a un rôle prépondérant. Dans le prochain chapitre, nous décrivons les cibles et stratégies de synthèse adoptées.

---

<sup>93</sup>Croitoru, M. C.; Ibolya, F.; Pop, M. C.; Dergez, T.; Mitroi, B.; Dogaru, M. T.; Tökés, B. Nitric Oxide **2011**, 25, 309–315.

# **CHAPITRE 2**

## **Nouvelles nitrones hybrides dérivées de la PPN**

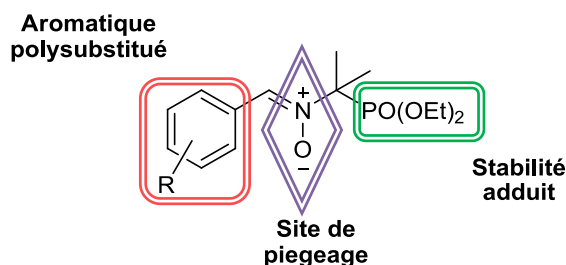




## **Introduction**

Au moment où a commencé notre travail, l'analyse de la littérature (Cf. Chapitre 1) montrait que l'essentiel des avancées relatives au couplage ST-RPE dans les milieux biologiques avait en grande partie résulté du développement de nitrones pentacycliques de type DMPO substituées par un groupe électron-attracteur en position  $\beta$  de la fonction nitrone. Cette transformation, à l'origine des familles DEPMPOs, EMPOs et ses analogues, a abouti à des pièges bio-compatibles formant avec le radical  $O_2^{\bullet}$  des adduits de persistance nettement accrue par rapport à l'adduit perhydroxyle DMPO-OOH, interprétée par l'existence d'un effet électronique stabilisateur de type anomère. Ensuite, l'introduction de substituants appropriés sur des positions n'étant concernées ni par la réaction de piégeage, ni par la stabilisation de l'adduit perhydroxyle a donné accès à des nitrones plus complexes apportant soit une stabilisation stérique accrue, soit une vectorisation particulière des espaces intracellulaires ou subcellulaires. Bien que la DEPMPO et l'EMPO aient progressivement remplacé la DMPO dans les études du stress oxydant par ST-RPE, on se heurte cependant toujours à des problèmes (a) de déconvolution des spectres liés à la pseudo-rotation du cycle pyrrolidinique combinée à l'existence de diastéréoisomères et (b) d'obtention des quantités suffisantes que requiert l'analyse statistique d'une étude biologique.

Parallèlement à cette approche mécanistique de la formation radicalaire en milieu biologique, un développement important des applications thérapeutiques de certaines nitrones linéaires de la **famille PBNs** est en cours, avec de possibles retombées pour l'industrie pharmaceutique (Cf. Chapitre 1, §.1.3). Dans cette perspective, le but de ce travail a été de tirer parti de l'effet stabilisateur du groupement diéthoxyphosphoryle en position beta sur la persistance des adduits NITRONE-OOH et NITRONE-OH observé pour **les nitrones du type PPNs, afin de développer de nouveaux analogues portant un cycle aromatique polysubstitué.**



**Figure 5 :** Structure générale des nouvelles nitrones PPNs

Jusqu'à maintenant peu de PPNs ont été décrites et nous n'avons trouvé dans la littérature qu'une seule application de la PPN et la 4-PyOPN *ex vivo* (cœur de rat isolé perfusé), où les auteurs rapportent un effet pro-oxydant *in vitro* pour la PPN<sup>94</sup>.

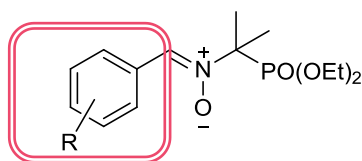
## 2.1 Objectifs

Dans nos PPNs-cibles, les substituants R du cycle ont été choisis de manière à introduire :

1. un **groupement de type phénolique** tel que celui qu'on retrouve dans certains antioxydants naturels afin d'étudier l'influence sur les propriétés antioxydantes *in vitro* de ces nouvelles structures. La finalité de cette partie de notre travail a été d'utiliser l'éventuelle synergie entre le caractère antioxydant du groupement phénolique et la capacité de la fonction nitrone à piéger les radicaux dans un modèle cellulaire du stress oxydant.
2. des substituants **électro-attracteurs** ou **électro-donneurs** sur le cycle aromatique afin de moduler l'électrophilie sur le carbone de la fonction nitrone et d'évaluer ainsi l'influence de l'effet inductif (+/-I) et de l'effet mésomère (+M/-M) des substituants sur les caractéristiques du piégeage.

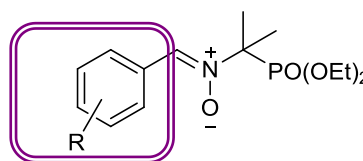
<sup>94</sup>Vergely, C.; Renard, C.; Moreau, D.; Perrin-Sarrado, C.; Roubaud, V.; Tuccio, B.; Rochette, L. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2003**, *17*, 433–442.

### Objectif 1



**COMPOSE PHENOLIQUE:**  
caractère antioxydant

### Objectif 2



**GROUPEMENT DONNEUR OU  
ATTRACTEUR D'ELECTRONS:**  
effet électronique

**Figure 6 :** Structures générales des deux séries de nouvelles nitrones

Pour chacune de ces **nouvelles nitrones linéaires hybrides**, nous avons effectué :

- 1) une étude par RPE du piégeage de radicaux de diverses natures (oxygénés, carbonés, azotés, soufrés), avec détermination des couplages hyperfins des adduits et une étude du pouvoir donneur de  $\text{NO}^\bullet$  *in vitro*;
- 2) la mesure de leur lipophilie (coefficient de partage octanol-eau) par une méthode semi-empirique;
- 3) une mesure de la cytotoxicité sur cultures cellulaires (cellules A945 dérivées de l'épithélium d'adénocarcinome pulmonaire humain);
- 4) la mesure du pouvoir antioxydant *in vitro* par des tests standard (DPPH, TRAP, ORAC, inhibition de la xanthine oxydase, quenching de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).

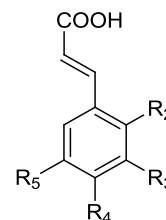
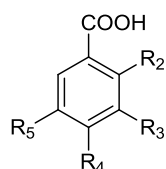
#### 2.1.1 Effet antioxydant des composés mono-phénoliques

Les antioxydants mono-phénoliques, très répandus dans le monde végétal, dont ils constituent également le plus important groupe de métabolites secondaires, possèdent des propriétés pharmacologiques qui ont fait l'objet d'un grand nombre d'études<sup>95</sup>. D'un point de vue structural, ceux-ci ont un (tocophérol, acide phénolique, coumarines) ou deux (hydroxystilbènes) cycles aromatiques, chacun étant substitué par un ou plusieurs groupes alkyle, hydroxyle ou alcoyle. A noter qu'une autre grande classe d'antioxydants naturels, les flavonoïdes, est constituée de molécules polyphénoliques ayant en commun un cœur de 15 carbones (aglycone).

<sup>95</sup> Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1819–1892

Parmi nos PPNs-cibles, celles dont le substituant aromatique présente un caractère potentiellement antioxydant peuvent être vues comme des dérivés d'acides phénoliques naturels (Table 11).

**Table 11 :** Exemples des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique



ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	OH	H	acide <i>p</i> -coumarique
acide protocatéchique	H	OH	OH	H	acide caféique
acide vanillique	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	acide férulique
acide syringique	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	acide sinapique
acide gallique	H	OH	OH	OH	
acide salicylique	OH	H	H	H	
acide gentisique	OH	H	H	OH	

Les deux principaux mécanismes responsables des effets antioxydants des composés phénoliques sont liés à leur pouvoir chélateur de métaux et à leur capacité à interrompre les chaînes de propagation radicalaire. Dans l'abondante littérature relative aux antioxydants naturels, on pourra se reporter à des revues récentes<sup>96</sup>.

La réactivité des phénols vis-à-vis des espèces radicalaires est liée à la présence des groupements OH sur la structure aromatique qui peuvent agir comme agents réducteurs par transfert d'un atome d'hydrogène. Cette aptitude à céder un atome d'hydrogène confère aux phénols un **caractère acide faible**, avec un pK<sub>a</sub> = 8–10 nettement inférieur à celui des alcools aliphatiques (pK<sub>a</sub> = 16–19) mais supérieur aux acides carboxyliques (pK<sub>a</sub> ≥ 5). Les réactions entraînant la **rupture de la liaison O–H** peuvent être **hétérolytiques ou homolytiques**.

<sup>96</sup>(a) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956. (b) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. (c) Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 435–445.

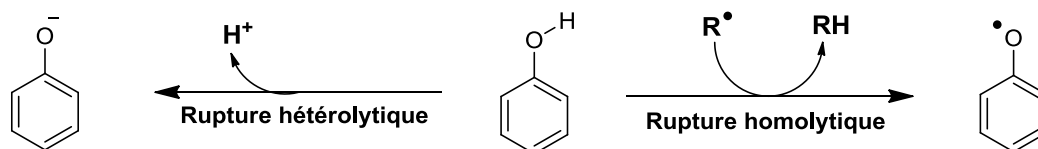


Schéma 39

Dans l'équilibre acido-basique du phénol, la base conjuguée (anion phénolate) formée par rupture hétérolytique de la liaison O–H est stabilisée par résonance, par effet +M (Schéma 40A). Cependant, le **mécanisme antioxydant** le plus probable des phénols résulte de la possibilité de **rupture homolytique**, conduisant à la formation d'un **radical aryloxy**  $\text{ArO}^\bullet$  également stabilisé par résonance (Schéma 40B).

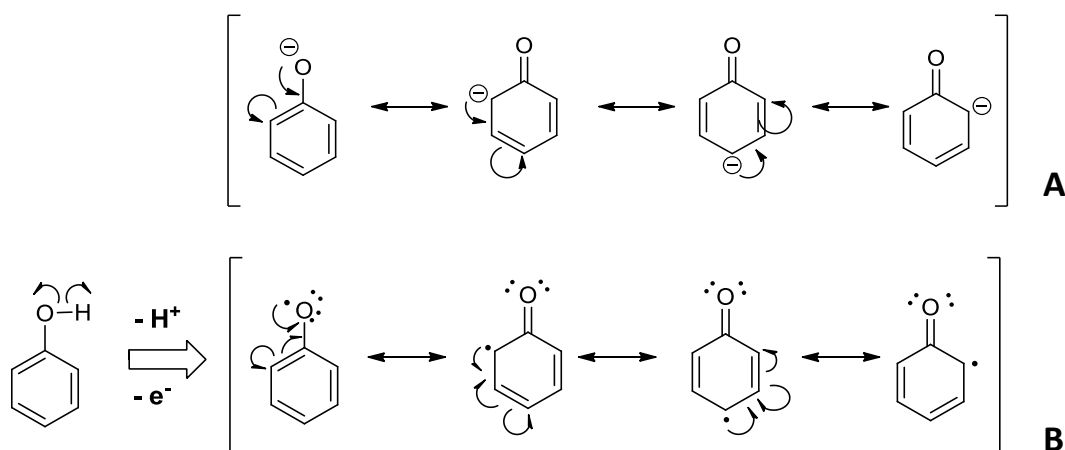


Schéma 40 : A. Formes limites de résonance de l'ion phénolate B. Stabilisation par résonance du radical phénoxy

Il s'en suit que la caractéristique responsable de la réactivité des composés phénoliques vis-à-vis des radicaux libres est la capacité à stabiliser le radical phénoxy résultant qui permet de diminuer l'enthalpie de liaison OH et faciliter le transfert d'un proton à des espèces radicalaires.

En particulier, la formation primaire d'un radical de type  $\text{ArO}^\bullet$  par transfert d'hydrogène apparaît comme l'événement le plus probable se produisant lors de l'interaction d'un composé phénolique ou polyphénolique naturel  $\text{ArOH}$  avec un radical libre  $\text{R}^\bullet$  ou  $\text{RO}_n^\bullet$  ( $n = 1$  ou  $2$ ) formé dans le stress oxydant (Table 12).

**Table 12** : Mécanismes possibles du transfert d'hydrogène à partir d'un composé phénolique

<b>MÉCANISME 1</b>		
<i>HAT</i> ( <i>H-atom transfer</i> ) :	$\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{RH}$	Eq. 1a
<i>PCET</i> ( <i>proton-coupled electron transfer</i> ) :	$\text{ArOH} + \text{RO}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{ROH}$	Eq. 1b
<b>MÉCANISME 2</b>		
<i>ET-PT</i> ( <i>electron transfer-proton transfer</i> ) :	$\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArOH}^{\bullet+} + \text{R}^-$	Eq. 2a
	$\text{ArOH}^{\bullet+} + \text{R}^- \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{RH}$	Eq. 2b
<b>MÉCANISME 3</b>		
<i>SPLET</i> ( <i>sequential proton loss-electron transfer</i> ) :	$\text{ArOH} \rightarrow \text{ArO}^- + \text{H}^+$	Eq. 3a
	$\text{ArO}^- + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{R}^-$	Eq. 3b
	$\text{R}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{RH}$	Eq. 3c

Le mécanisme détaillé du transfert d'hydrogène (Eqs. 1a et 1b) a été étudié selon ses aspects thermodynamiques et cinétiques par de nombreux auteurs, en reliant les données expérimentales aux résultats de calculs théoriques<sup>97</sup>. Dans le mécanisme 1, l'atome d'hydrogène et son électron sont transférés en une seule étape, soit dans la même orbitale moléculaire de  $\text{R}^\bullet$  (*HAT*; Eq. 1a), soit dans deux orbitales différentes (*PCET*; Eq. 1b). Le mécanisme 2 (*EP-PT*) est en deux étapes, initié par un transfert électronique (Eq. 2a) suivi d'une déprotonation (Eq. 2b). Le mécanisme 3 (*SPLET*) est l'inverse du mécanisme 2 : il est initié par une déprotonation (Eq. 3a), l'anion phénolate formé subit un transfert d'électron (Eq. 3b), la réaction se terminant par la protonation de l'anion alkyle (Eq. 3c).

La réactivité particulière des composés phénoliques envers les radicaux libres sera favorisée s'il y a sur le cycle des substituants qui stabilisent le radical phénoxy. D'une manière générale on obtient les effets antioxydants les plus forts pour des substituants électron donneurs et/ou stériquement encombrants, mais aussi dans le cas de groupements donneurs d'une liaison hydrogène en position *ortho*<sup>98</sup>.

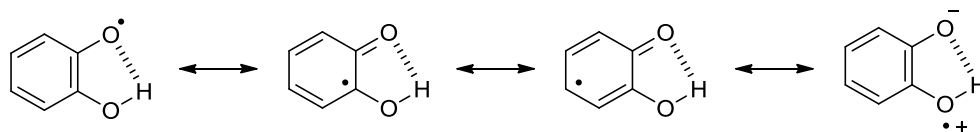
L'une des caractéristiques structurales les plus importantes pour la réactivité de composés phénoliques est le nombre et la position des groupes hydroxyles. En particulier, ceux comportant un **motif catéchol** (1,2-dihydroxybenzène) possèdent des **propriétés antioxydantes accrues**. De nombreux travaux associant données expérimentales, structurales et calculs théoriques ont montré que le radical aryloxy est **stabilisé par une liaison H** avec le groupe hydroxy vicinal<sup>99</sup> (Schéma 41). Ce type de

<sup>97</sup>Di Meo, F.; Lemaury, V.; Cornil, J.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. L.; Olivier, Y.; Trouillas, P. J. *Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 2082–2092. et références citées.

<sup>98</sup>Jing, P.; Zhao, S. J.; Jian, W. J.; Qian, B. J.; Dong, Y.; Pang, J. *Molecules* **2012**, *17*, 12910–12924.

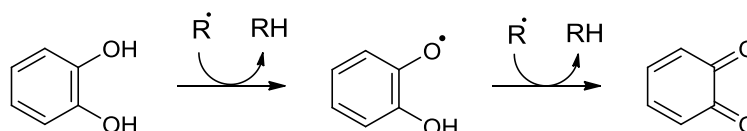
<sup>99</sup>Amorati, R.; Valgimigli, L. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4147–4158 et références citées.

stabilisation s'ajoute à l'effet antioxydant résultant du pouvoir métal chélateur des composés mono-phénoliques à motif catéchol<sup>100</sup>.



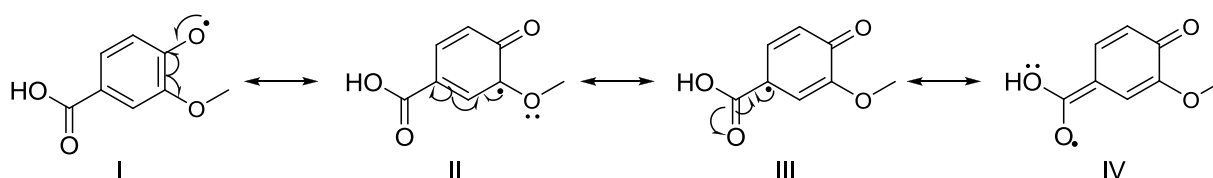
**Schéma 41** : Stabilisation du radical phénoxy dans un motif catéchol

De plus, la structure catéchol est stabilisée par résonance avec la formation d'une semi-quinone qui peut facilement donner un autre atome d'hydrogène pour se réarranger en o-quinone<sup>101</sup>. Ainsi, chaque transfert d'hydrogène est associé à l'interruption d'une chaîne de réactions radicalaires.



**Schéma 42** : Réaction du catéchol avec les radicaux libres et formation d'une quinone stable

Des **substituants méthoxy** sur le motif phénolique peuvent également moduler l'activité antioxydante en raison de leur **caractère +M** qui augmente la densité électronique sur le cycle et réduit l'énergie de dissociation de la liaison OH. Dans le Schéma 43, on peut observer que le doublet non liant dans l'orbitale 2p du groupement *o*-OCH<sub>3</sub> stabilise l'électron célibataire sur le carbone C-3 du cycle phénolique (Schéma 43, structure II)<sup>102</sup> et le doublet de l'hydroxyle dans la forme limite IV stabilise l'électron célibataire sur l'oxygène du groupement carboxylique.



**Schéma 43** : Stabilisation du radical phénoxy dans l'acide vanillique

<sup>100</sup>Engelmann, M. D.; Hutchenson, R.; Cheng, I. F. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2953–42960.

<sup>101</sup>Bendary, E.; Francis, R. R.; Ali, H. M. G.; Sarwat, M. I.; El Hady, S. *Ann. Agric. Sci.*, **2013**, *58*, 173–181.

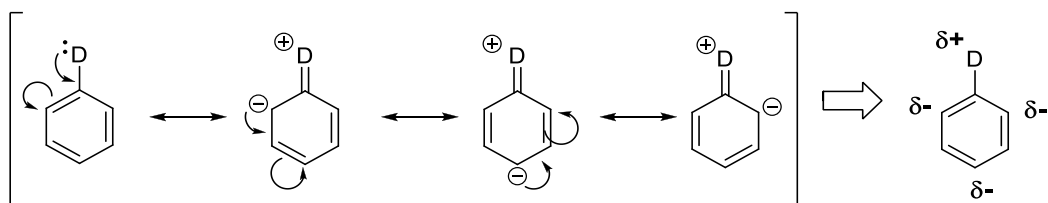
<sup>102</sup>Zhou, K.; Yin, J. J.; Yu, L. L. *Food Chem.* **2006**, *95*, 446–457.

Il existe une différence d'activité selon la position *ortho* et *para* vs *méta* du -OMe par rapport au groupe OH, en apparence liée au caractère *+M* du groupe méthoxy dans les formes limites du radical phénoxy. Cependant, cette situation est compliquée par la superposition, à ces effets électroniques, d'effets stériques et de solubilité dans les différents tests mis en œuvre<sup>103</sup>.

### 2.1.2 Effets électroniques des substituants d'un cycle aromatique

Les substituants sur un cycle aromatique peuvent influencer la réactivité. Les principaux effets électroniques qu'un substituant puisse exercer sur une structure aromatique sont :

- L'effet inductif – Il se produit au moyen des **électrons  $\sigma$**  et est influencé par l'électronégativité des atomes. Des substituants plus électronégatifs que le carbone provoquent un **effet inductif  $\sigma$ -accepteur,  $-I$** , qui abaisse la densité électronique sur le cycle. A l'inverse, dans le cas de substituants possédant une électronégativité inférieure à celle du carbone, un **effet inductif  $\sigma$ -donneur,  $+I$** , est observé et augmente la densité électronique sur l'aromatique.
- L'effet mésomère (ou résonance) – Il concerne les **électrons  $\pi$**  et dépend de la capacité du substituant à délocaliser ses électrons libres. Les substituants électrons-donneurs (**D**), possédant un doublet électronique libre, induisent un **effet mésomère donneur  $+M$** . Ils peuvent transférer leur paire libre sur le noyau aromatique de manière à augmenter sa densité électronique ; le cycle devient plus nucléophile en particulier dans les positions *ortho* et *para* (Schéma 44).



**Schéma 44** : Résonance de groupements à effet mésomère *+M*

<sup>103</sup>(a) Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; Scaccini, C. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1453–1459. (b) Neta, P.; Grodkowski, J. *J. Phys. Chem., Ref. Data* **2005**, *34*, 109–199. (c) Jing, P.; Zhao, S. J.; Jian, W. J.; Qian, B. J.; Dong, Y.; Pang, J. *Molecules* **2012**, *17*, 12910–12924.



Les groupements électrons-attracteurs (A) sont désactivants du cycle aromatique et provoquent un effet mésomère attracteur  $-M$ . Ils sont capables d'attirer les électrons du système  $\pi$  et par conséquent de réduire la densité électronique du cycle. Pour la résonance, le déficit d'électrons est localisé sur les positions *ortho* et *para*, alors que les positions *mé*ta sont plus nucléophiles et donc plus aptes à réagir avec un électrophile (Schéma 45).

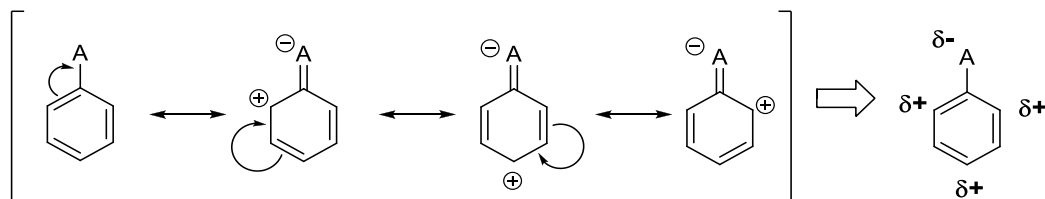


Schéma 45 : Résonance de groupements à effet mésomère  $-M$

Nous avons synthétisé des PPNs diversement substituées sur le cycle aromatique de manière à moduler les effets électroniques et par conséquent les caractéristiques discutées ci-dessus. Le but est d'étudier si les effets électroniques induits par les substituants peuvent influencer sur la capacité de piégeage des radicaux libres.

## 2.2 Synthèse de nouvelles PPNs

Pour la synthèse des PPNs substituées, nous avons utilisé la réaction de condensation entre une hydroxylamine *N*-monosubstituée et un composé carbonyle (Schéma 46) méthode décrite en détail dans le Chapitre 1.

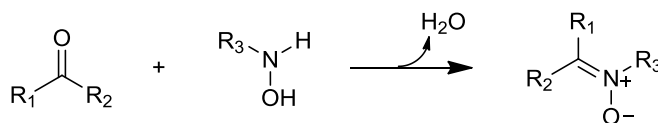
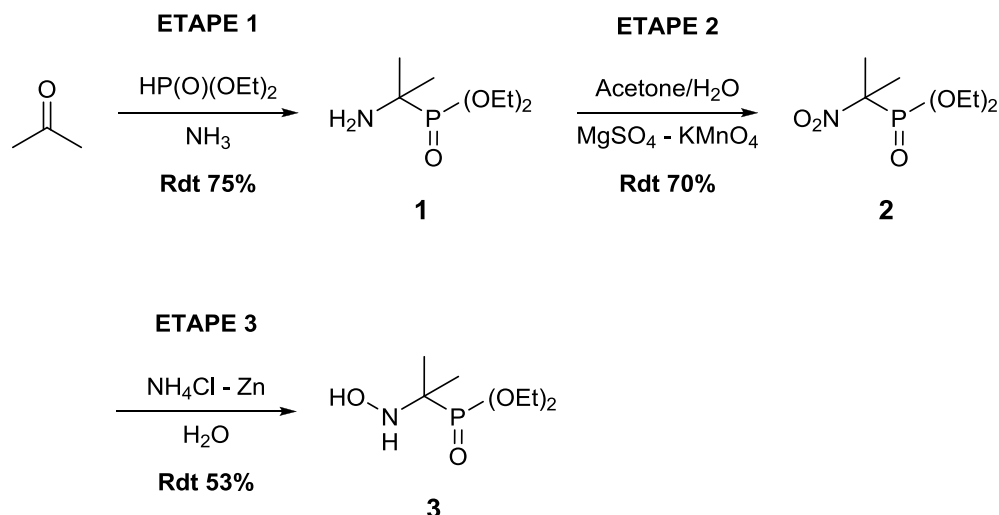


Schéma 46

Dans notre cas, il s'agissait de préparer le diéthyl 2-(hydroxyamino)propan-2-ylphosphonate **3**, phosphonate aliphatique portant une fonction hydroxylamine sur le carbone en  $\alpha$  du phosphore. A partir de la diméthylcétone, la préparation de **3** (Schéma 9) procède via la synthèse du dérivé intermédiaire nitro **2**, dont les méthodes générales de préparation ont fait l'objet d'une revue<sup>104</sup>. Nous avons obtenu, le dérivé **3**

<sup>104</sup>Baranov, G. M.; Perekalin, V. V. *Usp. Khim.* **1992**, *61*, 2215–2246. (*ibid.* *Russ. Chem. Rev., Engl. Transl.* **1992**, *61*, 1220–1237.)

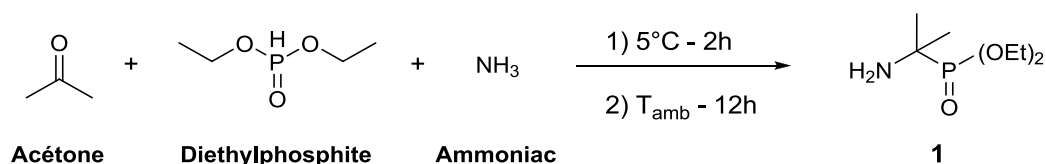
en trois étapes (Schéma 47) selon la méthode décrite par Rizzi<sup>105</sup>, en apportant des modifications afin d'améliorer les rendements et de simplifier les purifications car **3** est le synthon commun dans la synthèse de la série de PPNs.



**Schéma 47** : Synthèse de l'hydroxylamine **3** servant de synthon commun aux PPNs

**ETAPE 1** : synthèse du diéthyl 2-aminopropan-2-ylphosphonate **1**

La première étape est une aminophosphorylation, c'est-à-dire la condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone avec une amine et un phosphite de dialkyle. Nous avons conduit cette réaction (réaction de Kabachnik-Fields<sup>106</sup>) sur la diméthylcétone en présence d'ammoniac gazeux et de diéthylphosphite (Schéma 48).



**Schéma 48**

Par rapport à la méthode de purification de **1** initiale, qui consistait à extraire en continu le résidu brut et fournissait un rendement de l'ordre de 50%<sup>105</sup>, nous avons simplifié la procédure. Le résidu est dissous dans le CHCl<sub>3</sub> et lavé plusieurs fois par une solution de NaOH à 20%. Cette méthode de purification nous a permis d'obtenir le composé **1** avec un rendement de 75% suite à l'évaporation de la phase organique.

<sup>105</sup>Rizzi, C. Thèse de Doctorat, 2000 AIX11020, Marseille, 2000.

<sup>106</sup>Fields, E. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1528–1531.

**ETAPE 2** : Synthèse du diéthyl 2-nitropropan-2-ylphosphonate **2**

La synthèse décrite par Petrov *et al.*<sup>107</sup> permet d'obtenir **2** en oxydant l' $\alpha$ -aminophosphonate **1** par  $\text{KMnO}_4$  dans un mélange acétone/eau en présence de  $\text{MgSO}_4$  afin de contrôler le pH du milieu réactionnel<sup>108</sup>.

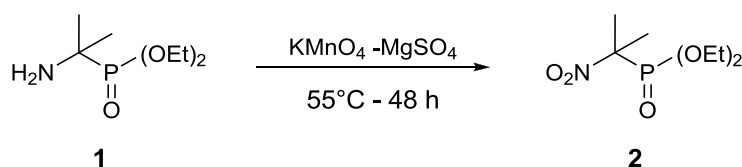


Schéma 49

Nous avons apporté des modifications à cette méthode afin d'améliorer le rendement de la réaction. La réaction est réalisée avec un mélange de solvants acétone/eau (90/10, v/v) en présence de deux équivalents de  $\text{MgSO}_4$  et de deux équivalents de  $\text{KMnO}_4$ . L'oxydation est effectuée deux fois consécutivement. En effet, l'étude par RMN de cette première oxydation permet de mettre en évidence l'obtention d'un mélange de produits contenant l' $\alpha$ -nitrophosphonate **2** et l'aminophosphonate **1** n'ayant pas réagi. En relançant l'oxydation dans les mêmes conditions sur ce brut réactionnel, le composé **2** pur est obtenu avec un rendement de 70%. La Table 13 résume les améliorations obtenues dans la préparation de **2**.

Table 13 : Optimisation de la synthèse de l' $\alpha$ -nitrophosphonate **2**

	Nombre d'oxydations	Amine (eq)	Acetone/eau (v/v)	$\text{KMnO}_4$ (eq)	$\text{MgSO}_4$ (eq)	Rdt %
Petrov <i>et al.</i> <sup>107</sup>	Oxydation 1	1 eq	80/20	6 eq	1,25 eq	53 %
Rizzi C. <sup>105</sup>	Oxydation 1	1 eq	80/20	5 eq	1 eq	≈ 40 %
Modifications	Oxydation 1	1 eq	90/10	2 eq	2 eq	/
	Oxydation 2	/	90/10	2 eq	2 eq	<b>70 %</b>

<sup>107</sup>Petrov, K. A.; Chauzov, V. A.; Pastukhova, I. V.; Bogdanov, N. N. *Zh. Obshch. Khim.* **1976**, *46*, 1246–1250. (ibid. *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1976**, *46*, 1226–1229.)

<sup>108</sup>Kornblum, N.; Clutter, R. J.; Jones, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4003–4004.

**ETAPE 3** : Synthèse du diéthyl 2-(hydroxyamino)propan-2-ylphosphonate (**3**)

La dernière étape permet l'obtention de **3** avec un rendement de l'ordre de 50%. Le composé **2** est réduit avec de la poudre de Zn dans une solution aqueuse de chlorure d'ammonium comme précédemment décrit par Petrov *et al.*<sup>109</sup>.

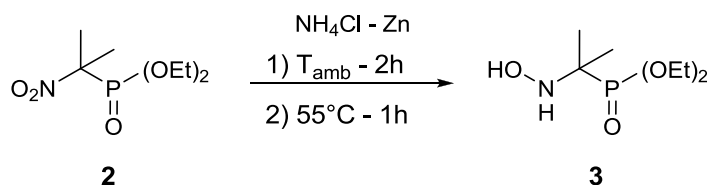


Schéma 50

**SYNTHESE DES NOUVELLES PPNs**

Dans la suite du manuscrit, nous avons adopté, pour chaque nouveau dérivés de la PPN, l'abréviation *position(s) sur le cycle-nature du (ou des) substituant(s)-PPN* pour les désigner, en omettant, pour raccourcir, les préfixes *di* et *tri* lorsqu'un même substituant est présent à différentes positions et en numérotant les cinq positions disponibles sur le cycle de 2 à 6. Dans le Schéma 52, nous donnons un exemple avec la 4-OH-PPN (**5**).

Pour obtenir les PPNs diversement fonctionnalisées, l'hydroxylamine **3** a été traitée par différents aldéhydes aromatiques qui sont commerciaux pour la plupart.

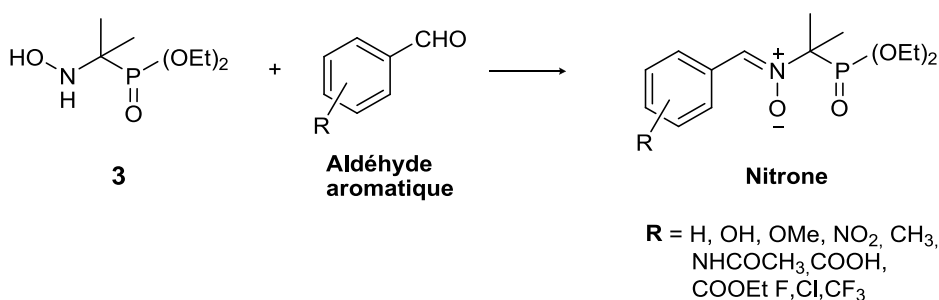


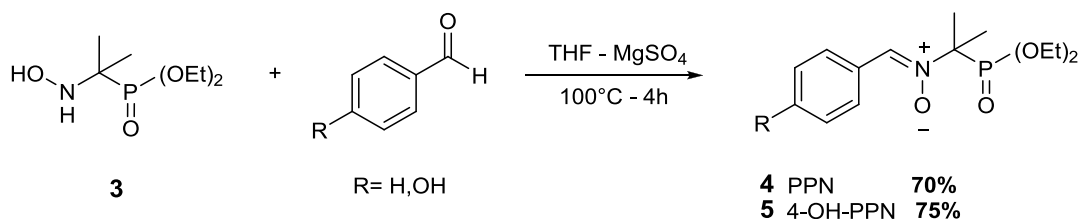
Schéma 51 : Synthèse générale des PPNs

Dans un premier temps, nous avons appliqué le mode opératoire décrit dans la littérature<sup>110</sup> pour obtenir deux composés déjà caractérisés : le 2-

<sup>109</sup>Petrov, K. A.; Treshchalina, L. V.; Chizhov, V. M. *Zh. Obshch. Khim.* **1979**, 49, 590–596. (*ibid. J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1979**, 49, 516–521.

<sup>110</sup>Liu, Y. P.; Wang, L. F.; Nie, Z.; Ji, Y. Q.; Liu, Y.; Liu, K. J.; Tian, Q. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7753–7762.

(diéthoxyphosphoryl)-*N*-(4 benzylidène) propan-2-amine oxyde (PPN) **4**<sup>85a</sup> et le 2-(diéthoxyphosphoryl)-*N*-(4-hydroxybenzylidène) propan-2-amine oxyde (4-OH-PPN) **5**<sup>110</sup>. Dans la préparation des nitrones **4** et **5**, la réaction a été réalisée au reflux du THF pendant 4 h en présence de MgSO<sub>4</sub> (Schéma 52).



**Schéma 52** : Synthèse des nitrones PPN (**4**) et 4-OH-PPN (**5**).

Appliquée à la série d'aldéhydes aromatiques du Schéma 51, cette procédure n'a pas conduit aux nitrones correspondantes avec des rendements suffisants (<10%). Nous avons donc décidé d'optimiser les conditions de réaction, en prenant pour substrat de départ le 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde (syringaldéhyde).

Les variations des conditions de réactions qui ont été appliquées sont résumées dans la Table 14.

**Table 14** : Optimisation des conditions de synthèse des PPNs : mise au point avec le syringaldéhyde

Essai	Solvant	Conditions	Temps	Rendement
<b>1</b>	THF	MgSO <sub>4</sub> - Reflux	12 h	Très faible (< 10%)
<b>2</b>	THF	MgSO <sub>4</sub> - Reflux - N <sub>2</sub>	12 h	Très faible (< 10%)
<b>3</b>	EtOH	MgSO <sub>4</sub> - 55°C	4 h	Dégradation des réactifs
<b>4</b>	CHCl <sub>3</sub>	MgSO <sub>4</sub> - Reflux - N <sub>2</sub>	12 h	Aucune réactivité
<b>5</b>	DCM	MgSO <sub>4</sub> - Reflux C	12 h	Aucune réactivité
<b>6</b>	DCE	MgSO <sub>4</sub> - 100°C	12 h	15%
<b>7</b>	DCE	MgSO <sub>4</sub> - 100°C	4 h	57%

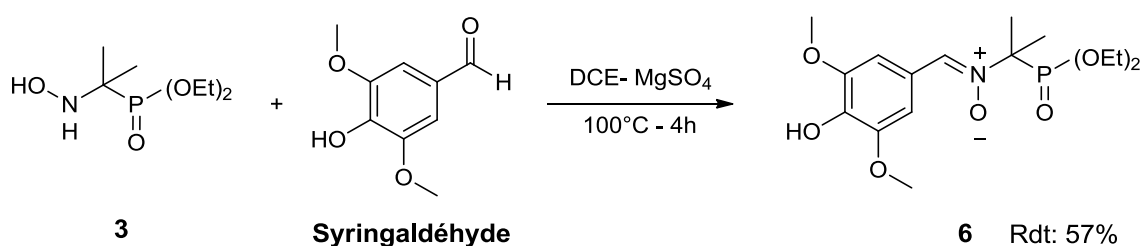
Tout d'abord, le temps de réaction a été augmenté de 4 h à 12 h. Au bout de ce temps, un mélange de trois produits est isolé : une très faible quantité de nitrone souhaitée, l'aldéhyde de départ n'ayant pas réagi et un produit de dégradation résultant probablement de l'oxydation par l'oxygène de l'air.

Nous avons donc essayé de conduire la réaction dans les mêmes conditions, mais sous atmosphère inerte (azote)<sup>61d</sup> (Table 14, entrée 2), afin d'éviter les réactions d'oxydation. Dans ces conditions, la réactivité reste inchangée par rapport à l'essai précédent : seuls les réactifs de départ sont récupérés.

L'essai suivant est réalisé en appliquant la méthode utilisée par Rizzi *et al.*<sup>85c</sup>, mais en fin de réaction un mélange d'aldéhyde de départ et de produits de dégradation sont récupérés (Table 14, entrée 3).

Nous avons ensuite essayé de jouer sur la nature du solvant en commençant avec le chloroforme sur la base de la procédure utilisée par Liu *et al.*<sup>111</sup>. Cependant, la méthode ne conduit pas à la nitrone désirée et les produits de départ n'ayant pas réagi sont récupérés en fin de manipulation (entrée 4). Un autre solvant testé est le dichlorométhane selon la méthode utilisée par Chan *et al.*<sup>112</sup>; de la même manière nous n'avons pas obtenu le produit final.

Le solvant qui a permis d'obtenir le produit souhaité est le 1,2-dichloroéthane (DCE), en présence de MgSO<sub>4</sub> et à une température de 100°C (entrées 6 et 7). Dans ces conditions expérimentales, le meilleur résultat est obtenu pour une durée de réaction de 4 h, le rendement chutant si l'on prolonge le chauffage jusqu'à 12 h. Pour un temps de réaction de 4 h, la nitrone **6** (3,5-MeO-4-OH-PPN) est isolée avec un rendement de 57% (Schéma 53).



**Schéma 53** : Méthode utilisée pour la synthèse de la 3,5-MeO-4-OH-PPN **6**

Par la suite, toutes les autres PPNs ont été obtenues en utilisant la méthode ci-dessus, sauf dans quelques cas où les réactifs de départ n'ont pas réagi dans le DCE. Dans ces

<sup>111</sup>Liu, Y.; Song, Y.; Du, L.; Villamena, F. A.; Ji, Y.; Tian, Q.; Liu, K. J.; Liu, Y. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1485–1490.

<sup>112</sup>Chan, K. S.; Yeung, M. L.; Chan, W.; Wang, R. J.; Mark, T. C. W. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1741–1747.

cas particuliers, nous avons remplacé le DCE par le THF selon la première méthode utilisée pour les composés **4** et **5**.

### 2.2.1 PPNs possédant un motif antioxydant de type phénolique

La première nitrone synthétisée, le composé **6** (3,5-MeO-4-OH-PPN), est, à notre connaissance, la première PPN dérivée d'un acide phénolique naturel (acide sinapique). Trois autres nitrones de cette classe ont été obtenues avec cette même méthode, avec des rendements allant de 50% à 72%. Il s'agit des nitrones **7** (3,4-OH-PPN), **8** (3-MeO-4-OH-PPN) et **9** (3,4,5-OH-PPN) (Schéma 54).

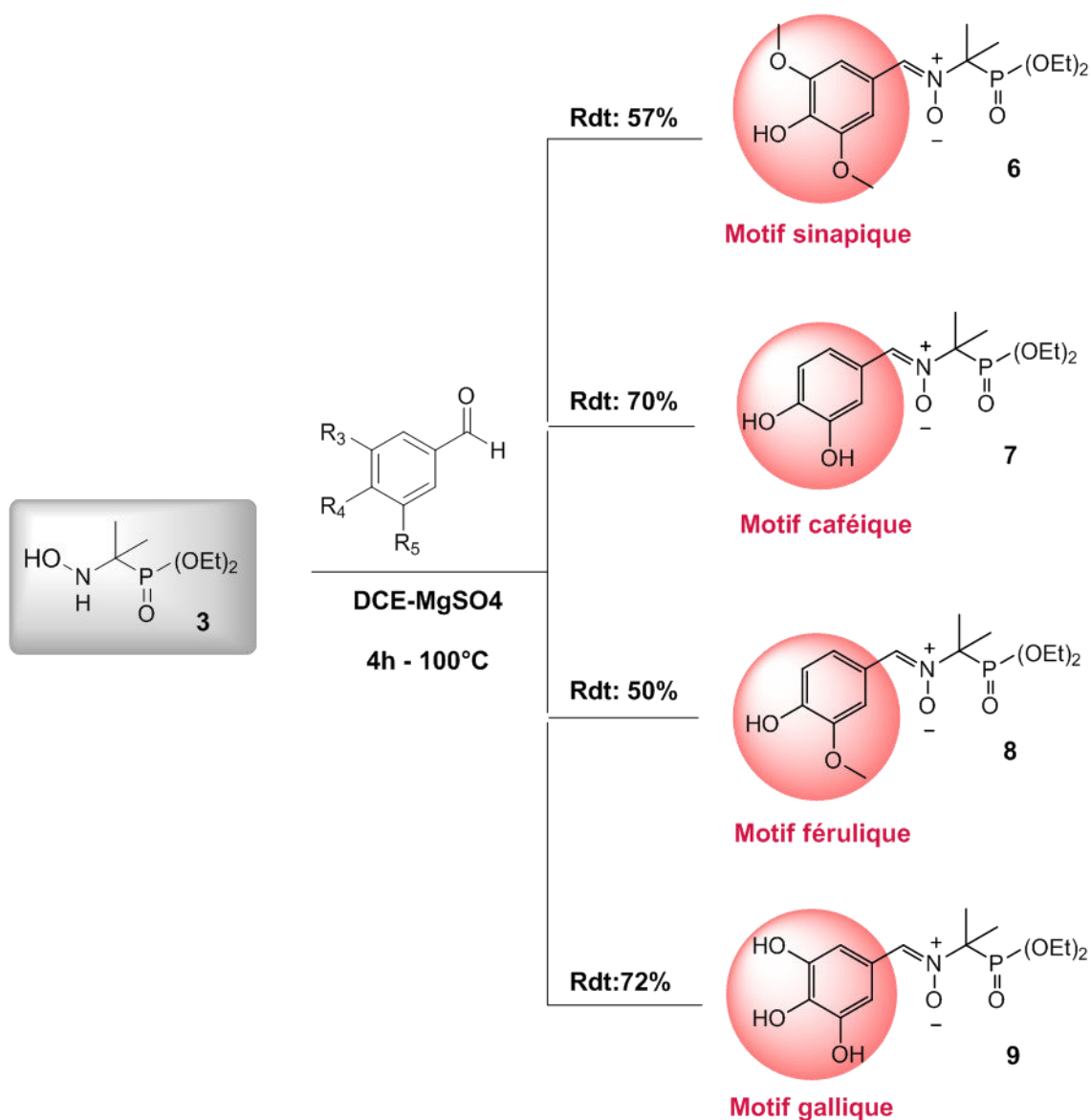


Schéma 54 : Synthèse des PPNs dérivées d'acides phénoliques naturels

La Table 15 montre que prolonger le temps de réaction de 4 à 12 h dans la synthèse de nitrones **5**, **6**, **7** et **8** entraîne une chute sensible du rendement, impliquant une dégradation du produit final-au delà de 4 heures de réaction.

**Table 15** : Synthèse de PPNs dérivées d'acides phénoliques naturels : effet du temps de réaction sur le rendement

Nitronne	Temps de réaction	Rendement
<b>5</b>	12 h	27%
	<b>4 h</b>	<b>75%</b>
<b>6</b>	12 h	15%
	<b>4 h</b>	<b>57%</b>
<b>7</b>	12 h	35%
	<b>4 h</b>	<b>70%</b>
<b>8</b>	12 h	15%
	<b>4 h</b>	<b>50%</b>

Dans le but d'évaluer l'influence sur les propriétés antioxydantes du nombre de groupements OH et leur position sur le cycle aromatique, nous avons également synthétisé les PPNs **10–13** (Schéma 16). Les nitrones **10** (3-OH-PPN), **11** (2-OH-PPN) et **12** (3,5-OH-PPN) ont été obtenues selon la méthode utilisant le DCE, avec des rendements de l'ordre de 50% (Schéma 55). Appliquée à la synthèse du composé **13** (2,4-OH-PPN), cette procédure n'a pas donné le produit attendu, mais un mélange des réactifs de départ. Dans ce cas, il a été nécessaire de changer le solvant; dans le THF, on obtient la nitronne **13** avec un rendement de 36%.

On peut remarquer que les nitrones **11** et **12** possèdent un substituant aromatique correspondant respectivement à celui de l'acide salicylique et du résorcinol.



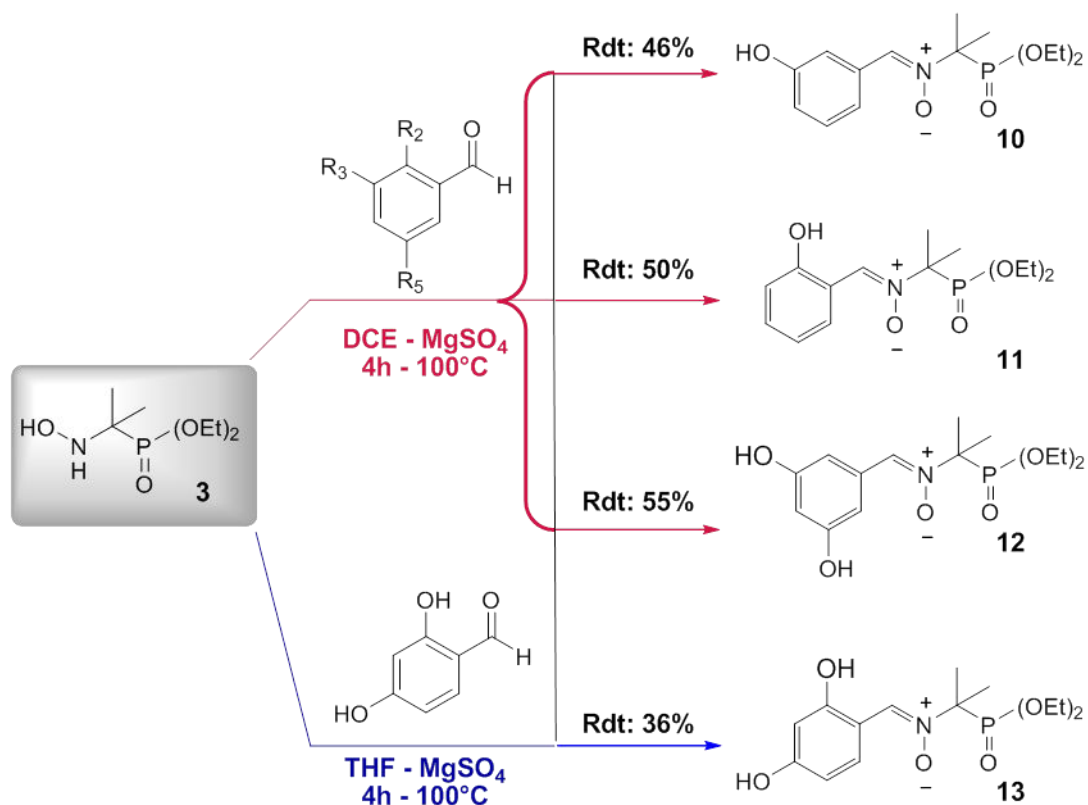


Schéma 55 : Synthèse des PPNs hydroxylées

Les nitrones **10** et **13** ont été obtenues sous la forme de monocristaux dont nous avons effectué l'analyse par diffraction des rayons X (Figure 7). Dans la structure de **13** (Figure 7b), on remarque que l'empilement des molécules deux-à-deux dans la maille minimise les interactions stériques entre les groupements diéthoxyphosphoryle, conduisant à un encombrement plus important de la fonction nitrone.

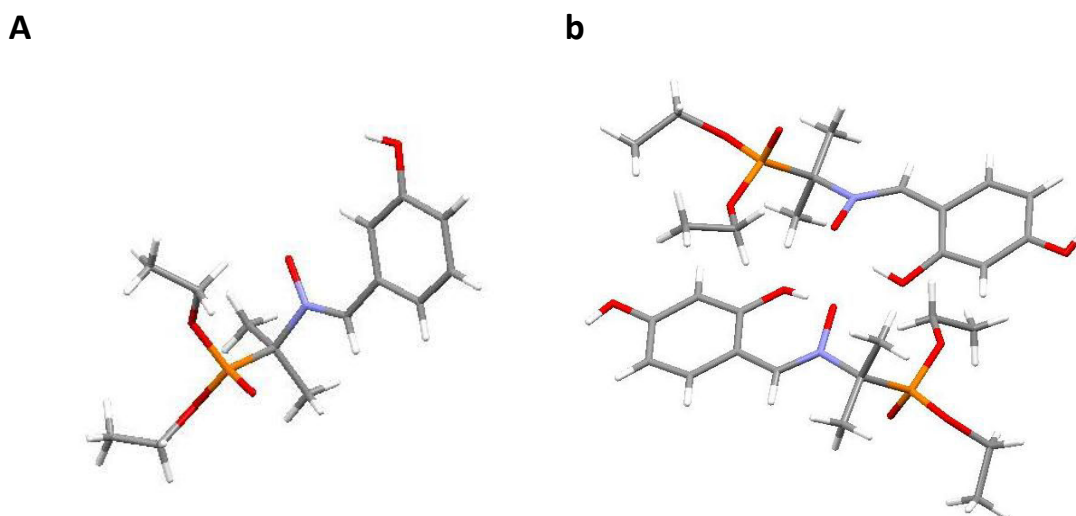


Figure 7 : Structures RX des PPNs **10** (a) et **13** (b)

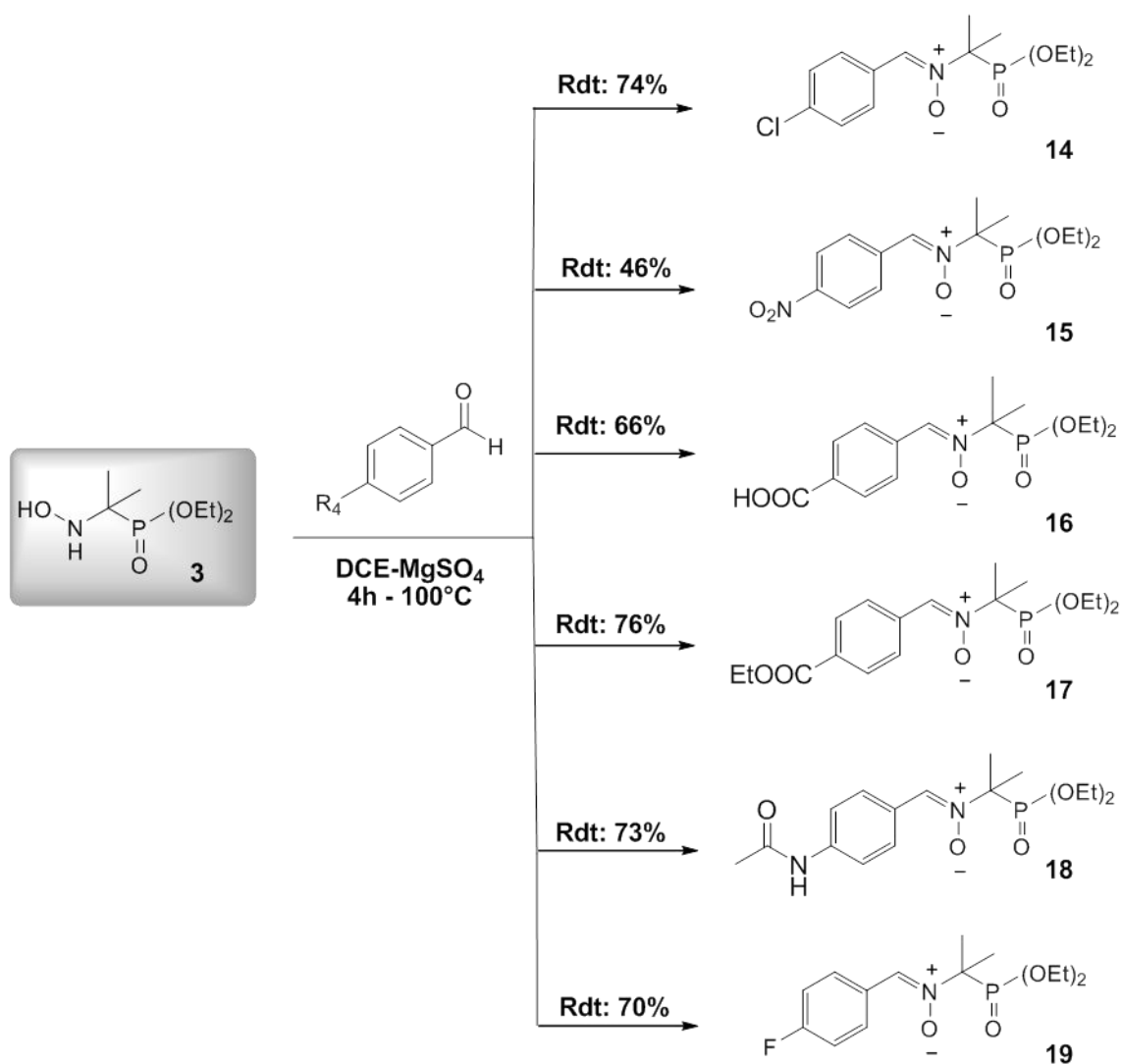
### 2.2.2 Nitrones substituées par un groupement donneur ou attracteur d'électrons

La deuxième classe de PPNs que nous avons synthétisées concerne les composés dont le cycle comporte d'autres substituants que OH; il s'agit d'acides carboxyliques et dérivés, d'alkyle et d'halogènes, la plupart générant des effets électroniques +/- induits ou +M/-M relativement forts (Table 16).

**Table 16:** Substituants utilisés pour la synthèse de nouvelles nitrones

Substituants à effet électro-donneur +M	Substituants à effet électro-attracteur -M
F	NO <sub>2</sub>
Cl	COOH
CH <sub>3</sub>	COOEt
NHCOCH <sub>3</sub>	

Dans un premier temps, nous avons synthétisé des composés différemment substitués en position *para* avec des rendements allant de 46% à 76% (Schéma 56). Pour les PPNs **14** (2-(diéthoxyphosphoryl)-*N*-(4-(chlorobenzylidène)propan-2-amine oxyde; 4-Cl-PPN)<sup>74</sup> et **15** (2-(diéthoxyphosphoryl)-*N*-(4-nitrobenzylidène)propan-2-amine oxyde; 4-NO<sub>2</sub>-PPN)<sup>85c</sup>, précédemment décrites, notre protocole de synthèse (utilisant le DCE) a donné des rendements légèrement inférieurs mais nous a permis d'obtenir des produits finaux purs. Notre méthode évite l'excessive formation des produits de dégradation comme c'était le cas avec la méthode originale utilisant l'éthanol, ce qui nous empêchait d'obtenir les produits avec un bon degré de pureté. On peut noter que les PPNs *para*-substituées **16** (4-CO<sub>2</sub>H-PPN), **17** (4-CO<sub>2</sub>Et-PPN), **18** (4-AcNH-PPN) et **19** (4-F-PPN) sont décrites pour la première fois.

Schéma 56 : Synthèse de PPNs *para*-substituées

A la suite des premiers essais de piégeage sur les PPNs **15** et **19**, nous avons synthétisé les analogues mono-nitrés (Schéma 57) et mono- et di-fluorés (Schéma 58) sur les autres positions. Le Schéma 57 indique que les rendements obtenus dans le cas des nitro-PPNs ne sont pas affectés par la position du substituant sur le cycle.

Si l'on compare les rendements des composés **15** et **21** (2-NO<sub>2</sub>-PPN) pour lesquels la délocalisation de la charge positive sur les positions *ortho* et *para* est la même (effet -*M* de NO<sub>2</sub>), ce résultat suggère que la présence d'un seul substituant en *ortho* ne produit pas une gêne stérique suffisante à ralentir la cinétique de la réaction.

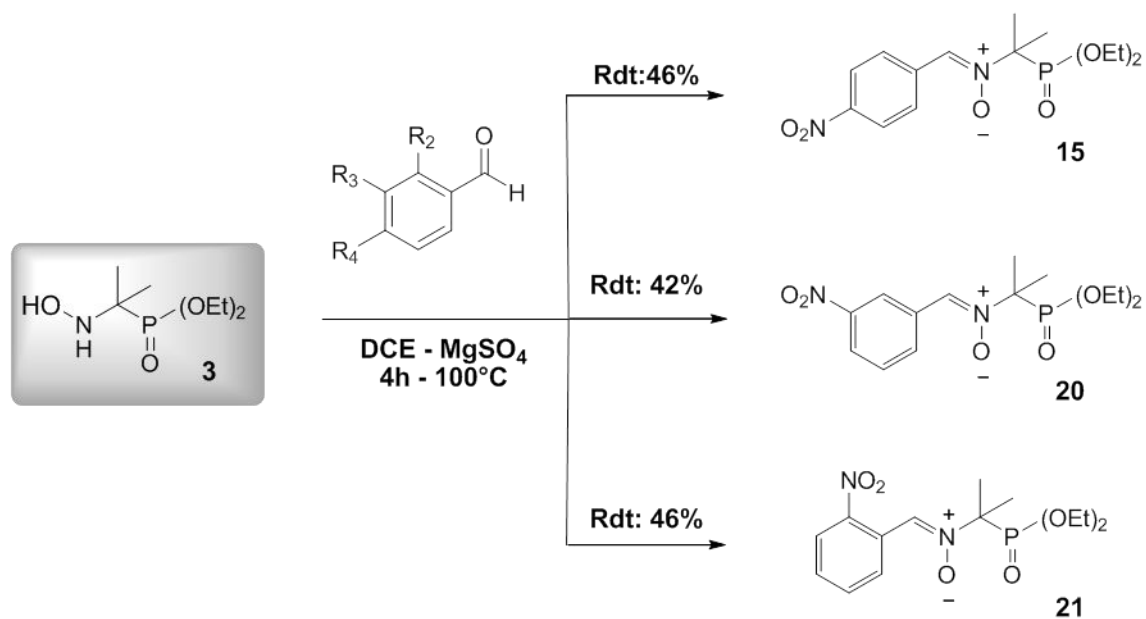


Schéma 57 : Synthèse de PPNs mono-nitrées

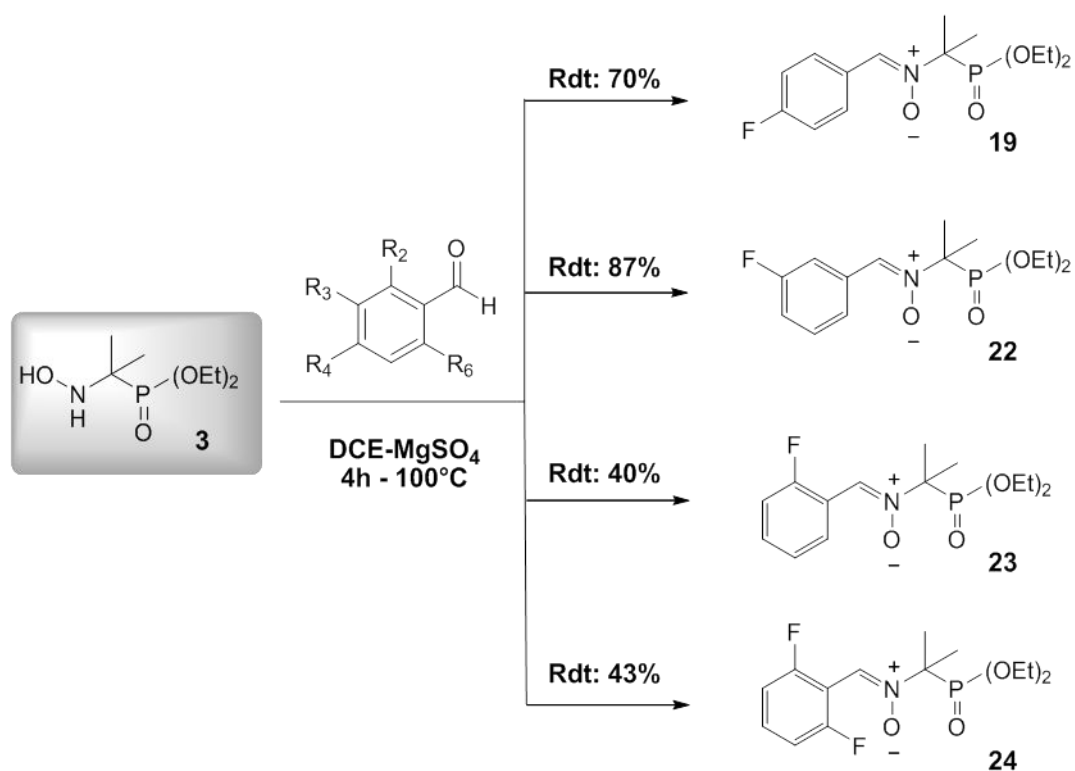


Schéma 58 : Synthèse de PPNs fluorées

Certains piégeages sur la PPNs **24** ayant conduit à des résultats intéressants sur le plan de la structure des adduits formés, nous avons voulu synthétiser d'autres structures disubstituées en position *ortho*.

A cette fin, nous avons essayé, tout d'abord, de synthétiser le dérivé du 2,6-dinitrobenzaldéhyde (Schéma 59). Cependant, la formation de la PPNs n'a pu être observée, que ce soit dans le DCE ou dans le THF. Il est probable que les deux groupements nitro positionnés en  $\alpha$  de la fonction aldéhyde génèrent un encombrement stérique qui empêche l'aldéhyde de réagir avec l'hydroxylamine.

Le seul produit que nous ayons obtenu dans cette série est la PPNs **25** (2,6-Me-PPN) qui présente deux groupements méthyles en position *ortho* (Schéma 59). L'aldéhyde de départ, le 2,6-diméthylbenzaldéhyde, utilisé dans du DCE n'a pas été réactif. En revanche, quand la réaction a été effectuée dans du THF le produit final a été obtenu avec un rendement modéré de 32%.

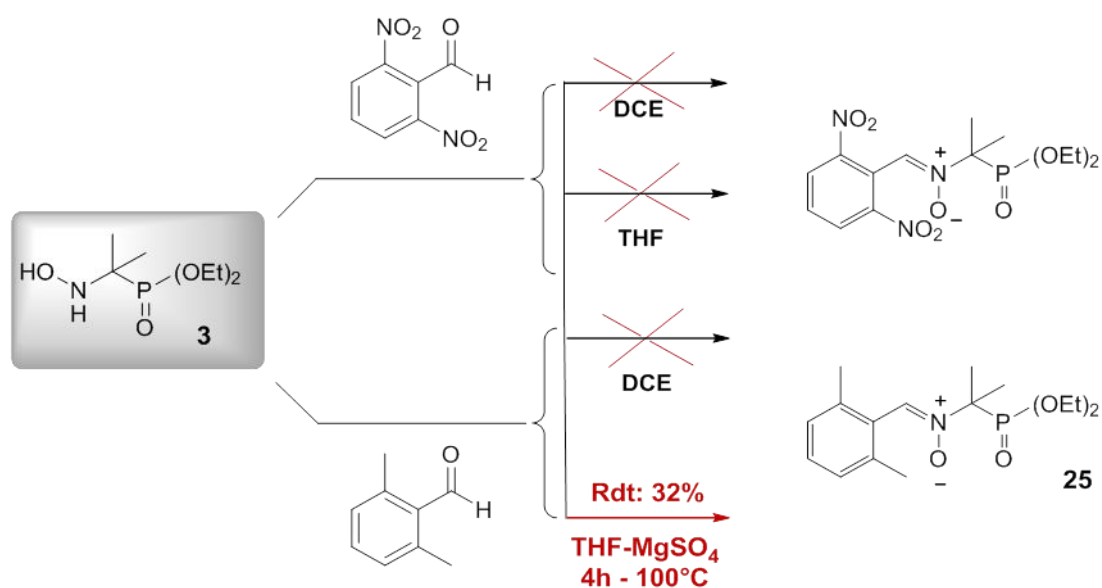
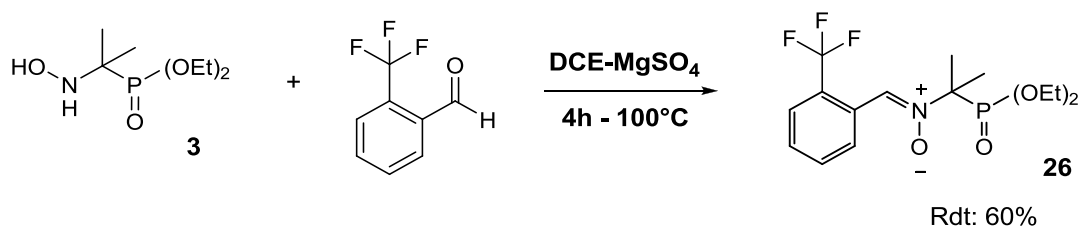
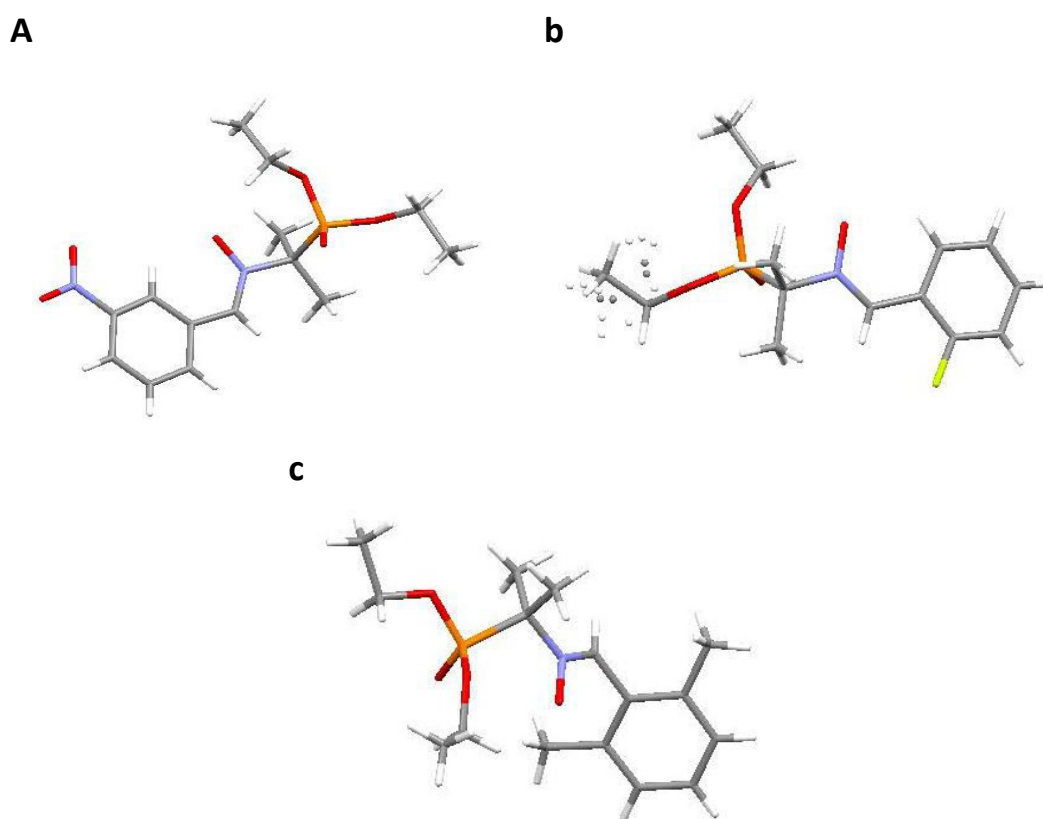


Schéma 59 : Essais de synthèse des composés disubstitués en position *ortho*

Un cas particulier est représenté par le composé **26** qui présente en position *ortho* un groupement trifluorométhyle. Ce groupement ne génère pas d'effet mésomère; il est seulement caractérisé par un fort effet attracteur d'électrons  $-I$ .



Parmi les PPNs appartenant à cette deuxième série, les nitrones **20** (3-NO<sub>2</sub>-PPN), **23** (2-F-PPN) et **25** (2,6-Me-PPN) forment de monocristaux analysables par diffraction des rayons X (Figure 8).



**Figure 8** : Structures RX des composés **20** (a), **23** (b) et **25** (c).

On remarque que dans la 3-OH-PPN (**10**), comme dans la 2-F-PPN (**23**), les deux groupes (EtO)<sub>2</sub>P(O) se positionnent le plus loin possible de la fonction nitroène (Figure 7a et Figure 8b). Dans la 3-NO<sub>2</sub>-PPN (**20**), qui est monosubstituée en méta comme **10**, l'un des deux diéthoxyphosphoryle gêne stériquement la fonction nitroène (Figure 8a), dont l'encombrement est maximal dans **25** (Figure 8c).

### **Conclusion du chapitre**

Nous avons synthétisé 23 nitrones analogues de la PPN, dont **19 nouvelles structures** et 4 précédemment décrites dans la littérature (composés **4, 5, 14** et **15**) que nous allons utiliser comme produits de référence dans nos études de piégeage. Toutes les nitrones ont été obtenues selon la méthode que nous avons mise au point avec des rendements qui vont de 32% à 87%.

Parmi les nouvelles molécules synthétisées, nous distinguons deux différentes classes: la première série concerne des nitrones qui possèdent un groupement avec une **activité antioxydante**; cette série inclut **8 nouveaux produits**. Ces PPNs pourront être testées pour la détection d'espèces radicalaires ainsi que comme produits ayant une activité antioxydante au niveau biologique.

La deuxième série est composée de **11 nouvelles nitrones** différemment substituées avec des groupements pouvant générer un **effet mésomère** ou **inductif**. Nous pensons que l'effet de délocalisation des électrons sur le cycle aromatique pourrait influencer d'une certaine manière l'efficacité des nitrones à piéger les radicaux libres.

Afin de valoriser ces nouvelles structures et d'utiliser le plus efficacement possible leur habilité à piéger des radicaux, nous avons décidé de les vectoriser pour cibler la mitochondrie. Parmi les structures décrites ci-dessus, certaines seront utilisées comme réactifs de départ sur lesquelles sera greffée la molécule vecteur. Cette dérivatisation des nitrones de type PPN permettra d'exploiter leur activité directement au niveau de la principale source endogène de production de ROS et ainsi tester leur capacité à bloquer la propagation des espèces radicalaires à partir des précurseurs. La synthèse de ces sondes mitochondriales sera décrite en détail dans le chapitre suivant. .





# **CHAPITRE 3**

## **Nouvelles nitrones ciblant la mitochondrie**



### 3.1 Objectifs

En gardant notre axe de recherche sur les composés de type PPN, notre objectif est de vectoriser les nitrones synthétisées dans le chapitre II, afin de **développer de nouvelles sondes capables de cibler de manière spécifique la mitochondrie**.

De plus, nous allons **moduler la distance entre la nitrone et le vecteur** pour étudier **l'influence de la longueur du bras espaceur sur l'activité des sondes**.



Figure 9

La vectorisation est une approche consistant en la fixation d'un composé actif, connu pour ses propriétés thérapeutiques, sur une structure moléculaire qui lui assurera un meilleur transport entre la zone d'absorption et le site d'application. Dans notre cas, la vectorisation des nitrones, composés reconnus pour leur habilité à piéger les radicaux libres et permettre leur détection, a pour objectif de favoriser le ciblage des sites endommagés par la production d'espèces radicalaires.

Il est bien établi que la mitochondrie est la principale source endogène de production de ROS au niveau biologique. Elle est une organelle intracellulaire qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire en fournissant l'énergie nécessaire à l'organisme à travers le processus d'oxydation phosphorylante. Il est amplement reconnu que la réduction de l'oxygène par le superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne la production de radicaux oxygénés et carbonés hautement réactifs responsables de nombreuses pathologies et du vieillissement tant au niveau cellulaire que de l'organisme entier.<sup>113</sup>

La mitochondrie possède des défenses endogènes (Mn-SOD) pour neutraliser les radicaux, mais celles-ci peuvent s'avérer insuffisantes lorsque la production d'espèces oxydantes est trop importante, comme dans le cas de situations pathologiques.

<sup>113</sup> (a) Liu, M.T.; Beal, M.F. *Nature* **2006**, 443, 787-795 (b) Murphy, M.P. *Biochem. J.* **2009**, 417, 1-13

De ces observations découle l'intérêt de développer des **composés antioxydants capables de cibler la mitochondrie** et de neutraliser les radicaux formés pendant le processus d'oxydation phosphorylante.

Il est également intéressant de développer des **sondes ciblant la mitochondrie** afin d'identifier et/ou de quantifier les radicaux libres produits directement à partir de la source, avant qu'ils ne réagissent avec d'autres molécules.

### 3.2 Méthodes pour le ciblage mitochondrial : étude bibliographique

La mitochondrie se compose de deux membranes mitochondriales : une externe qui délimite la mitochondrie du cytoplasme de la cellule, et l'autre interne qui sépare l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale (Figure 10).

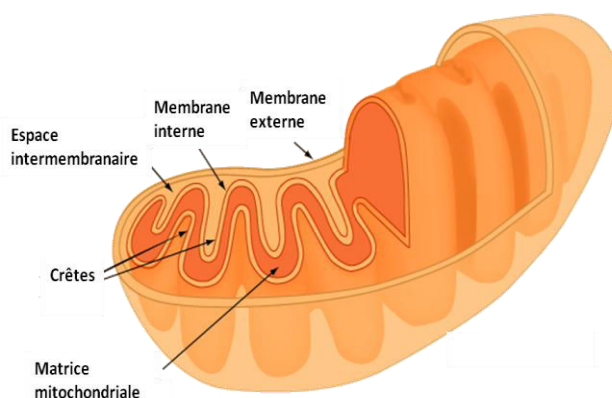


Figure 10 : Structure de la mitochondrie<sup>114</sup>

La membrane mitochondriale externe possède une composition similaire à celle des membranes cellulaires et est facilement perméable à la majeure partie des molécules de petite taille. La membrane interne forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle présente une perméabilité réduite et sélective et généralement le passage de molécules à travers cette membrane nécessite la présence de transporteurs.

Les différentes stratégies utilisées pour adresser des composés dans la mitochondrie peuvent être regroupées en deux catégories: le **ciblage actif et passif**.<sup>115</sup> Dans le premier cas, on exploite le système de transport de protéines qui permet la

---

<sup>114</sup>Modifié à partir de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/mitochondria.html>

<sup>115</sup> Rocha, M.; Apostolova, N.; Herance, J.R.; Rovira-Llopis, S.; Hernandez-Mijares, A.; Victor, V.M. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 160–189

reconnaissance et le passage des peptides dans la matrice mitochondriale au moyen d'**interactions spécifiques**. Le mécanisme est réglé par une séquence signal *N*-terminal (Mitochondrial Targetin Sequence, MTS) contenant environ 20-40 résidus d'acides aminés<sup>116</sup>, qui est reconnue par les transporteurs membranaires. L'emploi de cette séquence a permis de transporter dans la mitochondrie différentes molécules, en particulier des protéines et des acides nucléiques<sup>117</sup>, mais la longueur de la séquence représente un désavantage pour sa synthèse ce qui limite son utilisation.

Dans le cas du **transport passif**, il est nécessaire d'utiliser des vecteurs possédants des **propriétés physicochimiques** (hydrophobicité, taille, masse et charge) compatibles avec l'environnement de la mitochondrie qui devient la cible spécifique de ces composés.

Afin d'atteindre cet objectif, deux conditions doivent être remplies par la molécule : pour pouvoir traverser la membrane cytoplasmique, dans un premier temps, mais aussi les deux membranes mitochondriales doivent être perméables à cette molécule. De plus, cette dernière doit posséder des propriétés qui permettent de cibler la mitochondrie et non les autres compartiments cellulaires. Plusieurs molécules de petite taille ont été transférées avec succès dans la mitochondrie, au moyen de différents vecteurs.<sup>118</sup> Parmi ces vecteurs on mentionnera les plus rencontrés : le cation lipophile triphénylphosphonium (TPP) et les vecteurs de type peptidique.

### 3.2.1 Cations lipophiles

La stratégie la plus commune pour cibler la mitochondrie exploite sa particularité de posséder un potentiel électrochimique ( $\Delta\psi_m$ ) très élevé. La valeur la plus haute, mesurée *in vitro* dans des mitochondries isolées, est de 180-200 mV (négatif à l'intérieur) une valeur proche du maximum qu'une bicouche lipidique puisse supporter avant de subir des dégâts. Cette valeur est plus basse (130-150 mV) dans les cellules vivantes d'un organisme.<sup>119</sup>

Ce potentiel de membrane, beaucoup plus élevé que le potentiel de toutes les autres cellules et organelles, attire les cations lipophiles et favorise leur accumulation sélective dans la matrice mitochondriale. Les cations lipophiles sont des molécules de

---

<sup>116</sup> Hoye, A.T.; Davoren, J.E.; Wipf P., Fink, M.P.; Kagan, V.E. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41 (1), 87–97

<sup>117</sup> Yousif, L.M.; Stewart, K.M.; Kelley, S.O. *ChemBioChem* **2009**, 10, 1939-1950

<sup>118</sup> Gruber, J.; Fong, S.; Chen, C.-B.; Yoong, S.; Pastorin, G.; Shaffer, S.; Chean, I.; Halliwell B. *Biotechnol. Adv.* **2013**, 31, 563-592

<sup>119</sup> Murphy, M.P.; Smith, R.A.J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2000**, 41, 235–250

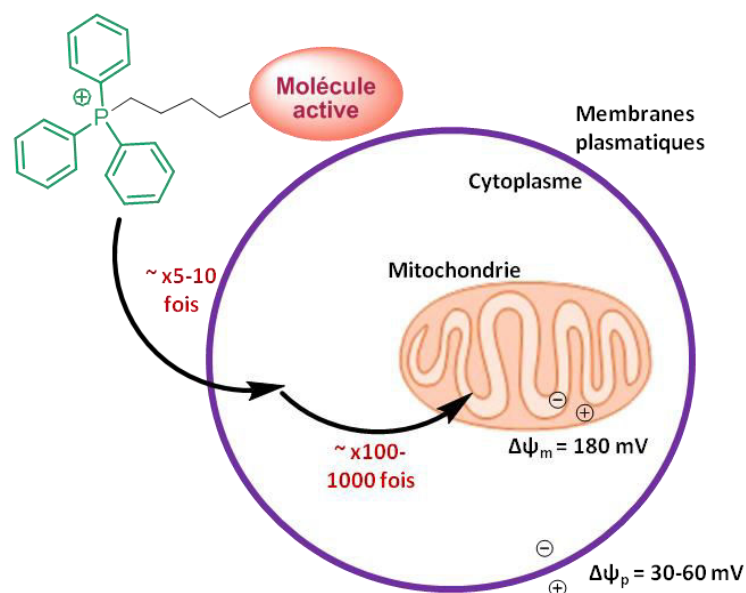
petite taille possédant une charge positive. A la différence des cations hydrophiles ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ..), ils possèdent une structure électronique qui favorise la délocalisation de la charge par résonance. Ainsi, le passage de ces cations à travers les membranes est favorisé énergétiquement à cause de la vaste surface hydrophobe et du fort rayon ionique généré par la dispersion de la charge sur une grande aire de la molécule.<sup>120</sup>

L'accumulation des cations lipophiles due au potentiel de membrane dans la mitochondrie est décrite par l'équation de Nernst :

$$\Delta\psi_m = 61.5 \log_{10} \frac{[\text{Cation in}]}{[\text{Cation out}]}$$

Selon l'équation, pour chaque hausse de 61.5 mV du potentiel de membrane on assiste à une augmentation de la concentration du cation lipophile dans la mitochondrie de 10 fois.<sup>121</sup>

En accord avec le potentiel mitochondrial, la concentration des cations lipophiles à l'intérieur de la mitochondrie sera de 100-1000 fois plus élevée que dans le cytoplasme.



**Figure 11 :** Transport des cations lipophiles à travers les membranes et leur accumulation dans le cytoplasme et dans la matrice mitochondriale<sup>122</sup>

<sup>120</sup> Smith, R.A.J.; Hartley, R.C.; Chochemé, H.M.; Murphy, M.P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, 33, 295-352

<sup>121</sup> Murphy, M.P. *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 326-330

<sup>122</sup> Inspiré de : Ross, M. F.; Kelso, G. F.; Blaikie, F. H.; James, A. M.; Cochemé, H. M.; Filipovska, A.; Da Ros, T.; Hurd, T. R.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. *Biochemistry (Moscow)* **2005**, 70, 222-230

De manière similaire, le potentiel des membranes plasmatiques ( $\Delta\psi_p = 30-60$  mV) engendre le transport des cations lipophiles depuis l'espace extracellulaire vers le cytoplasme (Figure 11). Ainsi, 90-95% d'entre eux seront accumulés dans la mitochondrie.

Les cations lipophiles sont parmi les meilleures entités ciblant la mitochondrie. En effet, ils ne nécessitent aucun mécanisme de reconnaissance spécifique. Parmi ces vecteurs, le plus utilisé et le mieux caractérisé est le cation triphénylphosphonium (TPP).

### 3.2.1.1 Composés antioxydants vectorisés avec le cation triphénylphosphonium

De nombreux composés antioxydants ont été vectorisés avec le cation TPP afin de les délivrer sélectivement dans la mitochondrie; parmi eux le plus étudié est la **Mito Q<sub>10</sub>**<sup>123</sup> une version vectorisée de l'ubiquinone. Dans ce composé, l'ubiquinone est reliée au motif TPP par un espaceur alkyle de 10 méthylènes (Figure 12). Cette longueur de chaîne a été choisie<sup>124</sup> pour permettre le meilleur placement du fragment ubiquinone dans la membrane mitochondriale interne.

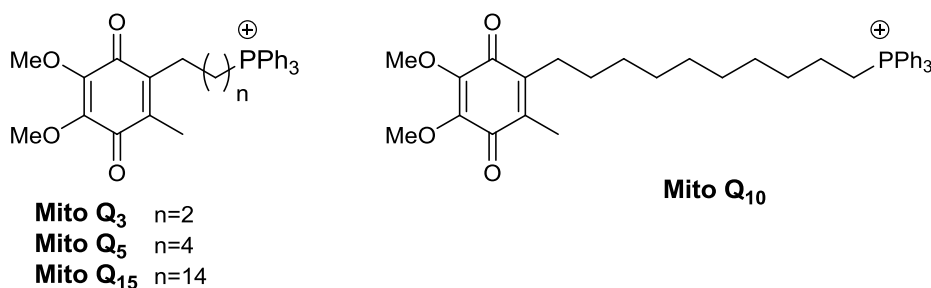


Figure 12

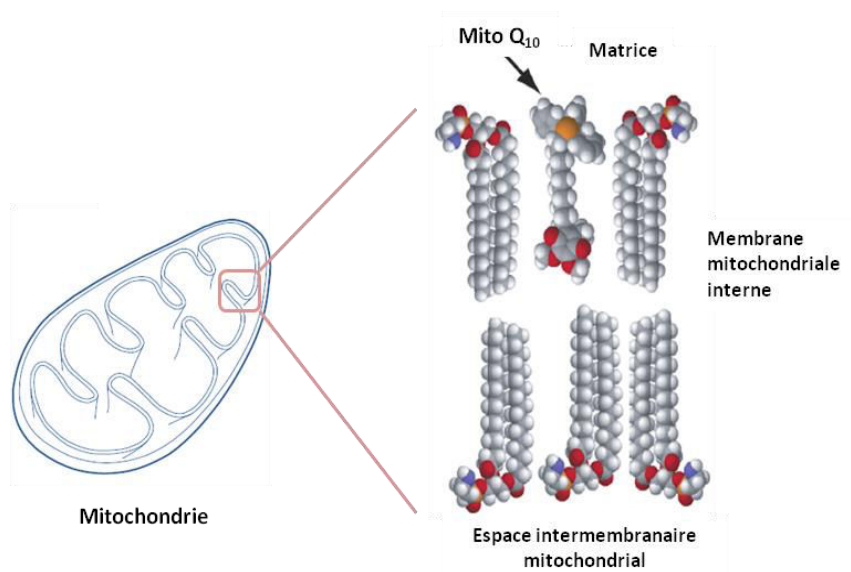
Les études conduites sur la Mito Q<sub>10</sub> et ses analogues ont permis d'explorer et de comprendre en détail le mécanisme impliqué dans l'interaction entre ces composés vectorisés par un cation TPP et la membrane mitochondriale.<sup>125</sup> Pour passer dans la mitochondrie, la Mito Q<sub>10</sub> est initialement adsorbée sur la membrane au niveau des groupements carboxyliques des acides gras qui interagissent avec le cation TPP. Dans un deuxième temps, elle passe à travers le noyau hydrophobe pour atteindre la matrice.

<sup>123</sup> Kelso, G.F.; Porteous, C.M.; Coulter, C.V.; Hughes, G.; Porteous, W.K.; Ledgerwood, E.C.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (7), 4588-4596

<sup>124</sup> James, A.M.; Cochemé, H.M.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 21295-21312

<sup>125</sup> James, A.M.; Sharpley, M.S.; Manas, A.-R.B.; Frerman, F.E.; Hirst, J.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 14708-14718

En réalité, un équilibre existe entre les composés libres en solution dans la matrice et ceux qui restent adsorbés sur la bicouche lipidique.<sup>126</sup> Dans le dernier cas, le groupement TTP à charge positive se positionne au niveau de la surface interne de la membrane alors que la chaîne alkyle reste incorporée dans le noyau hydrophobe en plaçant le fragment ubiquinone à une profondeur connue, qui dépend de la longueur de la chaîne (Figure 13). Cette position correspond à la région où il y a la plus grande production de ROS et donc où un antioxydant peut être plus efficace.



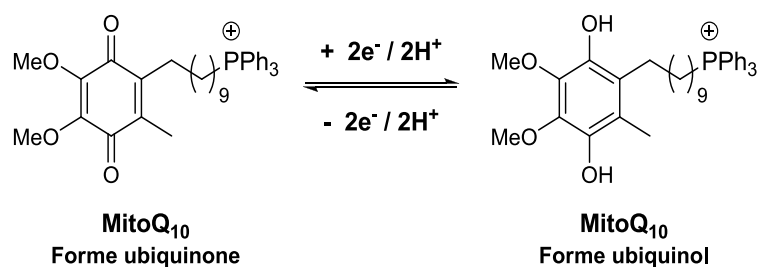
**Figure 13** : Disposition de la MitoQ dans la membrane mitochondriale (d'après Asin-Cayuela et al.)<sup>126</sup>

Une fois dans la mitochondrie, la MitoQ<sub>10</sub> est réduite *in situ* par les complexes de la chaîne respiratoire en ubiquinol qui possède l'activité antioxydante (Schéma 61). Cette forme réagit avec les radicaux libres et donne un radical intermédiaire qui est ensuite retransformé en ubiquinone.<sup>127</sup>

<sup>126</sup> Asin-Cayuela, J.; Manas, A.-R.B.; James, A.M.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *FEBS Letters* **2004**, 571, 9-16

<sup>127</sup> Maroz, A.; Anderson, R.F.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 46, 105-109

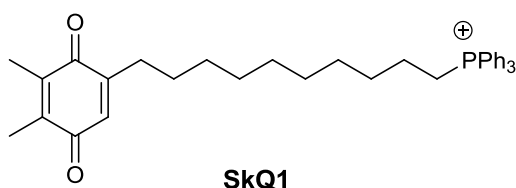




**Schéma 61** : Equilibre entre les formes ubiquinone et ubiquinol de la MitoQ<sub>10</sub>

La MitoQ<sub>10</sub> a montré une efficacité antioxydante dans différents modèles mitochondriaux et cellulaires en particulier pour prévenir la peroxydation lipidique. Elle a également montré des activités *in vivo* sur des modèles animaux<sup>128</sup> : protection contre les dysfonctions cardiovasculaires comme l'ischémie/reperfusion mais aussi dans les états septiques et diabétiques. De plus, des essais cliniques ont été réalisés. La MitoQ<sub>10</sub> a été testée pour le traitement de la maladie de Parkinson mais sans aucun succès. En revanche, elle a donné de bons résultats sur des malades chroniques d'hépatite C virale<sup>129</sup>. Ces résultats suggèrent que la MitoQ<sub>10</sub> est capable de réduire les dommages au cours des inflammations chroniques associées au dommage oxydatif mitochondrial. Ainsi, un test en phase II a été démarré concernant la stéatose hépatique non alcoolique.

Suite aux résultats obtenus avec la MitoQ<sub>10</sub>, la plastoquinone, équivalent de l'ubiquinone dans les chloroplastes, a été vectorisée avec le cation TPP en obtenant le composé **SkQ1**<sup>130</sup> (Figure 14).



**Figure 14**

A faible concentration, ce dernier a montré une bonne activité antioxydante selon un mécanisme similaire à celui de la MitoQ<sub>10</sub>. Les études *in vivo*<sup>131</sup> effectuées avec SkQ1

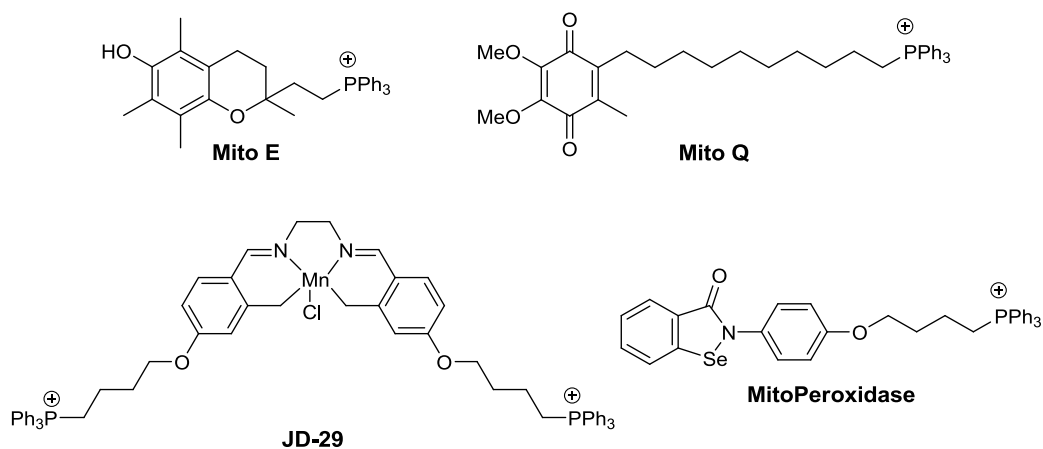
<sup>128</sup> Lukashov, A.N.; Skulachev, M.V.; Ostapenko, V.; Savchenko, A.Y.; Pavchenko, V.V.; Skulachev, V.P. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2014**, *127*, 251-265

<sup>129</sup> Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *Discov. Med.* **2011**, *11*, 106-114

<sup>130</sup> Antonenko, Y.N.; Anisimov, V.N.; Bakeeva, L.E.; Chernyak, B.V.; Chertkov, V.A.; Domina, L.V.; Ivanova, O.Yu.; Izyumov, D.S.; Khailova, L.S.; Klishin, S.S.; Korshunova, G.A.; Lyamzaev, K.G.; Muntyan, M.S.; Nepryakhina, O.K.; Pashkovskaya, A.A.; Pletjushkina, O.Yu.; Pustovidko, A.V.; Roginsky, V.A.; Rokitskaya, T.I.; Ruuge, E.K.; Saprunova, V.B.; Severina, I.I.; Simonyan, R.A.; Skulachev, I.V.; Skulachev, M.V.; Sumbatyan, N.V.; Sviryayeva, I.V.; Tashlitsky, V.N.; Vassiliev, J.M.; Vyssokikh, M.Yu.; Yaguzhinsky, L.S.; Zamyatnin, A.A.; Jr Skulachev, V.P. *Biochem.(Moscow)* **2008**, *73*, 1273-1287

indiquent que ce composé prévient le développement de modifications pathologiques associées aux maladies liées à l'âge chez les rats et est aussi efficace pour la suppression de la cancérogenèse spontanée chez les souris knock-out pour le gène p53. Différentes maladies des yeux, y compris les cataractes, la rétinopathie et le glaucome, ont été traitées avec succès par l'administration directe de solutions de SkQ1 chez différents animaux. Ces résultats indiquent que SkQ1 est un produit antioxydant très prometteur pour le traitement des problèmes liés à l'âge.

De nombreux autres composés antioxydants ont été vectorisés pour cibler la mitochondrie (Figure 15). L'α-tocophérol (vitamine E) et l'acide lipoïque, ont été utilisés pour obtenir respectivement, la **MitoE**<sup>132</sup> et la **MitoL**<sup>133</sup>. Les deux composés s'accumulent dans la mitochondrie, mais alors que la MitoE a montré une efficacité supérieure à celle de l'α-tocophérol non vectorisé dans la prévention du stress oxydant, l'acide lipoïque vectorisé (MitoL) perd sa capacité antioxydante.



**Figure 15** : Exemples de composés antioxydants vectorisés avec le cation TPP

La **MitoPeroxydase**<sup>134</sup> est la version vectorisée d'un mimétique de la peroxydase (Ebselen). L'activité antioxydante de l'Ebselen est due à la présence de l'atome de sélénium dans sa structure. La MitoPeroxydase agit dans la mitochondrie de la même manière qu'une peroxydase et a montré une activité protectrice, dans des

<sup>131</sup> Skulachev, V.P.; Anisimov, V.N.; Antonenko, Y.N.; Bakeeva, L.E.; Chernyak, B.V.; Elichev, V.P.; Filenko, O.F.; Kalinina, N.I.; Kapelko, V.I.; Kolosova, N.G.; Kopnin, B.P.; Korshunova, G.A.; Lichinitser, M.R.; Obukhova, L.A.; Pasyukova, E.G.; Pisarenko, O.I.; Roginsky, V.A.; Ruuge, E.K.; Senin, I.I.; Severina, I.I.; Skulachev, M.V.; Spivak, I.M.; Tashlitsky, V.N.; Tkachuk, V.A.; Vyssokikh, M.Y.; Yaguzhinsky, L.S.; Zorov, D.B. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1787, 437–461.

<sup>132</sup> Smith, R.A.J.; Porteous, C.M.; Coulter, C.V.; Murphy, M.P. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 263, 709–716

<sup>133</sup> Brown, S.E.; Ross, M.F.; Sanjuan-Pla, A.; Manas, A.-R.B.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *Free. Rad. Biol. Med.* **2007**, 42, 1766–1780

<sup>134</sup> Filipovska, A.; Kelso, G.F.; Brown, S.E.; Beer, S.M.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (24), 24113–24126

mitochondries isolées, vis-à-vis de la peroxydation lipidique induite par l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le composé **JD-29**<sup>135</sup> (Figure 15) est un complexe de type salen-manganèse et un mimétique de la superoxyde dismutase SOD. Il a été testé sur des cellules HeLa pour sa capacité à prévenir l'apoptose. Malheureusement, il n'a pas montré une activité accrue comparée à son analogue non vectorisé.

La vectorisation des composés antioxydants associé au cation triphénylphosphonium est de plus en plus utilisée pour cibler la mitochondrie. Récemment, la synthèse de ces produits vectorisés s'est focalisée sur l'utilisation d'antioxydants naturels que l'on retrouve dans l'alimentation, comme les polyphénols ou les dérivés d'acides phénoliques. Parmi les structures développées, on retrouve la **MitoResvératrol**<sup>136</sup> dérivé vectorisé du resvératrol, la **MitoQuercétine**<sup>137</sup> version vectorisée de la quercétine et la **Mitocur-1**<sup>138</sup> obtenue à partir de la curcumine (Figure 16).

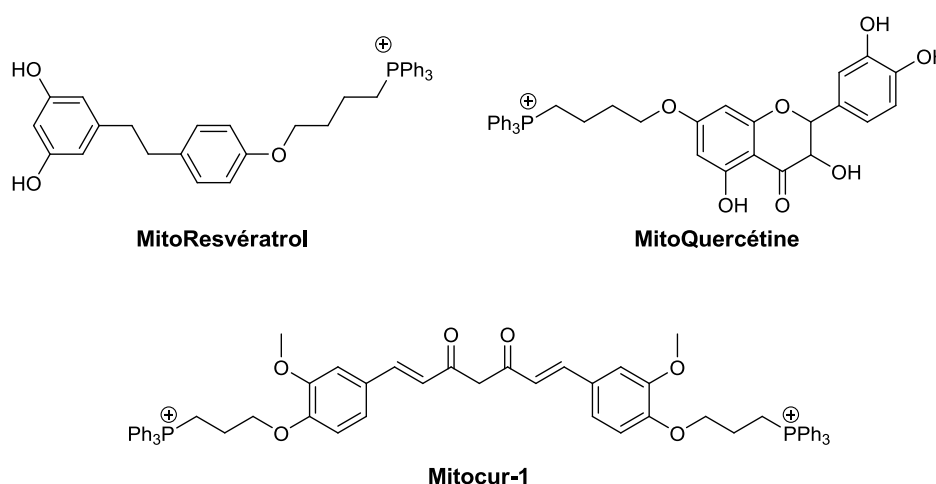


Figure 16 : Antioxydants naturels vectorisés pour cibler la mitochondrie

### 3.2.1.2 Nitroxydes vectorisés avec le cation TPP

Les nitroxydes sont des radicaux stables possédant une capacité antioxydante. Ils inhibent les dommages oxydatifs en piégeant les radicaux selon un mécanisme qui mime l'activité de la SOD. Le nitroxyde, en présence du radical superoxyde, subit une réduction mono-électronique qui conduit à la formation concomitante

<sup>135</sup> Dessolin, J.; Schuler, M.; Quinart, A.; De Giorgi, F.; Ghosez, L.; Ichas, F. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *447*, 155-161

<sup>136</sup> Biasutto, L.; Mattarei, A.; Marotta, E.; Bradaschia, A.; Sassi, N.; Garbisa, S.; Zoratti, M.; Paradisi, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5594-5597

<sup>137</sup> Mattarei, A.; Biasutto, L.; Rastrelli, F.; Garbisa, S.; Marotta, E.; Zoratti, M.; Paradisi, C. *Molecules* **2010**, *15*, 4722-4736

<sup>138</sup> Reddy, C.A.; Somepalli, V.; Golakoti, T.; Kanugula, A.K.; Karnewar, S.; Rajendiran, K.; Vagasiri, N.; Prabhakar, S.; Kuppusamy, P.; Kotamraju, S.; Kutala, V.K. *PLoS ONE* **2014**, *9* (3), e89351-e89351

d'hydroxylamine correspondante et d'oxygène (Schéma 62). L'hydroxylamine est ensuite oxydée par un autre radical superoxyde ce qui régénère le nitroxyde de départ ainsi que du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

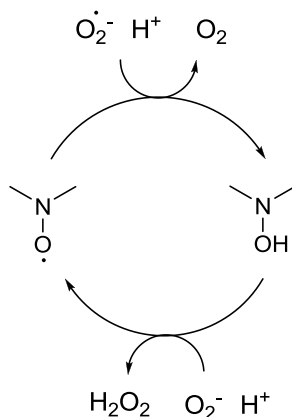


Schéma 62 : Mécanisme d'action d'un nitroxyde

La vectorisation de ces composés afin de cibler la mitochondrie a permis d'exploiter leur capacité à imiter l'activité de la SOD et à piéger le superoxyde à l'intérieur de la mitochondrie, dans laquelle ce radical est régulièrement formé.

Les nitroxydes TEMPOL et carboxy-proxyl ont été combinés avec le cation TPP pour synthétiser le **TEMPOL-TPP**<sup>135</sup>, la **Mito-TEMPOL**<sup>139</sup> et la **MitoCP**<sup>140</sup> (Figure 17).

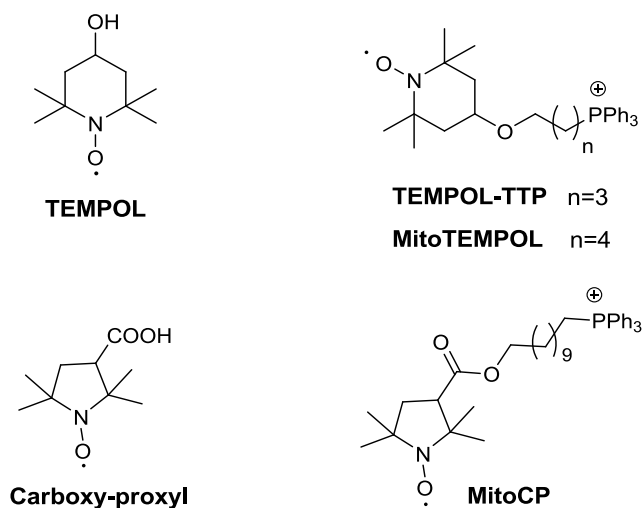
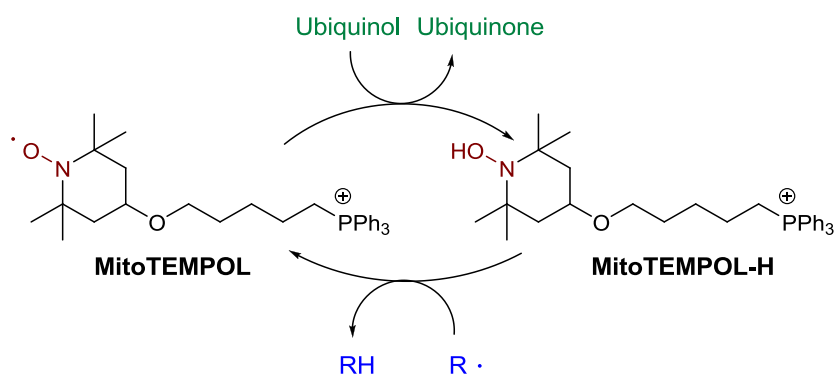


Figure 17

<sup>139</sup> Trnka, J.; Blaikie, F.H.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *Free Rad. Biol. Med.* **2008**, 44, 1406-1419

<sup>140</sup> Dhanasekaran, A.; Kotamraju, S.; Karunakaran, C.; Kalivendi, S.V.; Thomas, S.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. *Free Rad. Biol. Med.* **2005**, 39, 567-583

De bons résultats ont été obtenus avec la MitoTEMPOL qui est réduite dans la mitochondrie en hydroxylamine (MitoTEMPOL-H) par l'ubiquinol (Schéma 63). Sous cette forme, elle peut exercer son activité antioxydante *via* le transfert d'un proton, activité confirmée par sa capacité à protéger de la peroxydation lipidique considérablement supérieure à celle de la forme non réduite (MitoTEMPOL).



**Schéma 63:** Conversion de la MitoTEMPOL en hydroxylamine par l'ubiquinol

La forme nitroxyde (MitoTEMPOL) intervient plutôt dans l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) et limite la capacité d'un système à produire le radical  $\cdot\text{OH}$  à travers des réactions de type Fenton. Cependant, la forme prédominante *in vivo* est la forme réduite. Ainsi, l'activité du composé est attribuable à la capacité de la forme hydroxylamine à transférer des protons. La MitoTEMPOL a été testée sur des cellules murines C2C12, dans lesquelles elle évite le dommage oxydatif de l'ADN mitochondrial.<sup>141</sup>

La MitoCP a montré une bonne activité dans la protection de l'apoptose et du dommage oxydatif, induits par des peroxydes, dans des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC).

Les nitroxydes de type pyrrolidine (MitoCP) sont moins sensibles à la réduction de la forme hydroxylamine par rapport aux nitroxydes de type pipéridine (MitoTEMPOL), subséquemment leur activité est liée à un cycle antioxydant alternatif. La MitoCP réagit avec le superoxyde en donnant comme intermédiaire l'ion oxoammonium qui réagit ensuite avec une autre molécule de superoxyde pour reformer le nitroxyde<sup>140</sup> (Schéma 64). La réaction génère de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène, ce qui confirme la similarité du mécanisme avec l'activité de la SOD.

<sup>141</sup> Trnka, J.; Blaikie, F.H.; Logan, A.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *Free Radical. Res.* **2009**, 43, 4-12

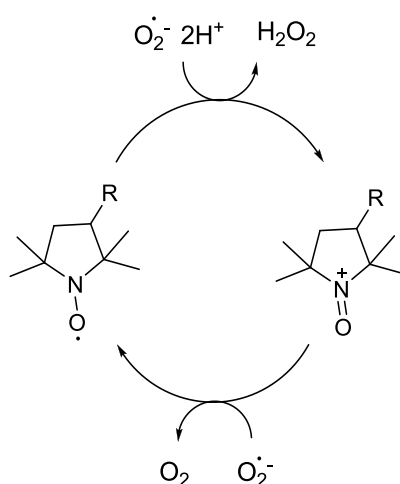


Schéma 64 : Mécanisme d'action des nitroxydes de type pyrrolidine

### 3.2.2 Vecteurs de type peptidique

Une autre manière de vectoriser des molécules est l'utilisation de peptides spécifiques capables de s'accumuler dans la mitochondrie, comme les peptides Szeto-Schiller (SS)<sup>142</sup> et les Mitochondrial-Penetrating Peptides (MPP)<sup>143</sup>. Les peptides faisant partie de ces deux classes sont constitués d'un mélange de résidus d'acides aminés cationiques et hydrophobes (alkyles ou aromatiques). Cette structure caractéristique, leur permet d'être absorbés dans la mitochondrie et ainsi d'y délivrer les molécules transportées. Le mécanisme d'absorption de ces peptides n'est pas encore clair.

#### PEPTIDES SZETO-SCHILLER (SS)

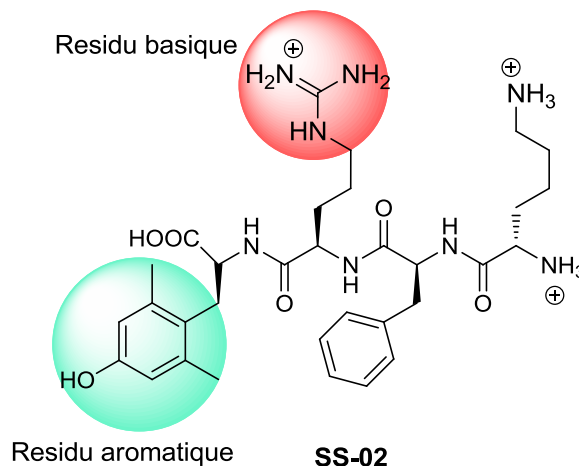
L'habilité des **peptides SS** à cibler la mitochondrie a été découverte par hasard pendant une étude sur leur activité comme analogues des opioïdes.

Ce sont des térapeptides dont le motif structural est une alternance de résidus apolaires aromatiques (phénylalanine, tyrosine ou diméthyltyrosine) et polaires basiques (arginine et lysine), ce qui confère à ces composés une charge nette **3+** à pH physiologique (Figure 18).<sup>144</sup>

<sup>142</sup> Sheu, S.-S.; Nauduri, D.; Anders, M.W. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1762, 256-265

<sup>143</sup> Horton, K.L.; Stewart, K.M.; Fonseca, S.B.; Guo, Q.; Kelley, S.O. *Chem. Biol.* **2008**, 15, 375-382

<sup>144</sup> Szeto, H.H.; Schiller, P.W. *Pharm.Res.* **2011**, 28, 2669-2679;



**Figure 18** : Un exemple de peptide SS

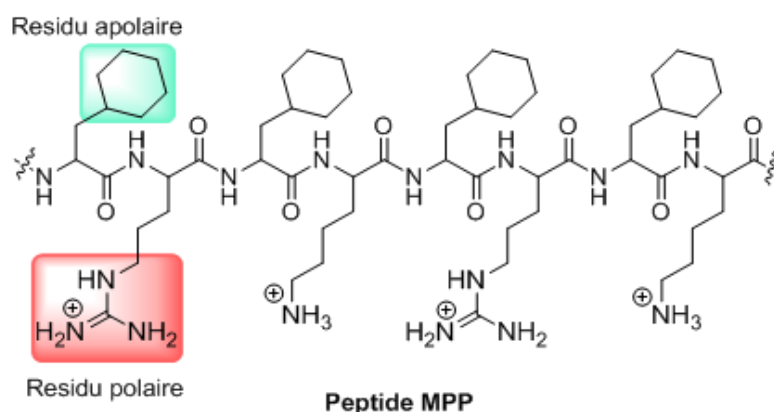
Bien que les peptides ne soient généralement pas solubles dans les membranes cellulaires à cause du fort caractère hydrophile et à leur tendance à former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, les peptides SS peuvent pénétrer dans la mitochondrie et se localiser au niveau de la membrane interne (où on retrouve une concentration > 85%).

Le mécanisme de l'absorption de ces peptides n'est pas encore connu. Malgré la charge positive 3+ qui laisse présager une implication du potentiel mitochondrial, il est tout à fait indépendant du  $\Delta\psi_m$ . L'absorption pourrait, plutôt, dépendre des interactions cation- $\pi$  entre les cycles aromatiques, riches en électrons, et les cations adjacents, de manière à ce que les aromatiques blindent les charges positives et favorisent la pénétration passive dans la mitochondrie.<sup>144</sup>

La présence d'un résidu de tyrosine (ou diméthyltyrosine) dans la structure confère à ces peptides un pouvoir antioxydant intrinsèque et permet de les utiliser sans l'ajout d'une autre molécule ; en effet, ils possèdent déjà soit l'activité antioxydante soit la capacité de cibler la mitochondrie.

### MITOCHONDRIAL-PENETRATING PEPTIDES MPP

Les MPP sont des peptides synthétisés sur la base des deux principales caractéristiques nécessaires pour passer les deux membranes mitochondriales à savoir la charge positive et le caractère lipophile. Comme pour les peptides SS, la structure est constituée de résidus hydrophobes alternés avec des résidus cationiques (Figure 19).



**Figure 19**

Ces peptides possèdent l'équilibre adéquat entre charge et lipophilie pour fournir la force électrostatique nécessaire afin de franchir les barrières énergétiques (potentiels des membranes cellulaires et mitochondriales) en gardant, également, l'habilité de traverser les membranes hydrophobes.<sup>117</sup>

Ils sont capables de transporter, dans la mitochondrie, différentes molécules greffées soit à l'extrémité *N*-terminale soit à la *C*-terminale.<sup>145</sup>

#### **ANALOGUES DE LA GRAMICIDINE S**

Une autre stratégie pour cibler la mitochondrie utilise comme vecteur un fragment de la gramicidine S. La structure de la gramicidine S correspond à un décapeptide cyclique, composé de deux pentapeptides (Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-) identiques reliés tête-à-queue entre eux. C'est un antibiotique possédant une forte affinité pour les membranes bactériennes. Le fragment utilisé (Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn) cible effectivement la mitochondrie<sup>146</sup> en raison de la similarité entre cette dernière et les bactéries.

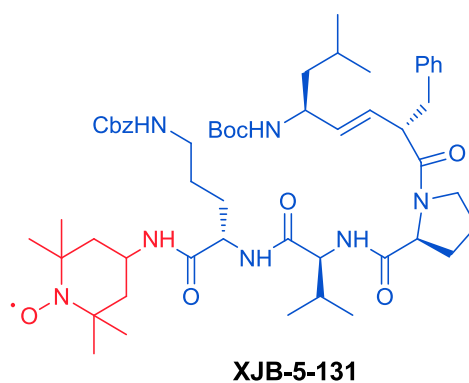
Le nitroxyde 4-amino-TEMPO<sup>147</sup> a été vectorisé avec ce fragment afin d'exploiter son pouvoir antioxydant dans la mitochondrie (Figure 20).

<sup>145</sup> Yousif, L.F.; Stewart, K.M.; Horton, K.L.; Kelley, S.O. *ChemBioChem* **2009**, 10, 2081-2088

<sup>146</sup> Yamada, Y.; Harashima, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1439-1462

<sup>147</sup> Wipf, P.; Xiao, J.; Jiang, J.; Belikova, N.A.; Tyurin, V.A.; Fink, M.P.; Kagan, V.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12460-12461





**Figure 20** : Un exemple de 4-amino-TEMPO (rouge) vectorisé par un fragment de gramicidine S (bleu)

Plusieurs analogues ont été synthétisés avec des variations dans la longueur du segment et dans les chaînes latérales afin de moduler le passage à travers la membrane cytoplasmique et le ciblage de la mitochondrie.

Les composés de cette série de vecteurs sont capables de pénétrer la mitochondrie et en plus de l'activité antioxydante, typique du nitroxyde, ont montré la capacité d'inhiber l'apoptose.<sup>148</sup>

### 3.3 Nitrones vectorisées par le cation TPP

L'habilité des nitrones à piéger les radicaux libres en donnant une espèce radicalaire stable détectable, permet leur utilisation comme sondes pour l'étude des mécanismes radicalaires responsables de différentes pathologies. Étant donné que la mitochondrie est la principale source de radicaux libres des cellules, il est intéressant de développer des nitrones pouvant cibler cette organelle afin d'étudier le processus radicalaire directement au niveau du site de production de ROS.

Plusieurs nitrones ont été vectorisées pour être délivrées dans la mitochondrie. Dans la bibliographie, on retrouve les dérivés de certaines nitrones cycliques, tels que la **MitoDEPMPO**<sup>149</sup>, la **MitoDIPPMPO**<sup>150</sup> et la **MitoBMPO**<sup>151</sup> et, pour les nitrones acycliques, la version vectorisée de la PBN, la **MitoPBN**<sup>152</sup> (Figure 21). Une autre

<sup>148</sup> Jiang, J.; Kurnikov, I.; Belikova, N.A.; Xiao, J.; Zhao, Q.; Amoscato, A.A.; Braslau, R.; Studer, A.; Fink, M.P.; Greenberger, J.S.; Wipf, P.; Kagan, V.E. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2007**, 320, 1050-1060

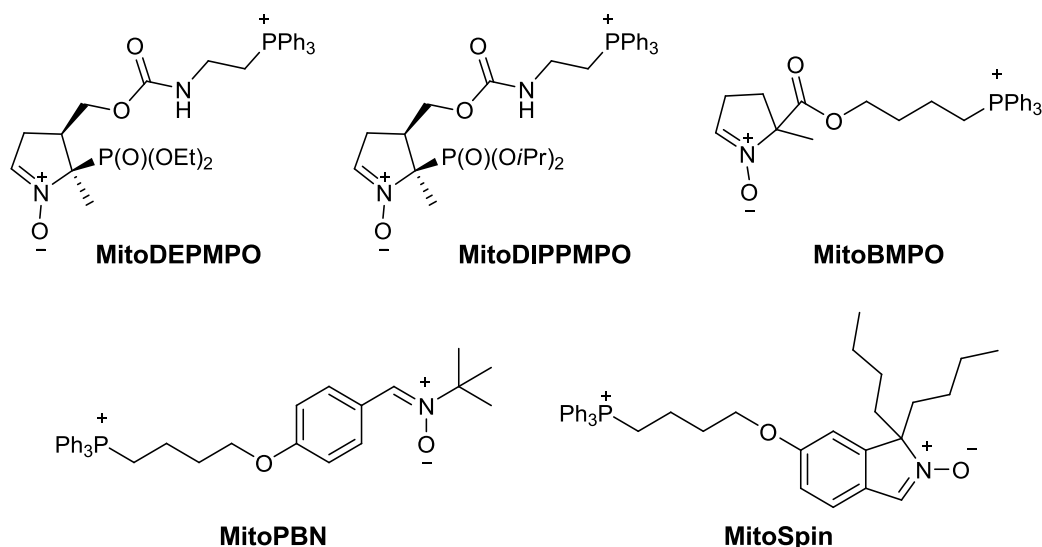
<sup>149</sup> Hardy, M.; Chalier, F.; Ouari, O.; Finet, J.-P.; Rockenbauer, A.; Kalyanaraman, B.; Tordo, P. *Chem. Comm.* **2007**, 1083-1085

<sup>150</sup> Hardy, M.; Poulhès, F.; Rizzato, E.; Rockenbauer, A.; Banaszak, K.; Kaouri, H.; Lopez, M.; Zielonka, J.; Vasquez-Vivar, J.; Sethumadhavan, S.; Kalyanaraman, B.; Tordo, P.; Ouari, O. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, 27, 1155-1165

<sup>151</sup> Yingkai, X.; Kalyanaraman, B. *Free Rad. Res.* **2007**, 41(1), 1-7

<sup>152</sup> Murphy, M.P.; Eghtay, K.S.; Blaikie, F.H.; Asin-Cayuela, J.; Cochemé, H.M.; Green, K.; Buckingham, J.A.; Taylor, E.R.; Hurrell, F.; Hughes, G.; Miwa, S.; Cooper, C.E.; Svistunenko, D.A.; Smith, R.A.J.; Brand, M.D. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(5), 48534-48545

nitronne, utilisée pour cibler la mitochondrie, possède une structure du type isoindolinique, la **MitoSpin**<sup>153</sup>.



**Figure 21** : Structures de nitrones ciblant la mitochondrie

Les trois composés dérivés des nitrones cycliques, MitoDEPMPO, MitoDIPPMPO et MitoBMPO, ont montré une activité efficace comme piègeurs des radicaux oxygénés,  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , ainsi que des radicaux carbonés.

La MitoDEPMPO et la MitoDIPPMPO piègent les radicaux plus efficacement que leurs analogues non vectorisés (DEPMPO et DIPPMPO). De plus, les adduits superoxydes ont un temps de demi-vie supérieur (environ 2,6 fois) comparés à ceux de leurs précurseurs.<sup>150</sup> La présence du groupement cationique TPP est à l'origine de ce comportement : i) il attire la charge négative de l'anion superoxyde et favorise ainsi sa réaction avec la nitronne, et ii) il contribue à stabiliser l'adduit formé *via* l'interaction avec la fonction hydroperoxyde.

La MitoDEPMPO a été testée dans des mitochondries isolées et le spectre résultant est un mélange d'adduits superoxydes (41%), hydroxydes (38%) et alkyles (21%)<sup>154</sup>. La MitoBMPO piège efficacement les radicaux oxygénés. L'adduit superoxyde MitoBMPO-OOH ne se décompose pas en adduit MitoBMPO-OH mais a un temps de demi-vie inférieur à celui de son analogue non vectorisé (BMPO).

<sup>153</sup> Quin, C.; Trnka, J.; Hay, A.; Murphy, M.; Hartley, R.C. *Tetrahedron* **2009**, 65, 8154-8160

<sup>154</sup> Hardy, M.; Rockenbauer, A.; Vásquez-Vivar, J.; Felix, C.; Lopez, M.; Srinivasan, S.; Avadhani, N.; Tordo, P.; Kalyanaraman, B. *Chem. Res.Toxicol.* **2007**, 20, 1053-1060.

La MitoPBN, a été synthétisée et utilisée afin d'élucider le mécanisme d'activation des Uncoupling Proteins (UCP), protéines présentes dans la membrane mitochondriale, et ayant pour rôle de dissiper le gradient de protons avant qu'ils ne puissent être utilisés par l'oxydation phosphorylante. Aux vues de leur activation liée à la production du superoxyde et des produits de la peroxydation lipidique, ces UCP seraient impliquées dans la régulation des ROS. Il a été démontré que la MitoPBN bloque l'activation des UCP dans le cas où le promoteur est le superoxyde, mais pas dans le cas du 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal (HNE)<sup>152</sup>. Compte tenu que la MitoPBN réagit rapidement avec les radicaux carbonés mais n'est pas réactive envers le superoxyde et les produits de peroxydation lipidique, on peut affirmer que le superoxyde et le HNE font partie de la même voie d'activation des UCP. En particulier, le superoxyde génère des radicaux carbonés qui, à leur tour, initialisent la peroxydation lipidique dont les produits finaux activent les UCP. La MitoPBN est capable de piéger les radicaux carbonés générés par le superoxyde, bloquant ainsi l'initiation de la peroxydation lipidique et par conséquent l'activation des UCP. En revanche, elle ne peut pas éviter l'activation due à HNE. En effet, une fois la peroxydation initiée, la MitoPBN ne se comporte pas comme un agent de coupure de chaînes.<sup>152</sup>

Parmi les nitrones rapportées, seules la MitoPBN et la MitoDEPMPO ont été utilisées dans des mitochondries isolées. Toutefois, leur potentiel thérapeutique n'a pas encore été approfondi.

La MitoSpin est une nitrone cyclique capable de pénétrer la mitochondrie. Elle a été synthétisée pour fonctionner comme une nitrone traditionnelle, afin de piéger et identifier les différents radicaux. Toutefois, les essais réalisés pour piéger le radical  $\cdot\text{OH}$  ont donné un spectre inattendu à trois raies<sup>153</sup>. Il semblerait que l'adduit MitoSpin-OH, généré dans les conditions de Fenton, soit rapidement converti en nitroxyde oxydé correspondant (MitoSpinOx) *via* la formation de l'hydroxylamine (Schéma 65).

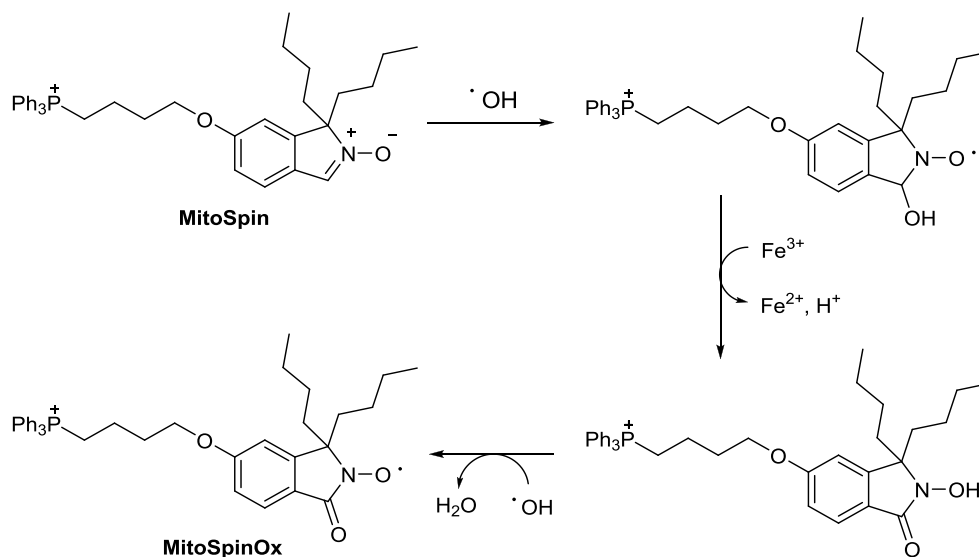


Schéma 65 : Mécanisme de conversion de l'adduit MitoSpin-OH

La facilité avec laquelle la MitoSpin s'oxyde ne permet pas d'exploiter cette nitrone pour l'identification des différentes espèces radicalaires. Elle peut, tout de même, être utilisée pour la détection du niveau de stress oxydant présent dans la mitochondrie mais aussi comme produit potentiellement thérapeutique<sup>153</sup>.

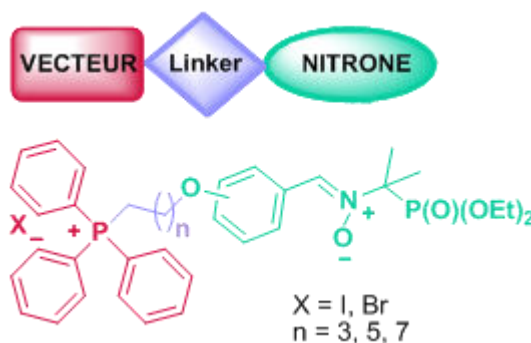
### 3.4 Synthèse de nouvelles nitrones ciblant la mitochondrie

Sur la base de l'étude bibliographique ci-dessus et aux vues des bons résultats obtenus dans les différents travaux concernant la vectorisation des nitrones, notre recherche s'est concentrée sur le développement de **nouvelles nitrones de type PPN** (Phényl Phosphoryl Nitron) **pouvant cibler la mitochondrie**.

Le vecteur de notre choix est le cation lipophile TPP qui, d'après la littérature, possède de fortes potentialités en ce qui concerne d'une part, le ciblage spécifique de la mitochondrie et d'autre part, la rapide pénétration au sein de la matrice mitochondriale<sup>155</sup>.

De plus, une thématique récemment développée au sein du laboratoire, concernant l'utilisation d' $\alpha$ -aminophosphonates vectorisés pour la mesure du pH au niveau mitochondrial, a confirmé l'efficacité du cation TPP lors du ciblage de la mitochondrie<sup>156</sup>.

Notre synthèse sera focalisée sur le greffage du **cation triphénylphosphonium** (TPP ou  $^+PPh_3$ ) sur des nitrones de type PPN afin de pouvoir délivrer ces composés et exploiter leur activité de piègeurs de radicaux au cœur même de la mitochondrie.



**Figure 22** : Structure générale des nouvelles nitrones

En particulier notre étude portera, dans un premier temps, sur la **longueur du bras espaceur** (linker) entre la nitronne et le vecteur (Figure 22). D'après la littérature<sup>124</sup>, l'intérêt de moduler la longueur du linker repose sur le rôle fondamental qu'il joue dans l'absorption et le positionnement du composé à l'intérieur de la mitochondrie et

<sup>155</sup> Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 5407-5412.

<sup>156</sup> Culcasi, M.; Casani, G.; Lucchesi, C.; Mercier, A.; Clément, J.-L.; Pique, V.; Michelet, L.; Krieger-Liszkay, A.; Robin, M.; Pietri, S. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (6), 2487-2499

par conséquence dans l'efficacité de son activité<sup>157</sup>. Pour cela, nous utiliserons **trois chaînes alkyles de différentes longueurs** possédant 4, 6 ou 8 atomes de carbone.

Dans un deuxième temps, notre attention se portera sur l'**orientation du vecteur**  $^+PPh_3$ . Ensuite, dans l'hypothèse que la modification de la position de greffage du vecteur puisse également apporter des différences de réactivité, nous allons développer la nitrone vectorisée en *méta*.

Ces travaux s'inscrivent dans la recherche de nouvelles sondes permettant la détection des radicaux libres au niveau mitochondrial. L'aptitude des nitrones à réagir avec les radicaux en donnant un nitroxyde stable, détectable avec la technique RPE, permet l'étude et la compréhension des mécanismes radicalaires physiologiques ou pathologiques.

Les modifications structurales apportées sur nos nouvelles nitrones serviront à évaluer les nitrones donnant les meilleurs résultats lors du ciblage mitochondrial et du piégeage de radicaux avec la technique RPE, ce qui nous permettra de les utiliser dans des modèles biologiques.

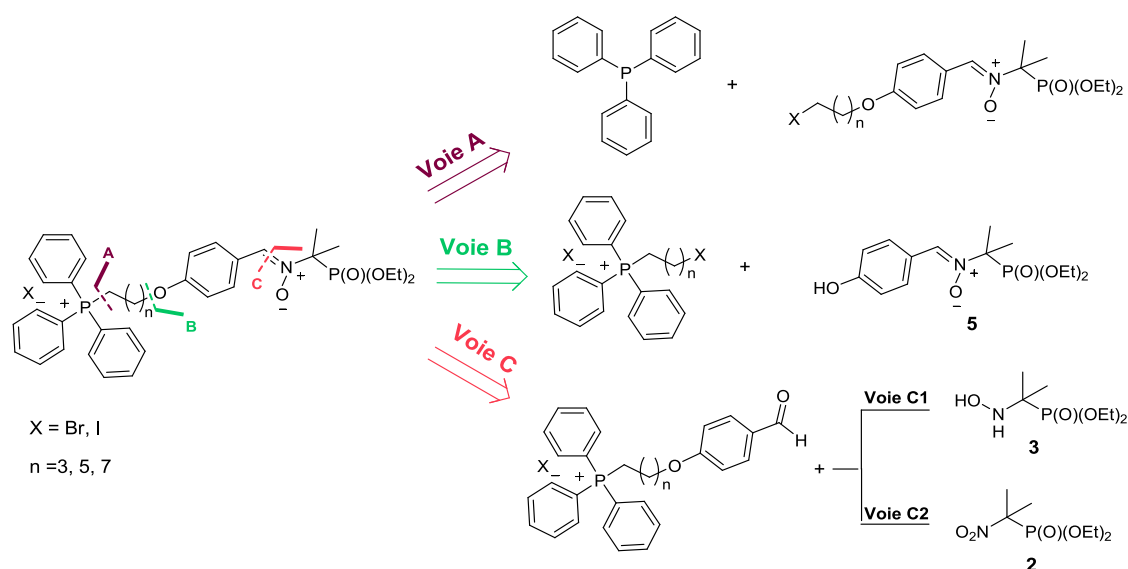
---

<sup>157</sup> Reily, C.; Mitchell, T.; Chacko, B.K.; Benavides, G.A.; Murphy, M.P.; Darley-Usmar, V.M. *Redox Biology* **2013**, 1, 86-93

### 3.4.1 Analyse rétrosynthétique

L'analyse de la rétrosynthèse des nouvelles nitrones ciblant la mitochondrie s'articule sur trois déconnexions principales comme montre le Schéma 66.

Pour des raisons de clarté, nous réaliserons notre étude sur les structures de nitrones où le vecteur sera orienté en *para*.



**Schéma 66** : Les trois voies de synthèses possibles selon les déconnexions principales

La **voie A** est déterminée par la déconnexion de la liaison P-C qui assure la jonction entre le vecteur triphénylphosphonium (TPP) et la chaîne alkyle de la nitrone. Cette première méthode nous permet, d'un point de vue synthétique, d'assurer le greffage du cation TPP en fin de synthèse et d'éviter ainsi les problèmes relatifs à la purification des composés finaux. La présence du cation TPP sur un composé peut considérablement réduire la solubilité dans les solvants organiques, et de ce fait, engendrer des difficultés de purifications.

La **voie B** envisage la déconnexion de la liaison éther qui assure la jonction entre la nitrone **5** et la chaîne alkyle du cation TPP. L'application de cette méthode permet d'obtenir le composé selon le concept de synthèse convergente. Les deux syntons sont obtenus de manière indépendante puis couplés par une réaction d'*O*-alkylation.

La **voie C** concerne la déconnexion de la liaison C=N qui se forme suite au couplage de l'aldéhyde avec l'hydroxylamine **3** (Voie C1) ou le composé nitro **2** (Voie C2). L'utilisation de cette voie synthétique nous permet d'obtenir à la dernière étape la nitrone lui évitant ainsi d'éventuelles dégradations.

### 3.4.2 Choix de la voie de synthèse

Le choix de la stratégie de synthèse pour l'obtention des nouvelles nitrones a été possible suite à plusieurs tentatives.

Nous avons appliqué les trois différentes voies décrites ci-dessus (Schéma 66) afin de trouver le mode opératoire le plus efficace pour l'obtention des produits finaux. Dans ce qui suit nous allons décrire les différentes méthodes appliquées ainsi que les résultats obtenus pour chaque essai.

Par simplicité, les essais effectués, pour choisir la voie de synthèse, ont été réalisés en envisageant l'obtention du produit avec le bras espaceur le plus court (4 méthylènes,  $n=3$ ).

#### SYNTHESE SELON LA VOIE A

La première stratégie de synthèse proposée (**voie A**) implique la formation d'une nitrone *O*-alkylée (intermédiaire A) qui permettra l'accès à la nitrone vectorisée suite à la réaction avec la triphénylphosphine (Schéma 67).

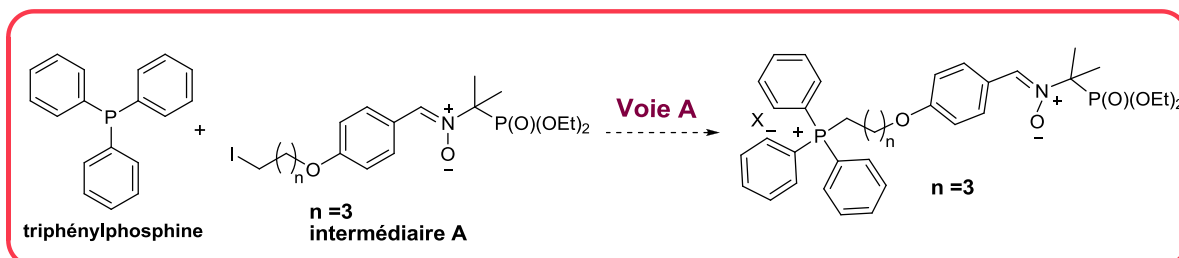
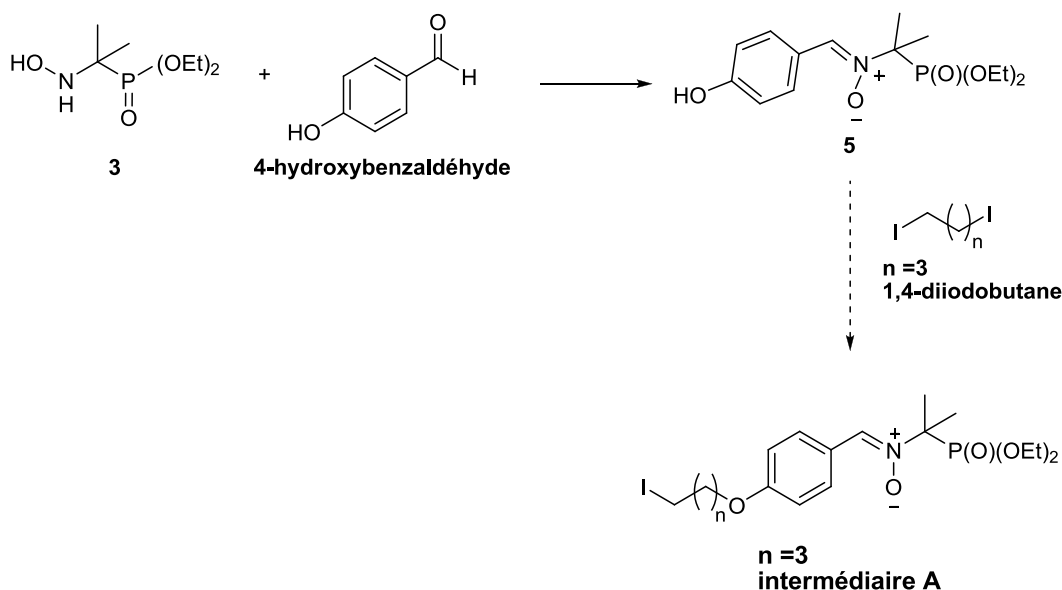


Schéma 67 : Synthèse selon la voie A

Pour la mise en œuvre de cette synthèse nous devons tout d'abord synthétiser l'**intermédiaire A** qui peut être obtenu selon différentes méthodes de synthèse. La première méthode utilisée (Schéma 68) concerne la synthèse de la nitrone **5** et la subséquente formation de l'intermédiaire A *via* *O*-alkylation de la nitrone.

La synthèse de la nitrone **5**, par condensation entre le 4-hydroxybenzaldéhyde et l'hydroxylamine **3**, a été effectuée selon la méthode décrite en détail dans le Chapitre 2.

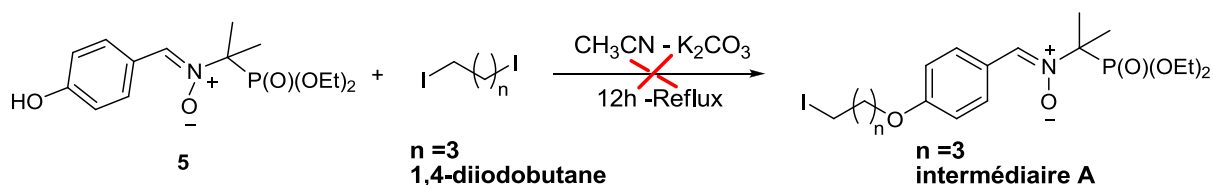




**Schéma 68** : Synthèse *via* l'O-alkylation de la nitrone 5

Pour la réaction d'O-alkylation entre la nitrone 5 et le 1,4-diiodobutane nous avons appliqué la méthode classique qui emploie une base pour former l'ion alcoolate et faciliter le couplage avec la chaîne halogénée. La réaction a été conduite dans l'acétonitrile à reflux pendant 12 heures en présence de  $K_2CO_3$  (Schéma 69).

En appliquant ces conditions, couramment utilisées dans la littérature<sup>158</sup> pour l'O-alkylation avec des chaînes halogénées, nous n'avons pas obtenu l'intermédiaire A.



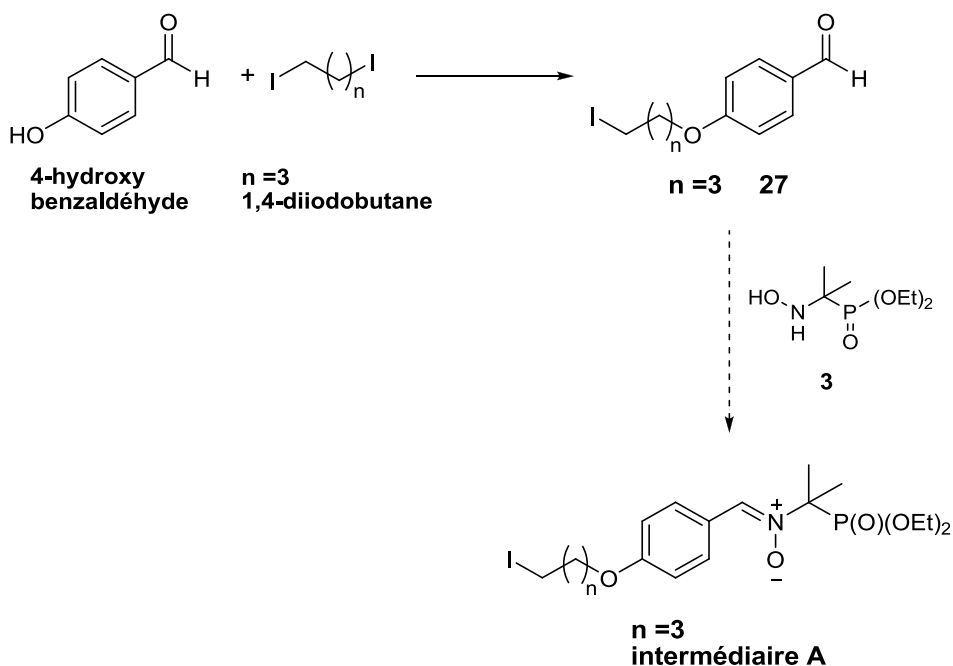
**Schéma 69**

La réaction dans notre cas a donné un mélange complexe de produits. D'après l'analyse RMN, on retrouve une faible quantité de produit final et les deux réactifs de départ n'ayant pas réagi. Nous avons constaté également la présence de sous-produits, probablement dus à des réactions de dimérisation. Ce mélange est difficilement séparable et les techniques de purification essayées (chromatographie

<sup>158</sup> (a)Tomasulo, M.; Kaanumal, S. L.; Sortino, S.; Raymo, F. M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 595-605 (b) Hada, K.; Suda, A.; Asoh, K.; Tsukuda, T.; Hasegawa, M.; Sato, Y.; Ogawa, K.; Kuramoto, S.; Aoki, Y.; Shimma, N.; Ishikawa, T.; Koyano, H. *Bioorgan. Med. Chem.* **2012**, 20, 1442-1460

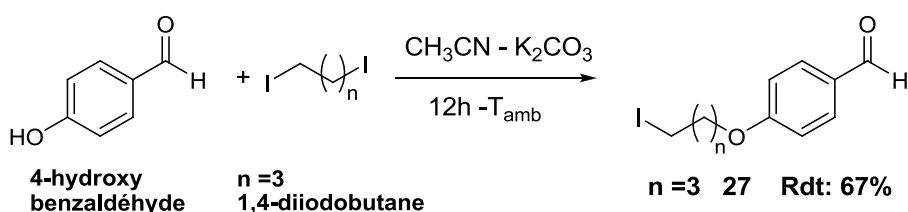
sur silice et/ou purification par précipitation dans différents solvants) conduisent à la dégradation de la fonction nitronne.

Aux vues de ces résultats, nous avons décidé d'appliquer une deuxième méthode (Schéma 70) qui implique d'abord l'*O*-alkylation du 4-hydroxybenzaldéhyde, suivie de l'introduction de la fonction nitronne *via* le couplage entre le groupement aldéhydique et l'hydroxylamine **3**.



**Schéma 70** : Synthèse via *O*-alkylation du 4-hydroxybenzaldéhyde et formation subséquente de la nitronne

La première étape est effectuée selon la méthode décrite dans la littérature<sup>159</sup> en faisant réagir le 4-hydroxybenzaldéhyde avec le 1,4-diiodobutane dans l'acétonitrile durant 12 heures à température ambiante en présence de  $K_2CO_3$  (Schéma 71).

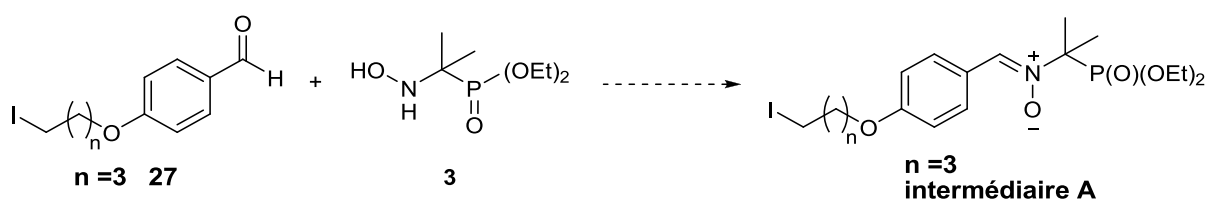


**Schéma 71** : Synthèse du composé 27

<sup>159</sup> Culcasi, M.; Benameur, L.; Mercier, A.; Lucchesi, C.; Rahmouni, H.; Asteian, A.; Casano, G.; Botta, A.; Kovacic, H.; Pietri, S.; *Chem. Biol. Interact.* **2012**, 199, 161-176

L'application de ces conditions a permis l'obtention du produit d'*O*-alkylation **27** avec un rendement de 67% après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant  $\text{CHCl}_3$ ).

Le produit **27** est ensuite utilisé dans la réaction avec l'hydroxylamine **3** pour introduire la fonction nitronne (Schéma 72).



Les conditions opératoires utilisées pour cette réaction sont résumées dans la Table 17. Nous avons appliqué les deux méthodes qui ont permis l'obtention des nitrones décrites dans le Chapitre 2, mais dans ce cas nous n'avons pas obtenu la nitronne souhaitée (intermédiaire A).

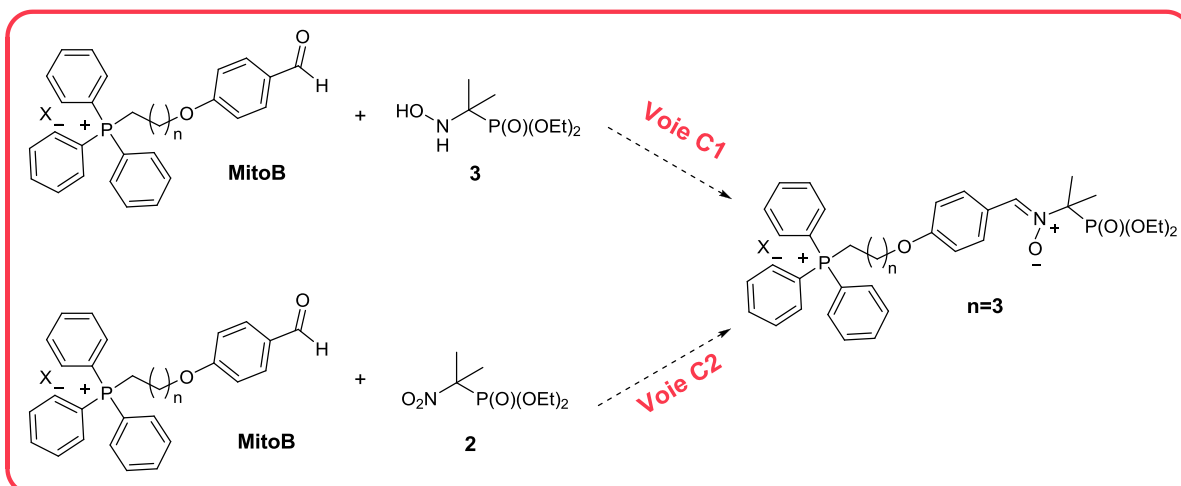
**Table 17** : Conditions opératoires des essais pour la synthèse de l'intermédiaire A

Essai	Solvant	Conditions	Temps	Rendement
<b>1</b>	DCE	$\text{MgSO}_4 - 100^\circ\text{C}$	5 h	Aucune réactivité
<b>2</b>	THF	$\text{MgSO}_4 - \text{Reflux}$	5 h	Faible réactivité

Le premier essai ( Table 17, entrée 1), effectué dans le DCE ne montre aucune réactivité et permet la récupération des réactifs de départ. Dans l'essai suivant ( Table 17, entrée 2) la réaction est conduite dans le THF et on obtient un mélange des produits. Dans ce cas le composé final n'est pas majoritaire et difficilement séparable. Aux vues des difficultés pour synthétiser et récupérer les différents syntons, on peut considérer que la voie A n'est pas applicable dans notre cas. Nous avons décidé d'appliquer les autres voies de synthèses.

**SYNTHÈSE SELON LA VOIE C**

La deuxième stratégie de synthèse (**voie C**) implique l'obtention d'un intermédiaire décrit dans la littérature, le Mito-benzaldéhyde<sup>152</sup> (**Mito B**). Ce composé, ayant un groupement aldéhyde, devrait permettre la formation de la nitronne suite à la réaction avec l'hydroxylamine **3** (Schéma 73, voie C1) ou, en alternative, avec le composé nitro **2** (Schéma 73, voie C2).



**Schéma 73** : Synthèse selon la voie C

L'intermédiaire Mito B peut être synthétisé selon deux méthodes différentes. La première méthode (Schéma 74, **I**) est une réaction entre le 4-hydroxybenzaldéhyde et un dérivé alkylé du cation triphénylphosphonium<sup>152</sup>. La deuxième méthode (Schéma 74, **II**) concerne le couplage du composé **27** avec la triphénylphosphine<sup>159</sup>.

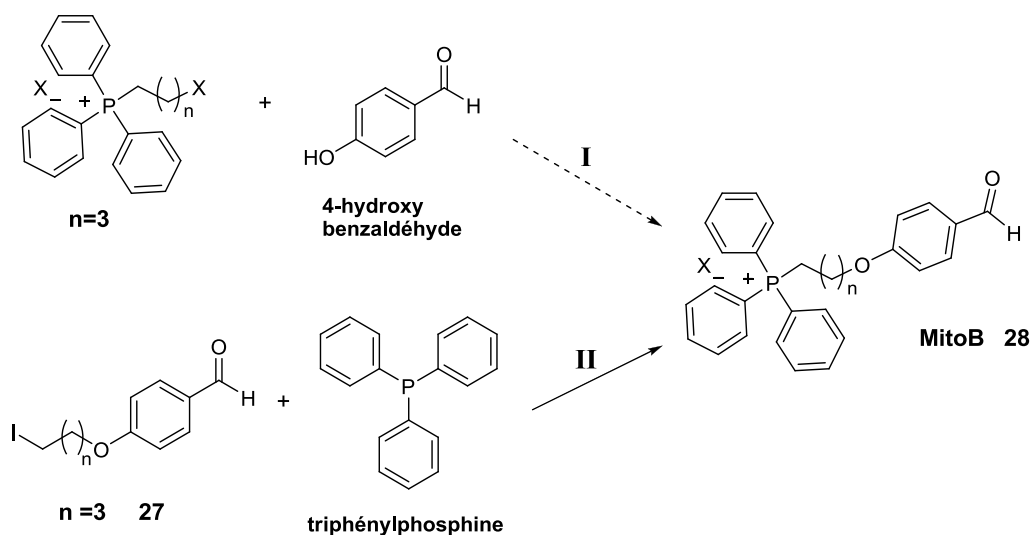


Schéma 74 : Méthodes pour l'obtention de la MitoB

Le composé **27** étant précédemment synthétisé, au moyen de l'*O*-alkylation du 1,4-diiodobutane avec le 4-hydroxybenzaldéhyde, nous avons décidé dans un premier temps de l'utiliser pour l'obtention de la Mito B (méthode **II**).

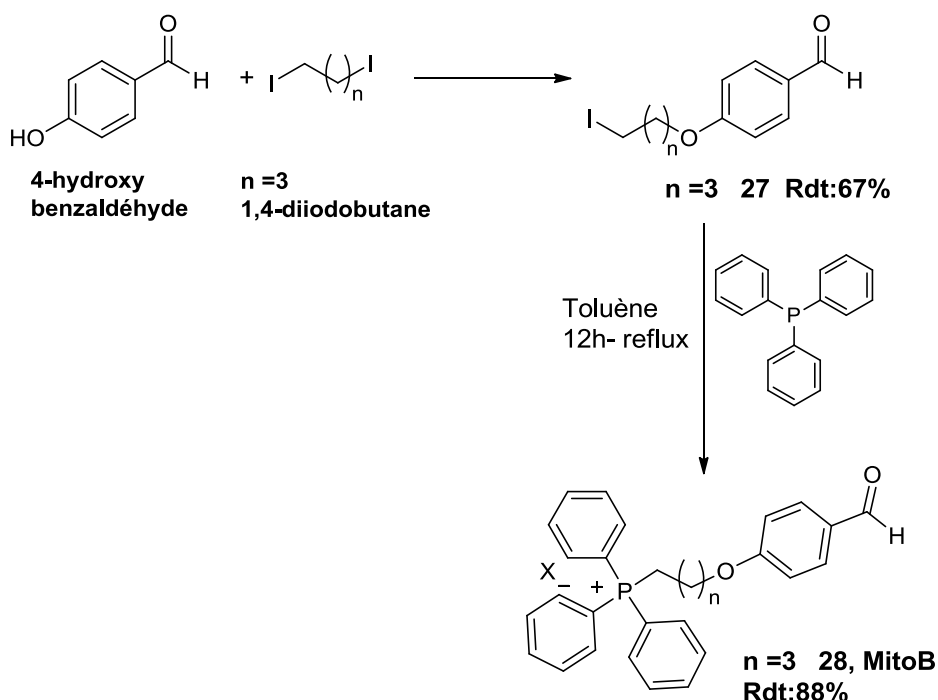
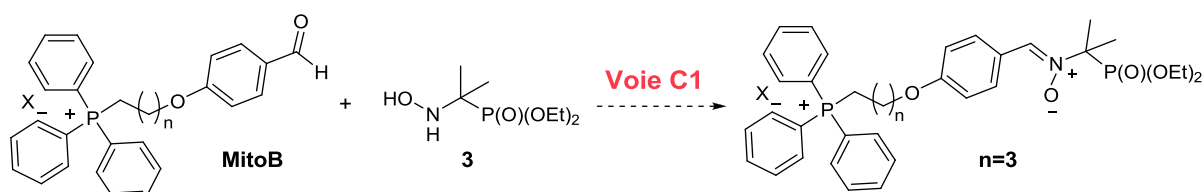


Schéma 75 : Synthèse de l'intermédiaire **28** (MitoB)

La réaction de couplage entre la triphénylphosphine et le composé **27** est réalisée dans du toluène à reflux pendant 12 heures, ce qui nous a permis d'obtenir le composé **28**

(MitoB) avec un rendement de 88% (Schéma 75). Aux vues du rendement obtenu, il n'a pas été nécessaire d'utiliser la méthode I.

Le produit **28** est utilisé, dans un premier temps, pour la formation de la fonction nitronne selon la réaction classique de couplage entre un aldéhyde et une hydroxylamine. Dans notre cas l'hydroxylamine utilisée est le composé **3** (Schéma 76).



**Schéma 76** : Synthèse selon la voie C1, par condensation entre l'aldéhyde **28** et l'hydroxylamine **3**

Les premiers essais (Table 18, entrées 1 et 2) sont réalisés dans du THF à reflux en présence d'un agent desséchant, MgSO<sub>4</sub>. La réaction a montré une faible réactivité quand elle est effectuée pendant 5 heures (entrées 1) ; une augmentation du temps de réaction (entrées 2) à 48 heures ne montre aucune amélioration de la réactivité. Dans les deux cas on récupère un mélange des produits de départ, n'ayant pas réagi, et une petite quantité de produit final inférieure à 5% selon l'analyse RMN.

**Table 18**

Essai	Solvant	Conditions	Temps	Rendement
<b>1</b>	THF	MgSO <sub>4</sub> – Reflux	5 h	Faible réactivité
<b>2</b>	THF	MgSO <sub>4</sub> – Reflux	48 h	Faible réactivité
<b>3</b>	DCE	MgSO <sub>4</sub> – Reflux	5 h	Faible réactivité
<b>4</b>	EtOH	MgSO <sub>4</sub> – 50°C	5 h	Aucune réactivité

Aux vues de ces résultats, nous avons changé le solvant en employant le DCE (Table 18, entrées 3) et nous avons appliqué les conditions avec lesquelles la synthèse des nitrones dérivées des PPN décrites dans le chapitre 2 a été possible. Tout comme pour les essais précédents, le produit final n'est pas majoritaire ce qui nous a empêché de l'isoler.

Dans le dernier essai (Table 18, entrées 4) le solvant a été changé pour utiliser cette fois-ci l'éthanol selon la méthode décrite dans la littérature pour l'obtention des nitrones<sup>85c</sup>. Dans ces conditions, aucune réactivité n'est observée et seuls les deux réactifs de départ sont récupérés.

Du fait de ces résultats peu satisfaisants, nous avons tenté d'accéder à la nitrone par une condensation directe entre l'aldéhyde et le composé nitro **2** (Schéma 77).

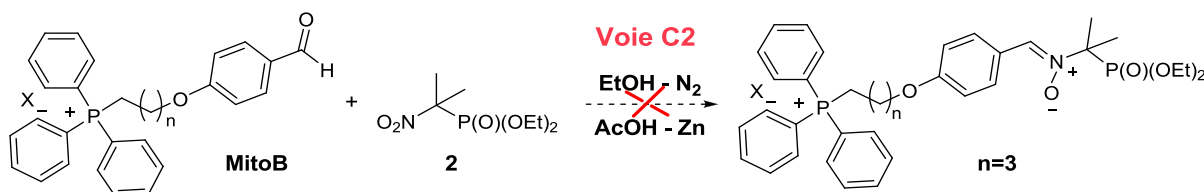


Schéma 77 : Synthèse selon la voie C2, via le composé nitro **2**

Cette méthode one-pot implique la formation *in situ* de l'hydroxylamine, via la réduction du composé **2**, ce qui devrait permettre l'obtention de la nitrone recherchée en une seule étape. Les conditions que nous avons appliquées sont celles décrites dans la littérature pour la synthèse de la Mito-PBN<sup>152</sup>.

La réaction entre l'aldéhyde **28** et le composé nitro **2** est réalisée dans l'éthanol sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) en présence de zinc, d'acide acétique et de tamis moléculaire 4 Å. Ce mélange est maintenu à une température de 4°C pendant 9 jours. Dans notre cas, cette méthode n'a pas conduit à la nitrone recherchée et seuls les réactifs de départ ont été récupérés.

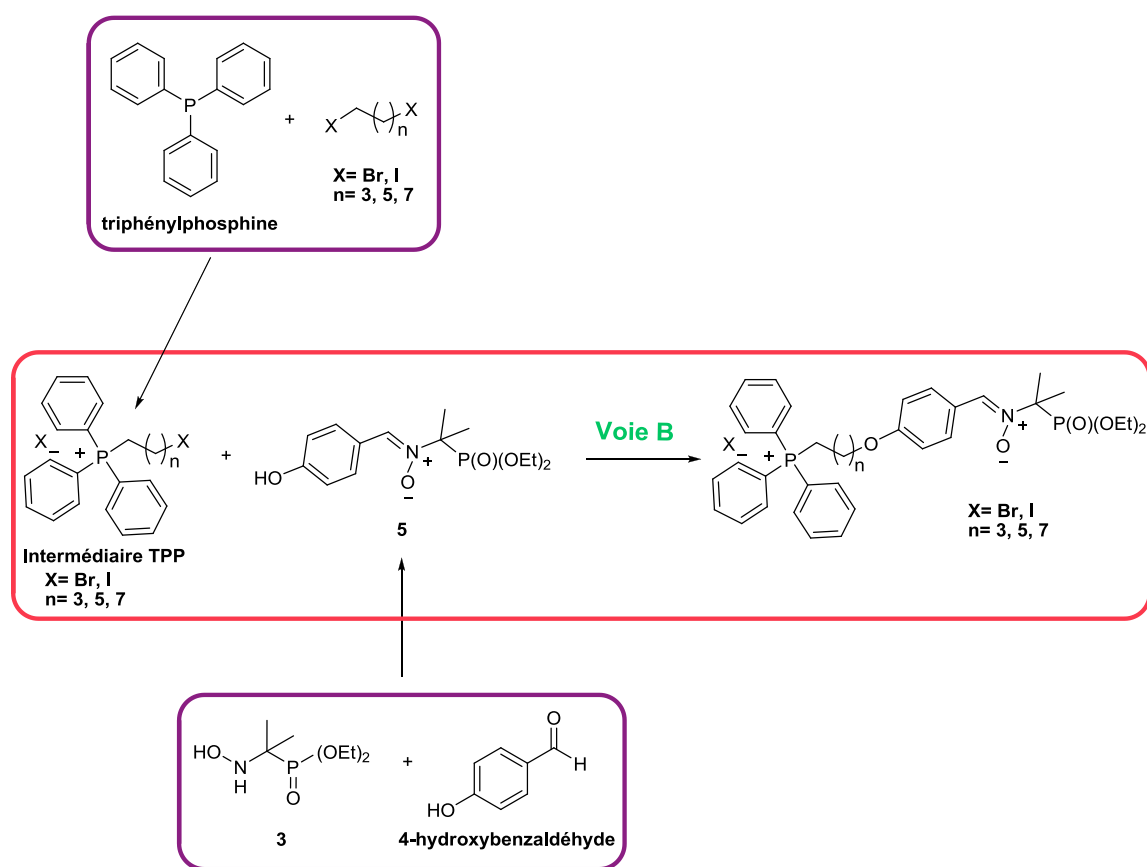
Compte tenu de ces échecs, on peut considérer que la voie C, ainsi que la voie A, ne sont pas applicables pour la synthèse de nos nouvelles séries de nitrones. Ce qui nous amène à penser que la voie la plus adaptée et la plus efficace à la synthèse de nos produits sera la **voie B**.

Contrairement aux voies A et C qui appliquent une synthèse de type linéaire, où les transformations chimiques sont réalisées de façon successive à partir du produit de départ jusqu'à obtenir le produit désiré, la voie B est une synthèse de type convergente. Cette dernière approche est basée sur la préparation de deux intermédiaires clés qui seront ensuite assemblés. Cette méthodologie est souvent préférée et appliquée dans le cas des synthèses de molécules complexes qui impliquent la mise en œuvre de plusieurs étapes. Suite à l'application de cette

stratégie synthétique nous avons, en effet, obtenu de nouvelles nitrones selon les méthodes que seront décrites dans le paragraphe suivant.

### 3.4.3 Synthèses en utilisant la voie B

La **voie B** permet d'accéder aux nitrones vectorisées, au moyen d'un couplage entre la nitrone **5** (dérivée de la PPN dont la synthèse a été discutée en détail dans le chapitre 2) et un dérivé d'halogénure d'alkyle du cation TPP comportant une chaîne de 4, 6 ou 8 atomes de carbones.



**Schéma 78** : Synthèse des nouvelles structures et des intermédiaires selon la voie B

Cette voie de synthèse s'articule en trois parties :

- ✓ la synthèse de la nitrone **5** par condensation entre le 4-hydroxybenzaldéhyde et l'hydroxylamine **3**.
- ✓ la synthèse du dérivé alkyle du cation TPP à partir de la triphénylphosphine.
- ✓ la synthèse de la nitrone vectorisée, issue du couplage entre les deux intermédiaires ci-dessus.



La synthèse de la nitrone **5** étant détaillée et illustrée dans le chapitre 2, nous allons décrire dans ce qui suit les méthodes de synthèses utilisées pour l'obtention des intermédiaires TPP.

### 3.4.3.1 Synthèse des différents intermédiaires TPP

La synthèse de dérivés TPP consiste à insérer différentes chaînes alkyles halogénées sur la triphénylphosphine. Nous avons utilisé quatre chaînes alkyles différentes avec X = Iode ou Brome pour n = 3, et X = Iode pour n = 5 et 7.

Les deux premiers dérivés de TPP obtenus, ayant **X = Iode** et **n = 3** ou **5**, ont été synthétisés selon la méthode décrite dans la littérature<sup>160</sup> en faisant réagir la triphénylphosphine avec le 1,4-diiodobutane (n= 3) ou le 1,6-diiodohexane (n= 5) utilisés en excès pour servir également de solvant (Schéma 79).

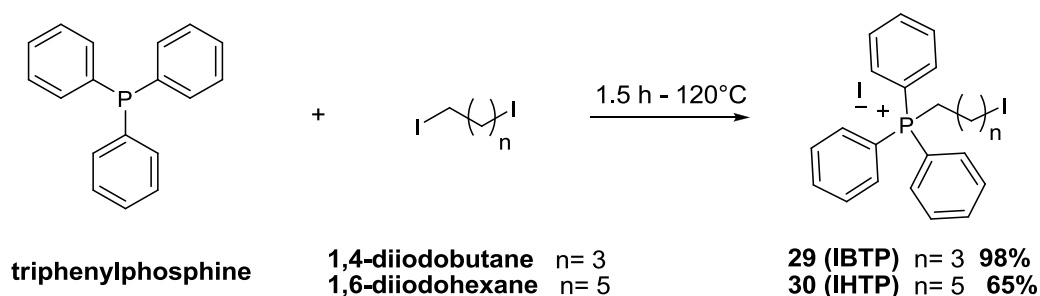


Schéma 79 : Méthode de synthèse des composés **29** et **30**

Cette méthode, simple et rapide, nous a permis d'obtenir les composés **29** et **30** avec de bons rendements.

Pour synthétiser l'intermédiaire TPP avec une chaîne de 8 atomes de carbone (**n= 7** et **X= I**), l'utilisation des mêmes conditions opératoires a donné un mélange de produits difficilement séparable, nous avons du appliquer une autre méthode afin d'obtenir le produit **34** (Schéma 80).

<sup>160</sup> Lin, T.-K.; Hughes, G.; Muratovska, A.; Blaikie, F.; Brookes, P.S.; Darley-USmar, V.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (19), 17048-17056

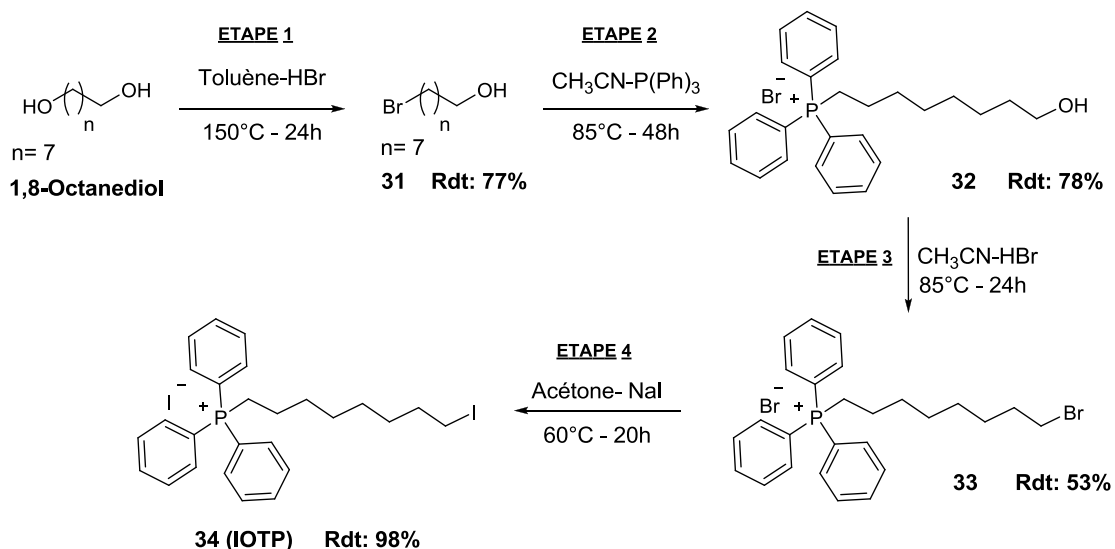


Schéma 80 : Synthèse de l'intermédiaire à 8 atomes de carbone

Dans la première étape, le produit de départ utilisé est le 1,8-octanediol qui après réaction avec du HBr dans le toluène permet de bromer une de deux fonctions hydroxyles<sup>161</sup> et d'obtenir le composé **31** avec un rendement de 77% (Schéma 80, étape 1). Ce dernier est ensuite mélangé avec la triphénylphosphine dans l'acétonitrile<sup>162</sup> pour donner le produit **32** avec un rendement de 78% (Schéma 80, étape 2).

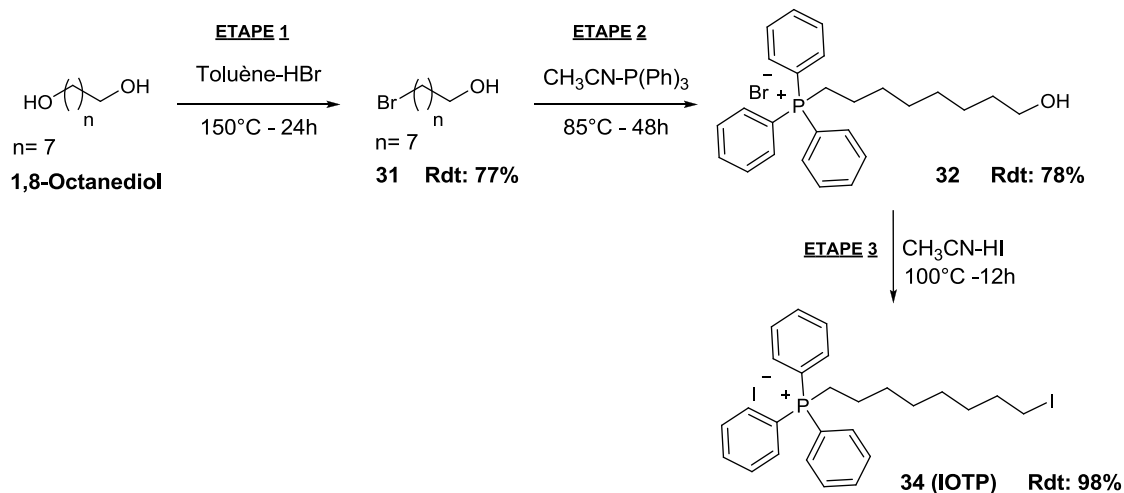
L'étape 3 correspond à la bromation de la deuxième fonction hydroxyle. Cette fois-ci la réaction est menée dans l'acétonitrile, suite au faible rendement (>5%) obtenu en utilisant le toluène comme dans l'étape 1. Ces conditions opératoires, nous ont permis d'obtenir le composé **33** avec un rendement de 53%. Dans la dernière étape, le composé **33** est mis en solution dans l'acétone en présence de NaI<sup>163</sup>, afin de convertir le dérivé bromé en dérivé iodé ; le composé **34** a été obtenu avec un rendement de 98%.

Une méthode alternative pour obtenir l'intermédiaire **34** consiste à ioder directement la fonction hydroxyle du composé **32** (Schéma 81) sans passer par l'intermédiaire bromé **33**.

<sup>161</sup> Wube, A.A.; Hufner, A.; Thomaschitz, C.; Blunder, M.; Kollroser, M.; Bauer, R.; Bucar, F. *Bioorgan. Med. Chem.* **2011**, *19*, 567-579

<sup>162</sup> Ahmed, R.; Altieri, A.; D'Souza, D.M.; Leigh, D.A.; Mullen, K.M.; Pappmeyer, M.; Slawin, A.M.Z.; Wong J.K.Y.; Woollins J.D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12304-12310

<sup>163</sup> Sheibani, E.; Warnmark, K. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2059-2067

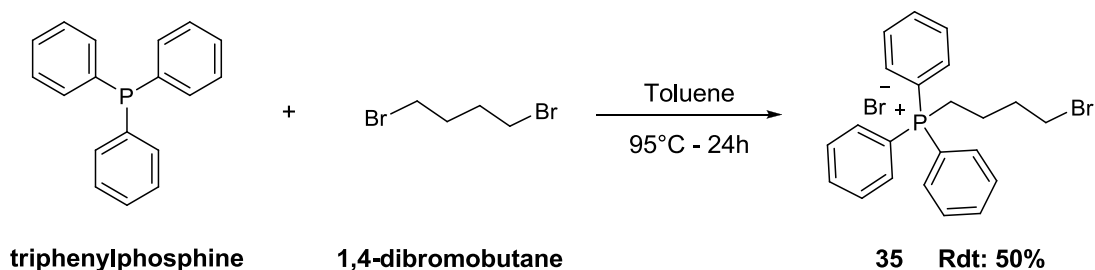


**Schéma 81** : Méthode alternative pour la synthèse du composé **34**

Cette deuxième méthode a été modifiée à partir de la littérature<sup>164</sup> et permet d'ioder une fonction OH par réaction avec HI dans l'acétonitrile.

L'application de ce mode opératoire permet d'éviter une étape de synthèse et d'obtenir le composé **34** de manière plus rapide avec un meilleur rendement, effectivement le rendement global dans ce cas est de 59% au lieu de 31% obtenu avec la méthode précédemment décrite.

Le dernier intermédiaire TPP, le bromure de (4-bromobutyl) triphénylphosphonium (BBTP), où **n = 3** et **X = brome**, a été obtenu en faisant réagir la triphénylphosphine avec le 1,4-dibromobutane dans le toluène selon la méthode décrite dans la littérature (Schéma 82)<sup>165</sup>. Cette méthode nous a permis d'obtenir le composé **35** avec un rendement de 50%.



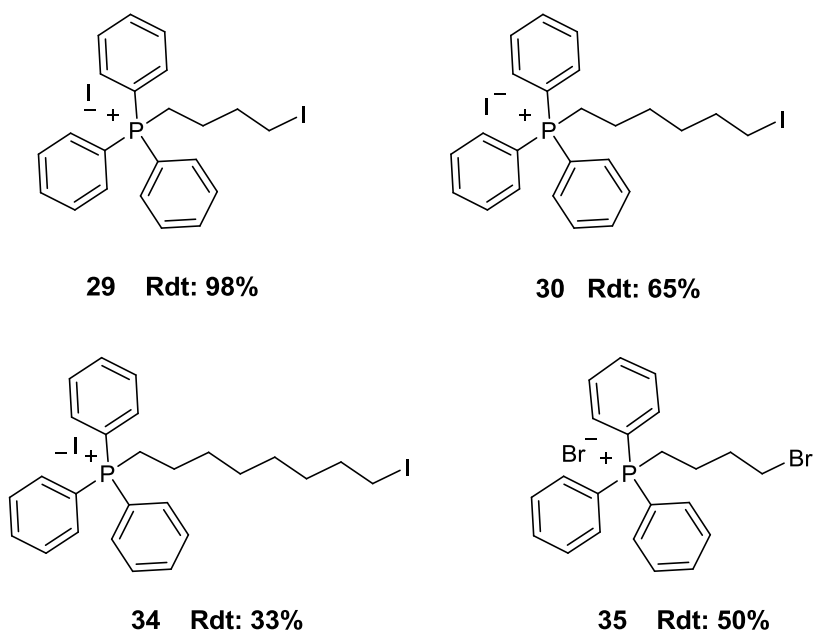
**Schéma 82** : synthèse de l'intermédiaire **35**

<sup>164</sup> Klein, S.M. ; Zhang, C. ; Jiang Y.L. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 2638-2641

<sup>165</sup> Chen, X.; Khairallah, G. N; O'Hair, R.A.J.; Williams, S. J. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 2750-2753

Le composé **35**, possédant la chaîne de 4 atomes de carbones et précédemment décrit dans la littérature<sup>165</sup>, nous servira à étudier et comparer la différence de réactivité entre les dérivés bromé et iodé afin de mettre au point notre méthode de synthèse pour réaliser le couplage avec la nitrone **5**.

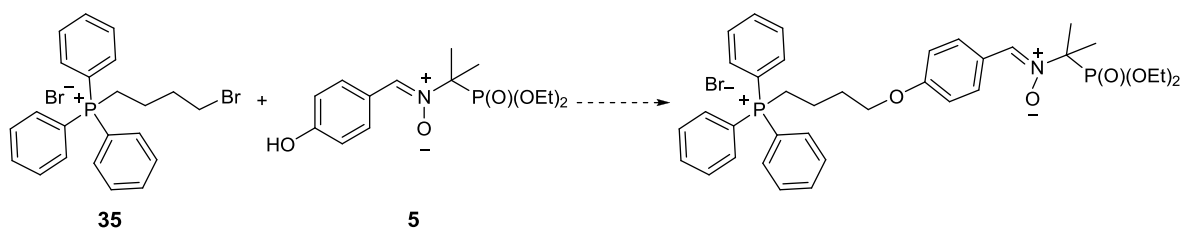
En conclusion, nous avons synthétisé quatre intermédiaires contenant le cation TPP, dont deux structures déjà décrites dans la littérature (**29** et **35**) et deux nouveaux produits (**30** et **34**).



**Figure 23** : Récapitulatif de quatre intermédiaires TPP synthétisés

### 3.4.3.2 Synthèse de nouvelles nitrones vectorisées à longueurs de chaînes variables

Les premiers essais de couplage de la chaîne alkyle-TPP avec la nitrone **5** (Schéma 83) ont été effectués en utilisant le composé **35** afin de reproduire les conditions décrites pour la synthèse de la nitrone MitoSpin<sup>153</sup>.



**Schéma 83** : Schéma de synthèse pour le produit attendu en utilisant le composé **35**

Le composé **35** est mis en solution avec la nitrone **5** en présence de carbonate de césium à 100°C durant 12 heures. L'application de cette méthode, dans notre cas, n'a pas permis d'obtenir le composé attendu (Table 19, entrée 1).

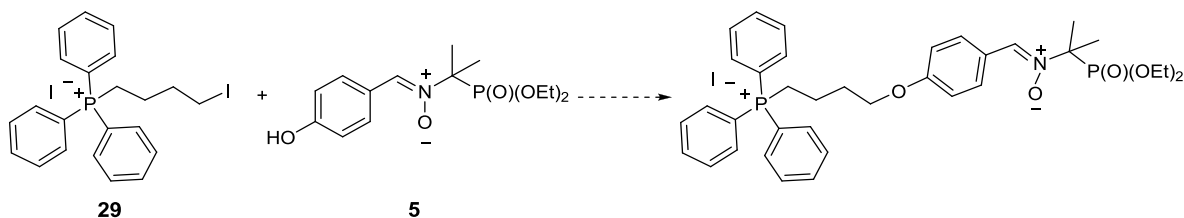
Lors du deuxième essai, nous avons appliqué les conditions décrites par Murphy *et al.*<sup>152</sup>, en faisant réagir les deux réactifs dans du DMF en présence de NaH. Malheureusement, nous n'avons pu isoler le produit souhaité.

Dans un troisième temps, nous avons modifié le solvant et la température de réaction, ce qui nous a permis de **visualiser en RMN la présence d'un composé de couplage** (environ de 5%) parmi, majoritairement, les composés de départ n'ayant pas réagit. Cette quantité très faible de produit obtenu ne nous a pas permis de l'isoler afin de le caractériser.

**Table 19** : Table récapitulative des essais effectués avec le composé **35** (BBTP)

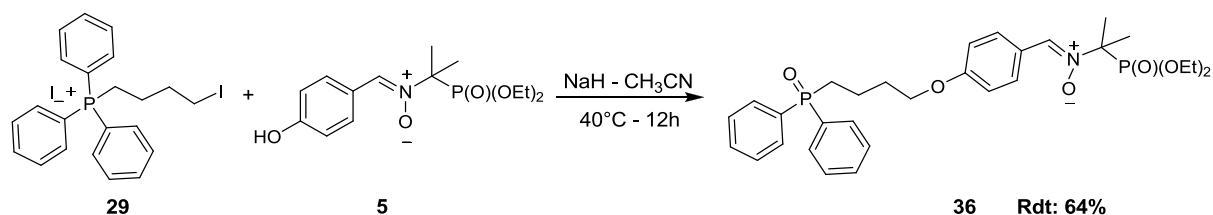
Essai	Solvant	Conditions	Temps	Rendement
<b>1</b>	MeOH	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> - Reflux	12 h	Aucune réactivité
<b>2</b>	DMF	NaH- T <sub>amb</sub>	12 h	Aucune réactivité
<b>3</b>	CH <sub>3</sub> CN	NaH- 40°C	12 h	Très faible (~5%)

Aux vues de ces résultats peu satisfaisants, nous avons décidé de substituer le BBTP (**35**) par l'IBTP (**29**) et d'appliquer les conditions opératoires de l'essai 3 (Schéma 84). La présence de l'atome d'iode dans le composé **29**, à la place du brome, devrait favoriser la réactivité de ce dérivé.



**Schéma 84** Schéma de synthèse pour le produit attendu en utilisant le composé **29**

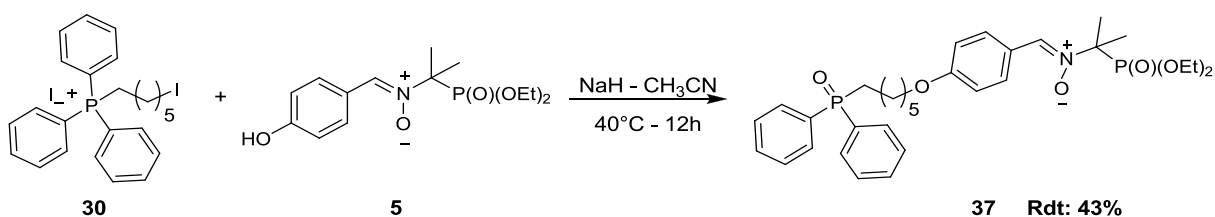
Effectivement, la réaction entre le composé **29** (IBTP) et la nitrone **5** dans l'acétonitrile en présence de NaH, pendant 12 heures à 40°C, conduit à la formation d'un composé de couplage **36** avec un rendement de 64 % (Schéma 85).



**Schéma 85** : Méthode de synthèse qui a permis l'obtention du composé **36**

D'après l'analyse RMN, cette structure est identique au composé de couplage de l'essai 3 décrit précédemment (Table 19, entrée 3) et correspond, en fait, à la forme oxydée (forme  $\text{POPh}_2$ ) du produit souhaité. L'analyse en HRMS confirme que le groupement TPP a subi une oxydation en diphénylphosphoryle ( $\text{POPh}_2$ ).

Nous montrons les résultats des analyses HRMS et RMN (Figure 24) obtenus pour le composé **37** synthétisé en parallèle avec la méthode décrite ci-dessus, en utilisant le réactif **30** comportant un bras espaceur comportant 6 méthylènes (Schéma 86).



**Schéma 86** : Synthèse du composé **37**

L'analyse HRMS du composé **37** n'a pas permis de détecter le cation recherché (contenant le groupement  $^+\text{PPh}_3$ ) avec une masse attendue de 661.3 Da. Cependant, le spectre de masse obtenu présente deux signaux diagnostiques de la présence d'un composé neutre de masse molaire ( $M'$ ) 599.3 Da: i) l'ion pseudo-moléculaire,  $[\text{M}'+\text{H}]^+$ , à  $m/z$  600.3 et ii) l'adduit sodium,  $[\text{M}'+\text{Na}]^+$ , à  $m/z$  622.3. La différence de 61 unités entre la masse recherchée et la masse obtenue, nous fait penser à la perte d'un phényle ( $M=77$ ) au niveau du phosphore et à son remplacement par un atome d'oxygène ( $M=16$ ) suite à l'oxydation.

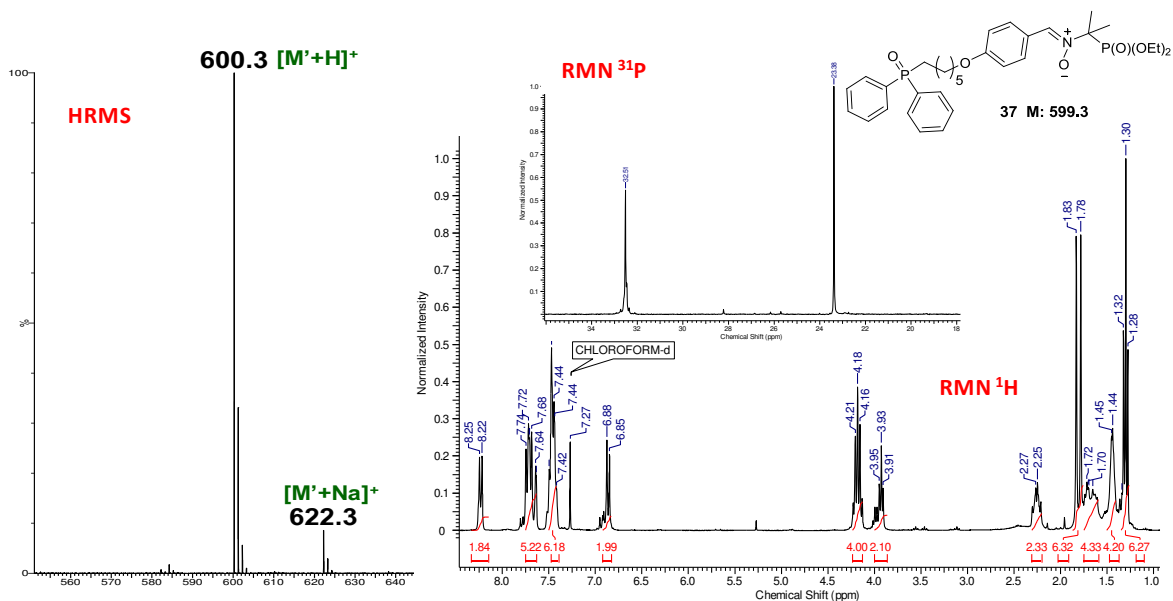


Figure 24 : Spectres HRMS et RMN du composé 37

Nos observations sont confirmées également par la RMN (Figure 25). Au niveau du spectre RMN du proton, le signal du **méthylène** lié au groupement diphenylphosphoryle est blindé par rapport au signal du méthylène lié à un groupement triphenylphosphine. On constate que la structure géométrique du groupement  $\text{POPh}_2$  engendre un déplacement chimique caractéristique des protons méthyléniques à 2.26 ppm au lieu de rester aux alentours de 3.5 ppm, valeur typique du méthylène lié à un groupement  $^+\text{PPh}_3$ .

On peut également appliquer cette observation au niveau de la RMN du phosphore où le signal de ce dernier apparait à 32.51 ppm au lieu de 24 ppm.

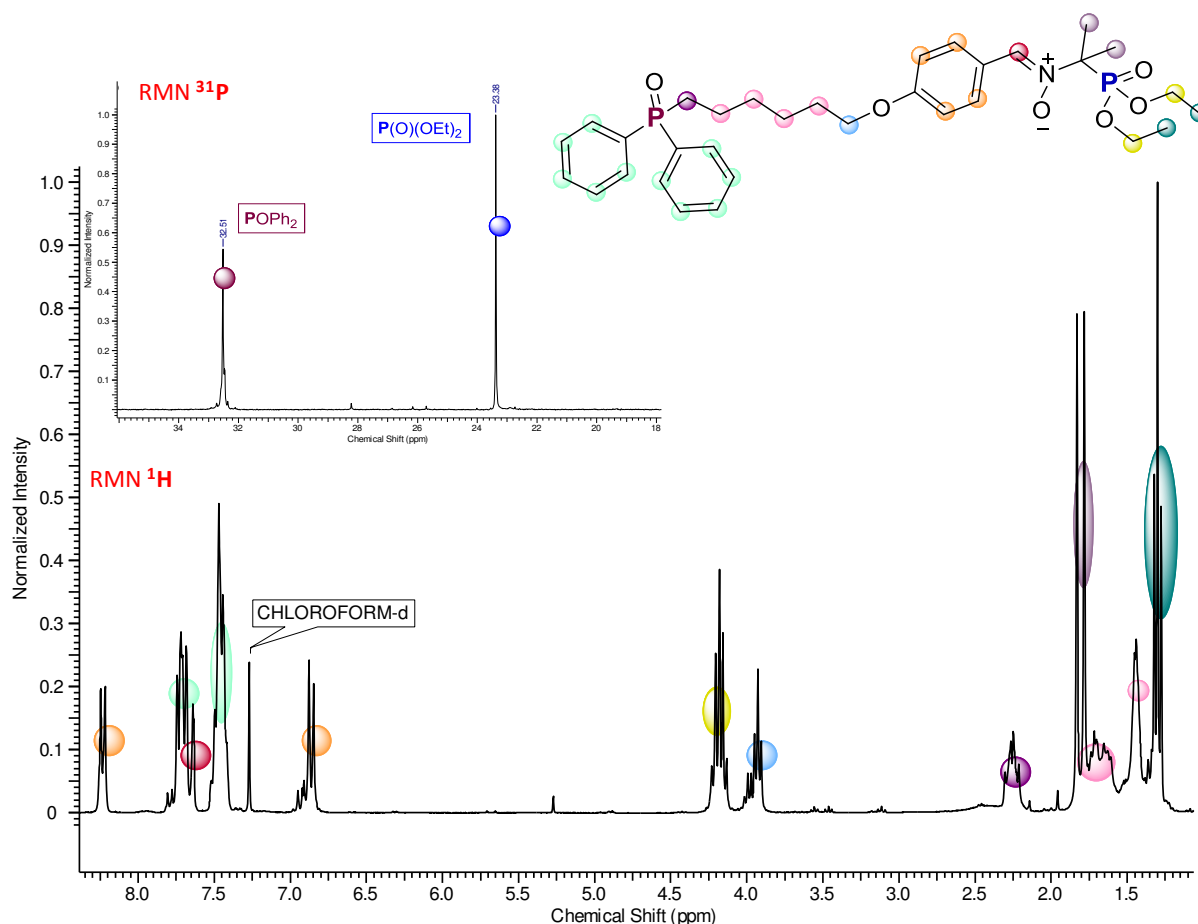


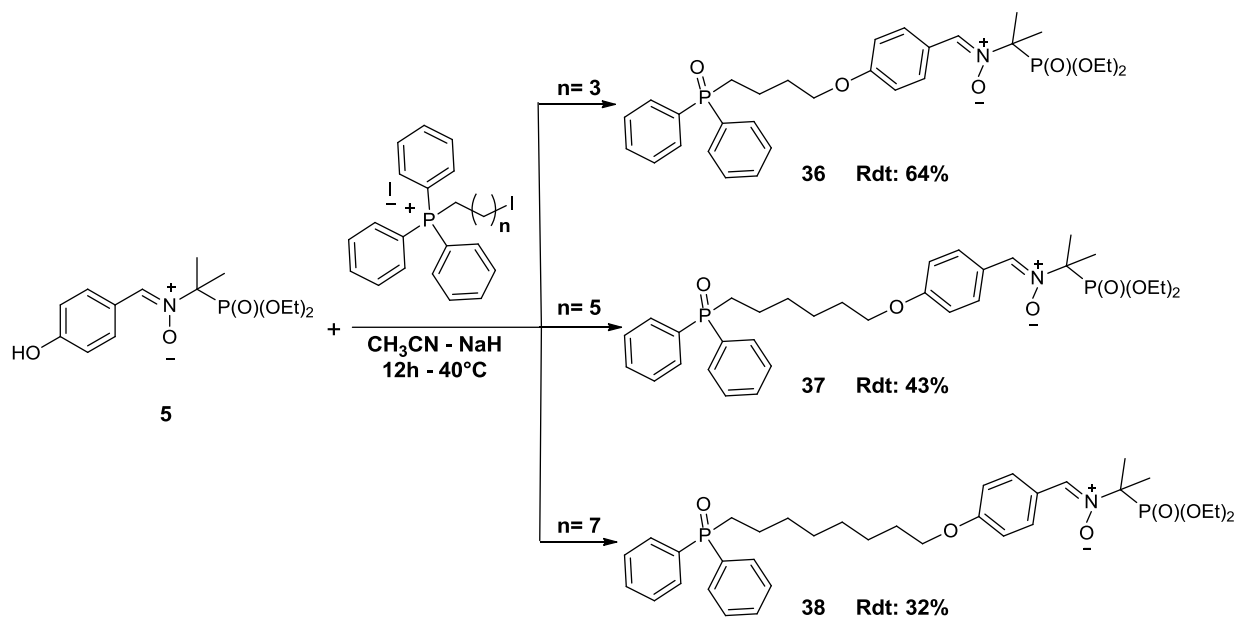
Figure 25 : Spectre RMN et attributions pour le composé **37**

D'après la bibliographie<sup>166</sup>, il est décrit qu'en présence d'une base forte et dans un solvant polaire aprotique, le triphénylphosphonium ( $^+\text{PPh}_3$ ) est oxydé à diphénylphosphoryle ( $\text{POPh}_2$ ). Les conditions que nous avons appliquées, avec l'utilisation de NaH dans l'acétonitrile, ont permis cette oxydation en donnant comme produits finaux des composés possédant le groupement  $\text{POPh}_2$ .

Cette nouvelle série des composés contenant le groupement  $\text{POPh}_2$  a été complétée par la synthèse du produit **38** possédant un bras espaceur de 8 méthylènes (Schéma 87). Nous avons donc réussi à obtenir trois nouveaux composés pouvant servir de contrôle négatif lors des essais de ciblage mitochondriaux.

<sup>166</sup> Ngwendson, J.N. ; Schultze, C.M. ; Bollinger, J.W.; Banerjee, A.; *Can. J. Chem.* **2008**, 86, 668-675





**Schéma 87** : Schéma récapitulatif des trois nouvelles nitrones contenant le groupement diphénylphosphoryle

Ces trois nouveaux produits vont nous permettre d'effectuer une comparaison avec leurs analogues contenant le groupement triphénylphosphonium (<sup>+</sup>PPh<sub>3</sub>). Effectivement, les structures contenant <sup>+</sup>PPh<sub>3</sub> sont connues pour leurs aptitudes à pénétrer la mitochondrie à l'inverse des composés contenant le groupement diphénylphosphoryle (POPh<sub>2</sub>). En effet, ces derniers ne possédant pas de cation, ne seront pas absorbés par la membrane mitochondriale.

Nous avons donc poursuivi par la synthèse d'analogues originaux des composés **36**, **37**, **38**, contenant cette fois ci le motif <sup>+</sup>PPh<sub>3</sub> pouvant cibler la mitochondrie.

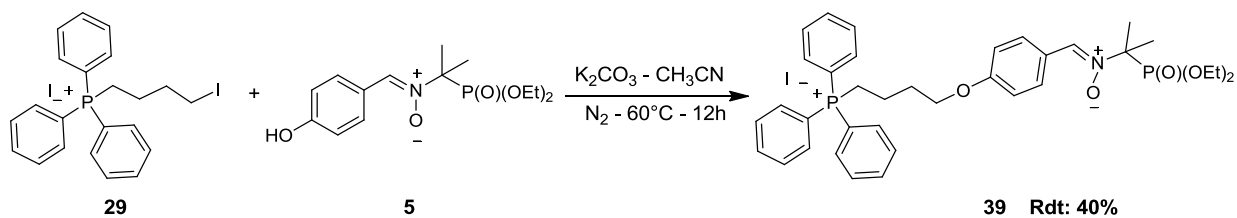
Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur la substitution de l'acétonitrile par un solvant apolaire afin d'éviter l'oxydation du groupement triphénylphosphonium. Lors du premier essai, nous faisons réagir le composé **29** et la nitronne **5** dans le DCM en présence de NaH. Afin d'éviter toutes sources d'oxygène qui puissent donner lieu à l'oxydation du groupement TPP, la réaction est effectuée sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) et en présence de tamis moléculaire 4 Å. En utilisant ces conditions à température ambiante nous n'avons observé aucune réactivité et seuls les réactifs de départ ont été récupérés. La même réaction, effectuée à une température de 40°C (Table 20, entrée 1), donne une faible quantité (avoisnant les 10%) de produit de couplage observable par analyse RMN, que nous n'avons pas réussi à isoler (Table 20, entrée 2).

**Table 20** : Table récapitulative des essais effectués avec le composé **39** (IBTP)

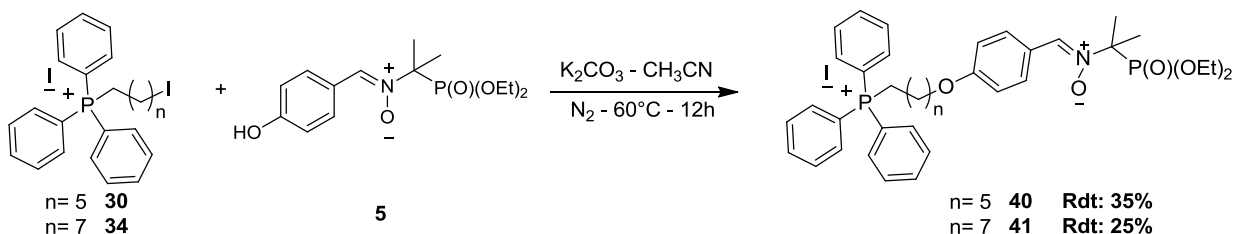
Essai	Solvant	Conditions	Temps	Rendement
<b>1</b>	DCM	NaH - T <sub>amb</sub> - N <sub>2</sub>	12 h	Aucune réactivité
<b>2</b>	DCM	NaH - 40°C - N <sub>2</sub>	12 h	Très faible (>15%)
<b>3</b>	CH <sub>3</sub> CN	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> - 60°C - N <sub>2</sub>	12 h	<b>40%</b>

Aux vues de la faible réactivité observée dans le DCM, nous avons décidé de revenir à l'acétonitrile en utilisant comme base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> au lieu de NaH (Table 20, entrée 2). La réaction effectuée avec ces réactifs, à 60°C et sous atmosphère inerte, a permis l'obtention du composé **39** avec un rendement de 40% (Schéma 88).

Les analyses RMN et HRMS confirment la présence du nouveau composé **39** avec un bras espaceur de 4 méthylènes.

**Schéma 88**: Synthèse du composé **39**

Nous avons donc appliqué ces conditions à la synthèse des analogues comportant comme bras espaceur 6 et 8 méthylènes, ce qui nous a permis d'obtenir les deux nouveaux composés **40** et **41** respectivement (Schéma 89).

**Schéma 89**: Synthèse des composés **40** et **41**

Nous montrons ci-dessous les résultats des analyses HRMS et RMN pour le composé **40** comportant un bras espaceur de 6 méthylènes

Le Spectre de Masse Haute Résolution (Figure 26) du composé **40** confirme bien la présence du pic moléculaire ciblé à  $m/z$  660.3004 [ $M^+$ ] qui correspond à la masse du cation recherché, à l'exclusion de son contre-ion  $I^-$ .

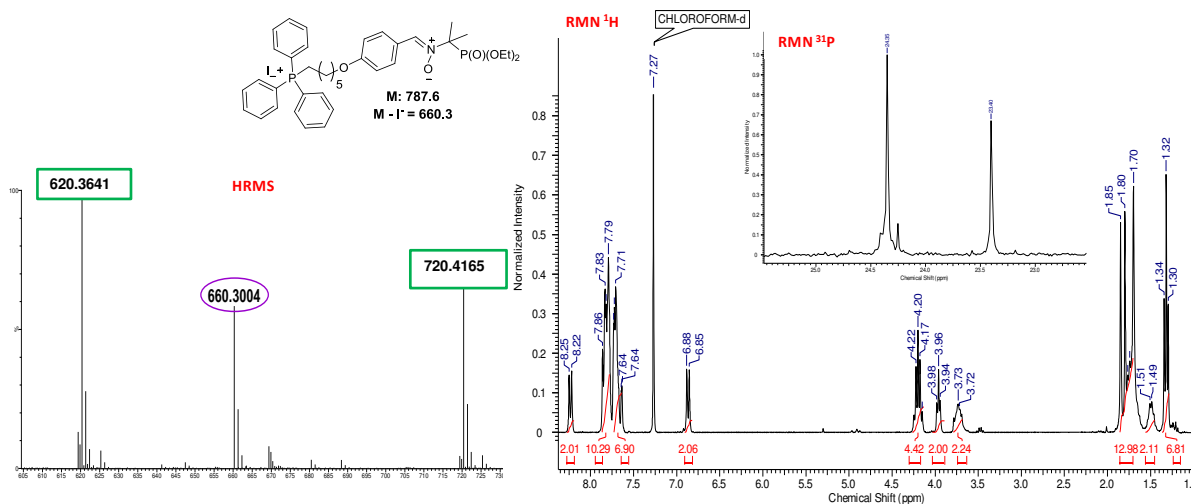


Figure 26 : Spectres HRMS et RMN du composé **40**

L'analyse RMN de ce composé confirme également sa structure (Figure 27). La RMN du proton montre que le multiplet caractéristique du méthylène lié au phosphore sort à 3.72 ppm, ce qui prouve la présence du cation triphénylphosphonium (<sup>+</sup>PPh<sub>3</sub>). Au niveau du spectre du phosphore, on peut observer la présence du pic à 24.35 ppm caractéristique des sels quaternaires de phosphonium, liés à des groupements alkyles.

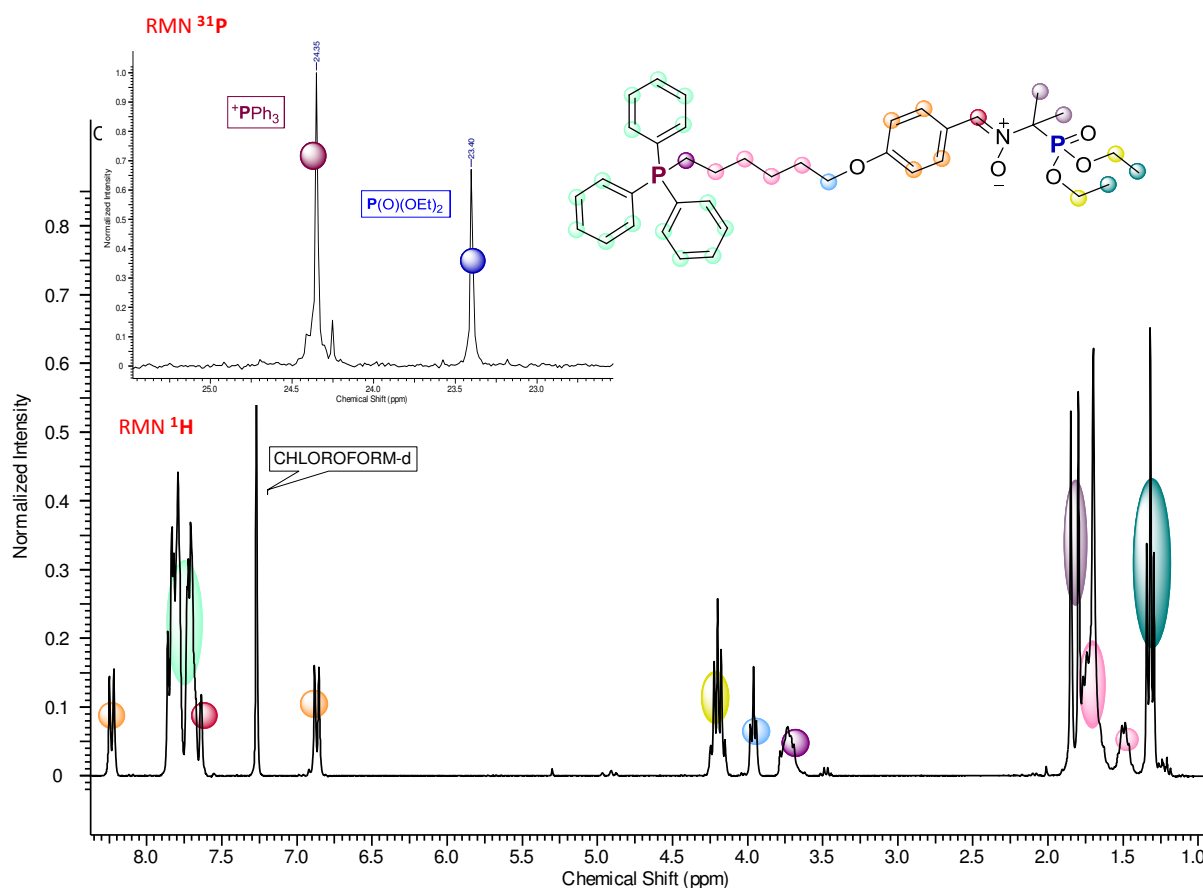
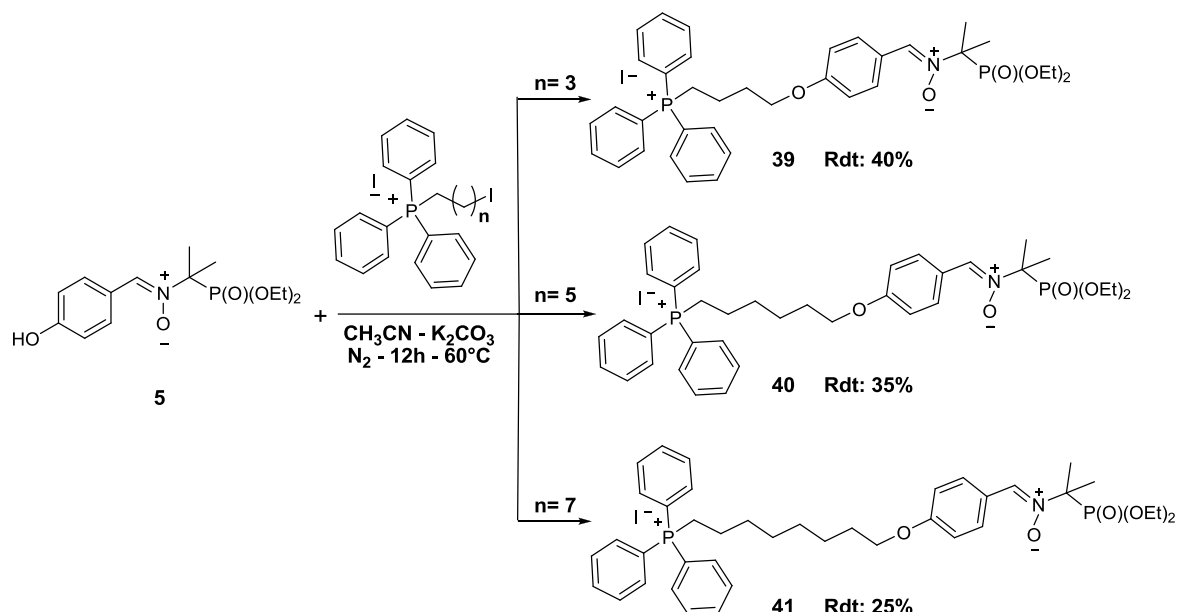


Figure 27 : Spectre RMN et attributions pour le composé 40

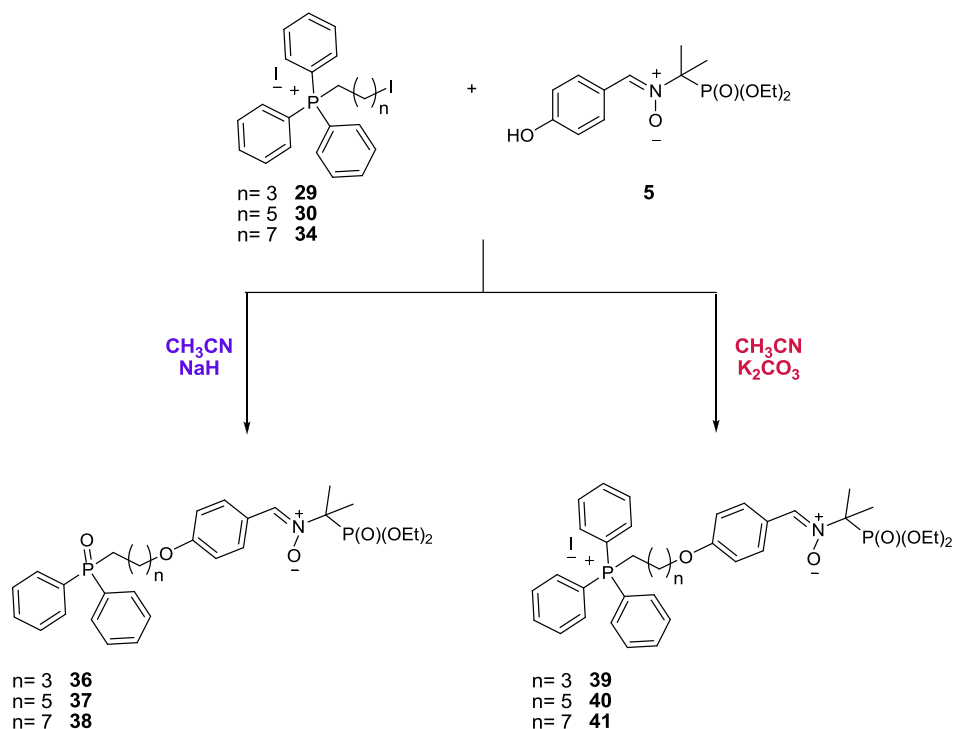
De ces observations, nous pouvons conclure que la méthode de synthèse mise en place dans l'acétonitrile, sous atmosphère inerte et en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  comme base, permet le couplage de la nitrone 5 avec les trois intermédiaires TPP (33, 33 et 34) ayant des chaînes de différentes longueurs. Nous avons ainsi obtenu trois nouvelles nitrones 39, 40 et 41 pouvant cibler la mitochondrie avec des rendements de 40, 35, 25% respectivement (Schéma 90).



**Schéma 90 :** Schéma récapitulatif des trois nouvelles nitrones synthétisées pour cibler la mitochondrie

Ces trois composés avec des bras espaceurs de différentes longueurs devraient montrer un comportement différent. Comme déjà discuté (§ 3.2.1.1), la longueur du linker influe non seulement sur la capacité de la molécule à pénétrer la mitochondrie mais aussi sur la position que prendra cette dernière au sein de l'organelle. Selon le compartiment de la mitochondrie où le composé se positionne, on pourra évidemment observer une activité plus ou moins efficace.

En conclusion, nous avons synthétisé six nouveaux composés originaux que l'on peut classer en deux séries de nitrones : une série incluant les trois nitrones ciblant la mitochondrie (**39**, **40** et **41**) et une série composée des analogues correspondants (**36**, **37** et **38**) dont le groupement  $\text{PPh}_3$  a subi une oxydation en  $\text{POPh}_2$ .



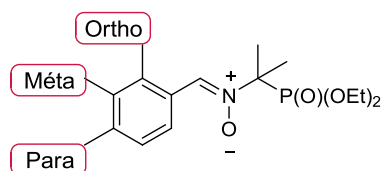
**Schéma 91** : Synthèse de deux séries originales de composés (série  $\text{POPh}_2$  et série  $\text{PPh}_3$ ) à longueur variable du bras espaceur

Les trois nitrones **39**, **40** et **41** seront évaluées pour leur capacité à cibler la mitochondrie et piéger les radicaux libres à l'intérieur de cet organite. Elles pourront ainsi être comparées à leurs analogues respectifs contenant le groupement  $\text{POPh}_2$ .

### 3.4.3.3 Synthèse de nouvelles nitrones vectorisées en position méta

Suite à l'obtention des ces composés comportant des bras espaceur de trois différentes longueurs, il nous a semblé également intéressant de jouer sur la position d'insertion du vecteur  $^+\text{PPh}_3$  sur la nitronne.

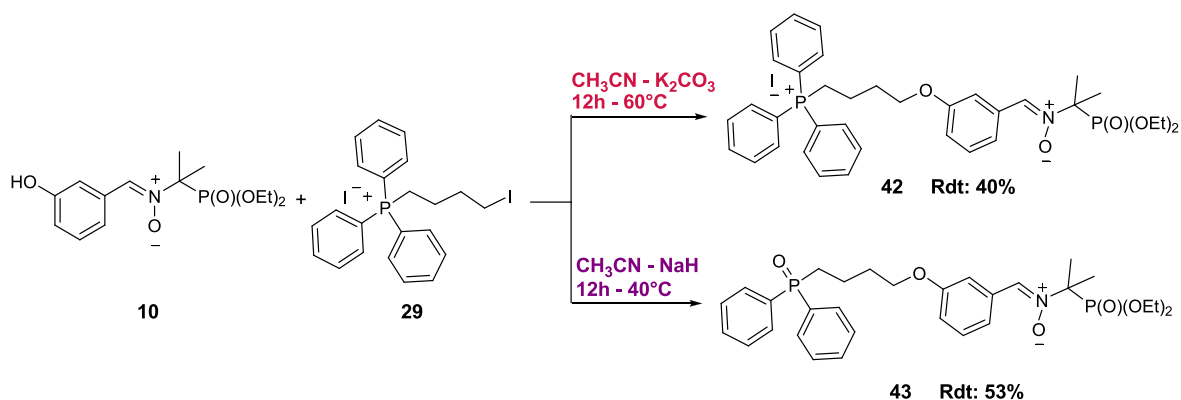
En effet, on s'attend à ce que la variation de l'orientation de la chaîne sur le cycle aromatique de la nitronne entraîne des effets différents sur la capacité à pénétrer la mitochondrie ou encore lors de l'étude RPE. Effectivement, les effets électroniques qui se produisent sur un cycle aromatique peuvent être différents selon la position des substituants et peuvent conduire, par exemple, à des adduits plus ou moins stables lors du piégeage de radicaux.



**Figure 28** : positions possibles pour l'insertion du vecteur

En estimant que l'orientation *ortho* génère une gêne stérique non-négligeable, qui peut empêcher le piégeage des radicaux libres, nous avons décidé d'insérer le vecteur TPP en position *méta*. Pour cette raison la nitrone de choix pour la synthèse du nouveau produit a été le composé **10** (décrit dans le chapitre 2) qui présente un groupement hydroxyle en position *méta*.

Nous avons synthétisé deux nouveaux composés : la nitrone vectorisée avec le cation triphénylphosphonium (composé **42**, Schéma 92) et son analogue contenant le groupement diphenylphosphoryle (composé **43**, Schéma 92).



**Schéma 92** : Synthèse de la nitrone avec l'orientation *méta* du cation TPP et de son analogue oxydé.

Les méthodes de synthèse utilisées pour ces deux nouvelles nitrones sont celles qui ont permis l'obtention des nitrones vectorisables précédemment décrites. Le composé **42** a été obtenu selon la méthode qui utilise  $K_2CO_3$  afin de favoriser le couplage entre la nitrone **10** et l'intermédiaire TPP **29**. Pour la synthèse du composé **43** on a utilisé la base plus forte NaH qui conduit à son analogue contenant un groupement  $POPh_2$ .

**Conclusion du chapitre**

Les travaux de recherche proposés dans la cadre de ce chapitre ont été axés sur le développement de nouveaux **dérivés vectorisés de la PPN pour le ciblage mitochondrial**.

Nous avons synthétisé **deux séries** de nouvelles nitrones. La première série (composés **39, 40, 41, 42**) inclut des nitrones vectorisées avec le **cation triphénylphosphonium** (**<sup>+</sup>PPH<sub>3</sub>**) connu pour son aptitude à cibler la mitochondrie et y délivrer les composés auxquels il est greffé. La deuxième série (composés **36, 37, 38, 43**) est constituée des analogues respectifs contenant un **groupement diphenylphosphoryle**, qui devrait empêcher la pénétration dans la mitochondrie.

Chaque série est formée de 4 composés qui diffèrent soit par la **longueur du bras espaceur** (chaînes alkyles de 4, 6 ou 8 méthylènes) soit par l'**orientation** (*para* ou *méta*) du vecteur sur la portion aromatique de la nitrone (Schéma 93).

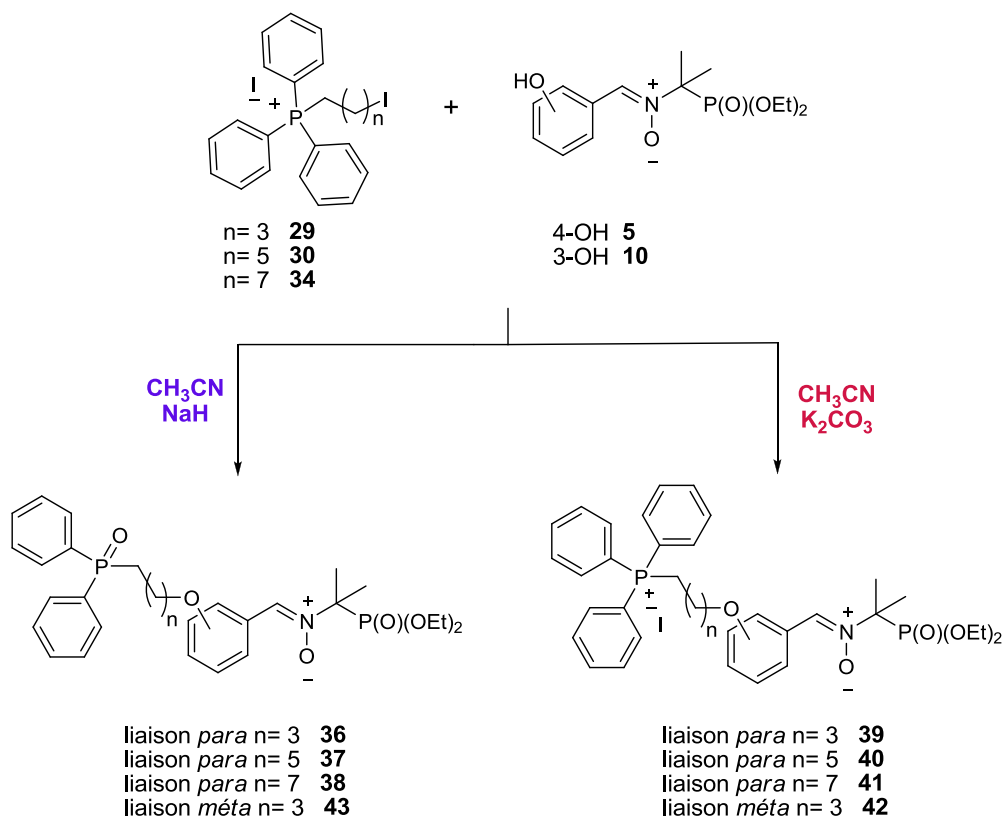


Schéma 93

Les deux séries ont été obtenues à partir des mêmes réactifs de départ. La réaction est un couplage entre une nitrone (**5** ou **10**) et un dérivé du cation TPP (**29, 30, 34**) en



présence d'une base. Cette dernière est l'élément qui permet l'obtention de l'une ou de l'autre forme du cation TPP ( $^+\text{PPh}_3$  ou  $\text{POPh}_2$ ): la base forte NaH favorise une oxydation du cation triphénylphosphonium en donnant la forme  $\text{POPh}_2$ , la base  $\text{K}_2\text{CO}_3$  plus faible, préserve la forme cationique  $^+\text{PPh}_3$ .

La synthèse des ces **8 nouveaux composés** nécessite l'obtention d'intermédiaires tels que les nitrones **5** ou **10**, dont la synthèse est détaillée dans le chapitre 2 de ce document, ainsi que les dérivés alkylés du cation  $^+\text{PPh}_3$  **29, 30, 34** obtenus selon les méthodes décrites ci-dessus.

L'intérêt d'utiliser des nitrones ciblant la mitochondrie (**39, 40, 41, 42**) sera leur possible utilisation dans la détection d'espèces radicalaires directement au niveau de la source, la plus importante de production des radicaux libres. Ceci pourra permettre l'étude de mécanismes radicalaires concernant la mitochondrie dans des situations physiologiques ou pathologiques.

Nous utiliserons ainsi les 4 analogues contenant le groupement  $\text{POPh}_2$  (**36, 37, 38, 43**) ne ciblant pas la mitochondrie comme contrôle négatif.



# CHAPITRE 4

## **Caractérisation RPE des adduits nitroxydes par la technique de spin-trapping**



### **Introduction**

Comme il a été largement discuté dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, les nitrones sont des composés capables de réagir avec les espèces radicalaires instables pour former des adduits nitroxyde plus stables. Cette technique du spin-trapping couplée à la détection par RPE des adduits formés permet, dans les cas favorables, d'obtenir des informations sur le radical piégé.

Le spin-trapping est de plus en plus exploité pour détecter et caractériser les espèces radicalaires produites dans des systèmes *in vivo* afin d'évaluer leurs implications dans différentes pathologies telles que l'athérosclérose, l'hypertension, les maladies neurodégénératives, les pathologies liées à l'âge etc..

Afin d'établir une base de données des paramètres de RPE (couplages hyperfins, facteur de Landé  $g$ ) d'adduits d'intérêt biologique sur nos PPNs, nous avons réalisé une étude préliminaire *in vitro* dans laquelle les radicaux primaires sont produits par des systèmes chimiques ou enzymatiques connus. Les radicaux concernés sont centrés sur le carbone, l'oxygène, l'azote ou le soufre.

Par la suite nous discuterons des résultats obtenus avec nos trois classes de PPNs: les nitrones antioxydantes, les nitrones à effet électronique ( $-I/+I$ ,  $-M/+M$ ) ainsi que les nitrones vectorisées pour la mitochondrie.

## 4.1 Production *in vitro* des adduits

Dans la littérature<sup>53a</sup> sont répertoriées plusieurs méthodes de production de radicaux libres  $R^\bullet$  *in vitro* destinées à fournir des adduits de piégeage caractéristiques en présence des nitrones.

Dans ces méthodes, la réaction mise en jeu est soit un piégeage proprement dit (addition de  $R^\bullet$  sur la double liaison C=N), soit l'addition d'un nucléophile sur le carbone électrophile de la nitronne, sous l'action d'un sel métallique.

L'addition de  $R^\bullet$  sur la liaison C=N de la nitronne permet la formation directe de l'adduit nitroxyde (Schéma 94a), tandis que l'addition nucléophile conduit à l'hydroxylamine qui est ensuite oxydée en nitroxyde par l'oxygène de l'air (Schéma 94b).

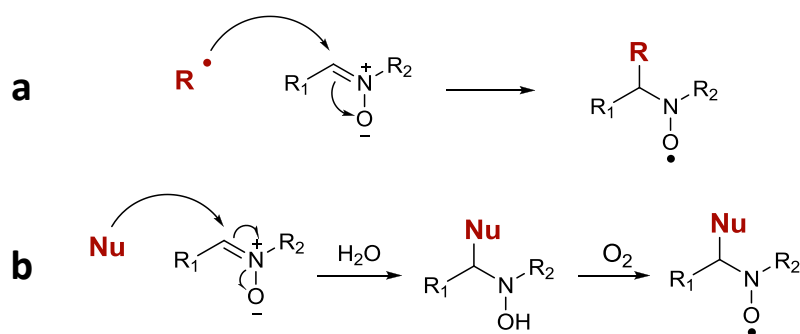
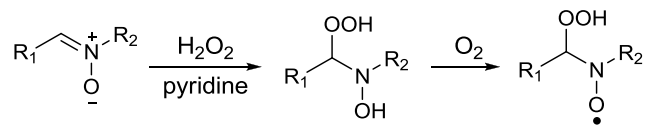
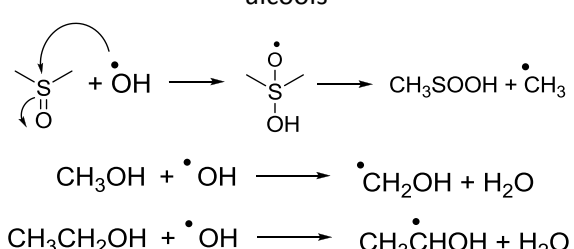
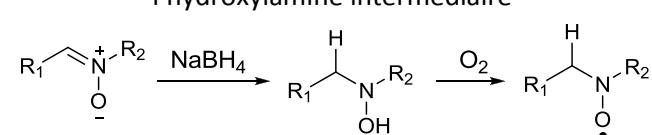


Schéma 94

Nous avons utilisé les deux systèmes selon les nécessités et le type d'adduit souhaité. La Table 21 résume les différentes méthodes pour générer les adduits.

Table 21: Méthodes des générations des adduits PPNs-R

Radical	Adduit	Source et mécanisme
Radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$	PPNs -OH	Réaction de Fenton en milieux aqueux $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \bullet\text{OH} + \text{Fe}^{2+} + \text{OH}^-$
		Photolyse de $\text{H}_2\text{O}_2$ 1% $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{h\nu} 2 \text{HO}\bullet$
Radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$	PPNs -OOH	Xanthine oxydase en présence d'hypoxanthine 

Radical hydroperoxyde $\cdot\text{OOH}$	PPNs -OOH	Addition nucleophile de $\text{H}_2\text{O}_2$ 3% en pyridine et oxydation de l'hydroxylamine intermédiaire 
		Photolyse UV de $\text{H}_2\text{O}_2$ à 30% $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightleftharpoons{h\nu} 2 \text{HO}\cdot \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}_2} \text{H}_2\text{O} + \text{HO}\cdot$
Radicaux centrés sur le carbone $\cdot\text{R}$	PPNs -R	Le radical hydroxyle généré par Fenton réagit avec le DMSO ou arrache l'atome d'hydrogène dans des alcools 
Radical formiate $\cdot\text{COO}$	PPNs -COOH	Le radical hydroxyle généré par Fenton arrache l'atome d'hydrogène sur l'ion formiate $\text{HCO}_2^- \text{Na}^+ + \cdot\text{OH} \longrightarrow \text{CO}_2\cdot^- + \text{Na}^+ + \text{H}_2\text{O}$
Radical $\text{H}\cdot$	PPNs -H	Réduction de la nitroxe avec $\text{NaBH}_4$ et oxydation de l'hydroxylamine intermédiaire 
Radical azide $\cdot\text{N}_3$	PPNs - $\text{N}_3$	Le radical hydroxyle généré par Fenton réagit avec l'azoture de sodium $^-\text{Na} \text{N}_3 + \cdot\text{OH} \longrightarrow \cdot\text{N}_3 + \text{Na}^+ + \text{HO}^-$
Radical sulfite $\text{SO}_3\cdot^-$	PPNs - $\text{SO}_3$	$\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ou $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
Radicaux alcoyle $\cdot\text{OR}$	PPNs -OR	Par réaction du tétra-acétate de plomb sur un alcool $\text{ROH} \xrightarrow{\text{Pb}(\text{OAc})_4} \text{RO}\cdot$

Nous avons ensuite, caractérisé les spectres RPE par leur facteur de Landé  $g$  et par les constantes de couplages hyperfins dues à l'interaction de l'électron célibataire avec les noyaux ayant un spin nucléaire  $I$  non nul. Chaque interaction avec  $I$  produit  $2I+1$  raies comme discuté en détail dans l'Annexe 1 de ce manuscrit.

Dans les adduits de type PPNs-R, les trois raies de base dues à l'interaction hyperfine de l'électron avec le noyau  $^{14}\text{N}$  ( $I_{14\text{-N}} = 1$ ) deviennent ainsi 12 raies à cause des

couplages hyperfins dus aux noyaux en position  $\beta$ , c'est-à-dire  $^1\text{H}$  ( $I_{1-\text{H}} = \frac{1}{2}$ ) et  $^{31}\text{P}$  ( $I_{31-\text{P}} = \frac{1}{2}$ ).

Dans l'interprétation des spectres RPE, il faut tenir compte que les constantes de couplage hyperfin sont influencées par plusieurs facteurs. Les variations de la constante de couplage  $a_{\text{N}}$  peuvent être expliquées si on considère la distribution de la densité de spin entre les atomes N et O de l'adduit nitroxyde, et en particulier la forme mésomère polaire (Schéma 26 ; Chapitre 1) où l'électron célibataire se trouve sur l'azote. En effet, la constante de couplage  $a_{\text{N}}$  est plus grande lorsque la densité de spin augmente sur l'azote quand la forme limite polaire est favorisée. Evidemment les solvants utilisés ont un rôle important dans la variation de cette constante : un solvant polaire contribue à déplacer l'équilibre mésomère vers la forme polaire ce qui produit une augmentation de  $a_{\text{N}}$ .

Les autres paramètres influençant la constante de couplage  $a_{\text{N}}$  sont la nature du radical piégé et, dans le cas de nitrone de type PBN, le caractère du substituant aromatique.

La constante de couplage hyperfine reflète les propriétés électroniques des radicaux piégés, et elle est dépendante de leur électronégativité : les radicaux les plus électronégatifs attirent les électrons et génèrent une diminution de la densité de spin sur l'azote, ce qui entraîne une diminution de la valeur de  $a_{\text{N}}$ <sup>167</sup>. Au contraire, la constante de couplage sera plus élevée pour les radicaux possédant une électronégativité plus faible ce qui permet une augmentation de la densité électronique sur N. Pour ces raisons, lorsqu'on piège un radical centré sur l'oxygène on observe des valeurs de  $a_{\text{N}}$  inférieures à celles trouvées avec les radicaux centrés sur le carbone.

Pour les nitrones de type PBN on a démontré que les substituants sur le cycle aromatique peuvent influencer également la valeur de  $a_{\text{N}}$ ; celle-ci diminue en présence de groupements électroattracteurs (-I) en position *para* ou *méta*<sup>168</sup>.

Le couplage hyperfin des noyaux de spin  $\neq 0$  en position  $\beta$  à la fonction nitroxyde, dépend de la relation de Heller-McConnell détaillée dans l'Annexe 2.

<sup>167</sup> Abe, Y.; Seno, S. Y.; Sakakibara, K.; Hirota, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 897–903.

<sup>168</sup> Pan, K.; Ho, T. I. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 1007–1012.



## 4.2 Résultats du piégeage par les nouvelles PPNs hybrides

Du fait de la grande affinité des  $R^\bullet$  pour la fonction nitrone, la principale réaction est l'addition (Schéma 94a) sur le carbone en position  $\alpha$  de l'azote. S'il existe dans la structure du piège d'autres sites potentiels d'attaque radicalaire (groupements OH), celle-ci pourra avoir lieu et, si elle se produit plus rapidement que l'attaque primaire, on pourra observer des radicaux différents des adduits PPNs-R attendus. Cette propriété, attendue dans le cas des PPNs antioxydantes (cycle aromatique hydroxylé), est ainsi défavorable à l'observation des adduits « normaux » car, dans tous les cas, les radicaux de type aryloxy formés sont soit inobservables par RPE, soit ne se piègent pas à leur tour sur l'excès de nitrone.

Ces réactions secondaires n'ont cependant pas été observées lorsque le radical primaire est carboné mais, elles ont considérablement gêné l'observation des adduits de type azoté ou oxygéné pour les PPNs hydroxylées/méthoxylées.

Par la suite, nous reporterons dans des tables les paramètres de RPE (couplages, g) des adduits, classés par type de radical piégé. Ces valeurs sont tirées de la simulation des spectres expérimentaux à l'aide des logiciels WinSim et WinSim 2002 (téléchargeable sur le site du NIH à l'adresse

<http://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/tox-pharm/tools/><sup>169</sup> ou du programme développé par Rockenbauer et Korecz<sup>170</sup>.






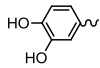


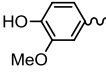
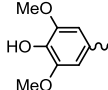




### 4.2.1 Piégeage des radicaux centré sur le carbone ( $\bullet\text{CH}_3$ , $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ , $\text{CH}_3\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ , $\bullet\text{CO}_2$ )

Comme dans le cas de la PBN et ses dérivés, toutes les nouvelles PPNs sont de bons pièges pour les différents types de radicaux centrés sur le carbone et les adduits formés sont remarquablement persistants en milieu aqueux tamponné (observables pendant plusieurs heures). Les Table 22 et Table 23 rassemblent les caractéristiques de RPE des adduits PPNs- $\text{CH}_3$ , PPNs- $\text{CH}_2\text{OH}$ , PPNs- $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$  et PPNs- $\text{COOH}$  obtenus dans un milieu tampon phosphate à pH 7,4.

<sup>169</sup> Duling, D. R. *J. Magn. Reson., B* **1994**, *104*, 105–110

<sup>170</sup> Rockenbauer, A.; Korecz, L. *Appl. Magn. Reson.* **1996**, *10*, 29–43

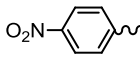
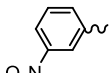

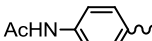
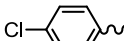
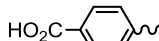
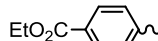





Table 22 : Paramètres de RPE des adduits carbonés des PPNs antioxydantes en milieu tampon phosphate, pH 7,4

	Ref.	 PPN (4)	 4-OH-PPN (5)	 3-OH-PPN (10)	 2-OH-PPN (11)	 2,4-OH-PPN (13)	 3,4-OH-PPN (7)	 3,5-OH-PPN (12)	 3,4,5-OH-PPN (9)	 3-OMe-4-OH-PPN (8)	 3,5-OMe-4OH-PPN (6)		
	Fenton/DMSO/tampon phosphate												
	$a_N$	1,495 <sup>a</sup>	1,506	1,490	1,505	1,518	1,502	1,483	1,500	1,502	1,494		
	$a_H$	0,348	0,329	0,361	0,436	0,411	0,346	0,375	0,367	0,348	0,367		
	$a_P$	4,673	4,665	4,664	4,774	4,731	4,662	4,674	4,672	4,647	4,625		
	% en mél.	93	74	88	85	100	91	100	100	100	100		
	Adduits secondaires	1,428	1,409	1,423	1,439	—	1,645	—	—	—	—		
		0,314	0,338	0,332	0,308	—	—	—	—	—	—		
		4,140	4,183	4,151	4,413	—	—	—	—	—	—		
		Fenton/EtOH/tampon phosphate											
		$a_N$	1,473 <sup>b</sup>	1,481	1,468	1,482	1,510	1,479	1,466	1,477	1,479	1,474	
$a_H$		0,320	0,310	0,327	0,350	0,364	0,322	0,333	0,342	0,322	0,331		
$a_P$		4,093	4,100	4,081	4,102	4,095	4,075	4,072	4,080	4,069	4,062		
% en mél.		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
	Fenton/MeOH/tampon phosphate												
	$a_N$	1,462 <sup>c</sup>	1,469	1,457	1,464	1,474	1,469	1,458	1,466	1,466	1,461		
	$a_H$	0,338	0,321	0,336	0,406	0,401	0,332	0,350	0,347	0,325	0,332		
	$a_P$	4,212	4,219	4,185	4,193	4,188	4,202	4,188	4,196	4,210	4,188		
	% en mél.	100	100	100	100	100	99	99	99	100	100		
	Fenton / (NH <sub>4</sub> )HCO <sub>2</sub> / tampon phosphate												
	$a_N$	1,451 <sup>d</sup>	1,456	1,447			1,453	1,444	1,451	1,452	1,447		
	$a_H$	0,461	0,466	0,444	n.o.	n.o.	0,454	0,427	0,447	0,458	0,445		
	$a_P$	4,997	5,067	4,972			5,043	4,952	5,003	5,081	5,093		
	% en mél.	100	97	100			75	100	95	100	100		
Adduits secondaires	—	1,639	—			1,658	—	1,560	—	—			

n.o.=non observé

<sup>a</sup> :  $a_N=1,50$   $a_H=0,36$   $a_P=4,69$ ; <sup>b</sup> :  $a_N=1,48$   $a_H=0,31$   $a_P=4,12$ ; <sup>c</sup> :  $a_N=1,47$   $a_H=0,34$   $a_P=4,23$ ; <sup>d</sup> :  $a_N=1,45$   $a_H=0,46$   $a_P=5,02$  d'après Tuccio et al.<sup>85b</sup>

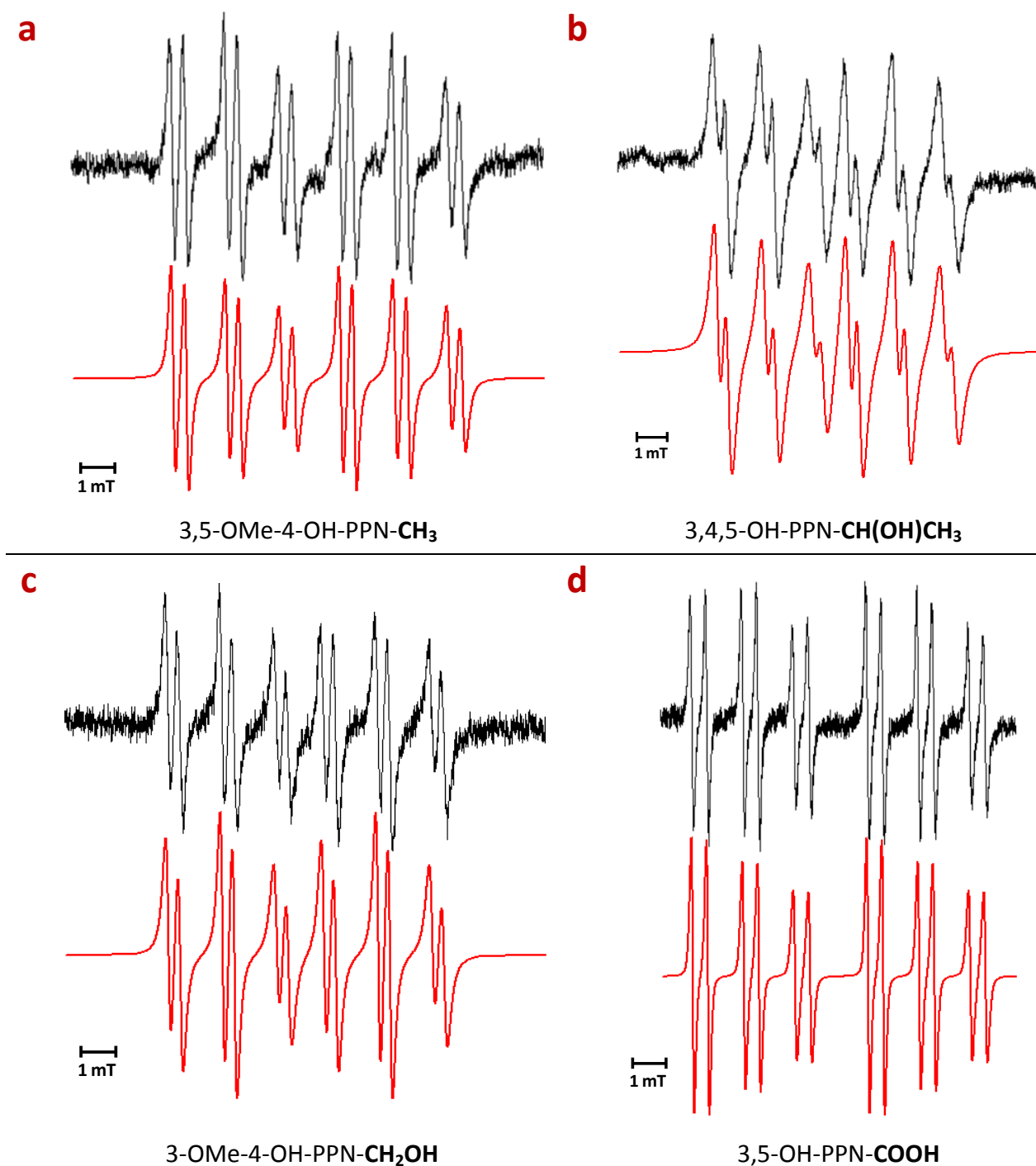
**Table 23:** Paramètres de RPE des adduits carbonés des PPNs non antioxydantes (chlorées, nitrées, fluorée, acides et ester) en milieu tampon phosphate, pH 7,4

	Ref.	 <b>4-NO<sub>2</sub>-PPN (15)</b>	 <b>3-NO<sub>2</sub>-PPN (20)</b>	 <b>2-NO<sub>2</sub>-PPN (21)</b>	 <b>4-AcNH-PPN (18)</b>	 <b>4-Cl-PPN (14)</b>	 <b>4-CO<sub>2</sub>H-PPN (16)</b>	 <b>4-CO<sub>2</sub>Et-PPN (17)</b>	 <b>2-CF<sub>3</sub>-PPN (26)</b>	
	<b>Fenton/DMSO/tampon phosphate</b>									
	a <sub>N</sub>	1,465 <sup>a</sup>	1,471	1,451	1,493	1,488 <sup>d</sup>	1,479	1,473		
	a <sub>H</sub>	0,294	0,269	0,471	0,307	0,314	0,329	0,324		
	a <sub>P</sub>	4,644	4,658	4,765	4,656	4,643	4,657	4,637		
	% en mél.	100	93	81	90	76	97	90		n.o.
	<b>Fenton/EtOH/tampon phosphate</b>									
	a <sub>N</sub>	1,439	1,442	1,423	1,469	1,465 <sup>e</sup>	1,454	1,451	1,435	
	a <sub>H</sub>	0,268	0,247	0,327	0,303	0,308	0,296	0,280	0,368	
	a <sub>P</sub>	4,198	4,316	4,474	4,119	4,130	4,152	4,101	4,145	
	% en mél.	100	100	73	100	80	100	98	50	
	<b>Fenton/MeOH/tampon phosphate</b>									
	a <sub>N</sub>	1,434 <sup>b</sup>	1,434	1,420	1,454	1,454 <sup>f</sup>	1,445	1,439	1,430	
	a <sub>H</sub>	0,278	0,247	0,379	0,312	0,293	0,303	0,293	0,501	
	a <sub>P</sub>	4,326	4,394	4,308	4,259	4,256	4,267	4,248	4,393	
	% en mél.	100	100	92	100	64	100	99	62	
	<b>Fenton / (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>2</sub>/tampon phosphate</b>									
	a <sub>N</sub>	1,434 <sup>c</sup>	1,435	1,425	1,451		1,441	1,441		
	a <sub>H</sub>	0,370	0,364	0,326	0,442		0,406	0,403		
	a <sub>P</sub>	4,947	5,052	3,877	5,021	n.o. <sup>g</sup>	4,949	4,952	n.o.	
	% en mél.	100	100	62	100		100	94		
	Adduits secondaires	—	—	1,655	—	—	1,618	—	—	

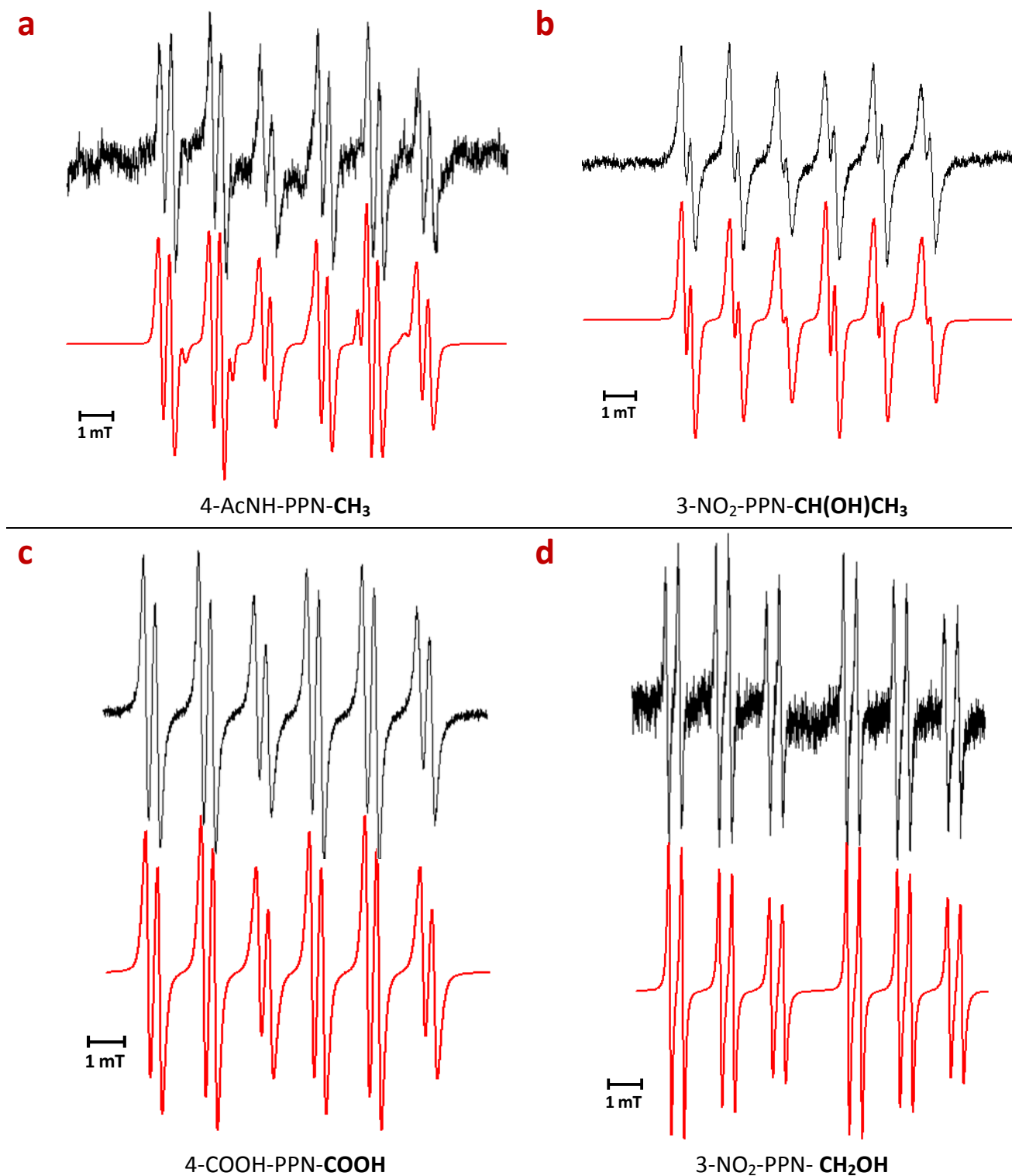
n.o. = non observé

**a :** a<sub>N</sub>=1,455 a<sub>H</sub>=0,307 a<sub>P</sub>=4,633; **b :** a<sub>N</sub>=1,435 a<sub>H</sub>=0,287 a<sub>P</sub>=4,305; **c :** a<sub>N</sub>=1,414 a<sub>H</sub>=0,350 a<sub>P</sub>=4,919 d'après Rizzi et al.<sup>85c</sup>
**d :** a<sub>N</sub>=1,50 a<sub>H</sub>=0,33 a<sub>P</sub>=4,67; **e :** a<sub>N</sub>=1,47 a<sub>H</sub>=0,30 a<sub>P</sub>=4,20; **f :** a<sub>N</sub>=1,47 a<sub>H</sub>=0,31 a<sub>P</sub>=4,34; **g :** a<sub>N</sub>=1,46 a<sub>H</sub>=0,42 a<sub>P</sub>=5,02 d'après Tuccio et al.<sup>85b</sup>

La Figure 29 et la Figure 30 illustrent quelques exemples de spectres pour lesquels l'adduit principal carboné PPNs-R est obtenu seul ou est très majoritaire (> 97%). Les paramètres d'acquisition sont : amplitude de modulation, 0,039–0,088 mT ; gain,  $4 \times 10^3$ – $3,2 \times 10^5$  ; filtre, 20,48–40,96 ms ; vitesse de balayage, 0,15 mT/s ; nombre d'accumulations, 1–9.



**Figure 29** : Spectres de RPE caractéristiques (et leur *simulation*) d'adduits carbonés sur des PPNs antioxydantes en milieu tampon phosphate pH 7,4



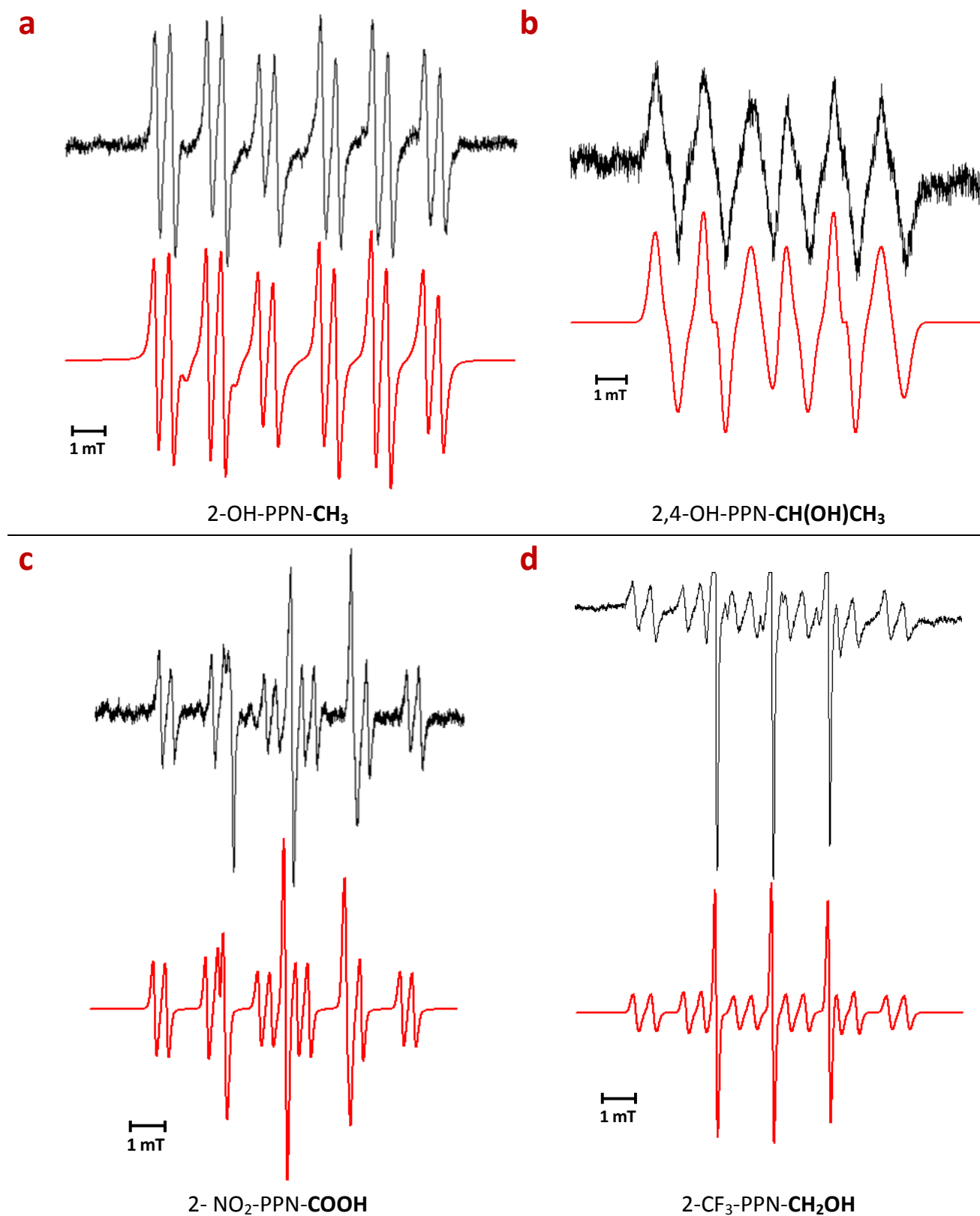
**Figure 30:** Spectres de RPE caractéristiques (et leur *simulation*) d'adduits carbonés sur des PPNs non antioxydantes en milieu tampon phosphate pH 7,4

Cas des PPNs substituées en position ortho

Dans le cas des PPNs dont le cycle aromatique est substitué sur une seule position 2 (en *ortho* du carbone de la fonction nitrone), les intensités des signaux de RPE sont plus faibles, probablement en raison de cinétiques de piégeage ralenties par l'encombrement stérique. Les PPNs les plus encombrées, telles la 2-NO<sub>2</sub>-PPN et la 2-CF<sub>3</sub>-PPN forment des mélanges d'adduits de capture et de décomposition. La formation d'adduits secondaires à partir de la PPN et de quelques dérivés a été rapportée par Rizzi et al.<sup>171,85a</sup>. Dans le cas de la seule PPN disubstituée en *ortho* de notre série, la 2,6-Me-PPN, aucune expérience de piégeage de radical carboné n'a conduit à l'observation de spectres de RPE. Ceci suggère que le fort encombrement stérique autour du site d'attaque radicalaire empêche le piégeage de s'effectuer de manière significative. La Figure 31 montre quelques spectres caractéristiques obtenus avec les PPNs monosubstituées en *ortho*. Les paramètres d'acquisition sont : amplitude de modulation, 0,039–0,088 mT ; gain,  $4 \times 10^5$ – $8 \times 10^5$  ; filtre, 20,48–81,92 ms ; vitesse de balayage, 0,15 mT/s ; nombre d'accumulations, 2–9. Dans le cas de signaux composites (spectres c et d), la Table 23 indique les paramètres et contribution des autres nitroxydes.

---

<sup>171</sup> Rizzi, C.; Lauricella, R.; Tuccio, B.; Bouteiller, J.-C.; Cerri, V.; Tordo, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1997**, 2507-2512



**Figure 31** : Spectres de RPE caractéristiques (et leur **simulation**) d'adduits carbonés sur des PPNs monosubstituées en ortho en milieu tampon phosphate pH 7,4

#### 4.2.2 Piégeage des radicaux centré sur l'oxygène ( $O_2^{\bullet-}$ , $\bullet OH$ , $\bullet OR$ )

Le piégeage des radicaux superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) par les PPNs a rarement conduit à l'observation d'adduits persistants. Ce phénomène est connu pour la PBN et ses dérivés<sup>73b,172</sup>, et le mécanisme de décomposition de l'adduit PBN-OH en milieu aqueux fait intervenir la libération de  $NO^{\bullet}$ .

Tous les essais de piégeage de  $HO^{\bullet}$  n'ont pas conduit à la détection de signaux de PPNs-OH suffisamment intenses, bien que plusieurs méthodes de génération de ce radical aient été testées (système de Fenton en milieu tamponné pH 7,4, photolyse de 1%  $H_2O_2$  dans  $H_2O$  et addition nucléophile d'eau).

Le radical  $O_2^{\bullet-}$  a été généré avec deux systèmes différents: l'addition nucléophile de  $H_2O_2$  dans la pyridine et la photolyse de  $H_2O_2$  (30%).

La méthode photolytique nous a permis d'obtenir des adduits purs, sans signaux secondaires, pour les nitrones PPN, 4- $NO_2$ -PPN (**15**), 3- $NO_2$ -PPN (**20**), 4- $CO_2H$ -PPN (**16**), 4-AcNH-PPN (**18**) et 2- $CF_3$ -PPN (**26**). Dans le cas de la nitrone **18**, le signal de RPE est très faible, suggérant que la substitution avec un groupement électroattracteur -*M* ( $COOH$  ou  $NO_2$ ) augmente la vitesse d'addition du radical superoxyde sur la nitrone.


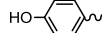


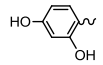
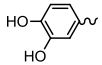

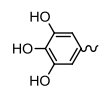
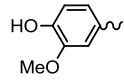
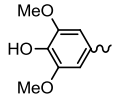
La Table 24 (PPNs antioxydantes) et la Table 25 (PPNs non antioxydantes) rassemblent les paramètres de RPE des adduits PPNs-OOH et PPNs-OCH<sub>3</sub> ayant été détectés.

---

<sup>172</sup> Kotake, Y. ; Janzen, E.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**,113,9503-9506



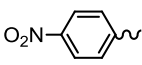
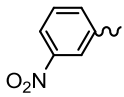
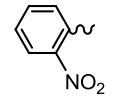
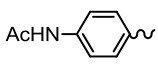
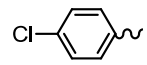
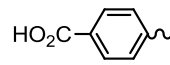
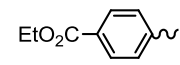
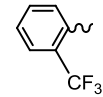
Table 24 : Paramètres de RPE des adduits oxygénés des PPNs antioxydantes

											
	PPN (4)	4-OH-PPN (5)	3-OH-PPN (10)	2-OH-PPN (11)	2,4-OH-PPN (13)	3,4-OH-PPN (7)	3,5-OH-PPN (12)	3,4,5-OH-PPN (9)	3-OMe-4-OH-PPN (8)	3,5-OMe-4OH-PPN (6)	
Radical piégé	Ref.										
HO <sub>2</sub> •	Addition nucléophile de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans pyridine										
	a <sub>N</sub>	1,277 <sup>a</sup>	1,294 <sup>b</sup>	1,281				1,289			
	a <sub>H</sub>	0,124	0,139	0,138				0,163			
	a <sub>P</sub>	3,861	3,856	3,746			Mélange contenant un Acylnitroxy de <sup>c</sup>	3,642	Mélange contenant un Acylnitroxy de <sup>c</sup>	Mélange contenant un Acylnitroxy de <sup>c</sup>	Mélange contenant un Acylnitroxy de <sup>c</sup>
	% en mél.	96	72	68	n.o.	n.o.		15			
	Adduits secondaires	1,371	13 / 15	4 / 28				1 / 84			
		4,393	1,556 / 1,368	1,855 / 1,382				1,546 / 1,387			
		—	— / 0,271	— / 0,198				— / 0,283			
		—	— / 4,165	— / 3,973				— 3,898			
	—O•	MeOH + Pb(OAc) <sub>4</sub> / DMSO									
a <sub>N</sub>		1,319	1,338 <sup>c</sup>	1,321	1,356	1,371	1,298	1,325		1,307	
a <sub>H</sub>		0,248	0,280	0,273	0,344	0,367	0,180	0,297	Mélange contenant un Acylnitroxy de <sup>c</sup>	0,285	Mélange contenant un Acylnitroxy de <sup>c</sup>
a <sub>P</sub>		3,899	3,921	3,847	3,983	4,014	3,950	3,852		4,017	
% en mél.		100	99	100	88	64	—	100		100	
Adduits secondaires		—	1,560	—	1,378/1,505	1,238	—	—		—	—
		—	—	—	0,424/—	0,065	—	—		—	—
		—	—	—	6,269/—	4,052	—	—		—	—

n.o. = non observé

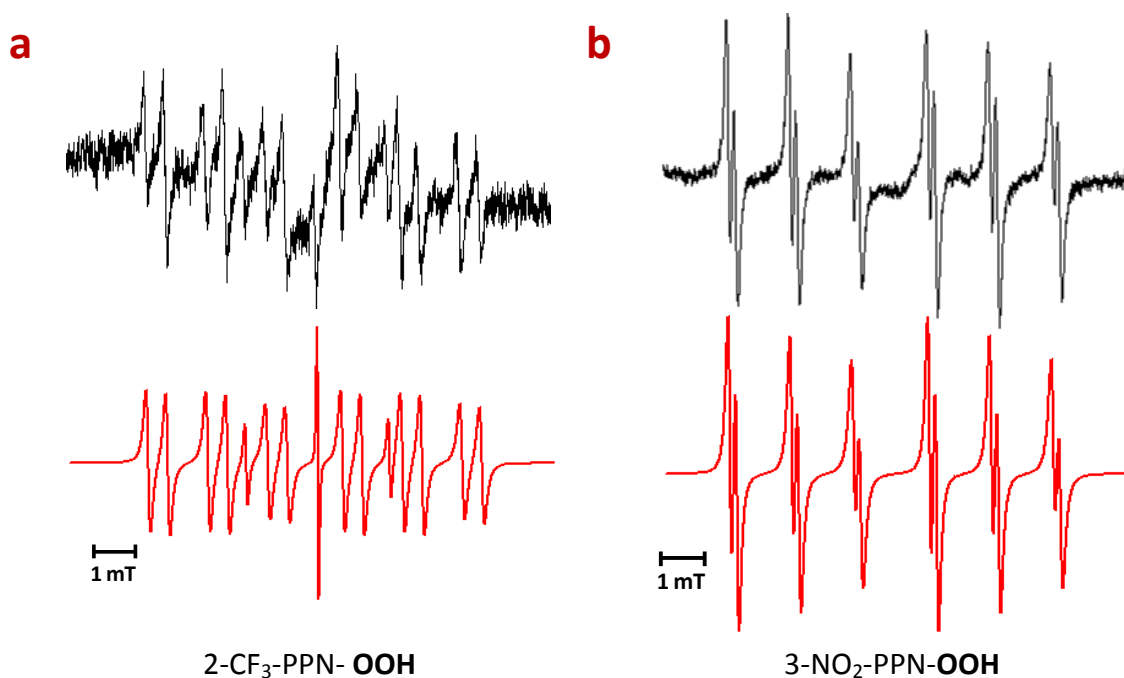
**a** : a<sub>N</sub>=1,47 a<sub>H</sub>=0,34 a<sub>P</sub>=4,23 d'après Tuccio et al.<sup>85b</sup>
**b** : a<sub>N</sub>=1,31 a<sub>H</sub>=0,16 a<sub>P</sub>=3,86; **c** : a<sub>N</sub>=1,34 a<sub>H</sub>=0,28 a<sub>P</sub>=3,89 d'après Liu et al.<sup>110</sup>
**c** : la simulation du signal multicomposant est en cours.

**Table 25** Paramètres de RPE des adduits oxygénés des PPNs non antioxydantes (chlorées, nitrées, fluorée, acides et ester)

	Ref.	 4-NO <sub>2</sub> -PPN (15)	 3- NO <sub>2</sub> -PPN (20)	 2- NO <sub>2</sub> -PPN (21)	 4-AcNH-PPN (18)	 4-Cl-PPN (14)	 4-CO <sub>2</sub> H-PPN (16)	 4-CO <sub>2</sub> Et-PPN (17)	 2-CF <sub>3</sub> -PPN (26)
<b>Radical piégé</b>									
		Addition nucléophile de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans pyridine							
		1,247	1,252		1,288		1,261		
		0,114	0,107		0,136		0,117		
		3,861	3,856		3,853		3,914		
		87	85	65/35	34	n.o.	84	n.o.	n.o.
		1,304	1,505	1,539/1,348	8/58		3/13		
		0,233	—	—/ 0,307	1,548/1,379		1,556/1,361		
HOO•		4,255	—	— / 4,025	—/0,282		—/0,260		
		—	—	— / —	—/4,164		—/4,158		
		photolyse de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30% dans l'eau							
		1,333	1,366		1,312	1,357	1,346		
		0,168	0,235	n.o.	0,179	0,200	0,196	n.o.	n.o.
		4,212	4,173		4,232	4,230	4,195		
		100	100		100	80	100		
		—	—		—	1,641	—		
		MeOH + Pb(OAc) <sub>4</sub> / DMSO							
		1,296	1,297	1,283	1,268	1,308	1,311	1,300	1,307
		0,195	0,195	0,335	0,135	0,231	0,229	0,234	0,527
—O•		4,027	4,027	3,823	4,062	3,900	3,824	3,887	4,306
		100	78	98		100	100	100	100
		—	0,782	1,527		—	—	—	—
		—	—	—		—	—	—	—
		—	2,536	—		—	—	—	—

n.o. = non observé

La Figure 32 représente quelques spectres caractéristiques d'adduits du radical  $\text{HOO}^\bullet$  généré par la méthode photolytique sur des PPNs non antioxydantes.



**Figure 32** : Spectres de RPE caractéristiques (et leur **simulation**) d'adduits PPNs-OOH pour des nitrones non antioxydantes dans l'eau

Comme dans le cas des radicaux  $\text{HO}^\bullet$ , pour les nitrones phénoliques aucun signal de RPE n'est observé lorsque  $\text{HOO}^\bullet$  est produit par la méthode photolytique. On peut supposer dans ce cas que le radical perhydroxyle réagit plus vite sur les fonctions OH aromatiques, formant des radicaux de type phénoxy qui ne sont pas observables directement et ne se piègent pas sur l'excès de nitronne de manière significative.

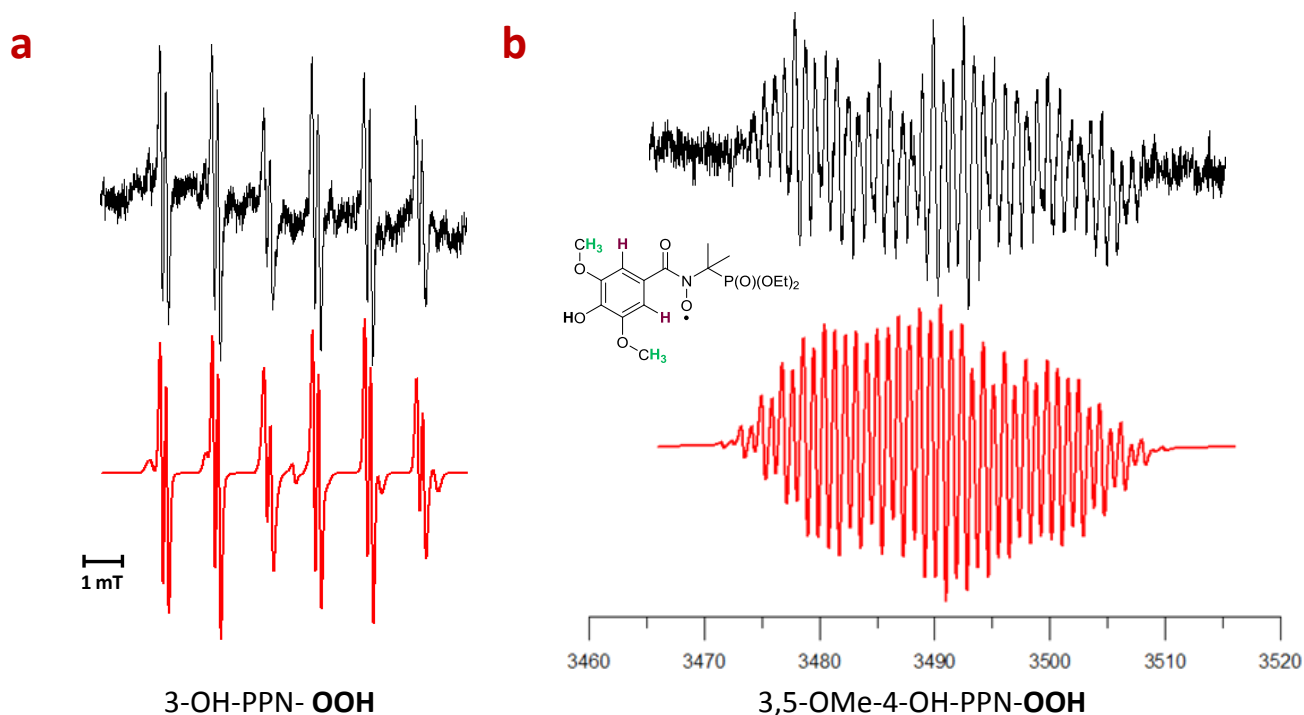
Nous avons cependant caractérisé, pour certaines nitrones antioxydantes, les adduits PPNs-OOH formés par addition nucléophile de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la pyridine. Dans ce cas, les adduits ont été détectés pour les mêmes nitrones qui ont donné des résultats avec la méthode photolytique: PPN, 4-NO<sub>2</sub>-PPN (**15**), 3-NO<sub>2</sub>-PPN (**20**), 4-CO<sub>2</sub>H-PPN (**16**) et 4-AcNH-PPN (**18**), mais également avec des nitrones contenant des OH: la 4-OH-PPN (**5**), la 3-OH-PPN (**10**) et la 3,5-OH-PPN(**12**).

Dans la plupart des expériences, on note la présence d'adduits secondaires et, dans un nombre limité de cas, la réaction conduit à un acylnitroxyde  $\beta$ -phosphoré  $\text{Ar-C(O)-N(O}^\bullet\text{)-CMe}_2\text{-P(O)(OEt)}_2$  transitoire. Pour ce dernier type de radical, le spectre de RPE (Figure 33b) traduit l'absence de H en position  $\beta$  et une participation de tous les

protons du cycle à la figure de couplage par délocalisation de l'électron célibataire, causant en conséquence une forte diminution de la densité de spin sur N et P (donc une diminution significative des couplages  $a_N$  et  $a_P$ ). Le mécanisme de formation de ce radical particulier n'a pas encore été élucidé.

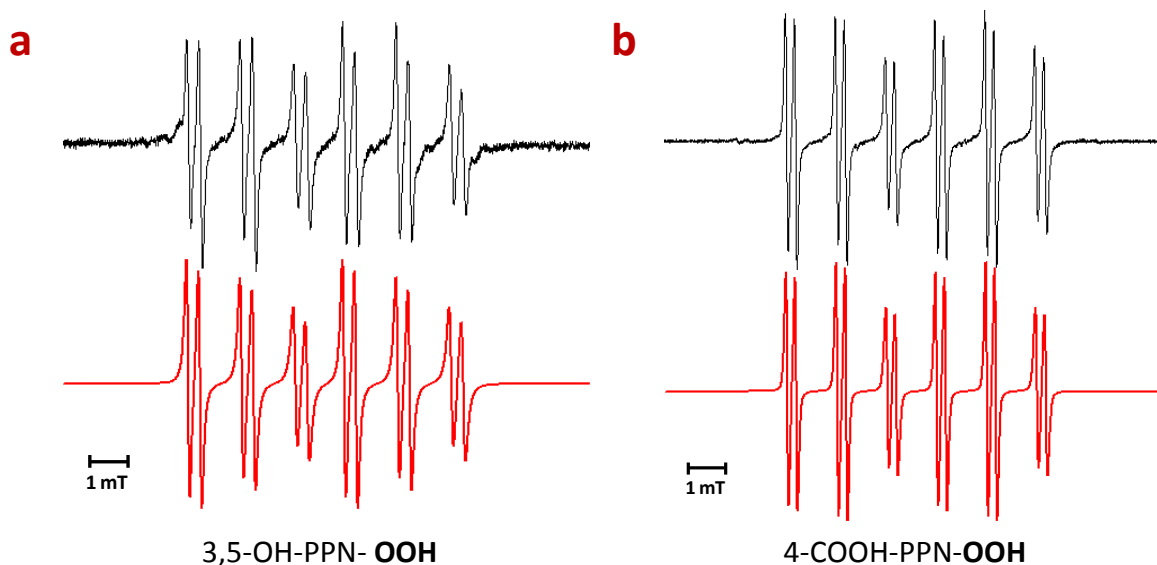
Pour les quatre nitrones, 3,5-OMe-4-OH-PPN **6**, 3,4-OH-PPN **7**, 3-OMe-4-OH-PPN **8** et 3,4,5-OH-PPN **9**, portant des groupements dérivés des acides phénoliques naturels avec activité antioxydante, l'adduit de  $O_2^{\bullet-}$  n'est pas détecté. Dans ce cas on peut supposer que l'activité antioxydante due aux groupements OH sur le cycle aromatique est supérieure à la capacité de piégeage de la fonction nitrone. Le radical pourrait réagir avec les hydroxyles en arrachant un atome d'hydrogène, plutôt que s'ajouter au carbone de la nitrone.

De la même manière, les nitrones avec un substituant en *ortho*, (2-NO<sub>2</sub>-PPN **21**, 2-OH-PPN **11** et 2,4-OH-PPN **13**), plus encombrées, ne sont pas réactives envers le radical superoxyde. La Figure 33 b illustre un exemple d'adduits PPNs-OOH obtenus dans la pyridine, un radical étant attribuable à un adduit de type acylnitroxyde (obtenu avec la 3,5-MeO-4-OH-PPN).



**Figure 33** : Spectres de RPE dans la pyridine (et **simulations**) de l'adduit 3-OH-PPN-OOH (a) et de l'acylnitroxyde produit lors de la réaction d'addition nucléophile de  $H_2O_2$  sur la 3,5-MeO-4-OH-PPN (b) ; les paramètres simulés sont (en mT) ;  $a_N = 0,500$  ;  $a_P = 0,932$  ;  $a_H$  (2H *ortho*) = 0,371 ;  $a_H$  (6H, MeO) = 0.177 ;  $a_H$  (1H, *p*-OH) = 0,09

La Figure 34 donne deux exemples de spectres d'adduits PPNs-OCH<sub>3</sub> formés par la méthode utilisant Pb(OAc)<sub>4</sub>.


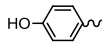


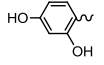
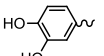
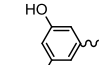
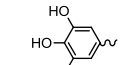
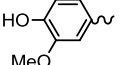
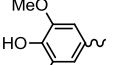


**Figure 34** : Spectres de RPE caractéristiques dans le DMSO (et *simulations*) d'adduits de type PPNs-OCH<sub>3</sub>

#### 4.2.3 Autre radicaux (\*N<sub>3</sub>, SO<sub>3</sub><sup>•-</sup>, H<sup>•</sup>)

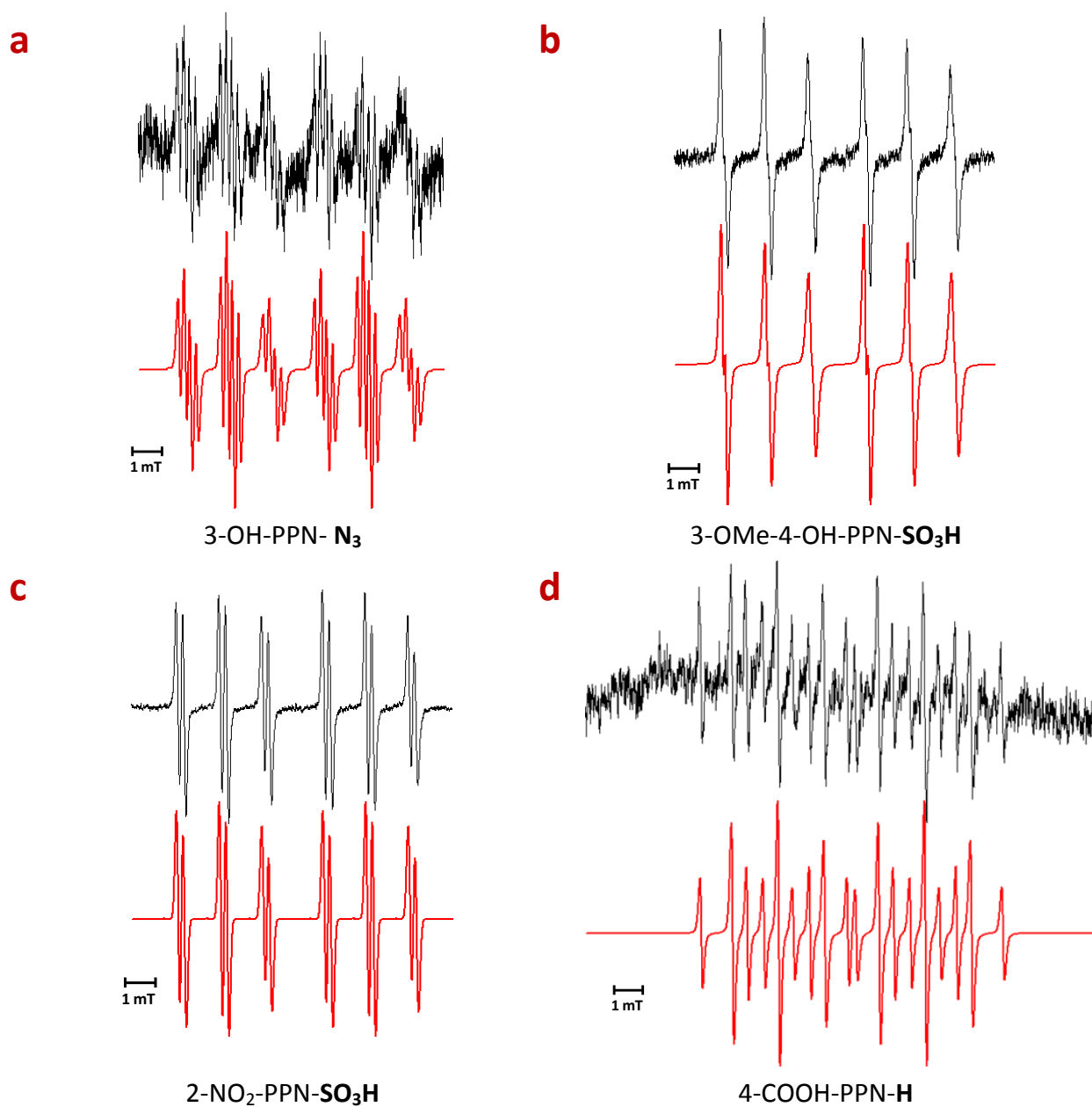
Nous avons cherché à caractériser des adduits de radicaux centrés sur N et S, ainsi qu'à obtenir les nitroxydes réduits du type PPNs-H. C'est avec le radical SO<sub>3</sub><sup>•-</sup> que nous avons pu obtenir le plus d'adduits persistants PPNs-SO<sub>3</sub>H, y compris avec la majorité des PPNs antioxydantes de notre série. En effet pour cette série, aucune nitrone n'a donné l'adduit PPNs-H à cause d'une réaction secondaire du réactif utilisé (NaBH<sub>4</sub>) avec les hydroxyles aromatiques et l'adduit PPNs-N<sub>3</sub> a été obtenu seulement pour la nitrone 3-OH-PPN (**10**). Les constantes de couplage de ce dernier adduit ( $a_N=1,394$   $a_H=0,221$   $a_{N\beta}=0,176$ ) ne sont pas insérées dans la Table 26, mais son spectre est représenté à la Figure 35a.

Table 26 : Paramètres de RPE des adduits PPNs-N<sub>3</sub>, PPNs-SO<sub>3</sub>H et PPNs-H

	Ref.	 PPN (4)	 4-OH-PPN (5)	 3-OH-PPN (10)	 2-OH-PPN (11)	 2,4-OH-PPN (13)	 3,4-OH-PPN (7)	 3,5-OH-PPN (12)	 3,4,5-OH-PPN (9)	 3-OMe-4-OH-PPN (8)	 3,5-OMe-4OH-PPN (6)
<b>Radical piégé</b>											
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ou K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ) / tampon phosphate -DTPA											
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	a <sub>N</sub>	1,365	1,375	1,362	1,373	1,378	1,373	1,358		1,372	1,366
	a <sub>H</sub>	0,133	0,129	0,128	0,148	0,137	0,122	0,123		0,121	0,120
	a <sub>P</sub>	4,354	4,442	4,366	4,255	4,311	4,440	4,394		4,462	4,479
	% en mél.	88	100	100	81	100	100	100	n.o.	100	100
	Adduits secondaires	1,348	—	—	1,421	—	—	—	—	—	—
		1,303	—	—	1,290	—	—	—	—	—	—
	5,202	—	—	4,933	—	—	—	—	—	—	
<b>Radical piégé</b>											
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ou K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ) / tampon phosphate -DTPA											
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	a <sub>N</sub>	1,333	1,331	1,332	1,367	1,362	1,361	1,354	1,340		
	a <sub>H</sub>	0,168	0,226	0,197	0,125	0,121	0,123	0,114	0,168		
	a <sub>P</sub>	3,978	4,338	4,564	4,441	4,467	4,439	4,466	3,989		
	% en mél.	100	33	100	100	100	100	100	100		
	Adduits secondaires	—	1,654	—	—	—	—	—	—		
Fenton + NaN <sub>3</sub> /tampon phosphate											
N <sub>3</sub> <sup>•</sup>	a <sub>N</sub>	1,370	1,368	—	—	1,392	1,388	1,381	—		
	a <sub>H</sub>	0,183	0,162	—	—	0,173	0,200	0,188	—		
	a <sub>P</sub>	4,420	4,446	—	n.o.	4,451	4,476	4,421	n.o.		
	a <sub>Nβ</sub>	0,192	0,201	—	—	0,187	0,182	0,180	—		
	% en mél.	100	100	100	—	35	100	74	—		
	Adduits secondaires	—	—	1,655	—	1,624	—	1,626	—		
réduction avec NaBH <sub>4</sub> + air / eau											
H <sup>•</sup>	a <sub>N</sub>	1,508 <sup>a</sup>	1,506	1,545	—	—	1,525	1,512	—		
	a <sub>H</sub>	1,042(2H)	1,065(2H)	1,325(2H)	—	—	1,037(2H)	1,029(2H)	—		
	a <sub>P</sub>	4,798	4,819	4,879	n.o.	n.o.	4,846	4,816	n.o.		
	% en mél.	100	—	53	—	—	100	22	—		
	Adduits secondaires	—	—	1,659	—	—	—	1,644	—		

 n.o.= non observé a : a<sub>N</sub>=1,507 a<sub>H</sub>=1,039 a<sub>P</sub>=4,794 d'après Rizzi et al.<sup>85c</sup>

La Figure 35 illustre des exemples de spectres obtenus pour ces trois types de radicaux en milieu aqueux.



**Figure 35** : Spectres de RPE en milieu aqueux (et *simulations*) caractéristiques d'adduits sur les PPNs des radicaux  $N_3$ . (a),  $SO_3^-$  (b, c) et H (d)

### 4.3 Résultats du piégeage par les dérivés de PPN vectorisées pour la mitochondrie (mito-PPNs)

L'étude des propriétés des nitrones vectorisées mito-PPNs dans la réaction de spin trapping a été réalisée sur la série de radicaux libres décrite au § 4.2.

Du fait des bonnes propriétés de piègeurs observées pour les analogues PPNs non vectorisées vis-à-vis des radicaux alkyle et alcoyle, nous avons privilégié ces radicaux dans notre étude. En effet, les radicaux de type  $R^\bullet$  et  $RO^\bullet$  sont des espèces transitoires assurant la propagation des chaînes de peroxydation lipidique responsable des dommages causés à la cellule consécutivement à l'induction d'un stress oxydant. A la suite de la formation primaire de  $O_2^{\bullet-}$  et  $NO^\bullet$ , puis de  $H_2O_2$ , l'insuffisance d'efficacité des systèmes régulateurs endogènes (catalase, SOD, etc...) favorise les mécanismes d'oxydation et de propagation conduisant à la formation des radicaux  $R^\bullet$ ,  $RO^\bullet$  et peroxyde lipidiques ( $LOO^\bullet$ ). Il s'ensuit la destruction des lipides membranaires, avec pour conséquence la production de produits de dégradation cytotoxique<sup>173</sup>, tels qu'alcools, cétones, aldéhydes, alcanes et éthers.

Sur le plan mécanistique, la peroxydation lipidique<sup>174</sup> est une réaction en chaîne amorcée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène sur les acides gras polyinsaturés (AGPI). La présence d'une double liaison adjacente à un groupement méthylène rend la liaison C-H plus faible, rendant l'hydrogène plus sensible à la substitution. Il en résulte la formation d'un radical carboné  $R^\bullet$  qui peut se réarranger par migration des doubles liaisons pour former un diène conjugué (Figure 36). L'oxygène moléculaire s'additionne rapidement à  $R^\bullet$  conduisant à  $LOO^\bullet$ . Ce dernier peut ensuite extraire un atome d'hydrogène issu d'un autre acide gras polyinsaturé et démarrer ainsi une réaction en chaîne. Selon sa nature chimique, l'hydroperoxyde lipidique  $LOOH$  ainsi formé peut être détectable par des méthodes analytiques classiques, mais il peut également donner lieu à une décomposition catalysée par les métaux de transition libérés au cours du stress oxydant, conduisant à des radicaux alcoxy lipidiques  $LO^\bullet$ <sup>175</sup>. Ces radicaux peuvent à leur tour prendre part à la propagation de la réaction en chaîne en réagissant avec un nouveaux AGPI ou ils peuvent subir une réaction de  $\beta$ -scission

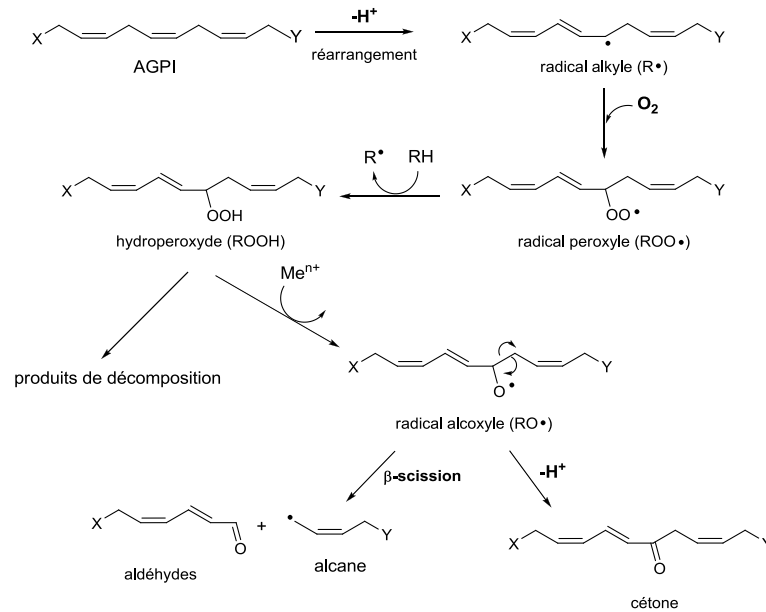
<sup>173</sup> Spickett C.M. *Redox Biol.* **2013**, 1, 145-152

<sup>174</sup> Josephy, P.D.; Mannervik, B.; *Molecular Toxicology*, Oxford University Press, **2006**, p. 27-34

<sup>175</sup> Repetto, M.G.; Ferrarotti, N.F.; Boveris, A. *Arch Toxicol* **2010**, 84, 255-262



conduisant à la formation de composés toxiques tels que des aldéhydes, des cétones ou des hydrocarbures.



**Figure 36:** Mécanisme de la peroxydation lipidique et produits formés

Dans l'ordre d'apparition, les radicaux impliqués dans le processus de peroxydation lipidique sont les radicaux : alkyle, peroxyde et alcoxy.

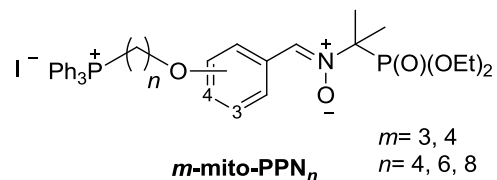
Les membranes biologiques, composées notamment d'AGPI, sont les cibles principales de la peroxydation lipidique qui entraîne des dommages structurels des cellules pouvant conduire à la mort cellulaire. En particulier le système membranaire mitochondrial est très sensible à l'attaque de radicaux libres à cause de la production élevée des espèces réactives dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Les radicaux libres attaquent les composants lipidiques de la membrane mitochondriale et entraînent la peroxydation lipidique; les modifications au niveau des membranes provoquent la variation du potentiel de membrane mitochondrial<sup>176</sup> qui influence l'activité de la mitochondrie. Par conséquent, les systèmes de radicaux impliqués dans les dommages mitochondriaux sont considérés comme un mécanisme clé intervenant dans l'apparition et le développement d'un grand nombre de pathologies

<sup>176</sup> (a) Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., Ruggiero, F.M. *Circ. Res.* **2004**, 94, 53-59 (b) Santos, D.J.S.L.; Moreno, A.J.M. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61, 155-164

Dans le but de contrôler l'efficacité de thérapeutiques spécifiques, il convient donc de développer des méthodes de détection et d'identification en amont des espèces radicalaires formées dans la mitochondrie. Ainsi, notre objectif initial a été de synthétiser des PPNs dont le cycle aromatique comporte une chaîne éther (linker) terminée par un  $\text{Ph}_3\text{P}^+$  ayant pour fonction d'améliorer la pénétration intra-mitochondriale (voir § 3.4.3 qui décrit leur synthèse).

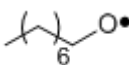
En 2003, Murphy et al.<sup>152</sup> ont décrit la mitoPBN, première nitrone linéaire dérivée de la PBN vectorisée pour la mitochondrie. Dans la mitoPBN, le linker comporte quatre méthylènes ( $n = 4$ ) et le contre-ion du phosphonium est  $\text{Br}^-$ . Dans ce qui suit, la mitoPBN, dont nous avons amélioré la synthèse en 2012<sup>159</sup> et dont les propriétés de piègeur radicalaire n'avaient pas été étudiées<sup>152</sup>, sera utilisée comme référence. Sur la base d'une vectorisation assurée par  $\text{Ph}_3\text{P}^+$ , des nitrones cycliques dérivées de la DEPMPO et de la DIPPMPPO<sup>150</sup> et une série de marqueurs du pH mitochondrial, amines secondaires phosphorylées<sup>156</sup> ont été récemment décrites.

Dans notre étude, les nouvelles mitoPPNs sont des iodures de triphénylphosphonium dérivés des 3-OH-PPN et 4-OH-PPN, avec  $n = 4, 6, 8$  (voir § 3.4.3 qui décrit leur synthèse). Pour simplifier, nous avons adopté pour ces nouveaux composés la nomenclature ***m*-mito-PPN<sub>*n*</sub>** (Table 27) où  $n$  = nombre de méthylènes du linker et  $m$  = position sur le cycle ( $m = 3$ , position *mé*ta, nitrone obtenue à partir de la 3-OH-PPN;  $m = 4$ , position *para*, nitrone obtenue à partir de la 4-OH-PPN). Table 27 rassemble les paramètres de RPE d'une série d'adduits des mitoPPNs avec des radicaux alkyle, alcoxy et avec le radical anion du trioxyde de soufre  $\text{SO}_3\bullet^-$ .

**Table 27:** Paramètres de RPE (mT) des adduits R<sup>•</sup> et OR<sup>•</sup> et SO<sub>3</sub><sup>•-</sup> sur les mito-PPNs et comparaison avec la mitoPBN


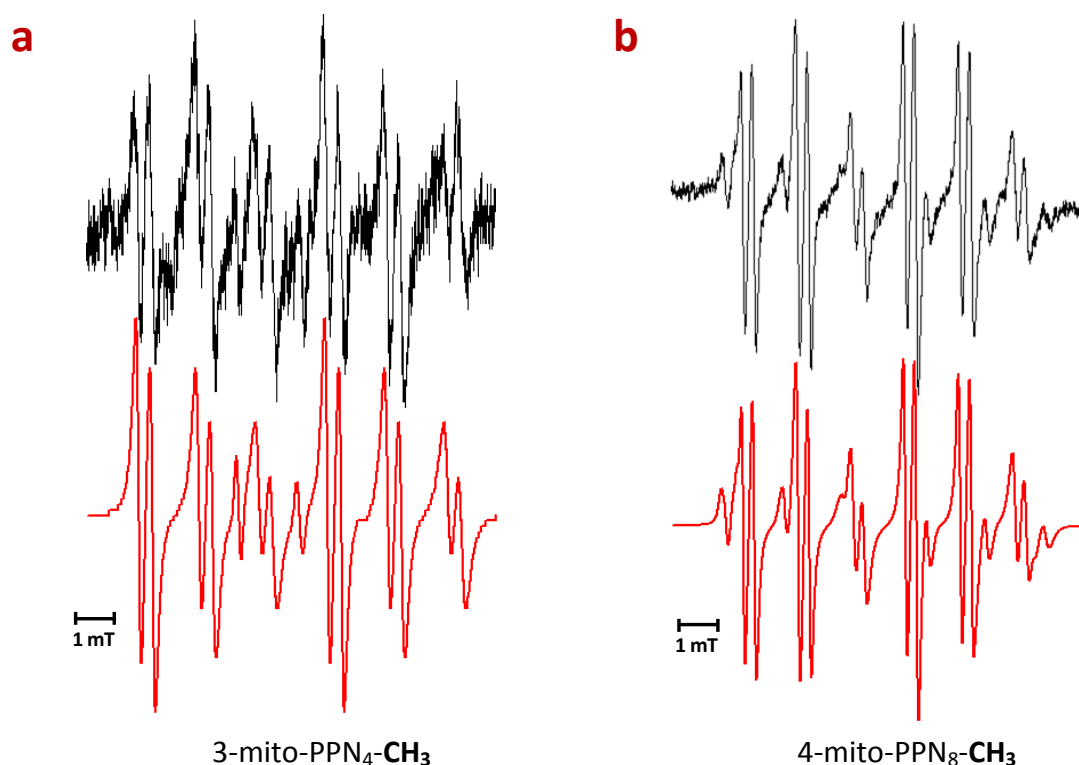
	4-mito-PPN <sub>4</sub> (39)	3-mito-PPN <sub>4</sub> (42)	4-mito-PPN <sub>6</sub> (40)	4-mito-PPN <sub>8</sub> (41)	mito-PBN	
<b>Radical piégé</b>						
Fenton/DMSO/ tampon phosphate pH 7,4						
—•	a <sub>N</sub>	1,489	1,471			
	a <sub>H</sub>	0,322	0,326			
	a <sub>P</sub>	4,620	4,620	n.o.	n.o.	n.o.
	% dans le mélange	53	97			
	Adduits secondaires	1,581	1,563			
Fenton/ DMSO pur						
—•	a <sub>N</sub>	1,331	1,319	1,331	1,332	
	a <sub>H</sub>	0,270	0,260	0,264	0,269	
	a <sub>P</sub>	3,911	3,903	3,919	3,927	
	% dans le mélange	85	60	53	77	n.o.
	Adduits secondaires	1,443	1,416	39/8	7/16	
		0,292	0,317	1,411/1,431	1,572/1,423	
	4,603	4,615	0,253/0,305	0,264/0,286		
			4,500/4,651	4,440/4,607		
Fenton/EtOH/ tampon phosphate pH 7,4						
—• OH	a <sub>N</sub>	1,512	1,462			1,601
	a <sub>H</sub>	0,309	0,333			0,324
	a <sub>P</sub>	4,029	4,091	n.o.	n.o.	—
	% dans le mélange	75	98			100
	Adduits secondaires	1,591	1,595			—
Fenton/MeOH/ tampon phosphate pH 7,4						
HO—•	a <sub>N</sub>	1,488	1,448			1,590
	a <sub>H</sub>	0,327	0,327			0,368
	a <sub>P</sub>	4,110	4,125	n.o.	n.o.	—
	% dans le mélange	62	95			100
	Adduits secondaires	1,590	1,597			—

CHAPITRE 4 Caractérisation RPE des adduits nitroxydes par la technique de spin- trapping

	Fenton / (NH <sub>4</sub> )HCO <sub>2</sub> / tampon phosphate pH 7,4					
CO <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	a <sub>N</sub>	1,454		Signal tres faible	n.o.	n.o.
	a <sub>H</sub>	0,454			n.o.	n.o.
	a <sub>P</sub>	5,030				
	% dans le mélange	68				
	Adduits secondaires	1,068				
	MeOH + Pb(OAc) <sub>4</sub> / DMSO					
—O•	a <sub>N</sub>	1,268	1,259	1,268	1,270	1,373
	a <sub>H</sub>	0,136	0,129	0,135	0,136	0,198
	a <sub>P</sub>	4,032	4,001	4,041	4,038	—
	% dans le mélange	83	32	100	63	100
	Adduits secondaires	1,469	1,313	—	1,326	—
		—	0,264	—	0,240	—
	—	3,871	—	3,865	—	
	EtOH + Pb(OAc) <sub>4</sub> / DMSO					
/O•	a <sub>N</sub>	1,267	1,259	1,267	1,268	1,372
	a <sub>H</sub>	0,131	0,123	0,134	0,134	0,197
	a <sub>P</sub>	4,033	4,002	4,039	4,035	—
	% dans le mélange	100	46	100	100	100
	Adduits secondaires	—	1,302	—	—	—
		—	0,271	—	—	—
	—	3,912	—	—	—	
	1-octanol + Pb(OAc) <sub>4</sub> / DMSO					
	a <sub>N</sub>	1,267	1,258	1,267	1,266	1,368
	a <sub>H</sub>	0,135	0,133	0,135	0,133	0,196
	a <sub>P</sub>	4,032	3,993	4,031	4,031	—
	% dans le mélange	100	100	100	100	100
	Adduits secondaires	—	—	—	—	—
	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> or K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ) / tampon phosphate-DTPA pH 7,0					
SO <sub>3</sub> <sup>•-</sup>	a <sub>N</sub>	1,374	1,359			1,498
	a <sub>H</sub>	0,112	0,118	Signal faible	Signal faible	0,183
	a <sub>P</sub>	4,443	4,370			—
	% dans le mélange	100	100			100

n.o. = non observé

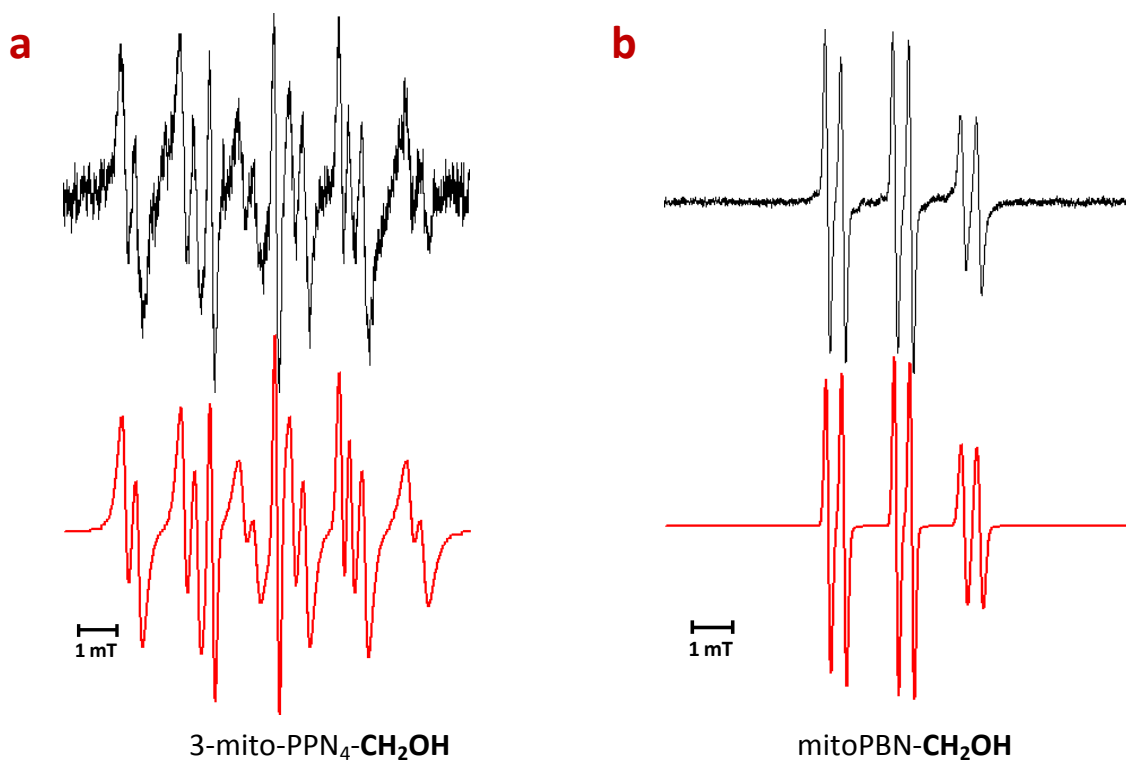
Opposées au radical méthyle (réaction de Fenton sur le DMSO à 25% dans un tampon phosphate), les mito-PPNs comportant un linker  $n = 4$  (mais ni la mitoPBN ni les autres mitoPPNs testées) ont conduit à un signal de RPE faible de l'adduit 3-mito-PPN<sub>4</sub>-Me correspondant (nitrones **42**). Lorsque le radical alkyle dérive d'un alcool, on observe des adduits mitoPBN-R et 3-mito-PPN<sub>4</sub>-Me, mais pas d'adduits avec les nitrones où  $n = 6$  ou 8 (nitrones **40** et **41**). Cependant, tous les adduits du radical Me• ont été observés en conduisant la réaction de Fenton dans le DMSO pur, suggérant que la plus grande lipophilie des mito-PPNs à linkers  $n = (6, 8)$  empêche d'obtenir des concentrations suffisantes. La Figure 37 donne deux exemples de spectres de RPE d'adduits du radical Me• obtenus en milieu tampon (spectre a, avec la 3-mito-PPN<sub>4</sub>) et dans le DMSO pur (spectre b, 4-mito-PPN<sub>8</sub>). Dans ce qui suit, les paramètres d'enregistrement des spectres communs à toutes les expériences sont : fréquence, 9,79 GHz, modulation de fréquence, 100 kHz et puissance, 10 mW. Les autres paramètres sont indiqués dans les légendes des Figures.



**Figure 37** : Spectres de RPE et **simulation** des adduits du radical méthyle sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et la 4-mito-PPN<sub>8</sub> (b) obtenus dans un tampon phosphate pH 7,4 (a) ou dans le DMSO pur (b). Les paramètres d'enregistrement sont : amplitude de modulation, 0,079 (a) et 0,039 (b) mT; filtre, 40,96 (a) et 168,84 (b) ms; gain,  $1,6 \times 10^5$  (a) et  $4 \times 10^5$  (b); vitesse de balayage, 0,238 (a) et 0,61 (b) mT/s, nombre d'accumulations, 5 (a) et 1 (b)

On remarque que le passage d'un milieu [eau:25% DMSO] au DMSO pur, moins polaire s'accompagne de la diminution attendue de la valeur de  $a_N$  dans les adduits du radical  $\text{Me}\bullet$  et que, dans le DMSO pur, on obtient des valeurs  $a_H > 0.25$  mT pour toutes les mito-PPNs testées.

La Figure 38 illustre le piégeage de radicaux carbonés issus du méthanol sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et la mitoPBN (b ; il est à remarquer que ce dernier adduit n'avait jamais été décrit).



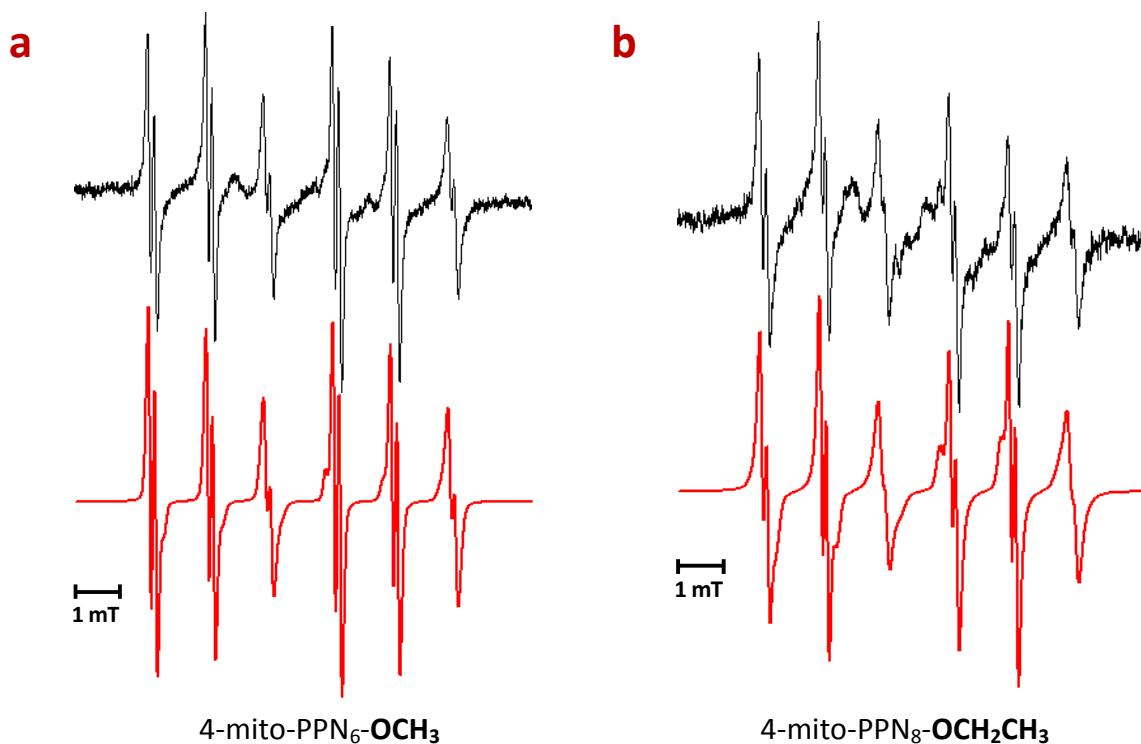
**Figure 38** : Spectres de RPE et simulation des adduits du radical hydroxyméthyle sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et la mitoPBN (b) obtenus dans un tampon phosphate pH 7,4. Les paramètres d'enregistrement sont : amplitude de modulation, 0,079 (a) et 0,039 (b) mT; filtre, 40,96 ms (a et b); gain,  $1,6 \times 10^5$  (a) et  $1 \times 10^5$  (b); vitesse de balayage, 0,238 (a) et 0,131 (b) mT/s, nombre d'accumulations, 15 (a) et 5 (b)

Les mito-PPNs ont été testées dans le ST de radicaux alcoxy  $\text{RO}\bullet$  issus d'alcools primaires. Le générateur radicalaire est  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  et la réaction a lieu dans le DMSO pur, solvant dans lequel toutes les nitrones sont solubles. Pour les alcoxy de faible longueur  $\text{MeO}\bullet$  et  $\text{EtO}\bullet$ , le piégeage est efficace et les adduits mito-PPNs-OMe et mito-PPNs-OEt ont une très bonne persistance.

Lors du piégeage du radical  $\text{MeO}\bullet$ , on observe des signaux secondaires, sauf dans le cas de la 4-mito-PPN<sub>6</sub> et de la mitoPBN où il est détecté seul.

Au cours du piégeage du radical  $\text{EtO}\bullet$ , on détecte seulement l'adduit principal, sauf dans le cas de la 3-mito-PPN<sub>4</sub>.

La Figure 39 illustre le piégeage des radicaux  $\text{MeO}\bullet$  et  $\text{EtO}\bullet$ , respectivement sur la 4-mito-PPN<sub>6</sub> (a) et la 4-mito-PPN<sub>8</sub> (b).



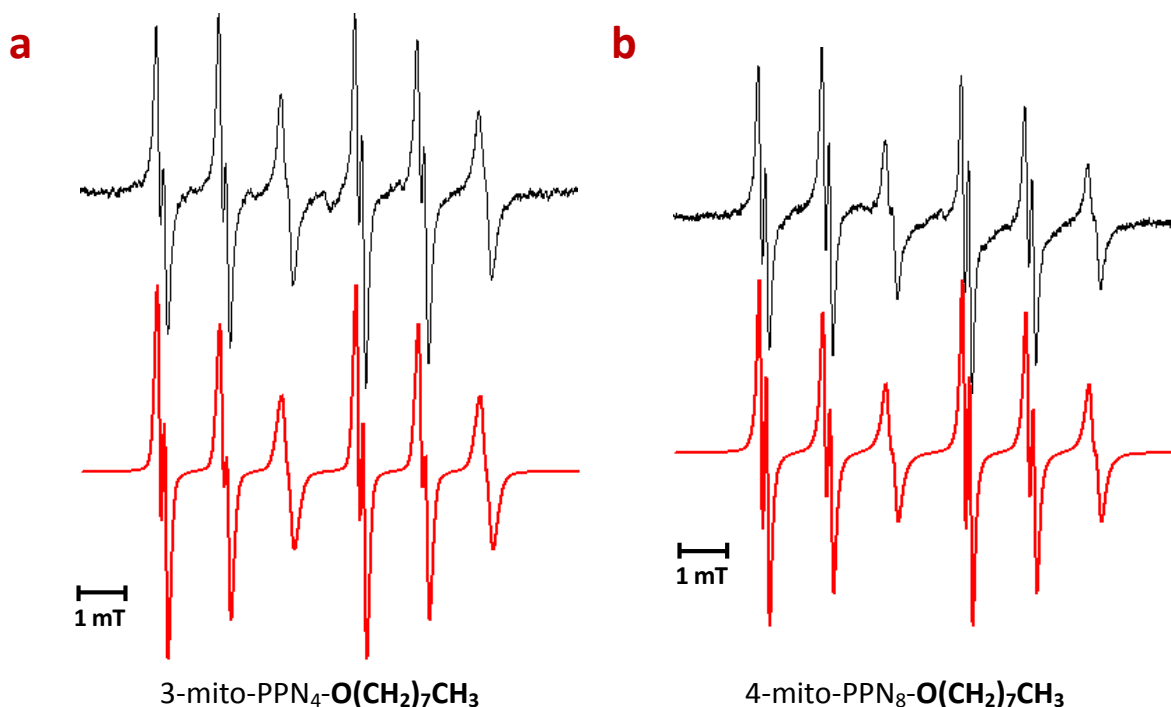
**Figure 39 :** Spectres de RPE et simulation des adduits du radical méthoxy sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et du radical éthoxy sur la 4-mito-PPN<sub>8</sub> (b) obtenus dans un tampon phosphate pH 7,4. Les paramètres d'enregistrement sont : amplitude de modulation, 0,039 (a) et 0,07 (b) mT; filtre, 81,92 (a) et 40,96 (b) ms; gain,  $2 \times 10^5$  (a) et  $1,2 \times 10^5$  (b); vitesse de balayage, 0,06 (a) et 0,24 (b) mT/s, nombre d'accumulations, 2 (a) et 1 (b)

Dans les adduits mito-PPNs-OR (R = Me, Et), on remarque que, dans le DMSO pur, les simulations conduisent à des valeurs de  $a_H$  inférieures à celles obtenues pour les adduits méthyles mito-PPNs-Me (soit,  $a_H < 0.14$  mT). Cette différence  $a_H(\text{OMe}) < a_H(\text{Me})$  a également été observée pour les adduits 3-OH-PPN-OMe et 4-OH-PPN-OMe (Cf. Table 24), même si cela doit être pondéré de la différence de polarité des solvants (DMSO vs tampon) qui joue principalement sur les  $a_N$ .

Dans un second temps, nous avons réalisé le ST d'un radical alcoxy d'encombrement stérique et de lipophilie supérieurs à  $\text{EtO}\bullet$ . Cette série d'expérience sur le radical 1-octylo $\bullet$  (formé à partir du 1-octanol en présence de  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ ) a eu pour but de tester

le comportement des nouvelles mito-PPNs en présence d'un radical alcoxy lipidique susceptible de se former *in vivo*.

Les 4 nouvelles mito-PPNs, mais aussi la mitoPBN ont piégé efficacement le radical  $\bullet\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$  et les spectres obtenus ne montrent pas d'adduits secondaires. La Figure 40 illustre le piégeage du radical 1-octylo $\bullet$  sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et la 4-mito-PPN<sub>8</sub> (b) dans le 1-octanol.



**Figure 40 :** Spectres de RPE et simulation des adduits du radical 1-octO $\bullet$  sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et la 4-mito-PPN<sub>8</sub> (b) obtenus dans le 1-octanol pur. Les paramètres d'enregistrement sont : amplitude de modulation, 0,063 mT (a et b); filtre, 81,92 (a) et 168,84 (b) ms; gain,  $1,2 \times 10^5$  (a) et  $1,6 \times 10^5$  (b); vitesse de balayage, 0,24 (a) et 0,12 (b) mT/s, nombre d'accumulations, 1 (a et b)

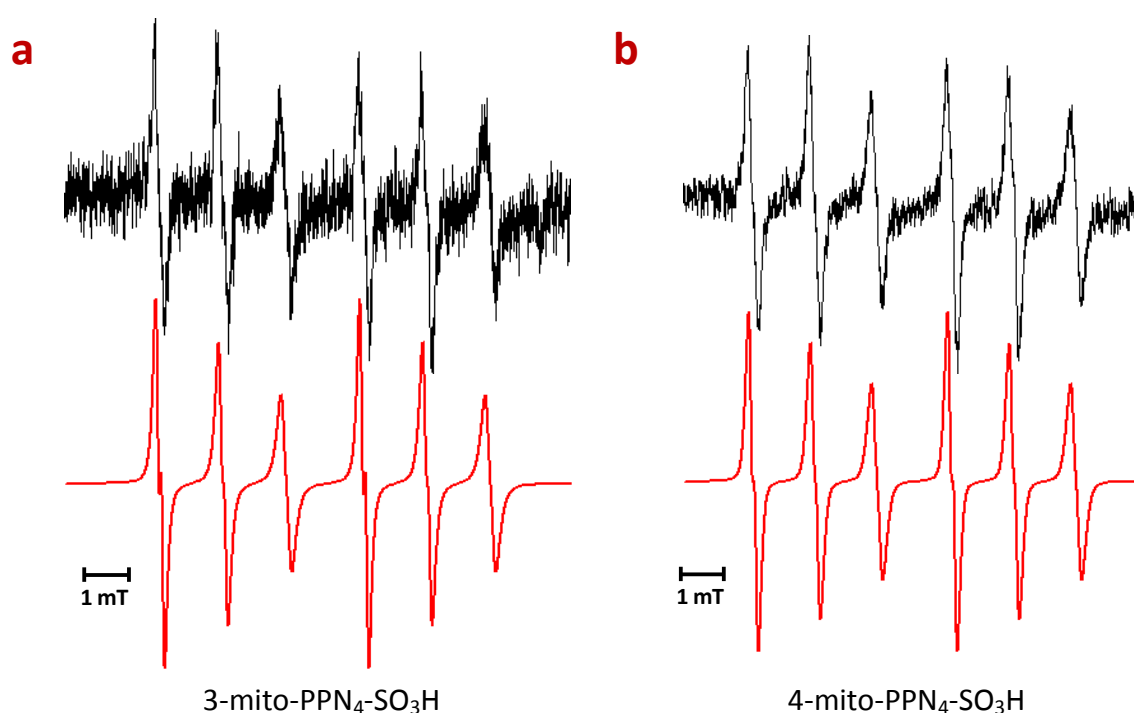
En analysant les produits formés dans la réaction du 1-octanol avec le  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ , Micovic et al.<sup>177</sup> ont isolé le 2-butyltétrahydrofurane comme produit majoritaire. Ce composé résulte d'une cyclisation du radical primaire 1-octO $\bullet$  en un radical carboné cyclique secondaire, thermodynamiquement plus stable. Dans notre étude, si la vitesse de la réaction de ST était très inférieure à celle de la cyclisation, on devrait observer pour chaque mito-PPNs des adduits carbonés, ou bien aucun signal si le radical carboné cyclisé ne s'additionnait pas sur la nitroène. Cependant, les simulations des signaux obtenus avec les quatre mito-PPNs conduisent à des valeurs de  $a_{\text{H}} < 0.14$  mT,

<sup>177</sup> Micovic, V. M.; Mamuzic, R. I.; Jeremic, D.; Mihailovic, M. L. *Tetrahedron*, **1964**, *20*, 2279-2287



du même ordre de grandeur que celles des adduits du radical  $\text{MeO}\bullet$  qui ne peut pas subir de réarrangement. On peut donc en déduire que les adduits détectés sont bien ceux du radical alcoxy 1-octO• (Table 27). Cette propriété des mito-PPNs vis-à-vis des radicaux alcoxy de différentes tailles semble un atout dans l'utilisation de ces pièges dans les milieux cellulaires en situation de stress oxydant.

Enfin, s'agissant du radical  $\text{SO}_3\bullet^-$ , seuls les adduits des mito-PPNs à court linker ( $n = 4$ ) ont été observés en milieu tampon (Figure 41).



**Figure 41:** Spectres de RPE et simulation des adduits du radical  $\text{SO}_3\bullet^-$  sur la 3-mito-PPN<sub>4</sub> (a) et la 4-mito-PPN<sub>4</sub> (b) obtenus en milieu tampon phosphate, pH 7,4. Les paramètres d'enregistrement sont : amplitude de modulation, 0,039 mT; filtre, 40,96 ms; gain,  $3,2 \times 10^5$ ; vitesse de balayage, 0,13 mT/s, nombre d'accumulations, 1

## 4.4 Evaluation du niveau de conservation des adduits méthyle and méthoxy dans l'azote liquide

### Congélation des adduits $\cdot\text{CH}_3$

La Table 28 montre les constantes de couplages des adduits principaux et de décomposition obtenus suite au piégeage du radical méthyle. Dans la Table 29 sont listées les concentrations des adduits avant et après congélation.

**Table 28 :** Constantes de couplage simulées (en mT) des adduits Me-nitronne

Nitronne	Nitronne-Me			Autres adduits		
	$a_N$	$a_H$	$a_P$	$a_N$	$a_H$	$a_P$
PBN	1.627	0.359	—	—	—	—
PPN	1.497	0.345	4.670	1.605	—	—
				1.374	—	3.800
				1.551	0.939/1.319	6.841
3,5-MeO-4-OH-PPN	1.496	0.371	4.623	—	—	—
3,4-OH-PPN	1.498	0.345	4.661	1.635	—	—
3,5-OH-PPN	1.469	0.369	4.685	1.387	—	3.703
3-MeO-4-OH-PPN	1.499	0.346	4.645	—	—	—
3,4,5-OH-PPN	1.496	0.365	4.670	—	—	—
3-OH-PPN	1.486	0.355	4.668	1.385	—	3.774

**Table 29 :** Variation de la concentration de l'adduit Me-nitronne après 4 jours de conservation dans l'azote liquide

Nitronne	% de Nitronne-Me dans la solution		Control non congelé	Congélation 4 jours + 1 min	Congélation 4 jours + 4,5 min
	Avant congélation	Après congélation			
PBN	100	100	78.1	59.1	59.0
PPN	77	75	289.6	204.5	257.4
3,5-MeO-4-OH-PPN	100	100	8.0	8.1	7.5
3,4-OH-PPN	93	96	13.7	12.2	13.5
3,5-OH-PPN	99	99	24.6	21.6	21.4
3-MeO-4-OH-PPN	100	100	12.0	11.9	10.8
3,4,5-OH-PPN	100	100	9.8	10.6	11.0
3-OH-PPN	93	93	34.8	33.9	34.6

La Table 29 montre que la concentration de l'adduit méthyle des PPNs antioxydantes testées, reste stable dans l'azote liquide plusieurs jours.

### Congélation des adduits $\cdot\text{OCH}_3$

La Table 30 montre les constantes de couplages des adduits principaux et de décomposition obtenus suite ou piégeage du radical methoxy. Dans la Table 31 sont listées les concentrations des adduits avant et après congélation.

**Table 30:** Constantes de couplage simulées (en mT) des adduits  $\text{OCH}_3$ -nitronne

Nitronne	Nitronne-Me			Autres adduits		
	$a_N$	$a_H$	$a_P$	$a_N$	$a_H$	$a_P$
PBN	1.389	0.235	—	0.813	—	—
PPN	1.319	0.248	3.899	1.495	—	—
3,5-MeO-4-OH-PPN	—	—	—	Acylnitroxyde	—	—
3,4-OH-PPN	1.284	0.162	3.975	Acylnitroxyde	—	—
3,5-OH-PPN	1.323	0.295	3.852	—	—	—
3-MeO-4-OH-PPN	1.297	0.280	4.025	Acylnitroxyde	—	—
3,4,5-OH-PPN	—	—	—	Acylnitroxyde	—	—
3-OH-PPN	1.321	0.273	3.847	—	—	—

**Table 31:** Variation de la concentration de l'adduit  $\text{OCH}_3$ -nitronne après 4 jours de conservation dans l'azote liquide

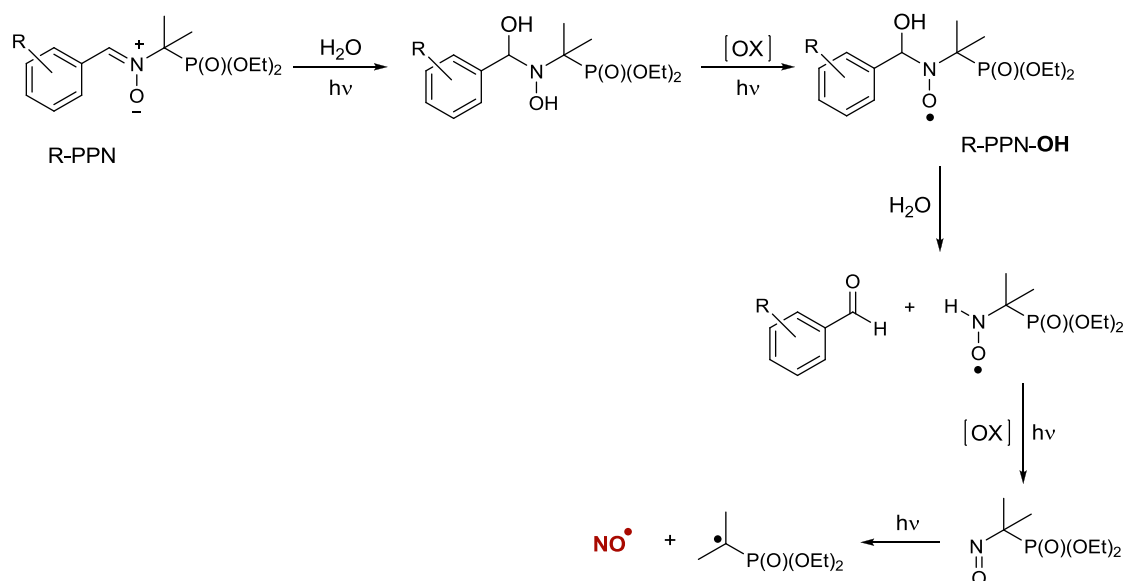
Nitronne	% de Nitronne-Me dans la solution		Control non congelé	Congélation 4 jours + 1 min	Congélation 4 jours + 4,5 min
	Avant congélation	Après congélation			
PBN	75	61	2.3 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>
PPN	97	99	1258.7	1629.9	1769.0
3,5-MeO-4-OH-PPN	NM	NM	—	—	—
3,4-OH-PPN	ND	ND	130.1 <sup>b</sup>	201.4 <sup>b</sup>	187.9 <sup>b</sup>
3,5-OH-PPN	100	100	144.8	159.7	107.3
3-MeO-4-OH-PPN	ND	ND	178.7 <sup>b</sup>	227.7 <sup>b</sup>	217.4 <sup>b</sup>
3,4,5-OH-PPN	NM	NM	—	—	—
3-OH-PPN	100	100	107.5	159.7	107.3

*NM: non mesurable (l'adduit attendu n'est pas détecté). ND: non déterminé (l'adduit attendu est détecté). a: lower receiver gain. b: on considère seulement l'adduit methoxy.*

La Table 31 montre que la concentration de l'adduit methoxy des PPNs antioxydantes testées, reste stable dans l'azote liquide plusieurs jours. Suite à décongélation des échantillons on observe une augmentation de la concentration, ce qui peut dépendre de la réactivation du système de génération du radical.

## 4.5 Détection d'oxyde nitrique libéré lors de l'hydrolyse photolytique de dérivés PPN

Dans le chapitre 1 de ce manuscrit, nous avons décrit le mécanisme proposé par Chamulitrat et al.<sup>91a</sup> (Chapitre 1, Schéma 38) concernant la formation de  $\text{NO}^\bullet$  au cours de la décomposition photolytique de la PBN en milieu aqueux. Sur la base de ces observations, nous supposons que ce même mécanisme s'applique lors de la photolyse de nos nitrones  $\beta$ -phosphorylées (Schéma 95).



**Schéma 95** : Mécanisme proposé pour la libération de  $\text{NO}$  par photolyse des nitrones de type PPN

Par la suite, nous décrirons la mise au point d'une méthode pour détecter le radical  $\text{NO}^\bullet$  avec l'utilisation d'un complexe de  $\text{Fe}^{2+}$  associé à la technique RPE. Cette méthode sera appliquée pour vérifier la libération de  $\text{NO}^\bullet$  dans nos nitrones dérivés de la PPN.

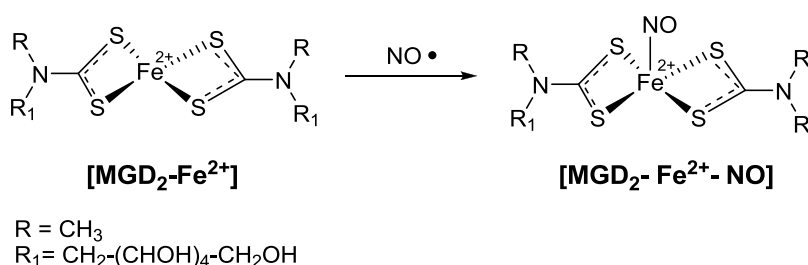
### 4.5.1 Méthode RPE pour la détection $\text{NO}^\bullet$

Chamulitrat et al.<sup>91a</sup> ont démontré le relargage de  $\text{NO}^\bullet$  dans des solutions aqueuses de PBN exposées à la lumière du jour ou à photolyse UV en utilisant un mélange de  $\text{Fe}^{2+}$  (ou de  $\text{Fe}^{3+}$  réduit par l'acide ascorbique) et de la cystéine. Lors de la libération  $\text{NO}^\bullet$  on assiste à la formation du complexe  $[(\text{Cys})_2\text{Fe}(\text{NO})_2]$  détectable par RPE comme un singulet ayant une valeur caractéristique de  $g = 2,03$ .

Cette technique, dans notre cas, n'a pas donné de bons résultats ; en effet nous avons détecté de forts singulets avec  $g_{av} = 2.03$  même en analysant les solutions de contrôle (blancs).

Notre choix s'est donc porté sur un agent plus fiable pour le piégeage de  $\text{NO}^\bullet$ <sup>178</sup>, le complexe hydrosoluble  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+}]$ .

Le MGD (*N*-méthyl-D-glucamine dithiocarbamate) a été synthétisé comme sel de sodium selon la méthode décrite dans la littérature<sup>179</sup> et il a été utilisé pour former le complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+}]$ . Ce complexe est capable de piéger le radical  $\text{NO}^\bullet$ , ce qui donne la formation du complexe mono nitrosyle de fer  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$  qui, à l'analyse RPE, donne un triplet caractéristique<sup>178</sup>.



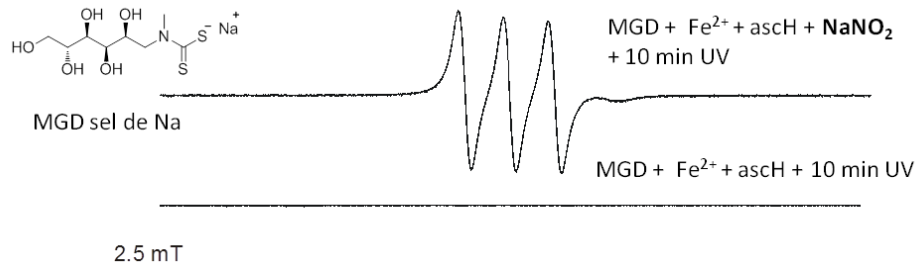
**Schéma 96** : Formation du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$  détectable en RPE

Afin de mettre au point la méthode de détection  $\text{NO}^\bullet$ , nous avons d'abord utilisé le  $\text{NaNO}_2$  (un donneur connu de  $\text{NO}^\bullet$ ) qui a été solubilisé dans l'eau en présence du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+}]$  et d'acide ascorbique (pour éviter l'oxydation aérienne de  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ ). Suite à 10 minutes de photolyse UV, nous avons analysé le mélange par RPE et nous avons détecté le triplet caractéristique du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$  avec  $a_N = 1,257$  mT,  $g_{av} = 2.0413$  (Figure 42).

Ce triplet persiste pendant des heures et il n'est pas détecté dans les échantillons réalisés en absence de  $\text{NaNO}_2$  (blancs), ce qui nous permet d'affirmer que sa formation est strictement liée à la libération et au piégeage de  $\text{NO}^\bullet$ .

<sup>178</sup> (a) Xia, Y.; Zweier, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12705–12710. (b) Venkataraman, S.; Martin, S. M.; Buettner, G. R. *Meth. Enzymol.* **2002**, *359*, 3–18. (c) Pou, S.; Tsai, P.; Porasuphatana, S.; Halpern, H. J.; Chandramouli, G. V. R.; Barth, E. D.; Rosen, G. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 216–226.

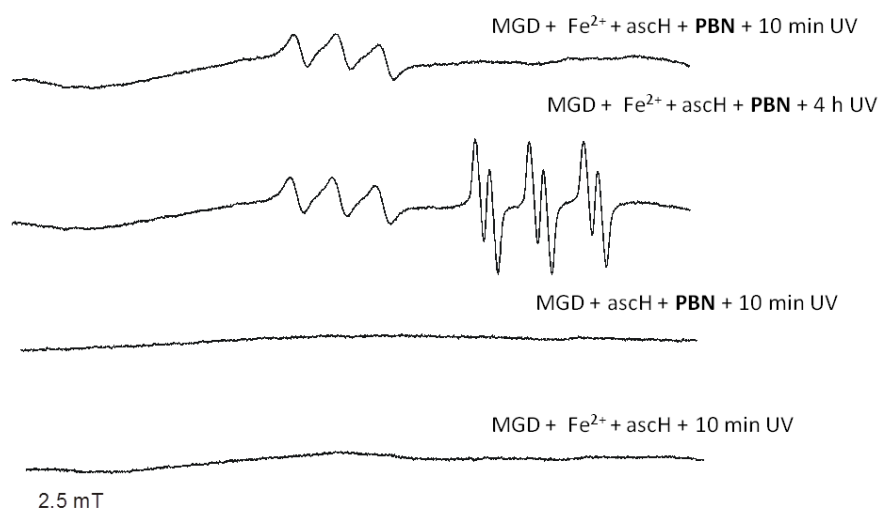
<sup>179</sup> Shinobu, L. A.; Jones, S. G.; Jones, M. M. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1984**, *54*, 189–194.



**Figure 42** : Signal RPE obtenu par photolyse de  $\text{NaNO}_2$  et le blanc respectif (sans  $\text{NaNO}_2$ ).

La même méthode appliquée à la PBN a confirmé la formation du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$  suite à la photolyse de la nitron pendant 10 minutes, en démontrant que le radical  $\text{NO}^\bullet$  est libéré. Dans ce cas, le signal RPE est plus faible que le signal obtenu avec  $\text{NaNO}_2$ , ce qui suggère que la PBN est un donneur de  $\text{NO}^\bullet$  moins efficace (rapport estimé: 2/645).

Le prolongement de la photolyse jusqu'à 4 heures montre la formation supplémentaire d'un adduit de spin sur la PBN, détecté comme un sextuplet  $a_N = 1,598 \text{ mT}$ ;  $a_H = 0,376 \text{ mT}$ ;  $g = 2,0051$  (Figure 43). Ces caractéristiques suggèrent qu'un composé alkyle a été piégé par la fonction nitron de la PBN et la valeur élevée de  $a_H$  indique qu'il est moins encombrant qu'un tertio butyle (tBu).



**Figure 43** : Signaux RPE obtenue par photolyse de la PBN pendant 10 minutes, 4 heures et les spectres des blancs sans  $\text{Fe}^{2+}$  ou sans PBN

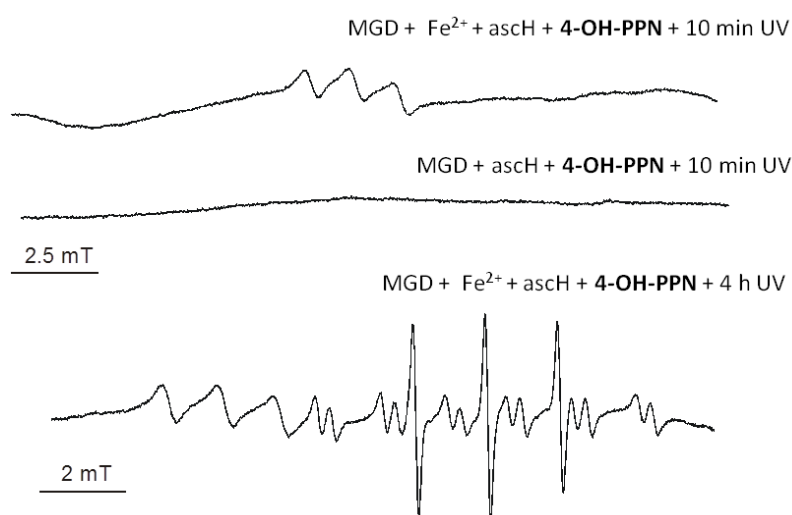
Pour démontrer que la formation du complexe est liée à la libération de  $\text{NO}^\bullet$  et qu'il se forme seulement en présence de tous les réactifs nous avons réalisé des blancs en absence de  $\text{Fe}^{2+}$  ou de la nitrone, ces échantillons n'ont donné aucun signal (Figure 43).

#### 4.5.2 $\text{NO}^\bullet$ libéré par les nitrones de type PPN

Nous avons utilisé la technique qui emploie le complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+}]$  associée à la détection RPE pour évaluer le relargage de  $\text{NO}^\bullet$  à partir de nos nouvelles nitrones dérivées de la PPN.

Le premier composé analysé a été la nitrone de référence 4-OH-PPN (**5**) qui a donné le signal du complexe nitrosyle-fer suite à 10 minutes de photolyse UV. On observe que l'intensité du signal détecté est en relation avec la capacité de donner  $\text{NO}^\bullet$  et dans ce cas, est plus faible que le signal obtenu pour la PBN avec un rapport PBN/4-OH-PPN de 2:0,55.

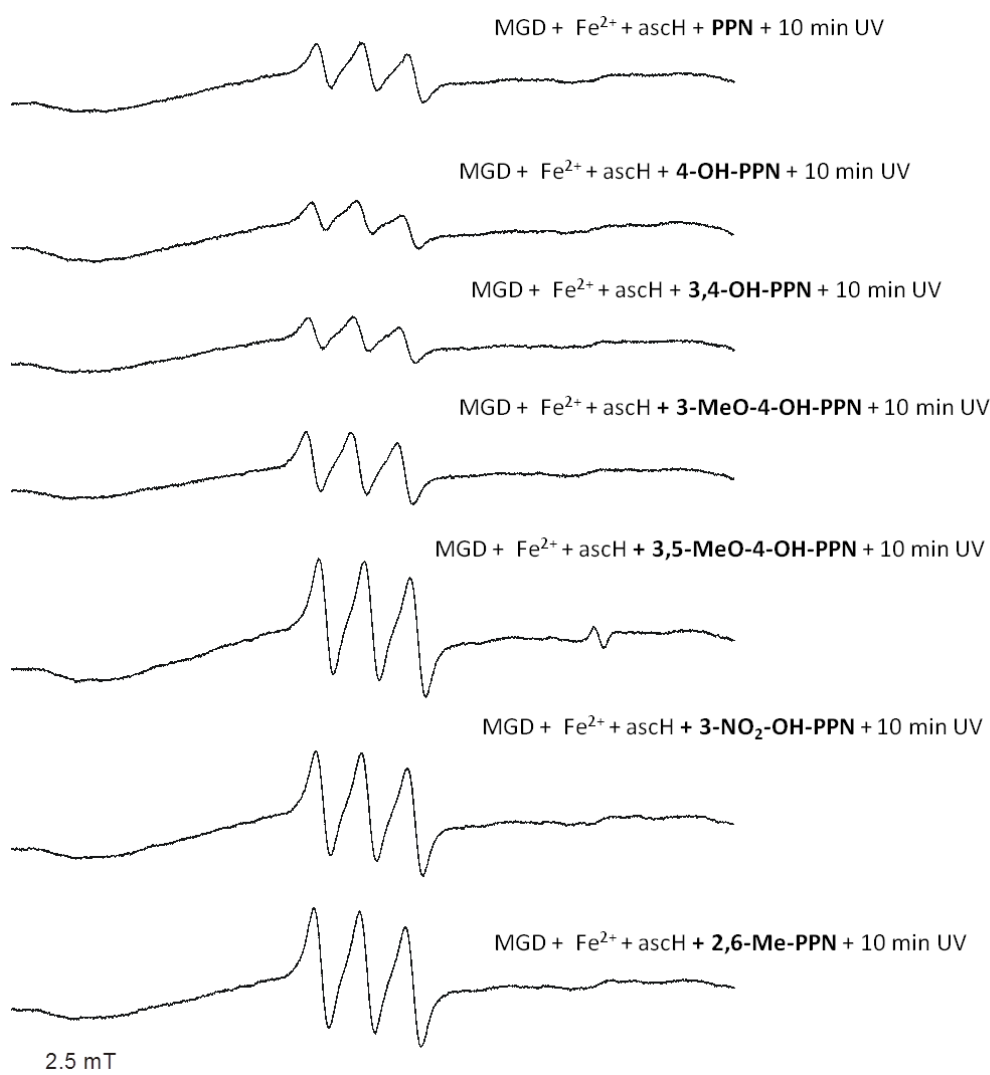
Encore une fois, le prolongement de la photolyse jusqu'à 4 heures montre la formation d'un adduit de spin alkyle de la 4-OH-PPN avec  $a_N = 1,479$  mT;  $a_H = 0,304$  mT;  $a_p = 4.311$  mT;  $g = 2,0055$  (Figure 44). On peut également observer un deuxième adduit, probablement produit de décomposition, qui donne un triplet avec une constante de couplage  $a_N = 1,632$  mT et une valeur de  $g = 2,0053$



**Figure 44** : Signaux RPE détectés suite à photolyse de la 4-OH-PPN pendant 10 minutes ou 4 heures

Parmi nos PPNs, dont le fragment aromatique possède différentes caractéristiques (substituants antioxydants, donneur ou accepteurs d'électrons et groupement avec effet stérique en position *ortho*), nous avons testé une série de composés représentatifs.

Indépendamment du type de substituent sur le cycle aromatique, toutes les PPN ont permis d'observer le triplet caractéristique du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$ . On peut donc affirmer qu'elles sont toutes donneuses de  $\text{NO}^\bullet$ . Cependant on peut observer dans les spectres obtenus dans les mêmes conditions expérimentales une certaine différence (difficile à quantifier en raison de différences de solubilité des composés) sur l'amplitude du signal RPE du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$ .



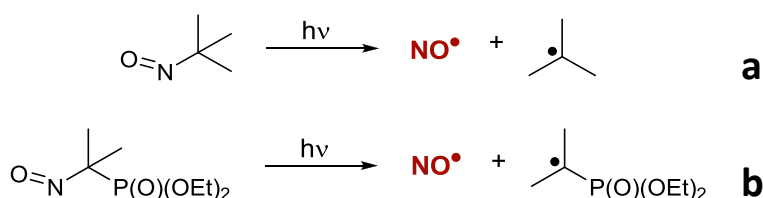
**Figure 45** : Signaux RPE des différentes PPNs testées



Dans la figure ci-dessus (Figure 45) sont illustrés les spectres des différentes nitrones testées (concentration 0,1 M). Les signaux détectés ont été enregistrés avec le même paramètre et avec environ 8 scans pour l'acquisition.

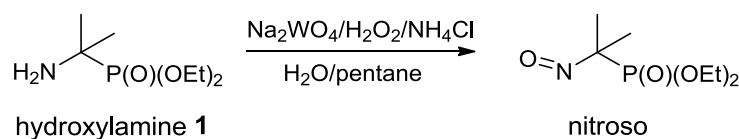
### Mécanisme de relargage du NO par les PPNs

En général, pendant la décomposition photolytique de nitrones de type PBN en solution aqueuse, le  $\text{NO}^\bullet$  est formé par coupure homolytique de la liaison  $t\text{Bu-NO}$  (Schéma 97, **a**). Si ce mécanisme est valable également pour la PPN, la dernière étape devrait impliquer l'homolyse de l'analogie nitroso phosphorylé (Schéma 97, **b**).



**Schéma 97** : Formation de  $\text{NO}^\bullet$  dans la PBN (a) et dans la PPN (b)

Le composé nitroso d'intérêt a été synthétisé selon un protocole précédemment décrit<sup>105</sup> que nous avons légèrement modifié. Ce composé a été préparé comme un mélange non séparables avec  $\text{NO}_2\text{-C}(\text{Me})_2\text{-P}(\text{O})(\text{OEt})_2$  (**2**).



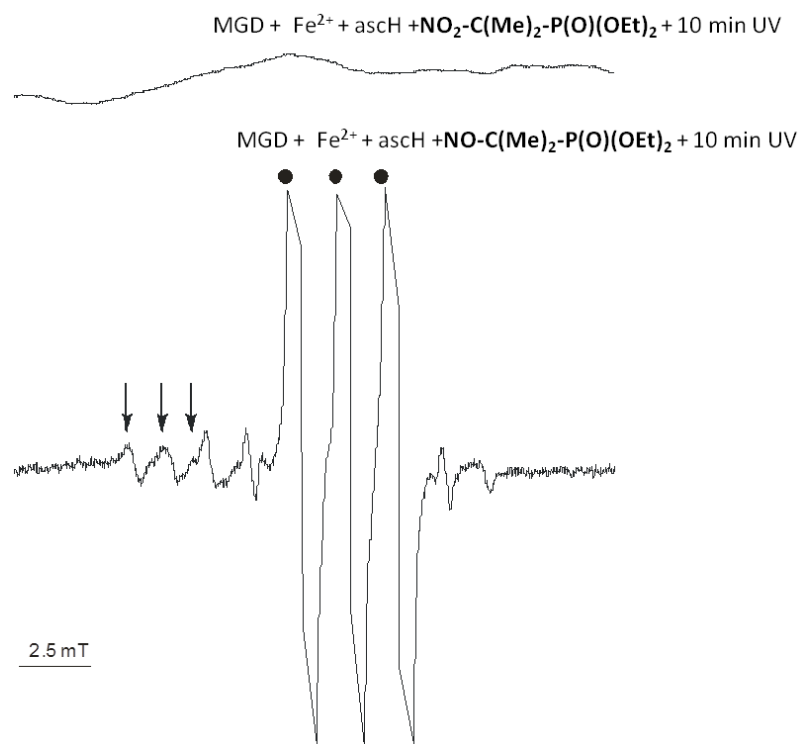
**Schéma 98**: Synthèse du composé nitroso

Le composé nitro (**2**), dont la synthèse est décrite dans le Chapitre 2 de ce manuscrit, a été testé pour control négatif. Comme attendu, dans les conditions utilisées pour les autres nitrones, aucun signal RPE du complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$  a été détectée.

Au contraire, le composé nitroso dissous dans de l'eau (0,1 M, concentration finale) en absence des autres réactifs montre un mélange de nitroxydes, contenant le signal du triplet de dégradation, suffisamment fort pour permettre la détermination du

couplage du  $^{13}\text{C}$  ( $a_{\text{N}} = 1,606$ ;  $a_{13\text{-C}} = 0,60$  mT;  $g = 2,0070$ ), et un nitroxyde diphosphorylé ne contenant pas d'atome d'hydrogène en  $\beta$  ( $a_{\text{N}} = 0,991$ ;  $a_{\text{P}1} = 3,061$ ;  $a_{\text{P}2} = 1,304$  mT;  $g = 2,0080$ ) qui peut se former par scission de la liaison N-C.

Lorsque le complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+}]$  et l'ascH sont ajoutés à la solution aqueuse du nitroso et le mélange est photolysé pendant 10 min (ou laissé au repos dans la lumière du jour pendant 4 h) on peut détecter le complexe  $[\text{MGD}_2 - \text{Fe}^{2+} - \text{NO}]$ .



**Figure 46:** Signal obtenu après photolyse du nitroso phosphorylé. ↓: complexe  $[\text{MGD}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}]$ ; ● : triplet de décomposition (signal saturé).

Dans le spectre on observe également le triplet très intense ( $a_{\text{N}} = 1,610$  à  $1,612$ ;  $a_{13\text{-C}} = 0,60$  mT;  $g = 2,0064$  à  $2,0068$ ) et un nitroxyde diphosphorylé ayant des constantes de couplages significativement plus élevées ( $a_{\text{N}} = 1,300$  à  $1,330$ ;  $a_{\text{P}1} = 3.800\text{-}3.840$ ;  $a_{\text{P}2} = 2,670$  à  $2,700$  mT;  $g = 2,0068$  à  $2,0070$ ) qui pourrait être la conséquence de la coordination par le complexe de fer.

### Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre une étude RPE de nos nouvelles nitrones basée sur le piégeage de radicaux centrés sur le carbone, l'oxygène, l'azote et le soufre a été menée. Cette étude nous a permis d'établir sur nos PPNs, une base de données sur les adduits nitroxydes formés. En général nous avons observé que toutes les nitrones hybrides, dérivées de la PPN, piègent efficacement les radicaux centrés sur le carbone à l'exception des nitrones avec un substituant en *ortho*. On suppose que leur manque de réactivité est dû à l'encombrement stérique du composé. Lors de l'obtention des adduits superoxydes pour les nitrones 4-OH-PPN **5**, 3-OH-PPN **10**, 3,5-OH-PPN **12**, 4-NO<sub>2</sub>-PPN **15**, 4-CO<sub>2</sub>H-PPN **16**, 4-AcNH-PPN **18** et 3-NO<sub>2</sub>-PPN **20** on observe que la substitution avec un groupement électron-attracteur augmente la vitesse d'addition de radical superoxyde et permet d'obtenir de spectres plus intenses. Les quatre nitrones, 3,5-OMe-4-OH-PPN **6**, 3,4-OH-PPN **7**, 3-OMe-4-OH-PPN **8** et 3,4,5-OH-PPN **9**, portant des groupements dérivés des acides phénoliques naturels à activité antioxydante ne montrent pas d'adduits pour le radical superoxyde. Dans ce cas on peut supposer une probable compétition entre la réactivité du carbone de la nitrone et les fonctions hydroxyles sur le cycle aromatique; il est probable que le radical soit réduit par le proton de l'hydroxyle plutôt que s'ajouter au carbone en  $\alpha$  de l'azote. Une étude RPE démontrant la propriété de donneurs de NO<sup>•</sup> de ce type de nitrones à été également réalisée. Toutes les PPNs ont permis de détecter le triplet caractéristique du complexe formé lors de la libération de NO<sup>•</sup>, indépendamment du type de substituant sur le cycle aromatique. Cette propriété est très importante au vu de l'implication de ce radical dans plusieurs fonctions biologiques, en particulier au niveau cardiovasculaire où il favorise la vasorelaxation de l'endothélium des vaisseaux sanguins.

Pour ce qui concerne les nitrones vectorisées, nous nous sommes focalisés essentiellement sur les radicaux alkyles et alkoxydes, espèces représentatives des radicaux issus de la peroxydation lipidique. Nous avons démontré que ces nouvelles nitrones peuvent réagir avec des radicaux alkyles et alkoxydes de petite taille ainsi qu'avec des espèces de dimension plus élevée proche de celle de radicaux lipidiques. Nous pouvons ainsi envisager leur potentielle utilisation pour contraster les effets de la peroxydation lipidique sur la membrane mitochondriale.



# CHAPITRE 5

**Evaluation de l'activité antioxydante des  
PPNs et étude de l'effet protecteur dans  
un modèle d'endothélium aortique**



## 5.1 Mesure de la capacité antioxydante des nouvelles nitrones

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à réagir avec les radicaux libres qui sont transformés en composés plus stables, de manière à inhiber ou réduire les dommages oxydatifs. En général tous les antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle sont caractérisés par la présence des groupes hydroxyphénoliques auxquels est attribuée la capacité antioxydante de ces composés.

L'activité antioxydante peut être évaluée en utilisant plusieurs méthodes qui diffèrent entre elles par le type de radical utilisé. En général il s'agit de mesures indirectes du pouvoir antioxydant qui consistent à quantifier la disparition ou la formation d'un produit spécifique.

Le principal problème dans la mesure de l'activité antioxydante dérive du fait que les espèces radicalaires impliquées dans la détermination de stress oxydatif sont nombreuses et réagissent avec des mécanismes différents.

De plus, la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, rendent extrêmement difficile déterminer une méthode d'analyse qui permet de mesurer sans ambiguïté la capacité d'un composé de réagir avec les radicaux.

Pour ces raisons il est nécessaire de combiner des tests différents et complémentaires pour avoir une indication exacte sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.

Dans notre étude nous avons mesuré l'activité antioxydante avec cinq différents tests:

- le test du DPPH (diphényl-picrylhydrazyle);
- les méthodes TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) qui mesurent la capacité de piéger les radicaux de type peroxyde  $ROO^{\bullet}$ ;
- le test d'inhibition de la xanthine oxydase;
- le test du quenching du superoxyde qui mesure directement la capacité à piéger le superoxyde.

Cette étude nous permettra de sélectionner les composés ayant la meilleure activité antioxydante pour évaluer leur effet *ex vivo* dans un modèle biologique d'endothélium aortique.

### 5.1.1 Mesure du pouvoir antioxydant par le test DPPH

Le **test DPPH**, largement employé dans la littérature<sup>180</sup>, permet dans notre cas, de déterminer par spectrophotométrie UV-visible la capacité d'un composé à réduire le radical persistant **DPPH<sup>•</sup>** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

Il s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

Le DPPH<sup>•</sup> est un radical stable centré sur l'azote, il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig.1). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH<sup>•</sup> reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire.

La solution de DPPH<sup>•</sup> est caractérisée par une coloration violette avec un maximum d'absorbance dans le visible à 517 nm en solution alcoolique.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant donneur d'hydrogène (**AH**) se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue (Schéma 99), due à une génération progressive de sa forme réduite, qui correspond à une **diminution de l'absorbance** à 517 nm.

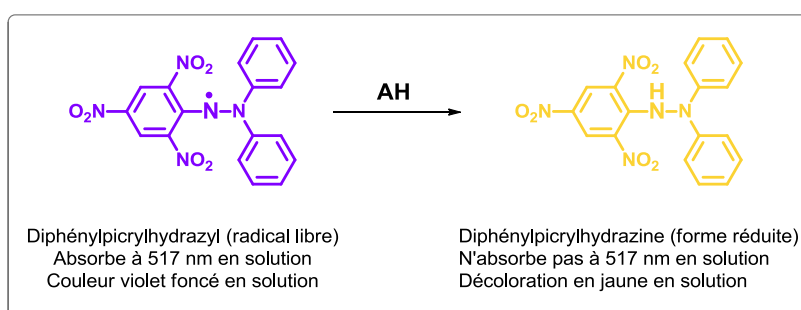


Schéma 99: Réduction du radical DPPH

Le test du DPPH est souvent utilisé pour effectuer un premier screening sur de nombreux composés et permet une rapide comparaison entre les molécules testées. Par ailleurs, pour des raisons stériques, ce test privilégie les petites molécules ayant un meilleur accès au site radicalaire<sup>181</sup>.

<sup>180</sup> Molyneux, P. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2004**, 26 (2), 211-219

<sup>181</sup> Huang, D. J.; Ou, B. X.; Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841-1856



Dans notre étude l'antioxydant est testé avec un gradient de concentrations, ce qui permet l'obtention d'une courbe de la mesure de l'absorbance, à 517 nm, en fonction de la concentration de l'antioxydant.

Les résultats sont exprimés selon l'EC<sub>50</sub> (µM) qui correspond à la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50% l'absorbance initiale du DPPH. Plus cette concentration est faible, plus le composé est considéré comme antioxydant.

### 5.1.2 Mesure du pouvoir antioxydant par les tests TRAP et ORAC

Les tests TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Potential) et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) sont les méthodes plus fréquemment utilisées pour évaluer la capacité d'un antioxydant à inhiber l'action de radicaux peroxytes<sup>182</sup>. Les deux tests utilisés dans notre laboratoire sont basés sur la mesure de la protection exercée par une substance ou molécule donnée contre l'oxydation d'un substrat par les radicaux dérivés du 2,2'-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH).

L'AAPH est le précurseur d'un radical persistant. Il se décompose spontanément sous l'effet de la température (37°C) en radicaux centrés sur le carbone; ces derniers en présence d'oxygène donnent des radicaux peroxytes (Schéma 100).

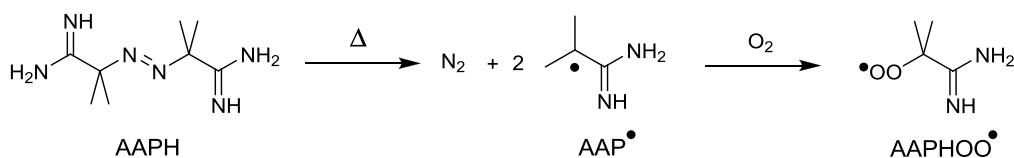


Schéma 100 : Décomposition thermique de l'AAPH

Les peroxytes générés par la dégradation thermolytique de l'AAPH vont oxyder le substrat en une molécule luminescente (TRAP) ou fluorescente (ORAC). Cette oxydation se traduit par une variation de l'intensité de la lumière émise qui peut être suivie par une cinétique. En présence d'un composé antioxydant, l'oxydation du substrat (et donc la variation de la luminescence ou fluorescence) sera observée avec un retard relatif au pouvoir antioxydant du composé.

Le calcul de l'effet protecteur dérive de l'intégration de l'aire sous la courbe (AUC) entre l'échantillon (substrat+AAPH+antioxydant) et le blanc (substrat+AAPH),

<sup>182</sup> Prior R.L.; WU, X.; Schaich, K. J. *Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290-4302

coïncidant avec la quantité de radicaux inhibés. Les résultats sont exprimés par rapport à la protection exercée par un antioxydant de référence, le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique).

### 5.1.2.1 Principe du test TRAP

La méthode TRAP est basée sur la mesure de la chimioluminescence<sup>183</sup> émise du luminol (3-aminophthalhydrazide) en présence d'AAPH. Le luminol subit une décomposition oxydative<sup>184</sup> par les radicaux peroxydes qui conduit à un produit dans un état excité. Ce produit revient ensuite à l'état fondamental en émettant de la lumière (Schéma 101).

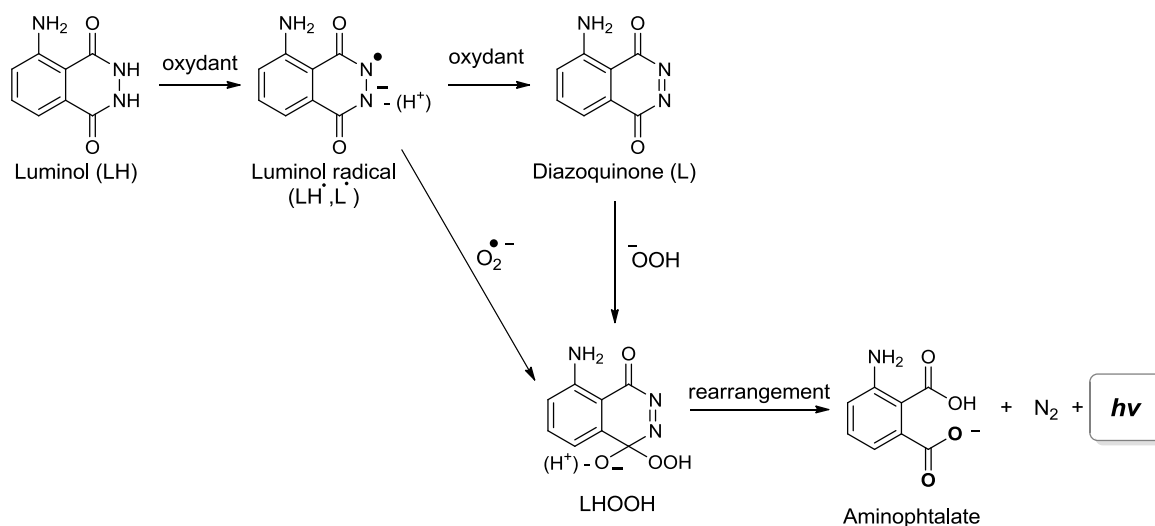


Schéma 101 : Mécanisme d'oxydation du luminol (d'après Malherbe et al.)<sup>185</sup>

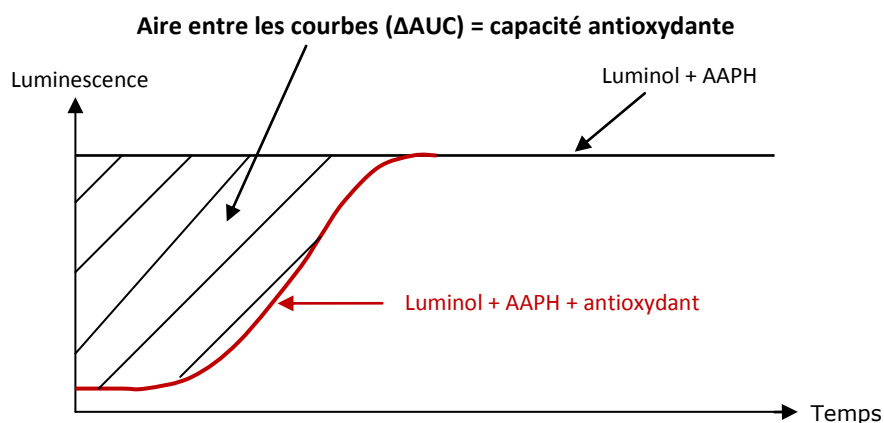
Lorsque le luminol est soumis à un stress radicalaire induit par l'addition d'AAPH, sa luminescence est stable au cours du temps<sup>186</sup> (Figure 47). En présence d'une activité anti-radicalaire (composé, produit naturel...), le luminol est protégé de l'attaque des radicaux et sa luminescence est au plus bas. Puis, au fur et à mesure du temps, la protection du composé antiradicalaire diminue et la luminescence revient au niveau de base.

<sup>183</sup> Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Castillo, M. D. D., *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 18, 153-158

<sup>184</sup> Rose, A. L.; Waite, T. D. *Anal. Chem* **2001**, 73, 5909-5920

<sup>185</sup> Malherbe, C. J.; de Beer, D.; Joubert, E. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 3101-3133

<sup>186</sup> Dresch, M.T.K.; Rossato, S.B.; Kappel, V.D.; Biegelmeyer, R.; Hoff, M.L.M.; Mayorga, P.; Zuanazzi, J.A.S.; Henriques, A.T.; Moreira, J.C.F. *Anal. Biochem.* **2009**, 385, 107-114



**Figure 47** : Rétablissement de la luminescence en présence d'AAPH et d'un antioxydant.

La lecture de la luminescence de la solution se fait toutes les 2 minutes ce qui permet d'obtenir une cinétique de dégradation du luminol (qui se manifeste comme une augmentation de la luminescence) en fonction du temps, qui sera ralentie par les antioxydants présents.

Le pouvoir antiradicalaire peut être quantifié par la mesure de la différence entre les aires sous la courbe en présence ( $AUC_{\text{échantillon}}$ ) et ou en absence ( $AUC_{\text{blanc}}$ ) d'un composé antioxydant<sup>187</sup>.

$$\Delta AUC = AUC_{\text{blanc}} - AUC_{\text{échantillon}}$$

Les résultats sont calculés en tenant compte de  $\Delta AUC$  de chaque échantillon et de  $\Delta AUC$  du standard Trolox® à différentes concentrations. Ces valeurs, exprimées en micromoles de Trolox® équivalent (**TE**), sont issues de la projection de la valeur  $\Delta AUC$  de chaque échantillon sur la courbe de tendance de différents  $\Delta AUC$  du Trolox® reportés à la concentration de produit testé.

### 5.1.2.2 Principe du test ORAC

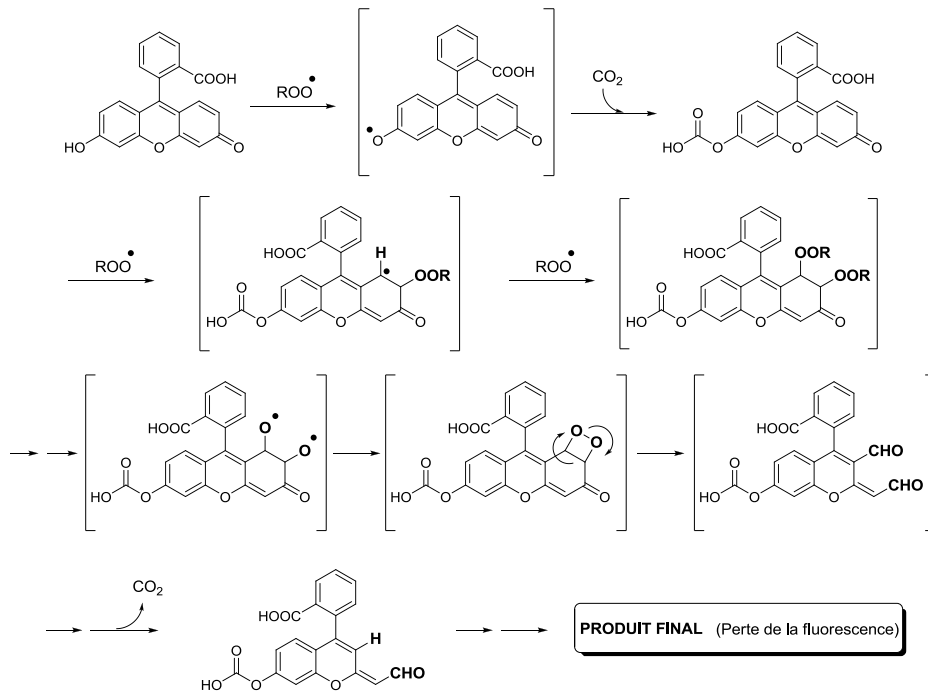
Le test ORAC repose sur le même principe du TRAP, mais est réalisé en spectrofluorimétrie et consiste en une mesure de la protection exercée par un antioxydant contre l'oxydation de la fluorescéine<sup>188</sup>.

Lorsque la fluorescéine est soumise à l'action oxydante d'un radical libre, l'AAPH, on observe que sa réponse en fluorescence diminue au cours du temps. La fluorescéine

<sup>187</sup> Bastos, E.L.; Romoff, P.; Eckert, C.R.; BAADER, W.J. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, 51, 7481-7488

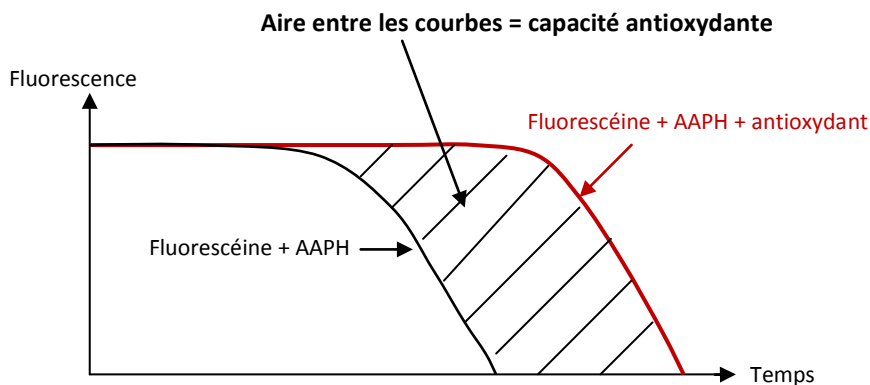
<sup>188</sup> Dávalos, A.; Gomez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, 52, 48-54

est oxydée par les radicaux libres provenant de l'AAPH et subit une série des transformations qui donnent un produit final non fluorescent (Schéma 102)<sup>189</sup>.



**Schéma 102** : Mécanisme d'oxydation de la fluorescéine en présence d'AAPH (d'après Ou et al.)<sup>189</sup>

En présence d'une activité antiradicalaire, la fluorescéine est protégée du stress et la durée de sa fluorescence est augmentée (Figure 48). C'est cette **augmentation qui permet de quantifier le pouvoir antiradicalaire** via un étalonnage par le Trolox®.



**Figure 48** : Décroissance de la fluorescence en présence d'AAPH et d'un antioxydant.

<sup>189</sup> Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 4619-4626

Les résultats sont calculés en tenant compte de l'aire sous la courbe (AUC) de chaque échantillon et du standard (Trolox®) pour l'ensemble de concentrations étudiées. L'AUC est calculée selon l'équation<sup>190</sup> :

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=70} fi/f0$$

Où  $f_0$  est la lecture de la fluorescence initiale et  $fi$  est la lecture de la fluorescence au temps  $i$ .

Les valeurs relatives ORAC sont exprimées en équivalent Trolox® (TE) ; elles sont issues de la projection de la valeur de l'AUC de chaque composé ( $AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}$ ) sur la courbe de régression linéaire de valeurs des AUC du Trolox® ( $AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}}$ ) à différentes concentrations.

### 5.1.3 Mesure du pouvoir antioxydant par l'inhibition de la xanthine oxydase et du quenching du superoxyde

Le test du quenching du superoxyde permet d'évaluer la capacité d'un composé à piéger le radical superoxyde produit par la xanthine oxydase (XO). Pour une exacte quantification de l'activité de piégeage du superoxyde, il est important de s'assurer que le composé testé ne soit pas un inhibiteur de l'enzyme XO.

De ce fait, nous allons effectuer un premier screening des nos produits avec le test d'inhibition de la XO afin de vérifier leur attitude à inhiber cet enzyme.

Si les produits n'inhibent pas l'enzyme on aura la certitude que la diminution du superoxyde lors du test du quenching est due exclusivement au piégeage par le composé antioxydant et non à une éventuelle inhibition de l'enzyme XO.

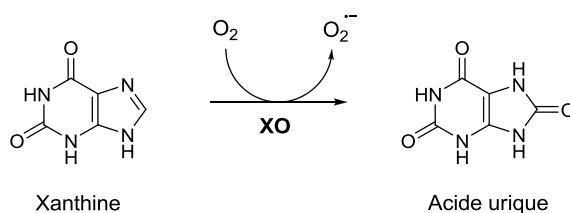
#### 5.1.3.1 Principe du test d'inhibition de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine.

Lors de l'oxydation de la xanthine on observe la production d'acide urique, caractérisé par un maximum d'absorbance à 290 nm, et de radical superoxyde (Schéma 103).

---

<sup>190</sup> Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Suberviola, J.; Gomez-Cordovés, C. *Pol. J. Food Nutr.Sci.* **2003**, 12(53), 133-136



**Schéma 103** : Oxydation de la xanthine en acide urique par la Xanthine Oxydase

L'ajout d'un inhibiteur de l'enzyme XO dans le milieu réactionnel aura pour effet de diminuer la concentration d'acide urique. Il s'ensuit qu'on pourra évaluer la capacité d'un composé d'inhiber la XO en mesurant la quantité d'acide urique formé par spectrophotométrie<sup>191</sup>.

L'activité des différents composés testés est comparée à des inhibiteurs connus de cette enzyme à savoir l'allopurinol et la quercétine<sup>192</sup>.

### 5.1.3.2 Principe du test du quenching du superoxyde

Le test du quenching du superoxyde est basé sur la mesure de la luminescence de la lucigénine lors de son oxydation par le superoxyde produit par la xanthine oxydase.

Dans ce test le substrat utilisé pour générer le superoxyde par la xanthine oxydase est l'allopurinol qui est au même temps un inhibiteur de l'enzyme et agit sur la XO en deux étapes<sup>193</sup>. Dans un premier temps l'allopurinol est reconnu par le site actif de l'enzyme, à cause de sa structure similaire à l'hypoxanthine/xanthine, et oxydé à oxypurinol, ce qui engendre la production du radical superoxyde (Schéma 104).

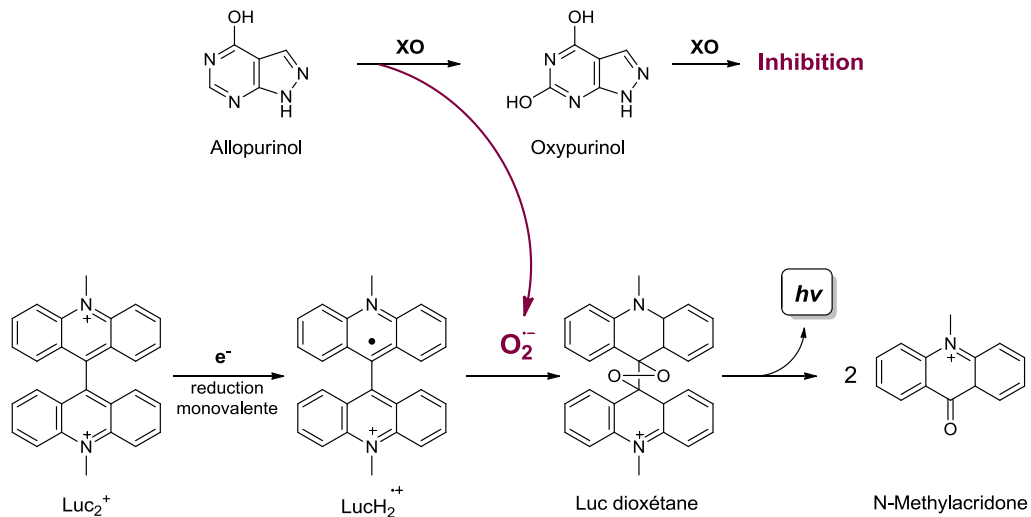
Dans un deuxième temps, l'oxypurinol dérivé de l'oxydation de l'allopurinol bloque le site actif de la XO et inhibe son activité.

---

<sup>191</sup> Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D.V. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 71-76.

<sup>192</sup> daSilva, S.L.; daSilva, A.; Honorio, K.M.; Marangoni, S.; Toyama, M.H. *J. Mol. Struct.*, **2004**, 684, 1-7

<sup>193</sup> Stoica, B. A.; Bordeianu, G.; Stanescu, R.; Serban, D.N.; Nechifor, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, 16, 753-761



**Schéma 104:** Mécanisme de l'oxydation de la lucigénine par le superoxyde généré par la XO

La lucigénine ( $\text{Luc}_2^{2+}$ ) est utilisée comme détecteur de la production en radical superoxyde, lors de la première étape, par chimioluminescence.

La  $\text{Luc}_2^{2+}$  subit une réduction univalente pour générer le radical cation  $\text{LucH}_2^{2+}$ , qui par réaction avec  $\text{O}_2^{\bullet -}$  va former un intermédiaire dioxétane instable, qui va spontanément se cliver pour produire la  $N$ -méthylacridone sous sa forme excitée, qui en se relaxant, va émettre de la lumière (Schéma 104).

Ainsi le piégeage de l'anion superoxyde résulte d'une diminution de cette luminescence. De ce fait la capacité d'un antioxydant à piéger l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet -}$  émis par le système allopurinol/XO se manifeste par sa protection exercée contre l'oxydation de la lucigénine.

Les résultats sont exprimés en fonction de l' $\text{EC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) qui est définie comme la concentration efficace pour réduire de 50% la luminescence de la lucigénine. L'allopurinol et la quercétine sont utilisés comme produit de référence.

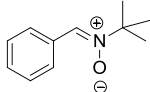
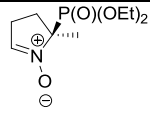
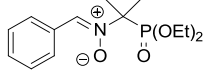
### 5.1.4 Interprétation des résultats

Les nitrones synthétisées ont été testées afin d'évaluer leurs capacités antioxydantes en utilisant les méthodes décrites ci-dessus. Les composés ont été comparés à des produits naturels de référence tels que, le Trolox, la quercétine et les acides caféique, sinapique et férulique; ainsi qu'à des nitrones cycliques et acycliques déjà utilisées dans le laboratoire.

La Table 32 résume tous les résultats pour les nitrones dans les différents tests effectués. Les valeurs du test DPPH sont exprimées en EC<sub>50</sub> (μM), c'est-à-dire la concentration nécessaire pour diminuer de 50% l'activité du DPPH; les valeurs de TRAP et ORAC sont données en Equivalent de Trolox (TE). Les valeurs d'inhibition de la xanthine oxydase et du test du superoxyde sont données en IC<sub>50</sub> (μM) qui représente la concentration de produit avec laquelle on observe 50% d'inhibition.

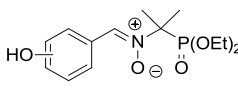
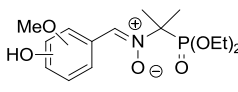
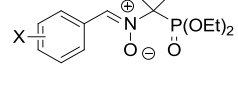
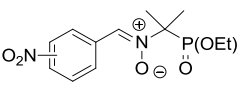
Pour simplifier la discussion les nitrones sont divisées en six séries selon le type de substituant sur le cycle aromatique.

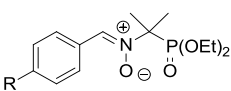
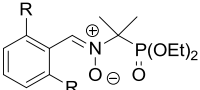
**Table 32:** Résultats des tests antioxydants

Structure	R	Composé	DPPH	TRAP	ORAC-FL	Superoxide quenching	AlogP
			EC <sub>50</sub> (μM)	TE	TE	IC <sub>50</sub> (μM)	
		Trolox	22,67 ± 2,73	1,00	1,00	15,5	2,73
		Acide caféique	17,47 ± 3,49	3,63 ± 0,11	4,67 ± 0,33	0,60 ± 0,03	1,25
		Acide sinapique	34,67 ± 2,56	—	—	—	—
		Acide férulique	61,22 ± 9,77	—	—	—	—
		Quercétine	13,85 ± 3,42	6,38 ± 0,06	6,35 ± 0,56	0,9 ± 0,2	1,35
		PBN	> 1000	< 0,015	< 0,015	> 40000	1,40
		DEPMPO	> 1000	< 0,015	0,42 ± 0,15	990	0,47
	-	<b>4 / PPN</b>	>1000	< 0,015	0,56 ± 0,16	350	1,65



CHAPITRE 5 Evaluation de l'activité antioxydante des PPNs et étude de l'effet protecteur dans un modèle d'endothélium aortique

Hydroxy- Substituted Nitrones							
	4-OH	<b>5</b> <b>4-OHPPN</b>	> 1000	0,58 ± 0,37	—	—	1,33
	3-OH	<b>10</b>	> 1000	< 0,06	—/	500	1,32
	2-OH	<b>11</b>	> 1000	0,57 ± 0,37	—	30	1,30
	3,4-OH	<b>7</b>	<b>21,58 ± 2,41</b>	<b>2,78 ± 0,35</b>	<b>3,20 ± 0,19</b>	<b>0,35</b>	1,26
	3,5-OH	<b>12</b>	> 1000	1,52 ± 0,49	1,39 ± 0,0,37	270	1,26
	2,4-OH	<b>13</b>	> 1000	1,92 ± 0,68	3,82 ± 0,41	—	1,25
	3,4,5-OH	<b>9</b>	<b>18,62 ± 2,23</b>	<b>1,77 ± 0,20</b>	<b>1,98 ± 0,26</b>	<b>0,20</b>	0,94
Hydroxy- and methoxy-Substituted Nitrones							
	4-OH, 3-OMe	<b>8</b>	<b>254,6 ± 86,9</b>	<b>2,15 ± 0,13</b>	<b>3,72 ± 0,40</b>	<b>80</b>	1,39
	4-OH, 3,5-OMe	<b>6</b>	<b>190,7 ± 125,6</b>	<b>1,7 ± 0,25</b>	<b>3,70 ± 0,17</b>	<b>210</b>	1,40
Halogeno-Substituted Nitrones							
	4-F	<b>19</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	160	1,64
	3-F	<b>22</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	210	1,60
	2-F	<b>23</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	890	1,60
	2,6-F	<b>24</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	600	1,73
	2-CF <sub>3</sub>	<b>26</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	—	2,34
	4-Cl	<b>14</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	—	2,10
Nitro-Substituted Nitrones							
	4-NO <sub>2</sub>	<b>15</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	—	1,65
	3-NO <sub>2</sub>	<b>20</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	—	1,63
	2-NO <sub>2</sub>	<b>21</b>	> 1000	< 0,015	< 0,015	230	1,63

Acetamido- or Carboxy-Substituted Nitrones							
	NHAc	18	> 1000	< 0,015	< 0,015	760	1,39
	CO <sub>2</sub> H	16	> 1000	< 0,015	< 0,015	—	1,28
	CO <sub>2</sub> Et	17	> 1000	0,16 ± 0,02	0,42 ± 0,05	—	2,00
Dialkyl-Substituted Nitrones							
	Me	25	> 1000	< 0,015	< 0,015	—	1,98

D'après les résultats obtenus et représentés dans la Table 32 on peut remarquer que seulement les séries de nitrones comportant des fonctions OH situées sur le cycle aromatique permettent d'obtenir des résultats intéressants.

On observe en particulier que les nitrones les plus actives sont celles comportant un motif dérivé des acides phénoliques naturels décrits dans le chapitre 2, à savoir les composés 3,5-OMe-4-OH-PPN **6**, 3,4-OH-PPN **7**, 3-OMe-4-OH-PPN **8** et 3,4,5-OH-PPN **9**. Dans la série de nitrones substituées seulement avec des **fonctions hydroxyles** on peut constater que les composés **7** et **9**, possédant respectivement 2 et 3 groupement OH, permettent d'observer les résultats les plus intéressants. Ces résultats peuvent s'inscrire dans la lignée des observations décrites par Amorati R. et Valgimigli L.<sup>99</sup> selon lesquelles la présence des OH en position spécifiques augmente le pouvoir antioxydant. Les deux composés sont très actifs vis-à-vis du radical DPPH (Figure 49) avec un EC<sub>50</sub> autour de 20 µM, inférieure à celle du Trolox (~ 23 µM) et proche de l'acide caféique (~ 18 µM). Une bonne activité antioxydante est observée également pour les composés **7** et **9** dans le cas du test TRAP : les résultats montrent que ces deux nitrones sont environ deux fois plus actives que le Trolox.

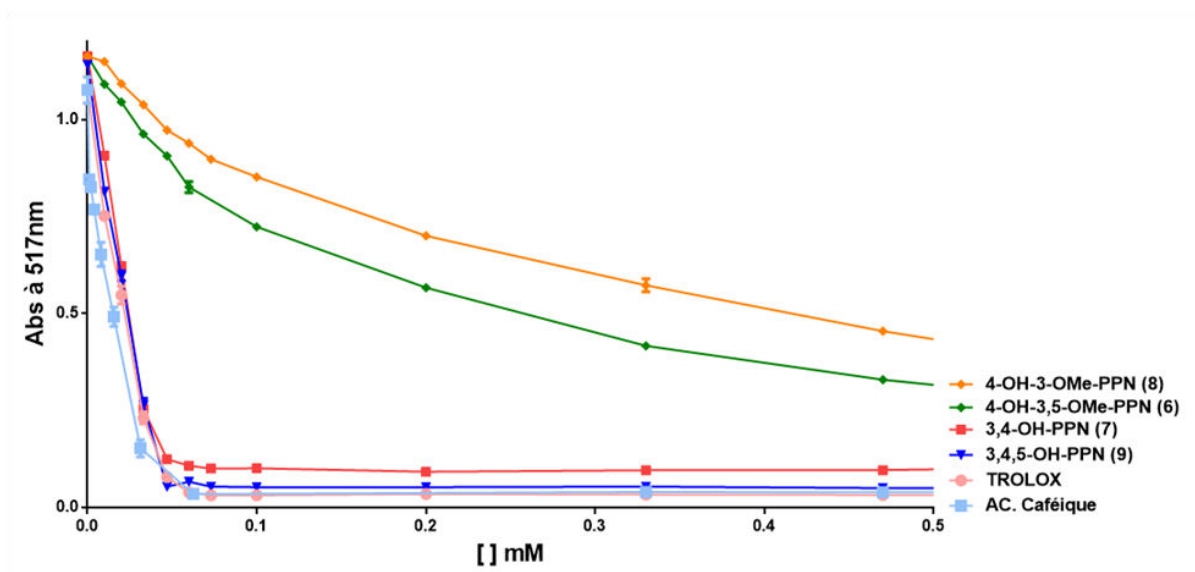


Figure 49 : Courbes d'évolution de l'absorbance du DPPH en présence des nitrones actives

Les nitrones **6** et **8**, possédant une fonction hydroxyle en position *para* et des **groupements methoxy** en *mé*ta, montrent également une activité deux fois supérieure à celle du Trolox dans le test TRAP. Leur réactivité vers le radical DPPH (Figure 49) est au contraire plus faible par rapport aux composés **7** et **9** ayant seulement des groupements OH.

En général, on observe que la substitution d'une fonction OH avec un groupement methoxy entraîne une diminution de l'activité antioxydante, néanmoins la présence d'un deuxième methoxy sur le cycle aromatique (composé **6**) augmente la réactivité vers les radicaux par rapport au composé **8**, en raison de la capacité à stabiliser l'aromatique par effet mésomère *+M*.

Pour une concentration donnée de 80  $\mu$ M (concentration la plus élevée testée), toutes les nitrones ne sont pas actives vis-à-vis du test d'inhibition de la xanthine oxydase (données non montrées). La quercétine (composé de référence) se trouve être le seul composé capable de cette inhibition avec une valeur de  $IC_{50} = 3.6 \pm 0.08 \mu$ M.

Pour ce qui concerne les résultats du quenching du superoxyde, on remarque que les deux composés les plus actifs sont le **7** et **9**, avec un  $IC_{50}$  de 0.35  $\mu$ M et 0.20  $\mu$ M respectivement. Encore une fois, on observe que la présence d'un troisième OH renforce la capacité de piéger le radical superoxyde, alors que l'introduction d'un

groupement methoxy diminue la réactivité du composé vis-à-vis de ce radical. En effet les nitrones **6** et **8** se placent dans une gamme de nitrone ayant une activité modérée ( $IC_{50}$  comprise entre 30-270  $\mu$ M). Certaines de ces nitrones ne possèdent pas de fonctions hydroxyles, ce qui confirme l'implication de la fonction nitrone dans le piégeage des radicaux. On peut donc observer que la fonction nitrone seule n'est pas aussi efficace dans le piégeage des radicaux qu'en présence des fonctions OH, ce qui souligne une synergie probable entre la fonction nitrones et les hydroxyles.

De plus on remarque que la position des fonctions OH joue un rôle important dans l'activité antioxydant : les nitrones avec des OH en *para* ont un meilleur pouvoir antioxydant par rapport a celles qui n'en possèdent pas (à l'exception de la nitrone **11**). On peut donc supposer l'importance de la position *para* dans cette activité.

Les nitrones qui montrent les résultats les plus encourageants en terme de pouvoir antioxydant, mais également pour le quenching du radical superoxyde, sont celles dont le motif aromatique est proche des antioxydants d'origine naturelle. En particulier, le composé **7** et **9** (analogues respectivement des acide caféique et gallique) se retrouvent être les plus actifs suivi des composés **6** et **8** (analogues respectivement des acide sinapique et férulique); ce classement reflète bien celui établi pour les produits naturels.

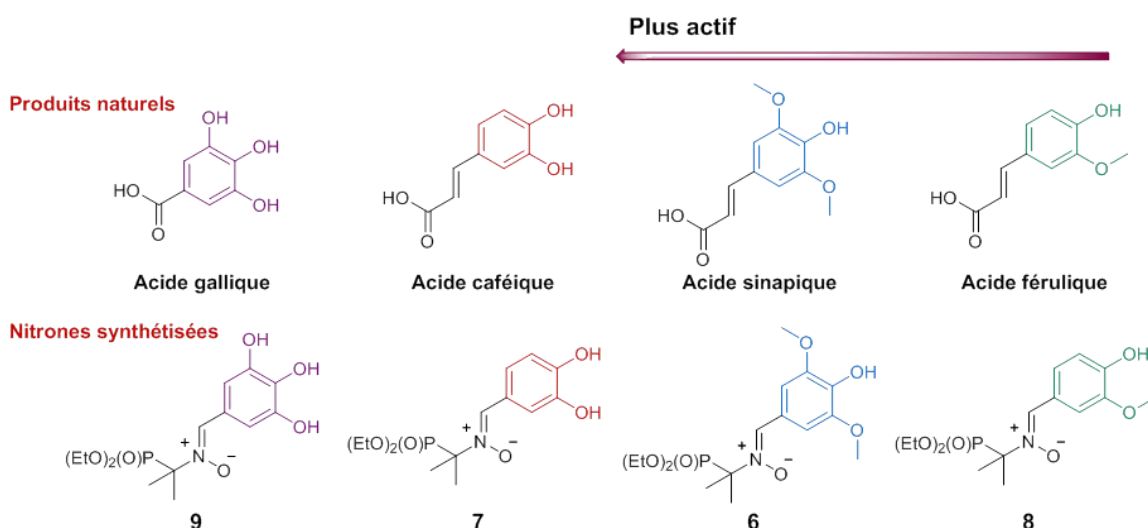


Figure 50

Ces résultats montrent que l'introduction d'un motif phénolique dans une nitrone permet de conserver l'activité antioxydante du composé naturel analogue et même de l'accroître grâce à la capacité de la fonction nitrone à piéger les radicaux libres.

## 5.2 Evaluation de la cytotoxicité

L'évaluation de la toxicité d'un produit est le premier test qui peut donner des informations concernant sa sécurité. Les études de toxicité peuvent être réalisées soit *in vitro* sur des cellules, des tissus ou des organes, soit *in vivo* sur des animaux.

Dans notre étude nous avons effectué un screening préliminaire sur des cultures cellulaires pour évaluer la cytotoxicité de nos produits afin de les utiliser dans des applications biologiques. Pour nos expériences nous avons utilisé la lignée cellulaire A549 communément utilisée dans notre laboratoire. Cette ligne cellulaire, établie en 1972 par Lieber et al.<sup>194</sup>, est issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire.

Le test de cytotoxicité se déroule classiquement en plusieurs phases :

- 1- Mise en culture des cellules et incubation; les cellules sont décongelées et transférées dans des flasques en présence du milieu de culture. Les flasques sont incubées à 37°C en atmosphère humide (95%) contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules A549 adhèrent au fond de la flasque grâce aux protéines d'adhérence qu'elles secrètent et elles sont laissées proliférer jusqu'à arriver à confluence (formation d'une monocouche homogène sur le fond de la flasque).
- 2- Trypsination; les cellules arrivées à confluence, le milieu de culture appauvri est aspiré et les cellules sont détachées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA. L'EDTA piège les ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> qui favorisent les interactions cellules substrat, et la trypsine est une enzyme protéolytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines de l'adhérence cellulaire (intégrines). Les cellules sont ensuite transférées dans une nouvelle flasque pour continuer la prolifération ou dans des plaques spécifiques pour les tests de cytotoxicité.
- 3- Induction des cellules; les plaques contenant les cellules sont incubées pour rejoindre la confluence et à ce moment on ajoute la molécule à tester. Les cellules A549 sont mises en contact avec les différents produits à tester, à différentes

---

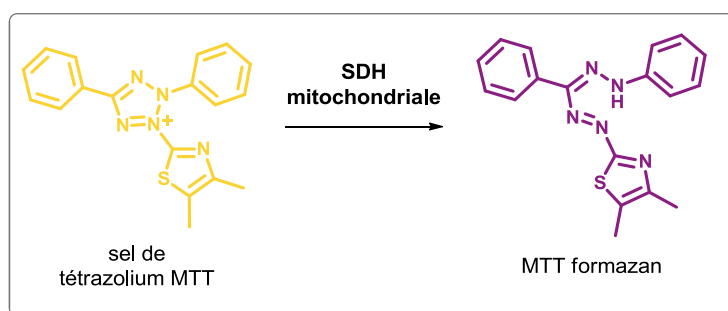
<sup>194</sup> Lieber, M. ; Smith, B. ; Szakal, A. ; Nelson-Ress, W. ; Todar, G. *Int. J. Cancer* **1976**, 17, 62-70

concentrations de manière à établir une courbe dose - réponse afin d'évaluer la toxicité des produits.

- 4- Mesure de la viabilité des cellules; consiste en l'évaluation de la cytotoxicité, elle est déterminée à la fin de la période d'exposition avec le test MTT et le test de lactate déshydrogénase (LDH).

### 5.2.1 Test MTT

Le test MTT<sup>195</sup> mesure le potentiel réducteur des cellules vivantes par réaction colorimétrique. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 diphenyl tétrazolium), composé jaune, qui est réduit en formazan de couleur violet, par la succinate déshydrogénase (SDH) mitochondriale des cellules vivantes actives (Schéma 105).



**Schéma 105** : réduction du MTT jaune en formazan de couleur violet

Le formazan est un produit insoluble qui donne un précipité de couleur violette absorbant dans le visible à 570 nm. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

Les cellules sont dissoutes dans du DMSO 100% afin de solubiliser les précipités de Formazan avant de mesurer l'intensité de la coloration par spectrophotométrie à 570 nm. L'intensité de la coloration mesurée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test et à leur activité métabolique.

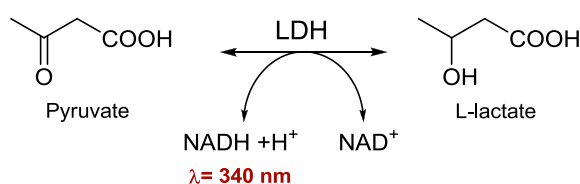
Les résultats sont exprimés sous forme d'un pourcentage par rapport au 100% de viabilité (contrôle).

<sup>195</sup> Li, N.; Liu, J.-H.; Zhang, J.; Yu, B.-Y. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 3876-3883

### 5.2.2 Test de la Lactate Déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase est une enzyme exclusivement cytoplasmique qui est relarguée dans le milieu extracellulaire lors de la perte de l'intégrité de la membrane plasmique (nécrose).

Le test LDH est basé sur la mesure de l'activité de l'enzyme présente dans le milieu de culture qui reflète l'attente toxique générée par les composés testés. Cette enzyme catalyse la conversion du pyruvate en L-lactate par la conversion du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) en sa forme oxydée  $\text{NAD}^+$  (Schéma 106).



**Schéma 106** : Mécanisme d'action de la LDH

Ce test est effectué à l'aide d'un kit commercial contenant le substrat pyruvate et le cofacteur NADH qui absorbe en UV-visible à une longueur d'onde de 340 nm. L'ajout de ces deux réactifs dans le milieu de culture déclenche la relation enzymatique : la LDH présente dans le milieu convertit le pyruvate en lactate en oxydant le NADH en  $\text{NAD}^+$ . La cinétique de disparition du NADH est suivie par spectrophotométrie à  $\lambda = 340$  nm.

### 5.2.3 Interprétation des résultats

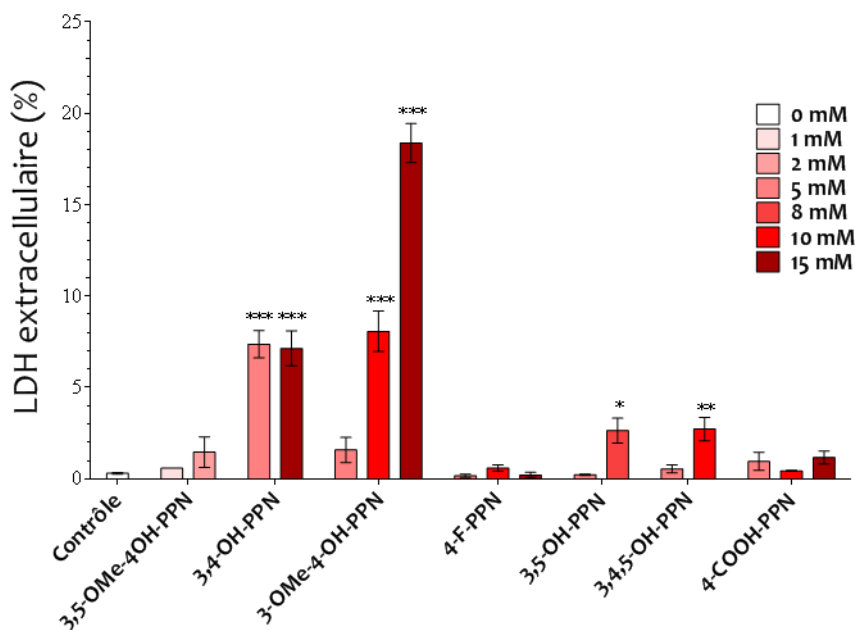
Les nitrones les plus intéressantes au niveau des capacités antioxydantes, ainsi que deux composés représentatifs de la série de PPN (composé **16** et **19**) ne contenant pas des groupements OH, ont été testées sur des cultures cellulaires afin d'évaluer leur toxicité.

La première évaluation de la cytotoxicité avec le test MTT ne nous a pas permis d'obtenir de résultats exploitables à cause des interférences avec les réactifs utilisés, en conséquence nous reportons seulement les résultats obtenus avec le test LDH.

Les nitrones ont été testées à différentes concentrations allant de 1 à 15 mM à l'exception de trois d'entre elles. A cause de la faible solubilité lors de la préparation de

la solution mère, les composés **6**, **9**, et **12** ont été respectivement utilisés à une concentration maximale de 2, 10 et 8 mM.

Les résultats (Figure 51) sont exprimés en pourcentage de LDH extracellulaire par rapport à la quantité maximale relarguée lors d'une lyse cellulaire totale (correspondant au 100% de LDH).



**Figure 51:** Dosage du LDH dans les cellules A549 après 24 heures d'incubation

Statistiques : ANOVA et test de Brown-Forsythe; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 comparé au control

D'une manière générale nous pouvons observer des valeurs significatives, comparées au contrôle (LDH libéré de manière physiologique), seulement pour les PPNs contenant des groupements hydroxyles. Le niveau de cytotoxicité obtenu pour les nitrones 4-F-PPN (**19**) et 4-CO<sub>2</sub>H-PPN (**16**), testées à la concentration la plus élevée (15 mM), n'est pas significatif.

Seule la 3,4-OH-PPN (**7**) donne un résultat significatif à une concentration de 5 mM, alors que pour avoir des valeurs exploitables pour les autres nitrones nous devons augmenter la concentration de produit testé.

Pour les nitrones 3,5-OH-PPN (**12**) et 3,4,5-OH-PPN (**9**) on observe des valeurs significatives de LDH extracellulaire à 8 et à 10 mM respectivement.

La toxicité du composé 3-OMe-4-OH-PPN (**8**) devient significative à une concentration de 10 mM et montre un effet dose dépendant (dès 5 à 15 mM).



Cependant, on ne peut pas réellement parler de cytotoxicité des ces composés en raison du fait qu'aucun résultat n'atteint pas le seuil du 50% de LDH extracellulaire ; la valeur la plus élevée (obtenue pour le composé **8** à 15 mM) se place en dessous du 20%.

Il est important de préciser que les concentrations pour lesquelles on observe une augmentation significative du niveau de LDH extracellulaire, sont très élevées et représentent des conditions non réalistes dans la cadre d'une utilisation de ces composés pour applications biologiques.

### **5.3 Evaluation de l'activité protectrice et vasorelaxante dans un modèle d'endothélium aortique**

Nous avons démontré avec la méthode de détection du NO<sup>•</sup> par RPE (Chapitre 4, § 4.5) que toutes les PPNs synthétisées sont donneuses d'oxyde nitrique. Cette espèce chimique est un radical centré sur l'azote et bien qu'il soit très réactif et cause de stress oxydant à concentration élevée, il est produit de manière physiologique dans l'organisme et possède plusieurs fonctions biologiques.

Il est impliqué dans la modulation de la transmission nerveuse et neuromusculaire, dans la régulation de l'apoptose, il est produit par les cellules du système immunitaire dans le but d'éliminer les microorganismes pathogènes et il a un effet vasorelaxant sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins. Cette dernière propriété est très importante en ce qui concerne la protection du système cardiovasculaire.

Au vue de la capacité des PPNs à libérer le NO<sup>•</sup>, nous avons testé une série de composés sélectionnés sur un modèle d'épithélium aortique afin d'évaluer leur effet sur la vasorelaxation et la protection contre un stress oxydant induit.

#### **5.3.1 Effet vasorelaxant des nitrones**

Nous avons évalué l'effet vasorelaxant de certaines nitrones synthétisées, en nous focalisant particulièrement sur les composés ayant montré un intérêt lors des tests d'évaluation d'activité antioxydante.

L'étude de la contractilité vasculaire originairement décrit par R.F. Furchgott et J.V. Zawadzki<sup>196</sup> est réalisée selon des méthodes développées plus récemment<sup>197</sup>.

L'activité vasorelaxante des nitrones est évaluée selon leur capacité à inhiber la contraction produite avec la phényléphrine (PE) sur des anneaux aortiques provenant de rat Sprague-Dawley.

Les anneaux aortiques sont precontractés avec la PE et ensuite, relaxés avec le nitroprusside de sodium (SNP) un agent vasorelaxant indépendante de l'endothélium.

Les résultats sont déterminés par rapport au control contenant seulement le SNP

L'effet vasorelaxant des PPNs dans les anneaux aortiques est examiné sur la sensibilité (pEC<sub>50</sub>) et la relaxation maximale (R<sub>max</sub>) du SNP.

**Table 33:** Activité vasorelaxante dans des anneaux aortiques

	Sensitivité et relaxation maximale de SNP en présences des PPNs	
	pEC <sub>50</sub> (μM)	R <sub>max</sub> (%)
Control	8.23 ± 0.02	100 ± 3
SOD	9.05 ± 0.02	104 ± 2
PBN	8.12 ± 0.12	98 ± 2
PPN	8.34 ± 0.05	99 ± 2
3,4-OH-PPN	9.57 ± 0.09*	104 ± 3
3,5-OH-PPN	8.28 ± 0.11	98 ± 4
3,4,5-OH-PPN	9.19 ± 0.09*	105 ± 5
3-OMe-4-OH-PPN	8.99 ± 0.03*	100 ± 3
3,5-OMe-4-OH-PPN	8.91 ± 0.04	101 ± 2

Les résultats montrent que les PPNs ayant présenté les meilleures propriétés de piégeage du superoxyde (Table 32) améliorent significativement la réponse relaxante dose-dépendante du SNP. Dans tous les groupes la sensibilité de SNP a été augmentée sans affecter la réponse maximale. Nous suggérons que les PPNs capables de piéger le superoxyde dérivé de l'endothélium, qui est essentiellement formé dans les vaisseaux dans des conditions normales, pourraient favoriser la relaxation tout en préservant la biodisponibilité du NO<sup>•</sup> endogène libéré.

<sup>196</sup> Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. *Nature* **1980**, *288*, 373-376

<sup>197</sup> (a) Woodman, O.L.; Meeker W. F.; Boujaoude M. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *46*, 302-308 (b) Chan, E.C.H.; Drummond, G.R.; Woodman O.L. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2003**, *42*, 727-735

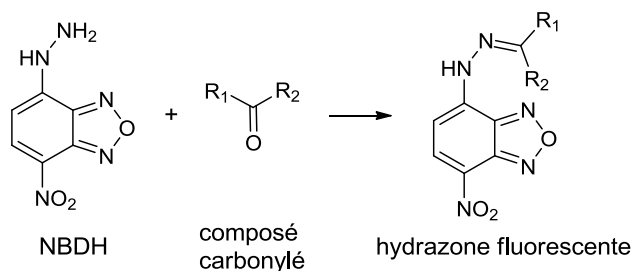
### 5.3.2 Effet protecteur des nitrones en présence de stress oxydant

Nous avons examiné l'effet protecteur des PPNs contre un dommage tissulaire du au superoxyde généré par la NADPH oxydase endothéliale présente dans les anneaux aortiques suite à l'introduction exogène de NADPH.

Les dommages oxydatifs suite au traitement des anneaux aortiques avec NADPH ont été évalués par le test de protéines carbonylées selon la méthode décrite dans la littérature<sup>198</sup>.

Les protéines carbonylées sont des dérivés dus à l'oxydation des protéines cellulaires qui se produit dans les systèmes biologiques en conditions de stress oxydant. La quantification du contenu en protéines carbonylées dans un tissu est un indicateur des dommages oxydatifs.

La méthode utilisée repose sur la réaction entre le NBDH (7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole) et les composés carbonylés pour former une hydrazone<sup>199</sup>.



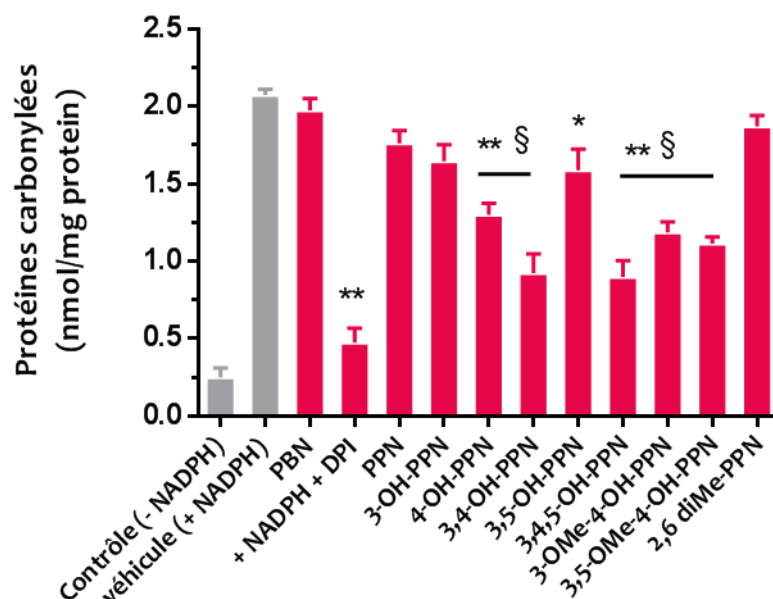
**Schéma 107:** Réaction entre le NBDH et un composé carbonylé

Le NBDH n'est pas un produit naturellement fluorescent, mais sa réaction avec les groupements carbonyles permet d'obtenir des dérivés hautement fluorescents. La quantité de protéines carbonylées présente dans l'échantillon sera donc proportionnelle à la quantité de fluorescence émise.

Les anneaux aortiques, traités avec NADPH endogène en présence des nitrones, ont été récupérés et analysés afin d'évaluer leur contenu en protéines carbonylées.

<sup>198</sup> Stocker, P.; Ricquebourg, E.; Vidal, N.; Villard, C.; Lafitte, D.; Sellami, L.; Pietri, S. *Anal. Biochem.* **2015**, *482*, 55-61

<sup>199</sup> Vidal, N.; Cavaille, J.P.; Graziani, F.; Robin, M.; Ouari, O.; Pietri, S.; Stocker, P. *Redox Biol* **2014**, *2*, 590-598



**Figure 52:** Détermination des protéines carbonylées dans les anneaux aortiques traités avec NADPH

Statistiques : ANOVA et test de Tukey; \*p <0,05, \*\*p <0,01 comparé au contrôle, §p <0,05 comparé à la PPN

Les résultats obtenus (Figure 52) montrent que seulement les PPNs contenant des groupements phénoliques donnent des résultats significatifs comparés au véhicule. La PBN et la PPN, utilisées comme références, ne montrent pas une particulière activité protectrice vers ce modèle de stress oxydants.

Par ailleurs, si on considère la statistique réalisée par rapport à la PPN (4), notre nitrone de référence sans substituant sur le cycle aromatique, on observe que les quatre nitrones (6, 7, 8 et 9) ayant montré les meilleures propriétés antioxydantes protègent de manière significative les tissus aortiques du stress oxydant induit par la NADPH oxydase. L'utilisation de DPI (diphenyleneiodonium), inhibiteur de la NADPH oxydase, permet de vérifier que les signaux obtenus sont d'origine endogène.

Au vu de ces résultats nous pouvons affirmer que l'introduction d'un motif phénolique dans les nitrones de type PPN, a en effet amélioré la réactivité de ces composés vers les radicaux libres, permettant de protéger les tissus soumis à un stress oxydant.

### **Conclusion du chapitre**

Nous avons réalisé une étude *in vitro* de nos 19 nouvelles nitrones hybrides afin d'évaluer leur activité antioxydante.

Les tests utilisés (DPPH, TRAP, ORAC, quenching du superoxyde) ont permis d'obtenir un screening préliminaire sur la capacité de ces composés à neutraliser différents types de radicaux.

On observe que les composés ayant montré les meilleures propriétés antioxydantes sont les 4 nitrones contenant un fragment phénolique (3,5-OMe-4-OH-PPN **6**, 3,4-OH-PPN **7**, 3-OMe-4-OH-PPN **8** et 3,4,5-OH-PPN **9**), issu des acides cinnamiques naturels. De plus on remarque une relation structure-activité correspondante au classement que l'on retrouve dans la bibliographie pour les acides phénoliques naturels: en présence de groupements hydroxyles sur le cycle aromatique l'activité antioxydante est améliorée, et lorsqu'un groupement OH est substitué par un groupement methoxy cela entraîne une diminution de cette activité.

Les résultats du screening antioxydant, associés à ceux obtenus lors de l'étude RPE, mettent en évidence que les composés **6**, **7**, **8** et **9** sont les plus prometteurs, cela nous a donc permis d'examiner leur impact pharmacologique dans un modèle d'endothélium aortique soumis à un stress oxydant.

Ces 4 nitrones ont montré un effet vasorelaxant, en raison de la propriété de donneurs de NO<sup>•</sup>, ainsi qu'un effet protecteur contre le superoxyde généré par la NADPH oxydase endothéliale suite à introduction exogène de NADPH.

En conclusion, nous sommes parvenus à atteindre nos objectifs en mettant en évidence une potentielle application thérapeutique des nos nouvelles nitrones.



**CONCLUSION**

**GENERALE**





## Conclusion et perspectives

Ce projet de recherche a consisté en la synthèse de nouvelles nitrones dérivées de la PPN dont les structures ont été adaptées afin de pouvoir les utiliser dans les systèmes biologiques. Les nitrones, couramment utilisées comme sondes pour l'évaluation du stress oxydant, sont de plus en plus exploitées pour leur effet pharmacologique dans plusieurs pathologies. Il paraît donc intéressant de développer de nouvelles nitrones pouvant être utilisées aussi bien comme sondes que comme agents thérapeutiques.

Dans ce contexte, la synthèse de nouveaux analogues de la PPN a porté sur plusieurs objectifs: (I) améliorer la capacité à piéger les radicaux libres, (II) évaluer l'influence d'un groupement antioxydant sur leur activité protectrice, (III) étudier la propriété de donneur de  $\text{NO}^\bullet$  et par conséquent l'effet vasorelaxant et protecteur dans un modèle d'aorte isolée et (IV) améliorer leur biodisponibilité.

Afin d'atteindre les objectifs qui nous ont été fixés, nous avons réalisé la synthèse de **19 nouvelles nitrones** en modifiant la partie aromatique de la **PPN**. Dans un premier temps nous avons introduit des **motifs phénoliques** dérivés de certains antioxydants naturels, pouvant contribuer à neutraliser les espèces radicalaires, ce qui nous a permis d'obtenir **8 nouvelles nitrones**. Dans un deuxième temps nous avons obtenu **11** nouveaux composés par l'insertion de groupements à **effet mésomère (+M/-M)**, pouvant moduler l'électrophilie sur le carbone de la fonction nitrone et influencer sa réactivité envers les espèces radicalaires.

Une **étude RPE**, concernant le **piégeage** de plusieurs radicaux libres d'intérêts biologiques, ainsi que la propriété de libérer l'**oxyde nitrique**, a été réalisée pour chacun des nouveaux dérivés de la PPN. Les résultats obtenus lors du spin trapping montrent pour toutes les nitrones une affinité élevée pour les radicaux centrés sur le carbone avec l'obtention des adduits nitroxydes correspondants. Cependant, lors du piégeage de radicaux oxygénés, nous n'avons pas observé les adduits nitroxydes pour les PPNs phénoliques, ce qui nous laisse supposer que ces radicaux pourraient réagir plus vite avec les hydroxyles du cycle aromatique, en arrachant un atome d'hydrogène, plutôt que de s'ajouter au carbone de la fonction nitrone.

Cette hypothèse a été également validée suite aux screenings *in vitro* de tous les composés par plusieurs tests (DPPH, TRAP, ORAC, quenching du superoxyde) afin d'évaluer leur **activité antioxydante**. En effet les composés ayant montré les meilleures propriétés antioxydantes sont, comme attendu, les **4 nitrones** contenant un **fragment phénolique** issu des acides cinnamiques naturels (PPNs phénoliques); les mêmes composés qui lors de l'étude RPE n'ont pas donné les adduits de piégeages souhaités.

Tenant compte des résultats RPE ainsi que des tests antioxydants, **on peut conclure que les PPNs phénoliques** réagissent avec les groupements OH portés par l'aromatique ainsi qu'avec la fonction nitrone. Elles peuvent aussi bien **piéger les radicaux carbonés que neutraliser les radicaux oxygénés**.

Ces 4 nitrones ont été utilisées pour réaliser une étude biologique dans un modèle d'endothélium aortique qui a démontré leur **effet vasorelaxant**, en raison de la propriété de donneurs de  $\text{NO}^\bullet$ , ainsi qu'un **effet protecteur contre le stress oxydant**.

Dans l'optique d'améliorer la **biodisponibilité** des nitrones obtenues précédemment nous avons utilisé certaines d'entre elles comme précurseurs pour la synthèse de sondes **vectorisées** pouvant cibler la **mitochondrie** principale source endogène de production de radicaux libres.

A cet effet, nous avons réalisé la synthèse de **4 nouvelles nitrones** dans lesquelles nous avons greffé le **cation triphénylphosphonium** connu pour son aptitude à cibler la mitochondrie. Ces 4 composés diffèrent soit par la **longueur du bras espaceur** soit par **l'orientation** (*para* ou *méta*) du vecteur sur la portion aromatique.

Nous avons synthétisé une deuxième série constituée des **4 analogues** respectifs, dans lesquels le cation triphénylphosphonium a été substitué par un **groupement diphenylphosphoryle**, ce qui devrait empêcher la pénétration dans la mitochondrie et nous permettre d'utiliser ces composés comme contrôles négatifs.

Une **étude RPE visant à évaluer le piégeage des radicaux libres** a été réalisée avec ces nouvelles sondes ce qui nous a permis de démontrer leur affinité particulière pour les radicaux alkyles et alkoxydes de différentes tailles. Nous pouvons ainsi envisager leur potentielle utilisation pour **contraster les effets d'un stress oxydant sur la membrane mitochondriale** et éviter les modifications des composants lipidiques pouvant

provoquer la variation du potentiel de membrane et influencer ainsi l'activité de la mitochondrie.

En conclusion nous sommes parvenus à atteindre nos objectifs par la synthèse de nouvelles nitrones de type PPN ayant montré une bonne capacité à piéger les radicaux libres, ainsi qu'une activité antioxydante comparable ou supérieure à celle de certains antioxydants naturels. Les études biologiques ont permis de mettre en évidence leurs effets vasorelaxant et protecteur dans des anneaux aortiques soumis à un stress oxydant, résultats très encourageant dans la perspective d'utiliser ces composé comme agents thérapeutiques.

Enfin, ces nitrones ont été associées à un vecteur qui devrait assurer le ciblage de la mitochondrie, un des sites les plus endommagés par la production d'espèces radicalaires. Les premières études réalisées nous laissent envisager que ces nouvelles sondes pourront avoir un rôle important dans la protection et/ou l'évaluation du stress oxydante au niveau mitochondrial.



**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**



## I. Synthèse et caractérisation de produits

### I.1 Matériels et méthodes

Les réactifs et les solvants utilisés dans les synthèses proviennent de Sigma-Aldrich, Fluka, SDS, TCI ou Acros et ont été utilisés tels que.

Pour chaque nouveau composé, l'ensemble des données physico-chimiques et le rendement sont donnés étape par étape. La numérotation utilisée pour l'attribution des spectres RMN est indiquée sur chaque structure des composés.

Les purifications sur colonne chromatographique sont réalisées sur gel de silice Merck Kiesegel 60M (40-63 mesh) et les CCM sur plaques d'aluminium recouvertes de silicagel 60F<sub>254</sub> de 0,2 mm d'épaisseur, puis visualisées par détection UV à 254 et 365 nm.

Les analyses RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et <sup>31</sup>P ont été enregistrées sur des spectromètres Brüker DPX-300, 400, 500 ou 600. Les solvants deutérés utilisés pour ces analyses, CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> et CD<sub>3</sub>OD, proviennent de la société Eurisotop.

Les déplacements chimiques  $\delta$  sont donnés par rapport au solvant : CDCl<sub>3</sub> ( $\delta^1\text{H} = 7.28$  ppm et  $\delta^{13}\text{C} = 77.00$  ppm), DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta^1\text{H} = 2.49$  ppm et  $\delta^{13}\text{C} = 39.70$  ppm), CD<sub>3</sub>OD. Les constantes de couplage *J* sont exprimées en Hertz.

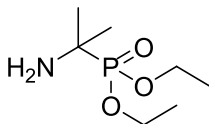
Les abréviations utilisées pour les figures de couplage sont les suivantes : (s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quadruplet, (quint) quintuplet, (dd) doublet de doublet, (ddd) doublet de doublet de doublet, (tt) triplet de triplet, (td) triplet dédoublé, (m) multiplet, (br) broad.

Les points de fusion ont été mesurés par un auto probe analyser Schorpp Gerätetechnik (APA II).

Les HRMS ont été effectuées au Spectropole (Campus Saint Jérôme, Marseille) avec un spectromètre de masse SYNAPT G2 HDMS (Waters), par ionisation en mode électrospray positif dans les conditions suivantes : tension électrospray : 2.8 kV ; tension d'orifice : 20 V ; débit du gaz de nébulisation (azote) : 100 L/h.

## I.2 Mode opératoire et caractérisation

## Diethyl 2-aminopropan-2-ylphosphonate (1)



$C_7H_{18}NO_3P$   
M: 195,2 g/mol

Dans un tricol muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome, on fait buller à 5°C en continu de l'ammoniac gazeux dans de l'acétone (174 g, 3 mol) jusqu'à saturation de la solution. Tout en laissant le bullage d'ammoniac et en maintenant la température à 5°C, le diethylphosphite (207 g, 1.5 mol) est ajouté au goutte à goutte. Après l'ajout, le milieu est agité à 5°C pendant 2 heures. Le bullage d'ammoniac est arrêté et l'agitation maintenue à température ambiante durant la nuit. Au bout de ce temps, le système est purgé de l'ammoniac, puis l'excès d'acétone évaporé sous vide.

Le résidu brut (290 g) est traité avec un mélange NaOH 20% (20 ml) et  $CHCl_3$  (60 ml) et agité pendant 20 minutes. On sépare la phase organique et elle est traitée encore 2 fois avec NaOH 20% (30 ml), sécher sur  $MgSO_4$  et évaporer. On récupère 256 g de produit sous forme d'huile translucide

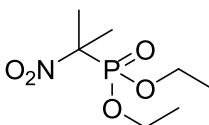
Rendement : 75%

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.16 - 1.30 (m, 12H), 4.01 - 4.12 (m, 4H,  $-OCH_2CH_3$ )

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.54 ( $-OCH_2CH_3$ ), 16.61 ( $-OCH_2CH_3$ ), 25.05 (d,  $J = 3.8$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 49.00 (d,  $J = 147.7$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 62.18 ( $-OCH_2CH_3$ ), 62.28 ( $-OCH_2CH_3$ )

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  32.39

## Diethyl 2-nitropropan-2-ylphosphonate (2)



$C_7H_{16}NO_5P$   
M: 225,2 g/mol

Dans un ballon de 500 ml, on dissout l'aminophosphonate 1 (20 g, 0.1 mol) et du  $MgSO_4$  (24 g, 0.2 mol) dans un mélange acétone / eau (150 mL / 20 mL), mélange



destiné à augmenter la solubilité de l'oxydant. Sous vive agitation, on ajoute par fractions sur 2 heures, du  $\text{KMnO}_4$  (32 g, 0.2 mol). Une fois l'addition terminée, le milieu est maintenu à reflux à 50-55 °C durant 24 heures. Après être revenu à température ambiante, le milieu est filtré sous pression réduite. Afin de récupérer le nitrophosphonate présent dans le précipité de dioxyde de manganèse ( $\text{MnO}_2$ ), le précipité est rincé à l'éther. Le filtrat est évaporé et le résidu extrait au DCM. Les phases organiques sont réunies, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrées. On obtient une huile bleutée qui contient un mélange nitro **2** et amino de départ **1**.

On relance l'oxydation sur le résidu brut dans les conditions décrites précédemment afin de compléter l'oxydation de l'amine présente dans le mélange. On obtient 16 g de nitrophosphonate **2** sous forme d'une huile translucide de couleur jaune pale.

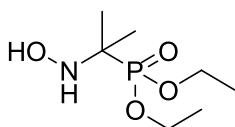
Rendement : 70%

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.72 (d,  $J = 14.5$  Hz, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.11 (quint,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.01 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.55 (d,  $J = 1.0$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.95 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 85.97 (d,  $J = 151.30$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ )

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  17.24

### Diethyl 2-(hydroxyamino)propan-2-ylphosphonate (3)



$\text{C}_7\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{P}$

M: 211,2 g/mol

A température ambiante et sous vive agitation, le diethyl 2-nitropropan-2-ylphosphonate **2** (4.0 g, 18 mmol), et le chlorure d'ammonium (0.58 g, 10.8 mmol) sont dissous dans l'eau (20 ml). Le mélange est placé dans un cryostat à -10°C et le zinc (2.4 g, 37 mmol) est ajouté par petites fractions sur 30 min. de manière à ne pas dépasser 25°C. Une fois l'ajout terminé l'agitation est maintenue 2 h à température ambiante puis 1 heure à 50-55°C. Le mélange réactionnel est filtré sous pression réduite puis le résidu de filtration rincé plusieurs fois au méthanol. Le filtrat est extrait avec du DCM et les phases organiques sont réunies, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis évaporées sous

pression réduite. Le résidu, une huile bleutée, est dissous dans l'hexane. L'hydroxylamine **3** est récupérée sous forme d'une poudre blanche.

Rendement : 53%

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.11 (d, *J* = 15.4 Hz, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.93 (quint, *J* = 7.2 Hz, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

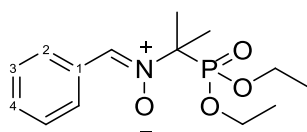
<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 15.96 (d, *J* = 6.0 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.04 (d, *J* = 1.6 Hz, 2C, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 61.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 57.62 (d, *J* = 146.40 Hz, C)

<sup>31</sup>P RMN (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 30.69

### Procédure générale des synthèses de nitrones

La procédure générale pour synthétiser les nitrones implique l'utilisation de l'hydroxylamine **3** et d'un aldéhyde mélangés en proportion équimolaire dans du THF ou du DCE. Le milieu réactionnel est maintenu à 100°C sous agitation pendant 4 heures, en présence de MgSO<sub>4</sub> et de tamis moléculaire 4 Å. Le mélange est ramené à température ambiante puis filtré sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne, ou par précipitation dans différents solvants.

#### **2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(4 benzylidene)propan-2-amine oxide (4)**



C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>P  
M: 299,3 g/mol

Le produit **4** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.4 g, 1.9 mmol) et de benzaldéhyde (0.2 g, 1.9 mmol) dans du THF anhydre (20 ml). Le produit, un huile jaune pale, est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant le mélange CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN (50/50, V/V), avec un rendement de 12% (65 mg). (non purifiée rendement de 70%, 400 mg, pureté ~ 90 %)

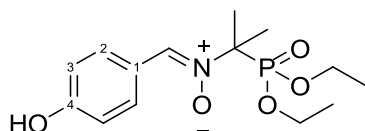
**$^1\text{H}$  RMN** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.32 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.81 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.85 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.20 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.40 (brs, 1H,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 7.40 (m, 2H, H-3), 7.74 (m, 1H H-4), 8.27 (m, 2H, H-2)

**$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.38 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.24 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.32 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.77 (d,  $J = 154.8$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 128.36 (C-3) 128.94 (d,  $J = 1.0$  Hz, C-2), 130.36 (C-1), 130.61 (d,  $J = 1.7$  Hz, C-1), 133.17 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ )

**$^{31}\text{P}$  RMN** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.09

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  300.1359; expérimentale 300.1360

### 2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(4-hydroxybenzylidene)propan-2-amine oxide (**5**)



$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{P}$

M: 315,3 g/mol

**m.p.** : 138.9 °C (litt: 138.5-139.5 °C)<sup>110</sup>

Le produit **5** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.6 g, 2.8 mmol) et de 4-hydroxybenzaldéhyde (0,35 g, 2,8 mmol) dans du THF (25 ml). La nitronne est isolée par cristallisation dans du diéthyl éther, sous forme de cristaux blancs (0.63 g).

Rendement : 75%

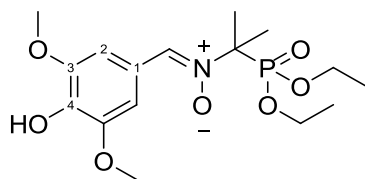
**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.79 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.84 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.27 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.75 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3), 7.37 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 7.88 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2), 9.41 (brs, -OH)

**$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.36 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.25 (s, 2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.54 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.65 (d,  $J = 159.0$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 115.69 (2C, C-3), 121.78 (d,  $J = 1.0$  Hz, C-1), 131.32 (2C, C-2), 133.26 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 159.73 (C-4)

**$^{31}\text{P}$  RMN** (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.97

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  316.1308; expérimentale 316.1311

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene) propan-2-amine oxide (6)**



$C_{16}H_{26}NO_7P$   
M: 375,4 g/mol  
m.p. : 139.2°C

Le produit **8** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et de syringaldéhyde (0,43 g, 2,4 mmol) dans du DCE (15 ml). Le produit est isolé sous la forme d'un précipité blanc par ajout d'acétate d'éthyle (0.28 g).

Rendement: 57%

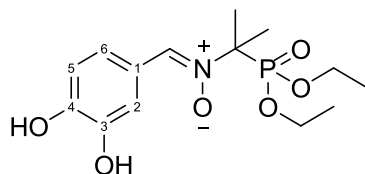
$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.26 (t,  $J = 6.9$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.75 (s, 3H,  $-C(CH_3)_2$ ), 1.77 (s, 3H,  $-C(CH_3)_2$ ), 3.86 (s, 6H,  $-OCH_3$ ), 4.20 (m, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.61 (s, 2H, H-2), 7.67 (brs, HC=NO)

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.40 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 23.20 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 56.32 (2C,  $-OCH_3$ ), 63.39 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 72.11 (d,  $J = 153.5$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 106.35 (2C, C-2), 122.34 (C-1), 133.98 (brs, HC=NO), 137.15 (C-4), 146.57 (2C, C-3)

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  23.39

HRMS : valeur théorique pour  $C_{16}H_{27}NO_7P^+$   $[M+H]^+$  376.1520; expérimentale 376.1518

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(3,4-dihydroxybenzylidene) propan-2-amine oxide (7)**



$C_{14}H_{22}NO_6P$   
M: 331,3 g/mol  
m.p. : 172.8°C

Le produit **7** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,6 g, 2,84 mmol) et de 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (0,4 g, 2,84 mmol) dans du DCE (25 mL). Le produit est isolé sous la forme d'un solide beige après précipitation avec du diéthyl éther (0.65 g).

Rendement : 70%

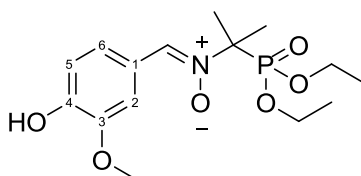
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  1.22 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.64 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.69 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.07 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.77 (d,  $J = 8.3$ , 1H, H-5), 7.47 (dd,  $J = 8.3$ ; 1.7, 1H, H-6), 7.62 (d,  $J = 1.7$ , 1H, H-2), 8.07 (brs, HC=NO)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  16.32 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.98 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 62.49 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.10 (d,  $J = 156.3$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 115.24 (C-5), 115.70 (C-2), 122.17 (C-6), 122.75 (C-1), 131.61 (d,  $J = 6.0$  Hz, HC=NO), 144.50 (C-4 et C-3)

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  23.66

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  332.1258; expérimentale 332.1258

**2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene) propan-2-amine oxide (8)**



$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{P}$   
M: 345 g/mol  
m.p. : 128.5°C

Le produit **8** est préparé selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2.4 mmol) et de 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde (0,36 g, 2.4 mmol) dans du DCE (25 mL). Le produit est isolé sous la forme d'un précipité blanc après précipitation dans du diéther.

Rendement : 50%

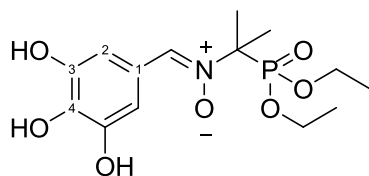
$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.33 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.83 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.85 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.95 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.21 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.94 (d,  $J = 8.3$ , 1H, H-5), 7.31 (dd,  $J = 8.3$  Hz; 1.8 Hz, 1H, H-6), 7.68 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, HC=NO), 8.57 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H-2)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.43 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.24 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 56.00 ( $-\text{OCH}_3$ ), 63.38 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.08 (d,  $J = 154.0$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 110.88 (C-2), 114.25 (C-5), 123.48 (C-1), 124.47 (C-6), 133.64 (HC=NO), 146.03 (C-5), 147.88 (C-3)

$^{31}\text{P RMN}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.49

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{15}H_{25}NO_6P^+$   $[M+H]^+$  346.1414; expérimentale 346.1413

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(3,4,5-trihydroxybenzylidene)propan-2-amine oxide (9)**



$C_{14}H_{22}NO_7P$

M: 347 g/mol

**m.p.** : >170°C dégradation  
du produit

Le produit **9** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.17 g, 0.8 mmol) et de 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde (0.14 g, 0.8 mmol) dans du 1,2-DCE (25 mL). Le produit isolé est précipité sous la forme d'un solide beige (0.2 g) dans l'acétate d'éthyle.

Rendement: 72%

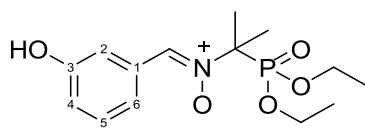
**$^1H$  RMN** (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.64 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.69 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 4.07 (m, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.38 (s, 2H, H-2), 7.52 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, HC=NO), 8.70 (brs, 1H, OH-4), 9.03 (brs, 2H, OH-3)

**$^{13}C$  RMN** (75 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  16.29 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 22.97 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 62.40 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 72.13 (d,  $J = 156.3$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 108.48 (2C, C-2), 121.47 (C-1), 131.75 (d,  $J = 6.1$  Hz, HC=NO), 135.85 (C-4), 145.16 (2C, C-3)

**$^{31}P$  RMN** (162 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  23.68

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{14}H_{23}NO_7P^+$   $[M+H]^+$  348.1207; expérimentale 348.1205

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(3-hydroxybenzylidene)propan-2-amine oxide (10)**



$C_{14}H_{22}NO_5P$

M: 315,3 g/mol

**m.p.** : 138.9 °C

Le produit **10** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.5 g, 2.4 mmol) et de 3-hydroxybenzaldehyde (0.3 g, 2.4 mmol) dans du THF (25 mL) ou du DCE (25 mL)(les réactions conduites dans les deux solvants ont environ le même

rendement). Le produit est isolé par cristallisation dans un mélange éther/hexane (70/30, V/V) sous la forme de cristaux translucides (0.35 g)

Rendement: 46%

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.33 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.87 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.23 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.91 (dd,  $J = 8.0, 2.1$  Hz, 1H, H-4), 7.19 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.31 (brd,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.74 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 8.36 (brs, 1H, H-2)

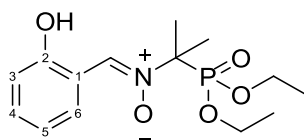
$^{13}\text{C RMN}$  (75.47 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.38 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.14 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.70 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.65 (d,  $J = 155.2$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 115.63 (C-4), 118.72 (C-2), 121.65 (C-6), 129.26 (C-5), 130.96 (d,  $J = 1.7$  Hz, C-1), 135.47 (d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 157.07 (C-3)

$^{31}\text{P RMN}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.21

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  316.1308; expérimentale 316.1307

**Données des cristaux** :  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{P}$ , Mr = 315.29, groupe d'espace C c, Hall group C - 2yc; a = 11.5234(5), b = 23.042(1), c = 7.7077(4) Å,  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 127.607(2)$ ,  $\gamma = 90^\circ$

### 2(diethoxyphosphoryl)-*N*-(2-hydroxybenzylidene)propan-2-amine oxide (**11**)



$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{P}$   
M: 315,3 g/mol

Le produit **11** est obtenu selon la méthode générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,4 g, 2 mmol) et (0,23 g, 2 mmol) dans du DCE (20 ml). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0.3 g).

Rendement: 50%

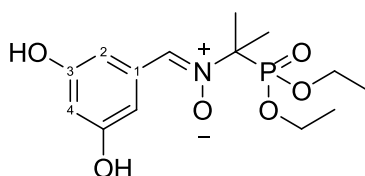
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.83 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.88 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.23 (q,  $J = 7.4$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.86 (brt,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 6.96 (brd,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3), 7.15 (dd,  $J = 7.9; 1.5$  Hz, 1H, H-6), 7.39 (td,  $J = 8.0; 1.5$  Hz, 1H, H-4), 7.90 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H,  $\text{HC}=\text{NO}$ ),

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.39 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.40 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.72 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 71.39 (d,  $J = 155.2$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 116.84 (C-1), 118.96 (C-3), 120.19 (C-5), 132.50 (C-4), 133.98 (C-6), 140.43 (d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 159.65 (C-2)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  21.90

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  316.1308; expérimentale 316.1309

### 2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(3,5-dihydroxybenzylidene)propan-2-amine oxide (12)



$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_6\text{P}$   
M: 331,3 g/mol  
m.p.: 180.2°C

Le produit **12** est obtenu selon la méthode générale, à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et de 3,5-dihydroxybenzaldehyde (0,33 g, 2,4 mmol) dans du DCE (25 mL). Le produit est isolé sous la forme d'une poudre rose (0.45 g) après précipitation dans du DCM.

Rendement: 55%

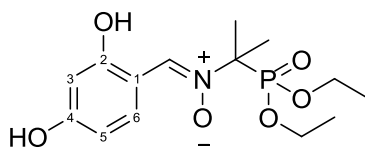
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  1.34 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.84 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.89 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.21 (dq,  $J = 15.1, 7.0$  Hz 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.29 (t,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-4), 7.24 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H, H-2), 7.66 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 9.36 (brs, 2H, OH).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  16.29 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.92 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 62.55 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.88 (d,  $J = 155.7$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 104.83 (C-4), 106.92 (2C, C-2), 132.02 (d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 132.17 (d,  $J = 1.7$  Hz, C-1), 157.95 (2C, C-3)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  23.24

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  332.1258; expérimentale 332.1258



**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(2,4-dihydroxybenzylidene) propan-2-amine oxide (13)**

$C_{14}H_{22}NO_6P$   
 M: 331,3 g/mol  
 m.p. : 133.3°C

Le produit **13** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et de 2,4- dihydroxybenzaldehyde (0,33 g, 2,4 mmol) dans du THF (25 mL). Le produit est isolé par précipitation à l'éther diéthylique sous la forme de cristaux blancs (0,29 g).

Rendement: 36%

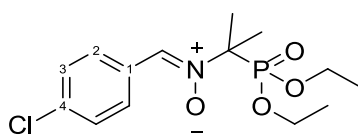
$^1H$  RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.68 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.72 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.08 (dq,  $J = 15.2, 7.1$  Hz, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.16 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H-3), 6.30 (dd,  $J = 8.7, 2.2$  Hz, 1H, H-5), 7.38 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H-6), 7.94 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, HC=NO)

$^{13}C$  RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  16.26 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.80 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 62.77 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 70.24 (d,  $J = 155.7$  Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.26 (C-3), 107.54 (C-5), 108.94 (C-1), 135.05 (C-6), 139.23 (d,  $J = 5.5$  Hz, HC=NO), 161.22 (C-4), 163.38 (C-2)

$^{31}P$  RMN (121 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  22.80

HRMS : valeur théorique pour  $C_{14}H_{23}NO_6P^+$  [M+H]<sup>+</sup> 332.1258; expérimentale 331.1257

**Données des cristaux**  $C_{14}H_{22}NO_6P$ , Mr = 331.30, groupe d'espace P 21/c, Hall group -P 2ybc; a = 12.2694(14), b = 34.361(3), c = 11.7456(12) Å,  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 95.870(12)$ ,  $\gamma = 90^\circ$

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(4-(chlorobenzylidene)propan-2-amine oxide (14)**

$C_{14}H_{21}ClNO_4P$   
 M: 333,7 g/mol  
 m.p. : 79.2 °C  
 (litt: 81 °C)<sup>87</sup>

Le composé **6** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.3 g, 1.42 mmol) et de 4-chlorobenzaldéhyde (0.2 g, 1.42 mmol) dans du DCE (20 mL). Le

produit est isolé sous la forme d'une poudre blanche (0.35 g) après précipitation dans du pentane.

Rendement: 74%

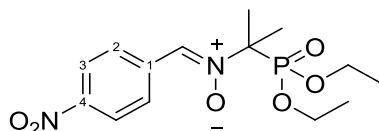
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.33 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.81 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.86 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.20 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.37 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2), 7.74 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, HC=NO), 8.23 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.41 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.20 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.59 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 73.97 (d,  $J = 153.5$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 123.71 (2C, C-3), 129.19 (2C, C-2), 131.46 (d,  $J = 4.4$  Hz, HC=NO), 136.24 (C-1), 147.77 (C-4)

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.92

**HRMS**: valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  334.0970; expérimentale 334.0970

### 2-(diethoxyphosphoryl)-N-(4-nitrobenzylidene)propan-2-amine oxide (15)



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$   
M: 344,3  
m.p. : 139.9°C (lit.)

Le produit **7** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,6 g, 2,8 mmol) et de 4-nitrobenzaldehyde (0,43 g, 2,8 mmol) dans du DCE (25 mL). Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0.44 g) après précipitation dans un mélange éther/DCM (70/30, V/V).

Rendement: 46%

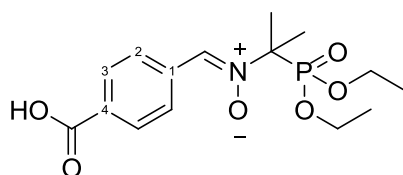
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.34 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.84 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.89 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.21 (dq,  $J = 15.1, 7.0$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.92 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, HC=NO), 8.26 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-2), 8.44 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-3)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.41 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.20 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.59 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 73.97 (d,  $J = 153.5$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 123.71 (2C, C-3), 129.19 (2C, C-2), 131.46 (d,  $J = 4.4$  Hz, HC=NO), 136.24 (C-1), 147.77 (C-4)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.38

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  345.1210; expérimentale 345.1210

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(4-carboxybenzylidene)-propan-2-amine oxide (16)**



$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_6\text{P}$   
M: 343,3 g/mol  
m.p. : 141.9°C

Le produit **16** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,4 g, 2 mmol) et de 4-carboxybenzaldehyde (0.29 g, 2 mmol) dans du DCE (20 mL). Le produit est isolé sous la forme d'une poudre blanche (0.43 g) par précipitation dans l'éther.

Rendement: 66%

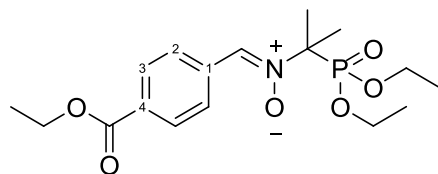
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.39 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.86 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.91 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.30 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.68 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 7.75 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-2), 8.16 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-3)

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.38 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.23 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.84 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 74.08 (d,  $J = 157.9$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 128.46 (2C, C-3), 129.82 (2C, C-2), 132.45 (d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 133.84 (d,  $J = 1.1$  Hz, C-1), 167.82 (C-4)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.59

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  344.1258; expérimentale 344.1260

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(4-(ethoxycarbonyl)benzylidene)propan-2-amine oxide (17)**



$C_{17}H_{26}NO_6P$   
M: 371,4 g/mol

Le produit **17** est obtenu selon la méthode général à partir d'hydroxylamine **3** (0.3 g, 1.42 mmol) et de 4-éthoxycarbonylbenzaldéhyde (0.25 g, 1.42 mmol) dans du DCE (20 mL). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0.4 g) après filtration et évaporation du mélange réactionnel.

Rendement: 76 %

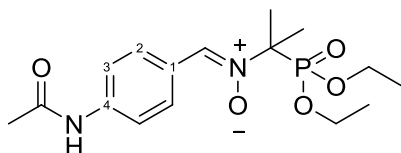
$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.30 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H,  $-P(OCH_2CH_3)_2$ ), 1.37 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $-CO_2CH_2CH_3$ ), 1.80 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.85 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 4.18 (quint,  $J = 7.2$  Hz, 4H,  $-P(OCH_2CH_3)_2$ ), 4.35 (q,  $J = 7.2$  Hz 4H,  $-CO_2CH_2CH_3$ ), 7.80 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, HC=NO), 8.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-2), 8.30 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-3)

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  14.20 ( $-CO_2CH_2CH_3$ ), 16.32 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-P(OCH_2CH_3)_2$ ), 23.15 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 61.3 ( $-CO_2CH_2CH_3$ ), 63.84 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-P(OCH_2CH_3)_2$ ), 73.37 (d,  $J = 154.1$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 128.47 (2C, C-3), 129.48 (2C, C-2), 131.38 (C-4), 132.43 (d,  $J = 5.0$  Hz, HC=NO), 134.29 (d,  $J = 2.2$  Hz, C-1), 165.83 (CO)

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  22.82

HRMS : valeur théorique pour  $C_{17}H_{27}NO_6P^+$   $[M+H]^+$  372.1571; expérimentale 372.1568

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(4-acetamidobenzylidene) propan-2-amine oxide (18)**



$C_{16}H_{25}N_2O_5P$   
M: 356,4 g/mol  
m.p. : 154.7°C

Le produit **18** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et du 4-acetamidobenzaldéhyde (0,39 g, 2,4 mmol) dans du DCE (25 mL). La

nitro est isolée sous la forme d'un solide blanc après précipitation avec de l'acétate d'éthyle (0.59 g).

Rendement : 73%

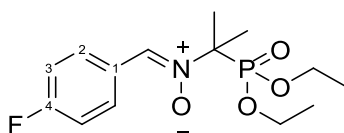
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.22 (t,  $J = 7.0$ , 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.67 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.72 (s, 3H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.05 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 4.07 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.63 (d,  $J = 8.8$ , 2H, H-2), 7.80 (d,  $J = 2.4$ , 1H, HC=NO), 8.28 (d,  $J = 8.8$ , 2H, H-3), 10.15 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  16.27 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.90 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.09 (CH<sub>3</sub>), 62.54 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.43 (d,  $J = 155.7$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 118.13 (2C, C-3), 125.82 (C-1), 129.50 (2C, C-2), 131.21 (d,  $J = 6.0$ , HC=NO), 140.72 (C-4), 168.58 (CO)

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  23.38

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  357.1574; expérimentale 357.1573

### 2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(4-fluorobenzylidene)propan-2-amine oxide (19)



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{FNO}_4\text{P}$   
M: 317,3 g/mol

Le produit **19** est obtenu selon la procédure générale à d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et du 4-fluorobenzaldéhyde (0.3g, 2.4 mmol) dans du DCE (20 mL). Le produit est isolé sous la forme d'une huile vert pâle (0.55 g).

Rendement: 70%

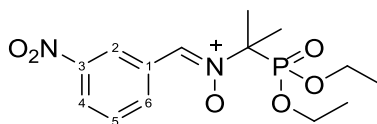
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.19 (td,  $J = 7.0$ , 1.4 Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.67 (s 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.72 (s 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.07 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.95 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-3), 7.60 (brs, 1H, HC=NO), 8.20 (dd,  $J = 8.4$  ; 6.0 Hz, 2H, H-2)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.06 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.88 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 62.99 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.47 (d,  $J = 155.2$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 115.08 (d,  $J = 21.5$  Hz, 2C, C-3), 126.77 (dd,  $J = 3.3$ , 1.7 Hz, C-1), 130.88 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2C, C-2), 131.59 (d,  $J = 5.5$  Hz, HC=NO), 162.93 (d,  $J = 252.5$  Hz, C-4)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.86

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{FNO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  318.1265; expérimentale 318.1267

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(3-nitrobenzylidene)propan-2-amine oxide (20)**



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$   
M: 344,3  
m.p. : 80.2°C

Le produit **20** est obtenu selon la méthode générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et de 3-nitrobenzaldehyde (0,36 g, 2,4 mmol) dans du DCE (25 mL). Le résidu isolé est repris dans un mélange éther/pentane (50/50, V/V) pour donner des cristaux translucides (0.1 g).

Rendement: 42%

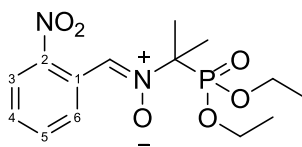
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.34 (t,  $J = 7.3$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.83 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.88 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.21 (q,  $J = 7.4$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.91 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, HC=NO), 8.23 (brd,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 8.58 (brd,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-4), 9.18 (brs, 1H, H-2)

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.39 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.17 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.55 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 73.62 (d,  $J = 154.1$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 123.28 (C-4), 124.50 (C-2), 129.37 (C-6), 131.16 (d,  $J = 6.0$  Hz, HC=NO), 132.07 (C-1), 134.02 (C-6), 148.20 (C-3)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.50

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  345.1210; expérimentale 345.1211

**Données des cristaux** :  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ , Mr = 344.30, groupe d'espace C c, Hall group C - 2yc; a = 14.3666(4), b = 17.1483(4), c = 7.19842(16) Å,  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 94.052(2)$ ,  $\gamma = 90^\circ$

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(2-nitrobenzylidene)propan-2-amine oxide (21)**

$C_{14}H_{21}N_2O_6P$   
M: 344,3

Le composé **21** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.4 g, 2 mmol) et de 2-nitrobenzaldéhyde (0.29 g, 2 mmol) dans du DCE (20 mL). Après filtration et évaporation sous pression réduite, le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (0.3 g).

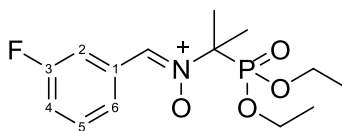
Rendement : 46%

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.83 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.88 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 4.24 (quint,  $J = 7.3$  Hz, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.52 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5), 7.68 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-4), 8.04 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 8.32 (d,  $J = 2.0$  Hz,  $HC=NO$ ), 9.01 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-3)

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.41 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 23.20 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 63.48 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 74.27 (d,  $J = 154.6$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 124.65 (d,  $J = 1.6$  Hz, C-1), 124.77 (C-3), 127.35 (d,  $J = 4.9$  Hz  $HC=NO$ ), 129.71 (C-6), 130.06 (C-4), 133.31 (C-5), 147.48 (C-2)

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  22.20

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{14}H_{22}N_2O_6P^+$   $[M+H]^+$  345.1210; expérimentale 345.1209

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(3-fluorobenzylidene)propan-2-amine oxide (22)**

$C_{14}H_{21}FNO_4P$   
M: 317,3 g/mol

Le produit **22** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.5 g, 2.4 mmol) et de 3-fluorobenzaldéhyde (0,3 g, 2,4 mmol), dans du DCE (20 mL). Le produit est isolé sous la forme d'une huile vert pâle (0.67 g).

Rendement: 87%

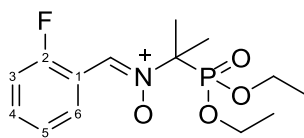
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.33 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.81 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.86 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.20 (dq,  $J = 15.1, 7.1$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.10 (td,  $J = 8.4, 2.6$  Hz, 1H, H-4), 7.36 (td,  $J = 8.1; 6.0$  Hz, 1H, H-5), 7.74 (brs,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.77 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, HC=NO), 8.35 (brd,  $J = 10.6$  Hz, 1H, H-2)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.39 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.18 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.21 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.46 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 73.14 (d,  $J = 154.0$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 115.17 (d,  $J = 24.2$  Hz, C-4), 117.23 (d,  $J = 21.5$  Hz, C-2), 124.92 (d,  $J = 2.2$ , C-6), 129.65 (d,  $J = 8.3$ , C-5), 132.27 (brs, HC=NO), 132.46 (dd,  $J = 8.8, 1.6$  Hz, C-1), 162.52 (d,  $J = 244.8$  Hz, C-3)

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.80

**HRMS** : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{FNO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  318.1265; expérimentale 318.1266

### 2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(2-fluorobenzylidene)propan-2-amine oxide (**23**)



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{FNO}_4\text{P}$   
M: 317,3 g/mol  
m.p.: 49.1°C

Le produit **23** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,5 g, 2,4 mmol) et de 2-fluorobenzaldehyde (0,3 g, 2,4 mmol) dans du DCE (25 mL). Le produit est isolé sous la forme de cristaux blancs (0,21 g) dans l'hexane.

Rendement : 40%

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.32 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.81 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.86 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.20 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.01 (ddd,  $J = 11; 8.2; 0.9$  Hz, 1H, H-3), 7.12 (brt,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-5), 7.30 (ddd,  $J = 7.5; 5.7; 1.5$  Hz, 1H, H-4), 7.94 (d,  $J = 2.6$  Hz, HC=NO), 9.19 (td,  $J = 7.9; 1.5$  Hz, 1H, H-6)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.33 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.21 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.22 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.31 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 73.78 (d,  $J = 155.2$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 114.47 (d,  $J = 21.5$  Hz, C-3), 119.1 (dd,  $J = 8.8, 2.2$  Hz C-1), 124.24 (d,  $J = 3.9$  Hz, C-6),



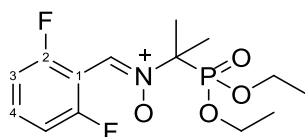
125.17 (dd,  $J = 9.4; 6.3$  Hz, HC=NO), 128.85, 131.62 (d,  $J = 8.8$  Hz, C-4), 160.24 (d,  $J = 253.1$  Hz, C-2)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.63

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{FNO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  318.1265; expérimentale 318.1265

Données des cristaux  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{FNO}_4\text{P}$ ,  $M_r=317.26$ , space group P 21/c, Hall group -P 2ybc;  $a = 7.3405(3)$ ,  $b = 23.6425(7)$ ,  $c = 9.5954(4)$  Å,  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 97.794(4)$ ,  $\gamma = 90^\circ$

### 2-(diethoxyphosphoryl)-*N*-(2,6-difluorobenzylidene)propan-2-amine oxide (24)



$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{NO}_4\text{P}$   
M: 335,3 g/mol

Le produit **24** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,3 g, 1,42 mmol) et de 2,6-difluorobenzaldéhyde (0,2 g, 1,42 mmol) dans du DCE (20 mL). Le produit est isolé sous la forme d'une huile verte (0,2 g).

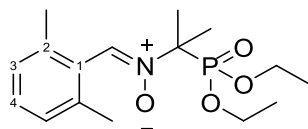
Rendement: 43 %

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.69 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.74 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.09 (quint,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.14 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-3), 7.52 (tt,  $J = 8.5; 6.7$  Hz, 1H, H-4), 8.32 (d,  $J = 2.0$  Hz, HC=NO)

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.24 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.02 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 62.92 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 72.89 (d,  $J = 154.6$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 108.70 (t,  $J = 11.6$  Hz, C-1), 111.72 (brd,  $J = 22.0$  Hz, 2C, C-3), 127.35 (d,  $J = 4.9$  Hz, HC=NO), 131.82 (t,  $J = 10.4$  Hz, C-4), 159.94 (dd,  $J = 252.5, 8.8$  Hz, 2C, C-2)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.48

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  336.1171; expérimentale 336.1171

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(2,6-dimethylbenzylidene)propan-2-amine oxide (25)**

$C_{16}H_{26}NO_4P$   
 M: 327,4 g/mol  
 m.p.: 66.7 °C

Le produit **25** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0.3 g, 1.42 mmol) et de 2,6-diméthylbenzaldéhyde (0.19 g, 1.42 mmol) dans du THF (20 mL). Le produit est isolé sous la forme de cristaux blancs (0.15 g) dans l'éther diéthylique.

Rendement: 32%

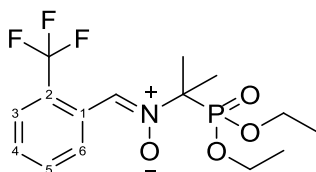
$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.84 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.89 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 2.30 (s, 6H,  $-PhCH_3$ ), 4.24 (m, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.05 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-3), 7.18 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-4), 7.89 (d,  $J = 1.8$  Hz,  $HC=NO$ )

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.46 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 19.79 (2C,  $-PhCH_3$ ), 23.60 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 63.30 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 72.47 (d,  $J = 155.7$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 127.46 (2C, C-3), 128.77 (C-1), 129.14 (C-4), 133.35 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $HC=NO$ ), 137.61 et 137.63 (2C, C-2)

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  23.03

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{16}H_{27}NO_4P^+$   $[M+H]^+$  328.1672; expérimentale 328.1672

**Données des cristaux**  $C_{16}H_{26}NO_4P$ ,  $M_r=327.35$ , space group C c, Hall group C -2yc;  $a = 16.2402(9)$ ,  $b = 20.1187(2)$ ,  $c = 9.1254(5)$  Å,  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 143.236(12)$ ,  $\gamma = 90^\circ$

**2-(diethoxyphosphoryl)-N-(2-(trifluorométhyl)benzylidene)propan-2-amine oxide (26)**

$C_{15}H_{21}F_3NO_4P$   
 M: 367,3 g/mol

La produit **26** est obtenu selon la procédure générale à partir d'hydroxylamine **3** (0,3 g, 1,42 mmol) et de 2-trifluorométhylbenzaldéhyde (0,25 g, 1,42 mmol) dans du DCE (20

mL). Le produit est isolé après filtration et évaporation sous pression réduite sous la forme d'une huile verte (0.33 g).

Rendement: 60 %

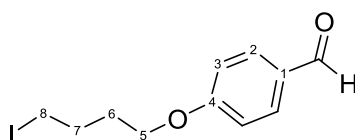
$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.34 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.83 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.88 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.23 (quint,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 7.47 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-5), 7.62 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-4), 7.72 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-6), 7.80 (d,  $J = 2.5$  Hz,  $\text{HC}=\text{NO}$ ), 9.42 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-3)

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.24 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 23.07 (1C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 63.39 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 74.03 (d,  $J = 154.1$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 123.95 (q,  $J = 274.0$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 125.68 (q,  $J = 6.1$  Hz C-3), 127.40 (q,  $J = 29.7$  Hz, C-2), 127.91 (brs, 2C,  $\text{HC}=\text{NO}$  et C-1), 129.02 (C-6), 129.43, (C-4), 131.99 (C-5).

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  22.36

**HRMS**: valeur théorique pour  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{NO}_4\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  368.1233; expérimentale 368.1233

#### 4-(4-iodobutoxy)benzaldehyde (27)



$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{IO}_2$   
M: 304,12 g/mol

Le 4-hydroxybenzaldehyde (0.5 g, 4 mmol) est dissout dans 20 ml d'acétonitrile en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.94 g, 6.8 mmol) et agité pendant 30 minutes à  $0^\circ\text{C}$ . Le 1,4-diiodobutane est ajouté goutte à goutte tout en maintenant la température à  $0^\circ\text{C}$ .

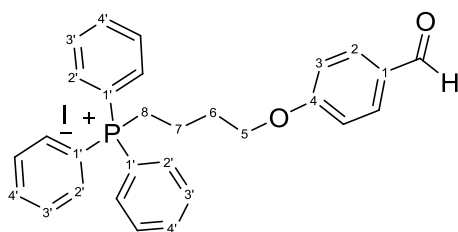
L'ajout terminé, la solution est ramenée à température ambiante et laissée en agitation pendant 12 heures. Le mélange brut, filtré et évaporé, est séparé par chromatographie sur gel de silice (éluant  $\text{CHCl}_3$ ) pour donner le composé **27** pur sous forme d'huile jaune (0.82 g)

Rendement: 67 %

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.92 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -7 et  $\text{CH}_2$ -6), 3.21 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ -8), 4.01 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 6.93 (dd,  $J = 2.0, 8.9$  Hz, 2H, H-3), 7.76 (dd,  $J = 2.00, 8.9$  Hz 2H, H-2), 9.82 (s, 1H, CHO).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.13 ( $\text{CH}_2$ -8), 29.77 ( $\text{CH}_2$ -7 et  $\text{CH}_2$ -6), 66.85 ( $\text{CH}_2$ -5), 114.52 (2C, C-3), 129.68 (C-1), 131.76 (2C, C-2), 163.65 (C-4), 190.53 (CHO).

**(4-(4-formylphenoxy)butyl)triphenylphosphonium iodide (28)**



$\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{IO}_2\text{P}$   
M: 566.41 g/mol

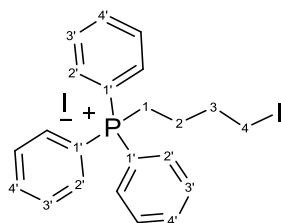
Le composé **27** (0.6 g, 2 mmol) et la triphenylphosphine (0.9 g, 3.4 mmol) sont mélangés dans toluène (20 ml) et agités pendant 12 heures à reflux. Le mélange réactionnel évaporé, on obtient une huile jaune qui est dissoute dans un minimum de DCM sur laquelle on ajout goutte à goutte de l'éther (30 ml). Une huile se colle à la paroi du ballon et l'agitation est maintenue jusqu'à ce que la phase étherée devienne limpide. La phase étherée est éliminée et la même procédure est répétée deux fois sur le résidu. L'huile récupérée est séchée sous pression réduite en donnant le produit **28** sous la forme d'huile jaune (1 g).

Rendement: 88%

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.88 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -7), 2.25 (quint,  $J = 6.0$ , 3H,  $\text{CH}_2$ -6), 3.84 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -8), 4.20 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 6.95 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.68 (m, 6H, H-3'), 7.80 (m, 11H, H-2', H-4' et H-2), 9.84 (s, 1H, CHO).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  19.14 (d,  $J = 4.0$  Hz,  $\text{CH}_2$ -7), 22.44 (d,  $J = 50$  Hz,  $\text{CH}_2$ -8), 29.13 (d,  $J = 16.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ -6), 67.00 ( $\text{CH}_2$ -5), 114.85 (2C, C-3), 118.00 (d,  $J = 85.8$  Hz, 3C, C-1'), 129.86 (C-1), 130.49 (d,  $J = 12.6$  Hz, 6C, C-3'), 130.94 (2C, C-2), 133.65 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 135.11 (d,  $J = 3.3$  Hz, 3C, C-4'), 163.70 (C-4), 190.74 (CHO).

**$^{31}\text{P}$  RMN** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.46

**Iodure de (4-iodobutyl)triphénylphosphonium (29, IBTP)**

$C_{22}H_{23}I_2P$   
 M: 572,2 g/mol  
 m.p.: 170.2 °C

La triphénylphosphine (1 g, 3,82 mmol) et le 1,4-diiodobutane (6 g, 19 mmol) sont mélangés et agités pendant 1,5 h à 120°C à l'abri de la lumière.

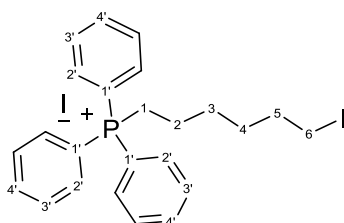
La réaction terminée, on obtient une crème rose que l'on reprend avec de l'éther. Le précipité formé (2.15 g) est filtré et séché à l'air.

Rendement: 98%

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.82 (m, 2H,  $CH_2$ -2), 2.21 (quint,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $CH_2$ -3), 3.33 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -4), 3.78 (m, 2H,  $CH_2$ -1), 7.72 (m, 6H, H-2'), 7.82 (m, 6H, H-3'), 7.85 (m, 3H, H-4').

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.42 ( $CH_2$ -4), 21.93 (d,  $J = 51.2$  Hz,  $CH_2$ -1), 23.16 (d,  $J = 3.9$  Hz,  $CH_2$ -2), 32.45 (d,  $J = 17.1$  Hz,  $CH_2$ -3), 117.81 (d,  $J = 86.4$  Hz, 3C, C-1'), 130.59 (d,  $J = 12.7$  Hz, 6C, C-3'), 133.71 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 135.20 (d,  $J = 3.3$  Hz, 3C, C-4'),

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  24.49

**Iodure de (6-iodohexyl)triphénylphosphonium (30, IHTP)**

$C_{24}H_{27}I_2P$   
 M: 600,3 g/mol

La triphénylphosphine (1 g, 3,8 mmol) et le 1,6-diiodohexane (5 g, 15 mmol) sont mélangés et agités 1,5 h à 120°C à l'abri de la lumière.

La réaction terminée, on obtient un résidu huileux rouge que l'on reprend avec un minimum de DCM auquel on ajoute de l'éther (50ml). Un produit visqueux se forme au fond du ballon. La phase étherée est éliminée et la même opération est répétée 2 fois. On obtient une huile rouge-brun (1.5 g).

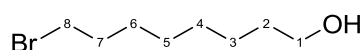
Rendement: 65%

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.42 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 1.74 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -2,  $\text{CH}_2$ -4,  $\text{CH}_2$ -5), 3.09 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -6), 3.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -1), 7.70 (m, 6H, H-2'), 7.80 (m, 9H, H-3' et H-4').

$^{13}\text{C RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.47 ( $\text{CH}_2$ -6), 22.42 (d,  $J = 4.40$  Hz,  $\text{CH}_2$ -2), 22.99 (d,  $J = 50.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ -1), 29.19 (d,  $J = 16.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ -3), 29.87 ( $\text{CH}_2$ -4), 32.78 ( $\text{CH}_2$ -5), 118.04 (d,  $J = 85.8$  Hz, 3C, C-1'), 130.53 (d,  $J = 12.6$  Hz, 6C, C-3'), 133.64 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 135.10 (d,  $J = 2.8$  Hz, 3C, C-4').

$^{31}\text{P RMN}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.23

### 8-bromo-1-octanol (31)



$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{BrO}$   
M: 209,12 g/mol

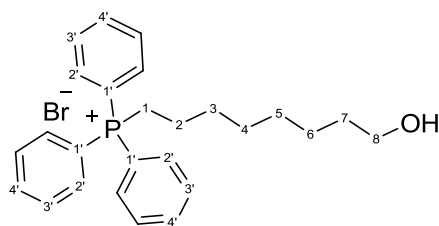
Le 1,8-Octanediol (3 g, 20.5 mmol) est solubilisé dans 40 ml de toluène et l'acide bromhydrique 48% (2.5 g, 1.6 ml, 30.8 mmol) est ajouté lentement. Le mélange réactionnel est agité à 150°C pendant 24 heures. La réaction terminée, la solution est extraite à l'eau, la phase organique évaporée est reprise avec du DCM (30 ml) et lavée avec des solutions NaOH 10% (30 ml), HCl 10% (30 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (2 X 30 ml) et  $\text{NaCl}_{\text{sat}}$ . (30 ml). La phase organique est évaporée et on obtient le produit **31** (3.2 g) sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 77%

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.34 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -3,  $\text{CH}_2$ -4,  $\text{CH}_2$ -5), 1.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6), 1.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 1.86 (quint,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -7), 3.41 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -8), 3.64 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -1).

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.60 ( $\text{CH}_2$ -3), 28.05 ( $\text{CH}_2$ -6), 28.69 ( $\text{CH}_2$ -4), 29.18 ( $\text{CH}_2$ -5), 32.68\* ( $\text{CH}_2$ -7), 32.75\* ( $\text{CH}_2$ -2), 33.97 ( $\text{CH}_2$ -8), 62.96 ( $\text{CH}_2$ -1).

\*peuvent être inversés

**(8-hydroxyoctyl)triphenylphosphonium bromide (32)**

$C_{26}H_{32}BrOP$   
M: 471,41 g/mol

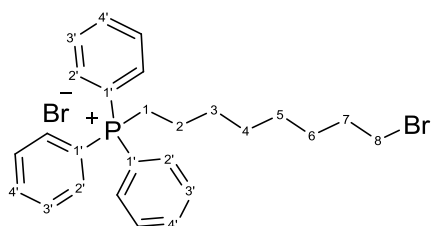
Le composé **31** (2 g, 9.6 mmol) et la triphénylphosphine (2.8 g, 10.5 mmol) sont mélangés dans l'acétonitrile (100 ml) et agités pendant 48 h à 85°C. Le mélange réactionnel est évaporé et on obtient une huile jaune pâle. Ce résidu est dissous dans un minimum de DCM sur lequel on ajoute goutte à goutte de l'éther (60 ml). Une huile se colle à la paroi du ballon et l'agitation est maintenue jusqu'à ce que la phase étherée devienne limpide. La phase étherée est éliminée et la même opération est répétée deux fois sur le résidu. Le résidu récupéré est séché sous pression réduite en donnant le produit **32** sous la forme d'une huile jaune (3.5 g).

Rendement: 78%

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.29 (m, 4H,  $\underline{CH_2-4}$ ,  $\underline{CH_2-5}$ ), 1.52 (m, 4H,  $\underline{CH_2-6}$ ,  $\underline{CH_2-3}$ ), 1.64 (m, 4H,  $\underline{CH_2-2}$ ,  $\underline{CH_2-7}$ ), 3.59 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\underline{CH_2-8}$ ), 3.73 (m, 2H,  $\underline{CH_2-1}$ ), 7.73 (m, 6H, H-2'), 7.81 (m, 6H, H-3'), 7.84 (m, 3H, H-4').

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  22.22 (d,  $J = 3.9$  Hz,  $\underline{C-2}$ ), 22.45 (d,  $J = 50.1$  Hz,  $\underline{C-1}$ ), 25.18 ( $\underline{C-6}$ ), 28.44 ( $\underline{C-4}$  et  $\underline{C-5}$ ), 29.88 (d,  $J = 16.0$  Hz,  $\underline{C-3}$ ), 32.22 ( $\underline{C-7}$ ), 62.10 ( $\underline{C-8}$ ), 118.00 (d,  $J = 85.8$  Hz, 3C, C-1'), 130.39 (d,  $J = 12.7$  Hz, 6C, C-3'), 133.39 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 134.95 (d,  $J = 2.2$  Hz, 3C, C-4'),

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  24.35

**(8-bromooctyl)triphenylphosphonium bromide (33)**

$C_{26}H_{31}Br_2P$   
M: 534,31 g/mol

Le composé **32** (1 g, 2.1 mmol) est dissous dans l'acétonitrile (50 ml) et du HBr 48% (0.88 g, 1.7 ml, 5.25 mmol) est ajouté lentement. Le mélange est agité à 85°C pendant 24 heures. La réaction terminée on observe la formation d'un précipité qui est éliminé par filtration. Le filtrat extrait à l'eau est évaporé et repris dans du DCM (20 ml). La solution est lavée avec NaOH 10% (20 ml), HCl 10% (20 ml), H<sub>2</sub>O (2 X 20 ml) et NaCl<sub>sat.</sub> (20 ml). La phase organique évaporée on obtient 0.6 g de produit **33** sous la forme d'une huile ocre.

Rendement: 53%

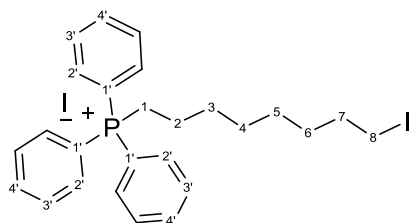
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.28 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-4 et CH<sub>2</sub>-5), 1.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-3), 1.69 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-2, CH<sub>2</sub>-6, CH<sub>2</sub>-7), 3.50 (d, J = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-8), 3.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-1), 7.73 (m, 6H, H-2'), 7.80 (m, 6H, H-3'), 7.85 (m, 3H, H-4').

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 22.34 (d, J = 4.4 Hz, CH<sub>2</sub>-2), 22.52 (d, J = 50.1 Hz, CH<sub>2</sub>-1), 26.37 (CH<sub>2</sub>-6), 28.13\* (CH<sub>2</sub>-5), 28.66\* (CH<sub>2</sub>-4) 30.03 (d, J = 15.4 Hz, CH<sub>2</sub>-3), 32.19 (CH<sub>2</sub>-7), 44.93 (CH<sub>2</sub>-8), 118.02 (d, J = 85.8 Hz, 3C, C-1'), 130.34 (d, J = 12.7 Hz, 6C, C-3'), 133.38 (d, J = 9.9 Hz, 6C, C-2'), 134.89 (d, J = 3.3 Hz, 3C, C-4').

\*peuvent être inversés

<sup>31</sup>P RMN (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 24.49



Iodure de (8-iodooctyl)triphénylphosphonium (**34**, IOTP)

$C_{24}H_{27}I_2P$   
M: 600,3 g/mol

Le produit **34** a été obtenu selon deux modes opératoires différents :

Methode 1

Le composé **33** (0.5 g, 0.9 mmol) est solubilisé dans l'acétone (60 ml) et la solution est saturée avec du NaI. La suspension est agitée pendant 24 h à 60°C. La réaction terminée on filtre et après évaporation on obtient le produit **34** (0.55 g) sous forme d'une huile orange.

Rendement: 98%

Methode 2

Le composé **32** (0.35 g, 0.74 mmol) est solubilisé dans l'acétonitrile (5 ml) et du HI à 57% est ajouté (1.7 ml, 1 g, 4.4 mmol) lentement. Le mélange est agité à 100°C pendant 5 heures. La réaction est bloquée avec l'ajout de NaOH 5% (3 ml) afin de neutraliser l'acide en excès. La phase organique récupérée est évaporée et reprise avec du DCM. Suite à deux lavages à l'eau et un lavage avec une solution saturée de  $Na_2S_2O_3$  la phase organique est évaporée et on obtient 0.46 g de produit **34** sous la forme d'une huile ocre.

Rendement: 98%

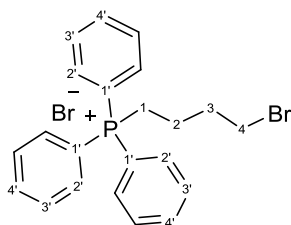
$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.20-1.35 (m, 6H,  $\underline{CH}_2$ -4,  $\underline{CH}_2$ -5 et  $\underline{CH}_2$ -6), 1.65 (m, 4H,  $\underline{CH}_2$ -3 et  $\underline{CH}_2$ -7), 1.79 (m, 2H,  $\underline{CH}_2$ -2), 3.15 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $\underline{CH}_2$ -8), 3.68 (m, 2H,  $\underline{CH}_2$ -1), 7.77 (m, 6H, H-2'), 7.81 (m, 6H, H-3'), 7.83 (m, 3H, H-4').

$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.47 ( $\underline{CH}_2$ -8), 22.52 (d,  $J = 4.4$  Hz,  $\underline{CH}_2$ -2), 23.12 (d,  $J = 50.1$  Hz,  $\underline{CH}_2$ -1), 27.96\* ( $\underline{CH}_2$ -5), 28.84\* ( $\underline{CH}_2$ -4), 30.17 ( $\underline{CH}_2$ -6), 30.22 (d,  $J = 15.4$  Hz,  $\underline{CH}_2$ -3), 33.27 ( $\underline{CH}_2$ -7), 118.15 (d,  $J = 85.8$  Hz, 3C, C-1'), 130.52 (d,  $J = 12.6$  Hz, 6C, C-3'), 133.67 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 135.07 (d,  $J = 2.8$  Hz, 3C, C-4'),

\*peuvent être inversés

$^{31}\text{P}$  RMN (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.23

**Bromure de (4-iodobutyl)triphénylphosphonium (35, BBTP)**



$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{P}$   
 M: 478,20 g/mol  
 mp: 207 °C

Le 1,4-dibromobutane (7.1ml, 60.0 mmol) et la triphénylphosphine (15.72 g, 60.0 mmol) sont mélangés dans du toluène (60 ml) et agités pendant 24 heures à 95°C.

Le produit **35**, insoluble dans le toluène, précipite et il est récupéré après filtration sous la forme de poudre blanche (15.6 g).

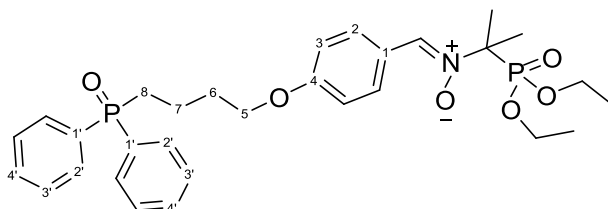
Rendement: 55%

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.24 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -3), 3.48 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.83 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -1), 7.64-7.86 (15H, m, Ar)

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  20.61 (d,  $J = 3.9$  Hz  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -2), 21.44 (d,  $J = 51.7$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -1), 31.78 (d,  $J = 17.0$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -3) 33.42 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -4), 117.81 (d,  $J = 85.8$ Hz, 3C, C-1'), 130.29 (d,  $J = 12.1$  Hz, 6C, C-3'), 133.42 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 134.86 (d,  $J = 2.8$  Hz, 3C, C-4'),

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  24.49

**2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(4-(4-(diphénylphosphoryl)butoxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (36)**



$\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{P}_2$   
 M: 571,6 g/mol

Le composé **5** (0.2 g, 0.63 mmol) est solubilisé dans l'acétonitrile (10 ml), et du NaH 60% (0.063 g, 1.6 mmol) est ajouté par fractions à 0°C. On obtient une suspension blanchâtre qui est agitée durant 30 minutes à température ambiante. Une solution d'IBTP (0.43 g, 0.76 mmol) dissous dans l'acétonitrile (10 ml) est lentement ajoutée à

0°C, puis le milieu agité à 40°C pendant 12h. Au bout de ce temps, la solution devient jaune limpide.

De l'eau glacée (10 ml) est ajoutée pour neutraliser l'excès de NaH et la solution est extraite au DCM (3 x 10 ml). Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées sous pression réduite. On obtient une huile jaune pâle qui est dissoute dans un minimum de DCM sur laquelle on ajout goutte à goutte de l'éther (50 ml). Une huile se colle à la paroi du ballon et l'agitation est maintenue jusqu'à ce que la phase étherée devienne limpide. La phase étherée est récupérée et la même opération est répétée sur le résidu. Les phases organiques sont récupérées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées. Le produit **36** est obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle (0.23 g).

Rendement: 64%

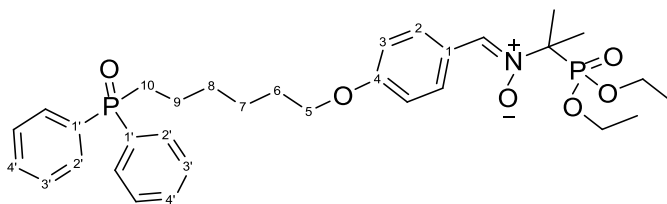
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 6H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.68 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.72, (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-6 et CH<sub>2</sub>-7), 2.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-8), 3.86 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 4.08 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.74 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-3), 7.37 (m, 6H, H-4' et H-3'), 7.54 (brs, 1H, HC=NO), 7.62 (m, 4H, H-2'), 8.12 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-2)

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 16.35 (d, J = 6.0 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.30 (d, J = 3.3 Hz, CH<sub>2</sub>-7), 23.73 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 29.20 (d, J = 72.1 Hz, CH<sub>2</sub>-8), 29.97 (d, J = 14.3 Hz, CH<sub>2</sub>-6), 63.27 (d, J = 6.6 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 66.99 (CH<sub>2</sub>-5), 72.14 (d, J = 154.6 Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 114.14 (2C, C-3), 123.50 (d, J = 1.7 Hz, C-1), 128.62 (d, J = 11.6 Hz, 4C, C-3'), 130.66 (d, J = 9.4 Hz, 4C, C-2'), 130.96 (2C, C-2), 131.74 (d, J = 2.8 Hz, 2C, C-4'), 132.61 (d, J = 98.5 Hz, 2C, C-1'), 132.89 (d, J = 6.1 Hz, HC=NO), 160.32 (C-4)

<sup>31</sup>P RMN (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 23.34, 32.29

MS-ESI : [M+H]<sup>+</sup> : m/z 572,2 ; [M+Na]<sup>+</sup> : m/z 594,2.

**2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(4-(6-(diphénylphosphoryl)hexyloxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (37)**



C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>6</sub>P<sub>2</sub>  
M: 599,6 g/mol

Le composé **37** est obtenu selon la même procédure que celle décrite précédemment pour le produit **36** à partir de la nitrone **5** (0,2 g, 0.63 mmol), de NaH 60% (0,063 g, 1.6 mmol) et d'IHTP (0,46 g, 0.76 mmol).

Après purification on obtient 0.17 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 43%

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-7 et CH<sub>2</sub>-8), 1.63\* (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6), 1.70\* (m, 2H, CH<sub>2</sub>-9), 1.78 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.83, (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-10), 3.93 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 4.18 (quint, 4H, *J* = 7.3 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3), 7.44 (m, 2H, H-4'), 7.47 (m, 4H, H-3'), 7.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, HC=NO), 7.71 (m, 4H, H-2'), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-2)

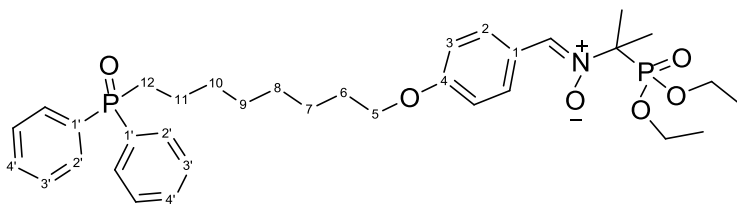
\*peuvent être inversés

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 16.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.29 (d, *J* = 3.8 Hz, CH<sub>2</sub>-9), 23.19 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.43 (CH<sub>2</sub>-7), 28.74 (CH<sub>2</sub>-6), 29.52 (d, *J* = 72.1 Hz, CH<sub>2</sub>-10), 30.50 (CH<sub>2</sub>-8), 63.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 67.67 (CH<sub>2</sub>-5), 72.08 (d, *J* = 154.6 Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 114.13 (2C, C-3), 123.29 (d, *J* = 1.7 Hz, C-1), 128.54 (d, *J* = 11.5 Hz, 4C, C-3'), 130.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 4C, C-2'), 130.91 (2C, C-2), 131.59 (d, *J* = 2.8 Hz, 2C, C-4'), 132.80 (d, *J* = 5.5 Hz, HC=NO), 132.95 (d, *J* = 97.9 Hz, 2C, C-1'), 160.52 (C-4)

<sup>31</sup>P RMN (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 23.38, 32.51

**MS-ESI** : [M+H]<sup>+</sup> : m/z 600.3 ; [M+Na]<sup>+</sup> : m/z 622.3.

**2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(4-((8-(diphénylphosphoryl)octyl)oxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (38)**


 $C_{34}H_{47}NO_6P_2$ 

M: 627,69

Le composé **38** est obtenu selon la même procédure que celle décrite précédemment pour le produit **36** à partir de la nitronne **5** (0,125 g, 0.4 mmol), de NaH 60% (0,04 g, 1 mmol) et de composé **34** (0,25 g, 0.4 mmol).

Après purification on obtient 0.08 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 32%

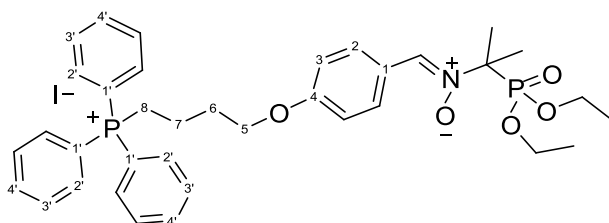
**<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.30 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.39 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-8, CH<sub>2</sub>-9 et CH<sub>2</sub>-10), 1.62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-6, CH<sub>2</sub>-7), 1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-11), 1.80 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.84 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.247 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-12), 3.96 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 4.19 (quint, 4H,  $J = 7.3$  Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.89 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3), 7.46 (m, 6H, H-4' et H-2'), 7.65 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, HC=NO), 7.72 (m, 4H, H-3'), 7.71 (m, 4H, ), 8.25 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2)

**<sup>13</sup>C RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  16.35 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.29 (d,  $J = 3.8$  Hz, CH<sub>2</sub>-11), 23.19 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.70 (CH<sub>2</sub>-9), 28.74 (CH<sub>2</sub>-6), 28.89 (CH<sub>2</sub>-7 et CH<sub>2</sub>-8), 29.52 (d,  $J = 72.1$  Hz, CH<sub>2</sub>-12), 30.50 (CH<sub>2</sub>-10), 63.21 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 67.67 (CH<sub>2</sub>-5), 72.08 (d,  $J = 154.6$  Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 114.13 (2C, C-3), 123.29 (d,  $J = 1.7$  Hz, C-1), 128.54 (d,  $J = 11.5$  Hz, 4C, C-3'), 130.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 4C, C-2'), 130.91 (2C, C-2), 131.59 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2C, C-4'), 132.80 (d,  $J = 5.5$  Hz, HC=NO), 132.95 (d,  $J = 97.9$  Hz, 2C, C-1'), 160.52 (C-4)

**<sup>31</sup>P RMN** (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  23.38, 32.51

**HRMS** : valeur théorique pour C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>6</sub>P<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 628.2951; expérimentale 628.2948

**Iodure de 2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(4-(4-(triphénylphosphonio)butoxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (39)**



$C_{36}H_{44}INO_5P_2$   
M: 759,6 g/mol

La nitrone **5** (0.1 g, 0.32 mmol) est dissoute dans de l'acétonitrile (10 mL) en présence de  $K_2CO_3$  (0.11 g, 0.8 mmol) et sous atmosphère inerte ( $N_2$ ). Le mélange est agité durant 30 minutes et l'IBTP (0.2 g, 0.32 mmol) dissous dans l'acétonitrile (10 mL) est ajouté au goutte à goutte à 0°C. Le mélange réactionnel est chauffé à 60°C et laissé sous agitation durant 12 heures. Au bout de ce temps, la suspension résultante est filtrée sous pression réduite afin d'éliminer le  $K_2CO_3$ , puis le filtrat est évaporé. Le résidu obtenu est repris avec du DCM (15 ml) et lavé à l' $H_2O$  acide (HCl 1%, 3 x 15 ml). La phase organique récupérée est séchée sur  $MgSO_4$  et évaporée sous pression réduite. Le résidu, une huile jaune pâle, est dissous dans un minimum de DCM sur lequel on ajoute goutte à goutte de l'éther (40 ml). Une huile se colle à la paroi du ballon et l'agitation est maintenue jusqu'à ce que la phase étherée devienne limpide. La phase étherée est éliminée et la même procédure est répétée deux fois sur le résidu. L'huile récupérée est séchée sous pression réduite en donnant un solide ocre (0.1 g).

Rendement: 40%

$^1H$  RMN (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.31 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.79 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.82, (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.86 (m, 2H,  $CH_2-7$ ), 2.22 (quint,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $CH_2-6$ ), 3.80 (m, 2H,  $CH_2-8$ ), 4.11 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $CH_2-5$ ), 4.18 (m, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 6.83 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-3), 7.66 (m, 6H, H-3'), 7.70 (m, 1H,  $HC=NO$ ), 7.80 (m, 9H, H-2' et H-4'), 8.21 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-2)

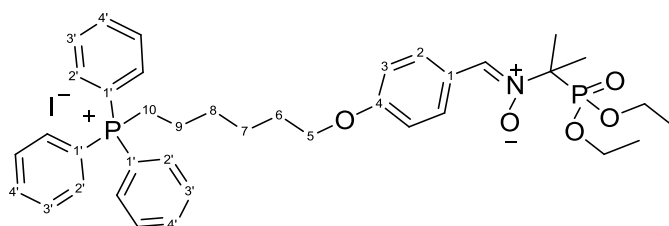
$^{13}C$  RMN (125.76 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.37 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 19.16 (d,  $J = 2.9$  Hz,  $CH_2-7$ ), 22.26 (d,  $J = 50.9$  Hz,  $CH_2-8$ ), 23.24 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 29.02 (d,  $J = 16.3$  Hz,  $CH_2-6$ ), 63.21 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 66.35 ( $CH_2-5$ ), 72.28 (d,  $J = 154.5$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 114.21 (2C, C-3), 117.98 (d,  $J = 85.41$  Hz, 3C, C-1') 123.76 (C-1), 130.47 (d,  $J = 12.5$  Hz,

6C, C-3'), 130.98 (2C, C-2), 132.61 (d,  $J = 5.8$  Hz, HC=NO), 133.62 (d,  $J = 10.6$  Hz, 6C, C-2'), 135.06 (d,  $J = 1.9$  Hz, 3C, C-4'), 160.06 (C-4)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.35, 24.61

HRMS : valeur théorique pour  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{NO}_5\text{P}_2^+ [\text{M}]^+$  632.2689; expérimentale 632.2690

**Iodure de 2-(diéthoxyphosphoryl)-*N*-(4-(6-(triphénylphosphonio)hexyloxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (40)**



$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{INO}_5\text{P}_2$   
M: 787,6 g/mol

Le composé **40** est obtenu selon la même méthode que celle décrite précédemment pour la préparation du produit **39** à partir de la nitrone **5** (0,15 g, 0,47 mmol), de composé **30** (0,31 g, 0,52 mmol) et de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,16 g, 1.2 mmol). Après purification on obtient 0.13 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 35 %

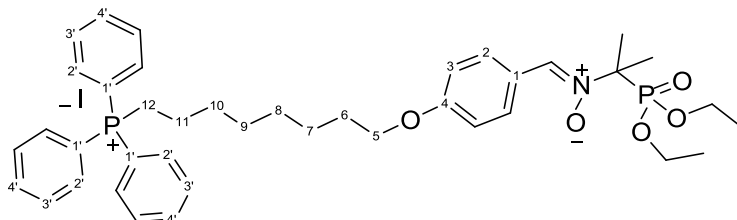
$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.32 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.49 (m, 2H, et  $\text{CH}_2$ -8), 1.74 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ -6,  $\text{CH}_2$ -7,  $\text{CH}_2$ -9), 1.80 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.85 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.74 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -10), 3.96 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 4.20 (quint,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 6.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3), 7.64 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, HC=NO), 7.72 (m, 3H, H-4'), 7.74 (m, 6H, H-3'), 7.82 (m, 6H, H-2'), 8.24 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2)

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.42 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 22.55 (d,  $J = 4.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ -9), 23.04 (d,  $J = 50.07$  Hz,  $\text{CH}_2$ -10), 23.27 (2C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.59 ( $\text{CH}_2$ -7), 28.63 ( $\text{CH}_2$ -6), 29.95 (d,  $J = 15.96$  Hz,  $\text{CH}_2$ -8), 63.28 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 67.68 ( $\text{CH}_2$ -5), 72.18 (d,  $J = 154.6$  Hz,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 114.23 (2C, C-3), 118.14 (d,  $J = 85.8$  Hz, 3C, C-1'), 123.45 (d,  $J = 1.7$  Hz, C-1), 130.51 (d,  $J = 12.7$  Hz, 6C, C-3'), 131.00 (2C, C-2), 132.83 (d,  $J = 6.6$  Hz, HC=NO), 133.71 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 135.06 (d,  $J = 2.8$  Hz, 3C, C-4'), 160.55 (C-4)

$^{31}\text{P}$  RMN (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  23.40, 24.35

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{38}H_{48}NO_5P_2^+ [M]^+$  660.3002; expérimentale 660.3004

**Iodide de 2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(4-(8-(triphenylphosphonio)octyloxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (41)**



$C_{40}H_{52}INO_5P_2$   
M: 815,70

Le composé **40** est obtenu selon la même méthode que celle décrite précédemment pour la préparation du produit **39** à partir de la nitrone **5** (0,19 g, 0,6 mmol), de composé **34** (0,37 g, 0,6 mmol) et de  $K_2CO_3$  (0,2 g, 1.4 mmol). Après purification on obtient 0.12 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 25 %

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.37 (m, 6H,  $CH_2-7$ ,  $CH_2-8$  et  $CH_2-9$ ), 1.64 (m, 3H,  $CH_2-6$ ), 1.68 (m, 2H,  $CH_2-10$ ), 1.78 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.83 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 3.62 (m, 2H,  $CH_2-12$ ), 3.93 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $CH_2-5$ ), 4.17 (quint,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 6.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3), 7.64 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, HC=NO), 7.69 (m, 9H, H-3' et H-4'), 7.78 (m, 6H, H-2'), 8.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2)

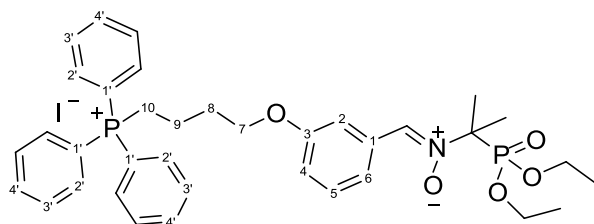
$^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.35 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 22.49 (d,  $J = 4.4$  Hz,  $CH_2-11$ ), 22.97 (d,  $J = 49.5$  Hz,  $CH_2-12$ ), 23.21 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 25.70 ( $CH_2-9$ ), 28.74 ( $CH_2-6$ ), 28.89 (d,  $J = 15.96$  Hz,  $CH_2-7$  et  $CH_2-8$ ), 30.22 (d,  $J = 16.0$  Hz,  $CH_2-10$ ), 63.18 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 67.87 ( $CH_2-5$ ), 72.14 (d,  $J = 154.6$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 114.14 (2C, C-3), 118.05 (d,  $J = 85.8$  Hz, 3C, C-1'), 123.45 (d,  $J = 1.6$  Hz, C-1), 130.48 (d,  $J = 12.7$  Hz, 6C, C-3'), 130.91 (2C, C-2), 132.79 (d,  $J = 7.9$  Hz, HC=NO), 133.58 (d,  $J = 9.9$  Hz, 6C, C-2'), 135.04 (d,  $J = 2.8$  Hz, 3C, C-4'), 160.56 (C-4)

$^{31}P$  RMN (121 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  23.34, 24.19

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{40}H_{52}NO_5P_2^+ [M]^+$  688.3315; expérimentale 688.3315



**Iodure de 2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(3-(4-(triphénylphosphonio)butoxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (42)**



$C_{36}H_{44}INO_5P_2$   
M: 759,6 g/mol

Le composé **42** est obtenu selon la même méthode que celle décrite plus haut pour la préparation de **39** à partir de la nitrone **10** (0,15 g, 0.48 mmol), d'IHTP (0,30 g, 0,52 mmol) et de  $K_2CO_3$  (0,16 g, 1.2 mmol).

Après purification on obtient 0.11 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 30%

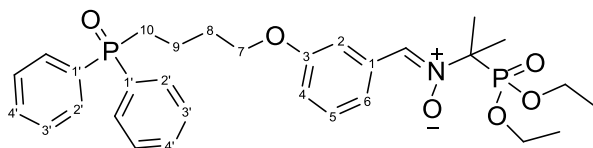
$^1H$  RMN (400 MHz, MeOD)  $\delta$  1.33 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $-OCH_2CH_3$ ), 1.82 (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.86, (s, 3H,  $C(CH_3)_2$ ), 1.90 (m, 2H,  $CH_2-9$ ), 2.05 (quint,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $CH_2-8$ ), 3.52 (m, 2H,  $CH_2-10$ ), 4.11 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $CH_2-7$ ), 4.21 (m, 4H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.01 (dd,  $J = 8.3$ ; 2.5 Hz, 1H, H-4), 7.36 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.63 (br d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.75 (m, 3H, H-4'), 7.80 (m, 6H, H-3'), 7.90 (m, 6H, H-2'), 8.01 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, HC=NO), 8.20 (brs, H-2)

$^{13}C$  RMN (75 MHz, MeOD)  $\delta$  16.95 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 20.38 (d,  $J = 3.9$  Hz,  $CH_2-9$ ), 22.41 (d,  $J = 72.4$  Hz,  $CH_2-10$ ), 23.87 (2C,  $C(CH_3)_2$ ), 30.73 (d,  $J = 16.5$  Hz,  $CH_2-8$ ), 64.98 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2C,  $-OCH_2CH_3$ ), 67.78 ( $CH_2-7$ ), 75.14 (d,  $J = 160.1$  Hz,  $C(CH_3)_2$ ), 115.92 (C-4), 118.98 (C-2), 119.86 (d,  $J = 86.4$  Hz, 3C, C-1'), 123.88 (C-6), 130.64 (C-5), 131.69 (d,  $J = 12.6$  Hz, 6C, C-3'), 132.98 (d,  $J = 1.1$  Hz, C-1), 134.96 (d,  $J = 9.0$  Hz, 6C, C-2'), 135.85 (d,  $J = 6.6$  Hz, HC=NO), 136.35 (d,  $J = 2.8$  Hz, 3C, C-4'), 159.97 (C-3)

$^{31}P$  RMN (162 MHz, MeOD)  $\delta$  23.24, 23.90

**HRMS** : valeur théorique pour  $C_{36}H_{44}NO_5P_2^+$   $[M]^+$  632.2689; expérimentale 632.2690

**2-(diéthoxyphosphoryl)-N-(3-(4-(diphénylphosphoryl)butoxy)benzylidène)propan-2-amine oxide (43)**



C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>P<sub>2</sub>  
M: 571,6 g/mol

Le composé **43** est obtenu selon la même méthode que celle décrite plus haut pour **39** à partir de la nitrone **10** (0,2 g, 0.63 mmol), de NaH 60% (0,063 g, 1.6 mmol) et d'IBTP (0,43 g, 0.76 mmol).

Après purification on obtient 0.19 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rendement: 53%

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, MeOD) δ 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-9), 1.81 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.84 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.92 (quint, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-8), 2.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-10), 4.02 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-7), 4.21 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.99 (dd, *J* = 7.9; 2.3 Hz, 1H, H-4), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.52 (m, 4H, H-3'), 7.59 (m, 2H, H-4'), 7.70 (brd, *J* = 7.9, 1H, H-6), 7.77 (m, 4H, H-2'), 7.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, HC=NO), 8.12 (brs, H-2)

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, MeOD) δ 16.88 (d, *J* = 5.5 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.57 (d, *J* = 3.7 Hz, CH<sub>2</sub>-9), 23.70 (2C, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 29.52 (d, *J* = 72.4 Hz, CH<sub>2</sub>-10), 31.21 (d, *J* = 14.7 Hz, CH<sub>2</sub>-8), 65.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 2C, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 68.39 (CH<sub>2</sub>-7), 74.98 (d, *J* = 159.5 Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115.74 (C-4), 119.14 (C-2), 123.82 (C-6), 130.18 (d, *J* = 11.9 Hz, 4C, C-3'), 130.60 (C-5), 131.98 (d, *J* = 9.2 Hz, 4C, C-2'), 132.98 (C-1), 133.48 (d, *J* = 98.9 Hz, 2C, C-1'), 133.52 (2C, C-4'), 136.16 (d, *J* = 6.4 Hz, HC=NO), 160.35 (C-3)

<sup>31</sup>P RMN (202 MHz, MeOD) δ 23.24, 36.93

MS-ESI : [M+H]<sup>+</sup> : m/z 572.2; [M+Na]<sup>+</sup> : m/z 594.2.

## II. Partie RPE

### II.1 Formation des adduits de piégeage détectés par RPE (technique du spin-trapping)

Les solutions utilisées pour la génération des adduits sont préparées fraîchement, à l'exception des solutions mères de tampon phosphate (200 mM) et de la solution d'acide diéthylène triamine penta acétique, DTPA (10 mM dans tampon phosphate 200 mM) qui se conservent à -4°C. La xanthine oxydase d'origine bovine, Grade III, en suspension dans le sulfate d'ammonium (Sigma Aldrich), 1,0–2,0 unités/mg de protéine. Les autres réactifs proviennent de Sigma Aldrich, ou Acros.

Les spectres de RPE ont été enregistrés en bande X (9.79 GHz) sur un spectromètre Bruker ESP 300 équipé d'une cavité  $TM_{110}$  et opérant à une fréquence de modulation de 100 kHz et à une puissance de 10 mW. Une fois la réaction de génération radicalaire initiée, le milieu réactionnel contenant la PPN (35-50 mM) est transféré dans un tube capillaire de 50  $\mu$ l, bouché à la pâte Critoseal®, inséré dans la cavité résonante et l'acquisition du spectre débute après 40-60 s, avec une résolution en champ de 4096 points. Les autres paramètres d'acquisition des spectres (amplitude de modulation, gain, vitesse de balayage, filtre, nombre d'accumulations) ont été ajustés en fonction de l'intensité du signal, de façon à obtenir le meilleur rapport signal/bruit et résolution.

La photolyse UV a été effectuée à l'aide d'une lampe UV (Oriol Instruments).

Les réactifs utilisés sont introduits dans l'ordre indiqué dans le texte et les concentrations données pour chaque réactif correspondent aux concentrations finales.

#### PREPARATION DES SOLUTIONS MERES

- Le **tampon phosphate** (200 mM) est préparé avec 6.8 g de  $KH_2PO_4$  dans 250 ml de  $H_2O$  et le pH est ajusté à 7.
- la solution de **DTPA** (10mM) est préparée avec 0.78 g de DTPA dissous dans 200 ml de tampon phosphate (200 mM).
- Pour le **réactif de fenton** deux solutions mères sont préparées : la **solution de  $Fe^{2+}$**  (14 mM) est obtenue avec 10 mg de  $FeSO_4$  dans 2.5 ml de  $H_2O$  et la

**solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (44 mM) est obtenue en rajoutant 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% dans 2 ml de H<sub>2</sub>O.

- La **solution de formiate d'ammonium** (CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, 500 mM) est préparée avec 63 mg de CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> dans 2 ml de tampon phosphate (200mM).
- La **solution d'azoture de sodium** (NaN<sub>3</sub>, 250 mM) est préparée avec 50 mg de NaN<sub>3</sub> dissous dans 3 ml de tampon phosphate (200 mM).
- La **solution de sulfite de sodium** (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 36 mM) est préparée avec 10 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> dissous dans 2 ml de solution de DTPA (10 mM).
- La **solution de dichromate de potassium** (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 8 mM) est préparée avec 9.5 mg de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dissous dans 4 ml de solution de DTPA (10 mM).
- La **solution de ferricyanure de potassium** (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 8 mM) est préparée avec 10.5 mg de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> dans 4 ml de solution de DTPA (10 mM).

#### METHODES POUR LA PRODUCTION DES RADICAUX LIBRES ET DES ADDUITS CORRESPONDANTS

##### Radical hydroxyle (<sup>•</sup>OH)

###### ❖ *Par réaction de Fenton*

La nitrone (50 ou 100 mM) est solubilisée dans du tampon phosphate (20 mM), on ajoute successivement, la solution d'eau oxygénée (3 mM) puis la solution de Fe<sup>2+</sup> (1 mM).

###### ❖ *Par addition nucléophile*

La nitrone (50 mM) est solubilisée dans l'eau et une solution de FeCl<sub>3</sub> (4 mM) est ajoutée.

###### ❖ *Par photolyse*

La nitrone est dissoute (50 ou 100 mM) dans l'eau, on ajoute de l'eau oxygénée (1%); l'adduit est détecté suite au démarrage de la photolyse.

##### Radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HOO<sup>-</sup>)

###### ❖ *Par photolyse*

La nitrone (50 mM) est solubilisée dans une solution de peroxyde d'hydrogène 30%; le signal est détecté suite au démarrage de la photolyse avec une lampe UV.

###### ❖ *Par substitution nucléophile dans la pyridine*

La nitrone (50 mM) est solubilisée dans la pyridine en présence du 3% de peroxyde d'hydrogène. Le spectre est enregistré après avoir bullé de l'air dans la solution pendant 3 minutes.

❖ Par la méthode enzymatique

La nitrone (100 mM) est solubilisée dans du tampon phosphate (20 mM) contenant du DTPA (1 mM). A cette solution on ajout l'hypoxanthine (0,4 mM) et la xanthine oxydase (0,02-0,03 unité/mg).

### **Radical méthyle ( $\cdot\text{CH}_3$ )**

Le radical carboné est généré par réaction de Fenton sur le DMSO : la nitrone à une concentration de 35 mM est solubilisée dans le tampon phosphate (20 mM) et on ajoute 25 % en volume de DMSO puis le peroxyde d'hydrogène (3 mM) et la solution de  $\text{Fe}^{2+}$  dans l'eau (1 mM).

### **Radical $\text{CH}_3\cdot\text{CHOH}$**

Ce radical est généré par réaction de Fenton sur l'éthanol : la nitrone est diluée à 35 mM dans le tampon phosphate (20 mM) et on ajoute 25 % en volume d'éthanol puis le peroxyde d'hydrogène (3 mM) et la solution de  $\text{Fe}^{2+}$  dans l'eau (1 mM).

### **Radical $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$**

Le radical est généré par réaction de Fenton en présence de méthanol: la nitrone à la concentration de 35 mM est solubilisée dans le tampon phosphate (20 mM) et on ajoute 25 % en volume d méthanol, le peroxyde d'hydrogène (3 mM) et la solution de  $\text{Fe}^{2+}$  dans l'eau (1 mM).

### **Radical $\text{H}\cdot$**

A une solution de nitrone (50 mM) diluée dans l'eau on ajoute quelques milligrammes de  $\text{NaBH}_4$  : après bullage d'air pendant une minute, on observe l'adduit [nitrone-H]

**Radical  $\text{CO}_2^{\bullet-}$** 

La nitronne (50 mM) est solubilisée dans du tampon phosphate (20 mM) ; on ajoute successivement une solution de formiate d'ammonium dans tampon phosphate (50 mM), le peroxyde d'hydrogène (3mM) et  $\text{Fe}^{2+}$  (1mM).

**Radical  $\text{N}_3^{\bullet}$** 

On obtient ce radical avec un système de Fenton : à une solution de nitronne (30 mM) dans du tampon phosphate (20 mM) on ajoute du sodium azide (220 mM), du peroxyde d'hydrogène (1%) et le  $\text{Fe}^{2+}$  (1 mM).

**Radicals  $\text{RO}^{\bullet}$**  (R= Me, Et, Octyl)

La nitronne est diluée à 50 mM dans du DMSO en présence du 25% d'un alcool (méthanol, éthanol ou 1-octanol) et on ajoute dans ce mélange quelques milligrammes de  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ .

**Radical  $\text{SO}_3^{\bullet-}$** ❖ *Système  $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$* 

A la nitronne (30 mM) est ajoutée une solution de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (18 mM) et une solution de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (4mM). Tous les réactifs sont solubilisés dans du tampon phosphate (20mM) contenant du DTPA (1mM).

❖ *Système  $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$* 

A la nitronne (30 mM) est ajoutée une solution de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (18 mM) et une solution de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (4mM). Tous les réactifs sont solubilisés dans du tampon phosphate-DTPA.

**II.2 Conservation des adduits méthyle et méthoxy dans l'azote liquide**

Les adduits du radical méthyle ( $\bullet\text{Me}$ ) ont été préparés dans des cryotubes par réaction de Fenton (génération de  $\bullet\text{OH}$  avec  $\text{FeSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) d'une solution de la nitronne (35 mM) en tampon phosphate (20 mM) contenant 25% de DMSO.

Les adduits du radical méthoxy ( $\text{MeO}^{\bullet}$ ) ont été générés par réaction de la nitronne (35 mM) avec  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  en présence de 25% de MeOH dans DMSO.

La formation de radicaux libres est initiée avec l'ajout du  $\text{Fe}^{2+}$  (radical  $\bullet\text{CH}_3$ ) ou du  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  (radical  $\text{MeO}^{\bullet}$ ), ~ 0.35 ml de la solution est introduite dans un capillaire en

verre pour être analysée en RPE bande X (9.79 GHz) et le cryotube est immédiatement congelé dans l'azote liquide.

Les spectres RPE sont enregistrés 5 min après la génération de radicaux en utilisant les conditions suivantes : fréquence de modulation, 100 kHz ; puissance des micro-ondes, 10 mW ; amplitude de modulation 0,063 mT ; filtre 20,48 ms ; gain,  $2 \times 10^5$  ; largeur du champ, 13 mT ; vitesse de balayage, 0,15 mT/s.

Les échantillons conservés dans l'azote liquide sont décongelés quatre (adduits  $\text{Me}^\bullet$ ) ou six (adduits  $\text{MeO}^\bullet$ ) jours après la congélation et deux scans RPE ont été effectués à 1 et 4,5 minutes après la complète décongélation de l'échantillon en utilisant les mêmes conditions d'enregistrement décrites ci-dessus. La quantification des signaux RPE a été réalisée par intégration des spectres simulés et les concentrations des adduits  $\text{Me}^\bullet$  ou  $\text{MeO}^\bullet$  sont exprimées en unités arbitraires (au).

### II.3 Détection du NO libéré par les nitrones

Les solutions utilisées pour la génération des adduits sont préparées fraîchement.

Le *N*-Methyl-*D*-glucamine dithiocarbamate, MGD a été synthétisé selon la méthode décrite et tous les autres réactifs proviennent de Sigma Aldrich. Les spectres de RPE ont été enregistrés sur le spectromètre Bruker ESP 300 à bande X et avec une cellule plate. La photolyse UV a été effectuée à l'aide d'une lampe UV à 254 nm de type CN-6. Les échantillons à tester sont préparés dans des tubes en verre qui sont utilisés une seule fois ; chaque manipulation est faite dans un tube neuf.

#### PREPARATION DES SOLUTIONS MERES

- La **solution de  $\text{Fe}^{2+}$**  (80 mM) est obtenue avec 222 mg de  $\text{FeSO}_4$  dans 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- La **solution de MGD** (400 mM) est préparée avec 586 mg de MGD dissous dans 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .
- La **solution d'acide ascorbique** (200 mM) est préparée avec 352 mg d'acide ascorbique dissous dans 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La nitrone (100 mM) est pesée dans un tube en verre et on y rajoute dans l'ordre :

- 50  $\mu\text{l}$  de la solution d'acide ascorbique (concentration finale 20 mM)
- 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$
- 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $[\text{MGD}_2/\text{Fe}^{2+}]$  préparée en mélangeant 25  $\mu\text{l}$  de la solution 400 mM de MGD et 25  $\mu\text{l}$  de la solution 80 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  (concentration finale 20 mM MGD et 4 mM  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Le mélange est photolysé avec une lampe UV pendant 10 minutes (ou 4 heures) et le complexe qui se forme par libération du NO et sa réaction avec  $[\text{MGD}_2\text{-Fe}^{2+}]$  est détecté par RPE.



### III. Partie biologique

#### III.1 Tests antioxydants

Tous les tests antioxydants ont été adaptés pour l'analyse sur microplaques 96 puits NUNC™ à fond plat translucides ou opaques blanches et noires (Termo Scientific, Danmark).

Les analyses en UV-Visible (mesure des absorbances) et fluorescence ont été effectuées sur le spectrofluorimètre à plaque TECAN Infinite® M200 (TECAN Männedorf, Switzerland).

Les mesures de la luminescence ont été effectuées sur le luminomètre à plaque TECAN Infinite® M200 (TECAN Männedorf, Switzerland) ou sur le luminomètre à tube Titertek-Berthold Sirius (Pforzheim, Germany).

L'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique (Trolox®), le 2,2'-Azobis(2-methyl propionamide) dihydrochloride (AAPH), le radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), le luminol (5-amino-2,3-dihydro-phthalazine-1,4-dione), la lucigénine (10-methyl-9-(10-methylacridin-10-ium-9-yl)acridin-10-iumdinitrate), la quercétine, l'acide caféique, l'acide syringique, l'acide vanillique, la superoxyde dismutase (SOD), la xanthine oxydase (XO) d'origine bovine, la xanthine, l'allopurinol et l'acide ethylenediaminetetraacétique (EDTA) proviennent de Sigma-Aldrich.

##### III.1.1 Protocole expérimental du test DPPH

Toutes les solutions sont fraîchement préparées et utilisées au cours de la même journée.

- Une **solution de DPPH** à 75 mg/L (0,19 mM) est préparée dans le méthanol et laissée en agitation pendant 2 heures à l'abri de la lumière.
- Des **solutions mères de produits** à tester à 3 mM et 0,3 mM sont préparées dans du méthanol.

Des aliquots de solutions mères (10 µl-100µl) sont déposés dans les puits et sont ajustés à un volume final de 100 µl avec du méthanol afin d'obtenir une gamme de concentrations 0,1 -1 mM. Le DPPH (200 µl) est ajouté de manière simultanée dans chaque puits pour arriver à un volume final de 300 µl.

La plaque est placée dans le spectrofluorimètre à plaque (TECAN) et agitée pendant 1 minute. L'absorbance du DPPH est enregistrée 3 minutes après addition du DPPH à **517 nm**. Chaque mesure de l'absorbance est réalisée en triplicata.

### III.1.2 Protocole expérimental du test TRAP

#### PREPARATION DES SOLUTIONS

- Le **tampon Tris-HCl** (100 mM) est préparé avec 2,42 g de Tris dans 200 ml d'eau distillée. La solution est tamponnée à pH 7,4 avec une solution aqueuse de HCl à 1N.
- La **solution de AAPH** (153 mM) est préparée avec 0,95 g de AAPH dans 10 ml de solution tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,4). La solution est placée dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes pour initier la réaction radicalaire et elle est utilisée dans la journée.
- La **solution mère de luminol** (4,19 mM) est préparée avec 148 mg de luminol dans 200 ml de solution tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,4) et conservée dans le noir à 4°C. La **solution de travail** est fraîchement préparée (concentration finale en luminol à 81,6 µM) à partir de la solution mère par dilution avec le tampon de Tris-HCl (100 mM, pH 7,4) et utilisée dans la journée.
- Les **solutions des produits** à tester sont préparées dans le DMSO à une concentration initiale de 10 mM, pour effectuer des dilutions dans le tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,4) à 50 µM ou 200 µM selon l'activité du produit. Des dilutions multiples au ½ permettent d'obtenir les autres concentrations à tester de 25, 12,5 et 6,25 µM pour les antioxydants les plus actifs ou 100, 50 et 25 µM pour les moins actifs.

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le test s'effectue dans une microplaque 96 puits NUNC™ spécifique pour luminomètre en polystyrène blanche. Dans chaque puits sont introduits dans l'ordre :

- 50 µl de la solution du composé à tester (gamme de concentration finale de 8,3 µM à 1 µM ou de 33,3 µM à 4,2 µM)
- 50 µl de la solution de luminol (concentration finale 13 µM)

- 200 µl de la solution de AAPH ajouté de manière simultanée (concentration finale 233 mM)

Après 1 minute d'agitation (orbitale, 3 mm d'amplitude) une mesure cinétique de la luminescence à 25°C est effectuée. Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions avec différentes concentrations de Trolox® (16,6, 8,3, 4,2, 2,1, 1,05, 0,52 µM finales). Chaque concentration est effectuée en duplicata.

### III.1.3 Protocole expérimental du test ORAC-FL

#### PREPARATION DES SOLUTIONS

- Le **tampon phosphate** à 100 mM (PBS 1X) est préparé avec 8 g de NaCl, 2,7 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1000 ml d'eau distillée. La solution est tamponnée à pH 7,4 avec une solution aqueuse de HCl à 1N.
- La **solution de AAPH** (153 mM) est préparée avec 0,414 g de AAPH dans 10 ml de tampon phosphate 100 mM à pH 7.4. Cette solution, préparée fraîchement pour chaque test, est placée à l'étuve à 37°C pendant 30 min.
- La **solution mère de fluorescéine** (821 µM) est préparée avec 6 mg de fluorescéine de sodium dans 20 ml de tampon phosphate 100 mM à pH 7,4 et conservée dans le noir à 4°C. La **solution de travail** est fraîchement préparée pour chaque test (concentration finale en fluorescéine à 8,21 nM) à partir de la solution mère par dilution avec du tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) et utilisée dans la journée.
- Les **solutions mères des produits** à tester sont préparées dans du DMSO à une concentration de 10 mM et ensuite diluées dans le tampon phosphate 100 mM à pH 7,4 à différentes concentrations selon l'activité du produit (10 ou 20 µM pour les produits actifs et 200 µM pour les produits non actifs). Des dilutions multiples au ½ de ces solutions permettent d'obtenir les autres concentrations à tester (de 10 à 1,25 µM, de 20 à 2,5 µM ou de 200 à 25 µM).

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le test s'effectue dans une microplaque 96 puits NUNC™ spécifique pour le fluorimètre en polystyrène noir. Dans chaque puits sont introduits dans l'ordre :

- 25 µl des différentes concentrations de l'échantillon (gamme de concentration finale de 1,25 à 0,16 µM, de 2,5 à 0,31 µM ou de 25 à 3,15 µM)
- 150 µl de fluorescéine de sodium (concentration finale 60 nM)

La microplaque est incubée pendant 15 minutes à 37°C dans le fluorimètre à plaques

- 25 µl de AAPH sont ajoutés de manière simultanée dans chaque puits (concentration finale 19 mM).

L'intensité de la fluorescence est relevée en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 485 nm et une longueur d'onde d'émission à 530 nm sur un temps de 70 minutes avec mesure toutes les 2 minutes.

Une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions avec différentes concentrations de Trolox® (16,6, 8,3, 4,2, 2,1, 1,05, 0,52 µM finales). Chaque concentration est effectuée en duplicata.

#### III.1.4 Protocole expérimental du test d'inhibition de la xanthine oxydase

##### PREPARATION DES SOLUTIONS

- Le **tampon phosphate** à 0,2 M est préparé avec 6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 250 ml d'eau distillée et tamponné à pH 7,5 avec NaOH 1 M
- La **solution de Xanthine** à 500 µM est préparée avec 7,6 mg de xanthine dans 100 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 7,5)
- La **solution d'EDTA** (0,1 mM) est préparée avec 18,62 mg dans 50 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 7,5)
- La **solution de Xanthine Oxydase (XO)**: est préparée avec 9,9 µl de la solution mère (11,76 U/ml) dilués dans 5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 7,5) pour obtenir une concentration de 23,32 mU/ml
- Les **solutions des produits** à tester sont préparées à une concentration initiale de 10 mM dans le tampon phosphate et ensuite diluées à 134 µM pour avoir une concentration finale de 80 µM. Des dilutions multiples au ½ permettent d'obtenir les autres concentrations à tester de 40, 20, 10 et 5 µM

##### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le Test s'effectue dans une microplaque UV 96 puits NUNC™ spécifique (n'absorbant pas aux longueurs d'onde de l'étude). Dans les puits sont introduits dans l'ordre :

- 150 µl de produits à tester (gamme de concentration finale de 48 à 3 µM) ou de TP pour les puits témoins
- 25 µl d'EDTA (concentration finale de 10 µM)
- 25 µl de Xanthine (concentration finale de 50 µM)
- 50 µL de XO (concentration finale de 23.32 mU/ml) ou de tampon phosphate pour les puits du blanc

La plaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C et l'absorbance UV est mesurée à t= 30 min à une longueur d'onde de 295 nm. La production d'acide urique est calculée pour chaque concentration comme la différence d'absorbance entre l'échantillon avec XO et le blanc sans XO.

### III.1.5 Protocole expérimental du test du quenching du superoxyde

#### PREPARATION DES SOLUTIONS

- Le **tampon glycine** (TG) (6,25 mM) est préparé avec 117,18 mg dans 250 ml d'eau distillée et tamponné à pH 10,1 avec NaOH 1 M. Il est préparé fraîchement pour chaque test.
- La **solution de xanthine oxydase** (XO) est préparée fraîchement avec 4 µl de la solution mère (27,3 U/ml) dilués dans 10 ml de tampon glycine (6,25 mM, pH 10,1) pour obtenir une concentration de 11 mU/ml
- La **solution mère d'allopurinol** à 10 mM est préparée avec 136 mg dans 100 ml de tampon glycine (6,25 mM, pH 10,1) ; la **solution de travail** (100 µM) est fraîchement préparée pour chaque test à partir de la solution mère par dilution avec du tampon glycine. La solution mère peut être conservée pendant 30 jours à 4°C
- La **solution mère de lucigénine** à 10 mM est préparée avec 510 mg dans 100 ml de tampon glycine (6,25 mM, pH 10,1) ; la **solution de travail** (100 µM) est fraîchement préparée pour chaque test à partir de la solution mère par dilution avec du tampon glycine. La solution mère peut être conservée pendant 30 jours à 4°C
- La **solution de superoxyde dismutase** (SOD) utilisée comme référence est préparée par dilution d'une solution mère à 19 U/25ml dans une solution d'EDTA à 1 mM. La concentration finale sera 0,5 U/ml SOD dans EDTA 0,1 mM.

- Les **solutions des produits** à tester sont préparées à une concentration initiale de 10 mM dans le tampon glycine (6,25 mM, pH 10,1) et ensuite diluées à 2 mM.

Les différentes concentrations à tester sont obtenues en augmentant le volume de solution 2 mM rajouté au tampon glycine lors du test.

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le test s'effectue dans des tubes jetables en polystyrène à volume 5 ml. Dans le tube sont introduits dans l'ordre :

- 1,7 ml de tampon glycine
- 2,4-24  $\mu$ L de la solution du composé après avoir éliminé le même volume de tampon glycine dans le tube (gamme de concentration finale de 0,1 à 1  $\mu$ M)
- 300  $\mu$ l d'allopurinol (concentration finale 12,5  $\mu$ M)
- 100  $\mu$ l de xanthine oxydase en agitant (concentration finale 0,458 mU/ml)
- 300  $\mu$ l de lucigénine (concentration finale 12,5  $\mu$ M)

La luminescence est relevée à 25 °C avec une cinétique de 7 minutes.

Une mesure du blanc est effectuée avec tous les réactifs en absence du composé à tester. La SOD est utilisé comme référence. Toutes les mesures sont effectuées en triplicata.

### III.2 Cultures cellulaires et tests de cytotoxicité

Les cellules A549, dérivées de l'épithélium d'adénocarcinome pulmonaire, proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC® CCL-185™) VA, USA. Les cultures cellulaires sont réalisées et conservées dans un incubateur à CO<sub>2</sub>, à une température de 37 °C et sous atmosphère contrôlée à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité.

Tous les produits et les réactifs utilisés comme le tampon phosphate saline (PBS), le Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), le sérum de veau foetal (SVF), le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), la solution de pénicilline/streptomycine (PS) contenant 10 000 U/ml et la solution trypsine-EDTA (1X) ont été achetés à Life Technologies Corp. (Gibco®).

Les flasques de culture à bouchon filtrant T25 de 25 cm<sup>2</sup> et les microplaques 96 puits NUNC™ à fond plat translucides proviennent de Thermo Scientific (Danmark).

Le bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 diphényl tétrazolium (MTT) utilisé pour le test de cytotoxicité provient de Merck (Allemagne).

Le test de LDH est effectué à l'aide d'un kit commercial Biolabo (Maizy, France).

### III.2.1 Protocole de mise en culture et exposition des cellules A549

#### ENSEMENCEMENT

Les cellules utilisées ont été précédemment congelées (azote liquide) dans le milieu de culture complète supplémentée à 12.5% de SVF et de 5% DMSO.

Après décongélation les cellules sont reprises avec 5 ml de milieu de culture et transvasées dans un tube à centrifuger. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 minutes à 1500 rpm afin d'éliminer le DMSO présent dans le milieu. Le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de culture DMEM complété avec 12.5 % de SVF puis les cellules sontensemencées dans des flasques à une concentration entre  $2 \times 10^3$  et  $1 \times 10^4$  cellules/cm<sup>3</sup> (volume final dans la flasque 5 ml) et elles sont incubées pendant la nuit à 37 °C sous une atmosphère contrôlée à 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'humidité.

Le lendemain la croissance des cellules et leur adhésion au fond de la flasque sont examinées au microscope. Le milieu est changé par aspiration du surnageant et ajout de 15 ml DMEM supplémenté avec 10 % de SVF et 1 % de PS.

Le milieu doit être renouvelé de 2 à 3 fois par semaine.

#### TRYPsinATION ET ENSEMENCEMENT DANS MICROPLAQUES 96 PUIITS

Les cellules arrivées à confluence (entre 24-48 heures), le milieu est éliminé par aspiration et les cellules sont rincées avec du PBS. Les cellules sont détachées de la boîte suite à incubation (2-6 min à 37°C) avec 6 ml d'une solution de trypsine-EDTA 1X; l'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 1 ml de SVF. La suspension récupérée avec l'ajout de 13 ml de PBS est centrifugée 5 minutes à 1500 rpm, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension avec 10 ml de milieu complet. Les cellules obtenues peuvent être congelées avec 95 % de milieu (DMEM + 12,5% SVF) et 5% de DMSO dans l'azote liquide ouensemencées à nouveau dans de nouvelles flasques ou dans les microplaques 96 puits.

Les cellules utilisées pour les tests de cytotoxicité sont ensemencées dans des microplaques 96 puits à une densité de  $1,5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> avec un volume final de 100 µl de milieu complet dans chaque puits.

**PREPARATION DES SOLUTIONS DES PRODUITS A TESTER ET EXPOSITION DES CELLULES**

Les différents composés sont testés avec une gamme de concentration allant de 10 à 0,1 mM en présence de 1% de DMSO vol/vol maximal. Des solutions mères de ces composés et des produits utilisés comme référence sont préparées à 1M dans 100% de DMSO. Puis des dilutions de ces solutions sont effectuées dans le DMEM jusqu'à l'obtention d'une solution à 2 mM dans 98% de milieu de culture et 2% de DMSO.

Les solutions filles contenant au maximum 1% de DMSO et permettant une gamme de concentrations finales dans les puits de 10 à 0,1 mM, ont été préparées par dilutions ultérieures dans le DMEM.

Les cellules arrivées à confluence dans les microplaques, le milieu est éliminé et les puits sont rincés avec du DPBS. Dans chaque puits sont introduits le milieu DMEM sans SVF et les solutions des produits à tester (volume final 100 µM). Les cellules sont incubées en présence des produits pendant 24 heures. Chaque plaque représente une série complète contenant: des puits contrôles (DMEM sans SVF), des puits témoins négatifs (DMEM sans SVF + DMSO selon le volume dans les produits), des puits témoins positif (gamme de solution des composés de référence) et des puits contenant les différentes concentrations des produits à tester.

A la fin de la période d'incubations la cytotoxicité est évaluée avec le test MTT et LDH.

**III.2.2 Protocole du test MTT**

La période d'exposition des cellules terminée, la microplaque est rincée trois fois avec du PBS.

Une solution de MTT à 5 mg/ml est préparée dans du PBS 1X et filtrée sur 0,20 µm.

La solution de MTT est ajoutée dans l'ensemble des puits à hauteur de 10% final (v/v ; 10 µl MTT dans 100 µl de milieu). La microplaque est incubée à 37°C à l'abri de la lumière durant 4 heures. Puis le milieu est éliminé par aspiration et les cellules sont reprises avec du DMSO (100 µl dans chaque puits). La plaque est encore incubée



pendant 10-20 minutes en agitant, et l'absorbance de chaque puits est ensuite mesurée à  $\lambda = 570$  nm.

### **III.2.3 Protocole du test de LDH**

A la suite de la période d'incubation des cellules en présence des produits, le milieu de culture dans chaque puits est prélevé et conservé pour l'évaluation de la quantité de LDH cytoplasmique.

Le kit Biolabo pour le dosage de LDH est vendu avec deux solutions prêtes à l'emploi: l'une contenant le pyruvate, l'autre le NADH. Les deux solutions sont mélangées, 200  $\mu$ l de ce réactif de travail sont transférés dans chaque puits d'une microplaque NUNC<sup>TM</sup> transparent. La température est laissée s'équilibrer à 37°C et on ajoute dans les puits 4  $\mu$ l des échantillons (milieu de culture précédemment prélevé). Suite à 30 secondes d'agitation on relève l'absorbance à 340 nm pendant 2 minutes (lecture toutes les minutes).

## **III.3 Evaluation des effets vasculaire et protecteur dans des anneaux aortiques**

### **III.3.1 Mesure de la vasorelaxation des anneaux aortiques**

Les rats (Sprague-Dawley, 200-250 g) provenant de CERJ (Le Genest St Isle, France) ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (100 mg/kg; Ceva Santé Animale, Libourne, France) avant thoracotomie. L'aorte est isolée, nettoyée et sectionnée en anneaux de 3 mm qui sont placés entre deux crochets en acier inoxydable et mis en suspension dans un bain thermostaté à 37 °C et rempli du tampon physiologique Krebs-Henseleit modifiée (pH 7,35) avec la composition suivante: NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; EDTA 0,5 mM; glucose 11 mM. Le milieu est renouvelé toutes les 20 minutes et continuellement aéré avec un mélange gazeux de 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. L'un des crochets métalliques est fixé à la base de la cuve et l'autre crochet est relié à un capteur de tension isométrique pour mesurer les variations de tension de l'anneau (Harvard Apparatus, Les Ulis, France).

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques sont réalisées par ANOVA (GraphPad, Prism).

L'intégrité endothéliale est testée avec l'acétylcholine ( $10^{-5}$  M) suite à une pré-contraction avec phényléphrine ( $10^{-5}$  M).

Ensuite, l'anneau est contracté avec la PE ajoutée dans la cuve à des concentrations cumulatives croissantes, débutant avec  $10^{-9}$  M, et terminant avec une dose de  $10^{-5}$  M jusqu'à obtenir la contraction maximale. L'anneau aortique est rincé et restabilisé avant d'être à nouveau contracté avec la PE ( $10^{-5}$  M) puis relaxé par le SNP qui est ajoutés dans la cuve à des concentrations cumulatives croissantes ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M). Les PPNs à tester sont ajoutées à une concentration de  $10^{-4}$  M.

Chaque anneau a fait l'objet d'un test unique de relaxation, ne recevant qu'une seule nitroène.

Les résultats sont exprimés comme sensibilité ( $pEC_{50}$ ) et relaxation maximale ( $R_{max}$ ) du SNP. Les courbes concentration-réponse ont été ajustées à une courbe sigmoïde en utilisant une régression non linéaire (GraphPad Prism 5.0) pour permettre le calcul de  $pCE_{50}$ .

### III.3.2 Evaluation de la protection contre le superoxyde

#### STRESS OXYDANT INDUIT PAR NADPH

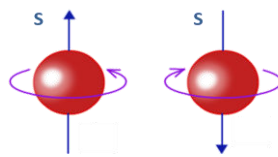
Les anneaux ont été pré-incubés pendant 30 min dans du tampon phosphate KH contenant le composé à tester (100  $\mu$ M) et le diéthylthiocarbamate (30  $\mu$ M; pour inactiver la SOD intracellulaire). On ajoute une aliquote de NADPH ( $10^{-4}$  M finale) et l'incubation a été poursuivie jusqu'à 60 min. Deux séries équivalentes d'anneaux sont ensuite transférées dans des puits différents pré-remplis avec 0,3 mL du mélange KH-modifié/PPNs/NADPH comme décrit ci-dessus, et encore incubés pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à 37 ° C. Les anneaux sont ensuite pesés et traités pour l'évaluation de la détermination du contenu en protéines carbonylées. Les données ont été obtenues par rapport aux puits remplis uniquement avec le véhicule (DMSO) sans NADPH. La SOD (30 U/ml) a été utilisée comme référence.

# ANNEXES



## ANNEXE 1: THEORIE RPE

La RPE est basée sur l'interaction du moment magnétique associé à l'électron célibataire (**spin électronique**) avec un champ magnétique externe ( $\vec{B}_0$ ). Tout électron est caractérisé par une grandeur intrinsèque nommée **spin** qui peut être vu comme un mouvement de rotation autour d'un hypothétique axe passant par le centre de l'électron. Le spin est associé à un moment angulaire de spin représenté par un vecteur ( $\vec{S}$ ) dont la direction coïncide à avec celle de l'axe de rotation. La valeur du spin pour l'électron est  $S = 1/2$  et les principes de la mécanique quantique lui attribuent deux états de spin ( $2S+1$ ) identifiés avec le nombre quantique  $m_s$ . On peut imaginer que l'électron soit capable de tourner dans le sens horaire ou antihoraire où chaque rotation permet un état de spin avec des directions opposées identifiées par les valeurs  $m_s = \pm 1/2$  (Figure 53).



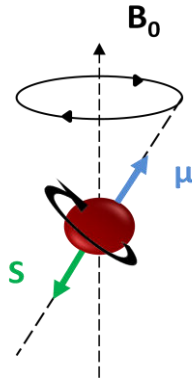
**Figure 53:** Les deux orientations possibles du spin

La conséquence la plus importante du spin électronique est le moment magnétique ( $\vec{\mu}$ ) associé, proportionnel au moment angulaire et représenté par l'équation:

$$\vec{\mu} = -g_e \mu_B \vec{S}$$

Il résulte que le moment magnétique peut avoir deux valeurs  $\mu = + 1/2 g_e \mu_B$  et  $\mu = - 1/2 g_e \mu_B$ , selon la valeur de  $|S|$ . Le signe moins de l'équation signifie que le moment magnétique de spin possède la même direction, mais une orientation antiparallèle à celle du spin, résultant de la charge négative de l'électron.

Le facteur  $g_e \mu_B$  indique le rapport gyromagnétique ( $\gamma$ ) et est dépendant de deux valeurs importantes:  $g$  appelé facteur-g ou facteur de Landé qui varie selon la particule ( $g_e = 2.002319304386$  pour l'électron libre) et  $\mu_B$  qui représente le magnéton de Bohr ( $9.2741 \times 10^{-24}$  J/T).

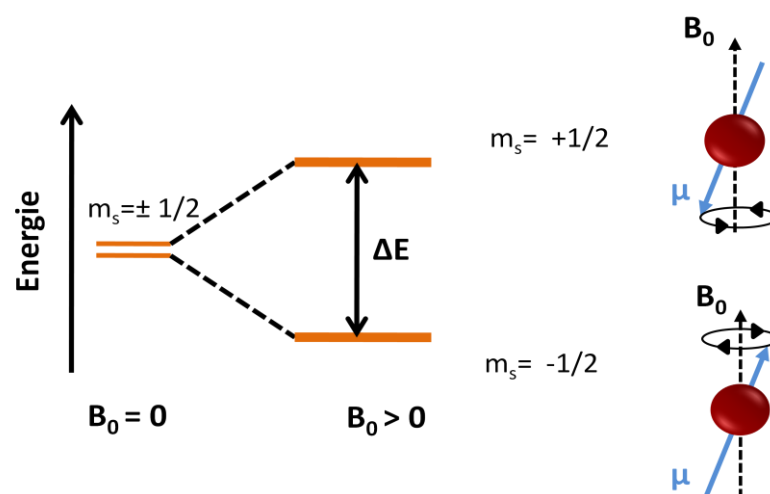


**Figure 54:** Orientation de  $\vec{S}$  et  $\vec{\mu}$  en présence d'un champ magnétique

Dans une molécule les électrons de spins antiparallèles s'apparient entre eux et leur moment magnétique s'annule. Cependant, si le nombre d'électrons est impair, il existe un électron non apparié auquel est associé un moment magnétique de spin.

En l'absence d'un champ magnétique externe, les électrons célibataires se trouvent à un niveau d'énergie  $E_0$  où les spins électroniques sont orientés de façon aléatoire et les niveaux énergétiques sont dégénérés.

En présence d'un champ magnétique statique ( $\vec{B}_0$ ) l'effet Zeeman est observé: la dégénérescence des niveaux énergétiques est levée et les électrons vont s'orienter de manière à ce que les moments magnétiques électroniques soient alignés parallèles (basse énergie;  $m_s = -1/2$ ), ou antiparallèles (haute énergie;  $m_s = +1/2$ ) au champ (Figure 55).



**Figure 55:** Représentation schématique de l'effet Zeeman

La différence d'énergie entre les deux niveaux est représentée par l'équation :

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0$$

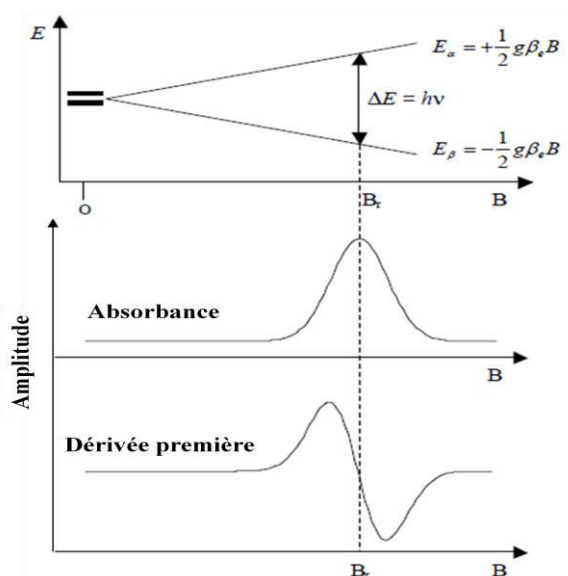
Le principe de la RPE consiste à induire une transition des électrons entre les deux niveaux d'énergie d'un système paramagnétique soumis à un champ magnétique. Cette transition se vérifie si on perturbe le système avec une radiation électromagnétique de fréquence  $\lambda$ , telle que son énergie ( $h\nu$ ) soit égal à  $\Delta E$  afin d'atteindre les conditions de résonance. L'équation devient alors :

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B B_0$$

L'expérience de RPE consiste à fixer la fréquence à une longueur d'onde appropriée (pour un appareil RPE en bande X,  $\lambda$  est normalement de 9.4 GHz) et à balayer le champ magnétique jusqu'à atteindre la valeur correspondant aux conditions de résonance (environ 3300 G pour une fréquence de 9.4 GHz).

L'électron qui se déplace entre les deux niveaux énergétiques absorbe ( $-1/2 \rightarrow +1/2$ ) ou émet ( $+1/2 \rightarrow -1/2$ ) une radiation électromagnétique de la même intensité. Il donc est important que les deux niveaux énergétiques aient un peuplement différent, pour que le transfert net d'énergie du système ne soit pas nul.

La répartition des électrons suit la distribution de Boltzmann selon laquelle le niveau énergétique inférieur est légèrement plus peuplé que le niveau supérieur. Le résultat net de la résonance sera donc une absorption d'énergie qui sera convertie en spectre, ce dernier étant enregistré comme dérivée première.



**Figure 56:** Représentation du spectre d'absorbance et conversion en dérivée première

### Paramètres des spectres RPE

Chacun spectre RPE permet d'identifier des paramètres caractéristiques de chaque radical:

#### Valeur de g

Le facteur g est fixe pour un électron libre, mais quand l'électron se trouve dans une molécule il faut tenir compte des autres paramètres et la valeur de g devient caractéristique de chaque composé.

L'électron possède aussi un moment angulaire orbital (**L**) dû à son mouvement de rotation autour du noyau atomique. Pour un radical dans son état fondamental le moment orbital est inhibé (quenching du moment orbital), on s'attend donc à une valeur de g égale à celui de l'électron libre pour tous les radicaux organiques. Cependant, chaque radical est caractérisé par une valeur typique de g, même si elle ne diffère pas trop de la valeur donnée pour l'électron libre.

La raison de ce comportement peut être expliquée en considérant que, même si à l'état fondamental le moment orbital est inhibé ( $L=0$ ), les électrons à l'état excité ont une valeur de L non nulle, le moment orbital est donc en partie rétabli et peut interagir avec le moment angulaire de spin (couplage spin-orbite).

La déviation de g par rapport à sa valeur de l'électron libre se traduit, dans un spectre RPE, par une variation du champ de résonance selon l'espèce considérée et sa valeur correspond au point central du spectre.



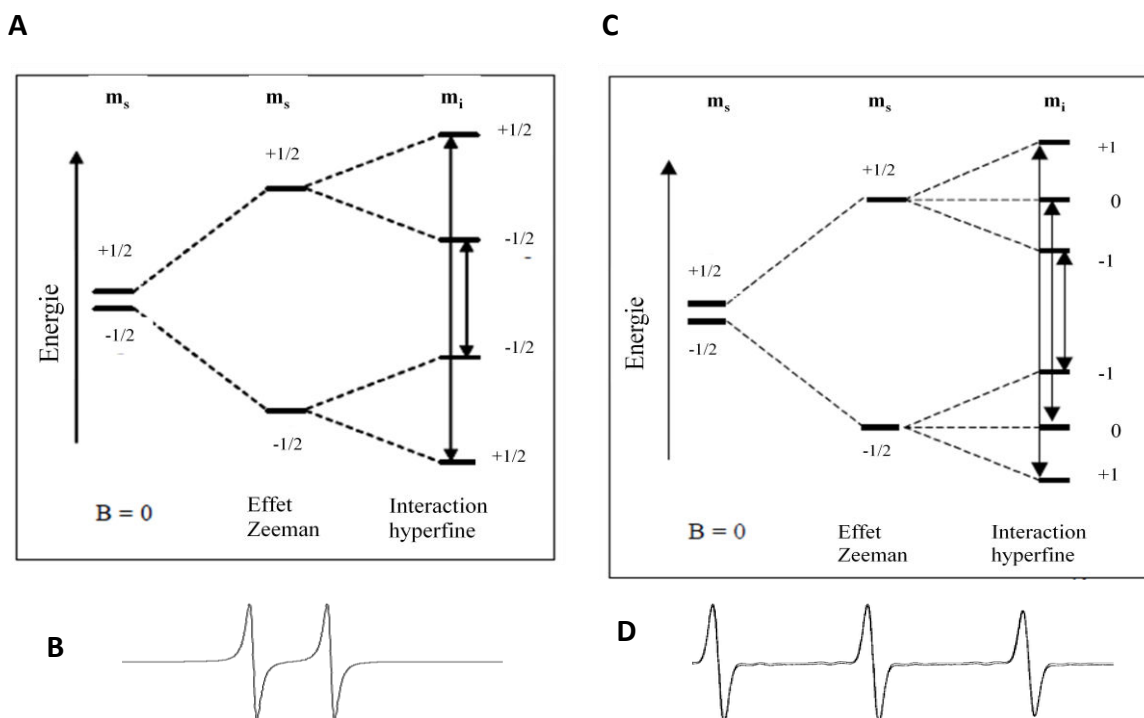
Interaction hyperfine

L'interaction hyperfine a pour origine l'association de l'électron non apparié à un ou plusieurs noyaux. Les noyaux, comme l'électron, possèdent un moment angulaire de spin ( $I$ ) et un moment magnétique associé qui peut interagir avec le moment magnétique électronique.

L'interaction de l'électron avec les noyaux de spin  $\neq 0$  (ex:  $I = 1/2; 1; 3/2\dots$ ) entraîne une multiplicité des raies spectrales qui correspondent aux transitions permises.

Les transitions RPE suivent la règle de sélection selon laquelle, les seules transitions permises sont celles entre deux niveaux énergétiques qui ne diffèrent que d'une unité de nombre quantique électronique ( $m_s$ ) mais de même nombre quantique nucléaire ( $m_i$ ):  $\Delta m_s = \pm 1$  et  $\Delta m_i = 0$ .

Si on considère un atome avec  $I = 1/2$ , par exemple l'hydrogène, il n'aura que deux transitions visibles en RPE, même s'il possède quatre niveaux énergétiques et donc six transitions possibles (Figure 57 A). Pour un atome avec  $I = 1$ , comme dans le cas de l'azote, on pourra observer trois transitions donc trois raies (Figure 57 B).



**Figure 57:** Diagramme des niveaux énergétiques pour l'atome d'hydrogène (système à deux spin  $S = 1/2$  et  $I = 1/2$ ) (A) et pour l'atome d'azote (système à deux spin  $S = 1/2$  et  $I = 1$ ) (C). (B et D): spectres RPE respectifs

On peut prévoir le nombre de transition et donc le nombre de raies selon la relation  $2I+1$ , où  $I$  représente le spin nucléaire. La distance entre les raies est mesurée en Gauss (G) ou Tesla (T) et donne la valeur de la constante de couplage hyperfine (hfsc indiqué comme  $a$ ).

Généralement le couplage n'est permis qu'aux noyaux proches de l'électron non apparié. Sur un spectre RPE on pourra donc observer les constantes de couplage des atomes en  $\alpha$  et en  $\beta$  du centre radicalaire. Dans certaines conformations particulières il est possible de résoudre de petits couplages des atomes un peu plus loin (position  $\gamma$  et  $\delta$ ).

## ANNEXE 2: RELATION DE HELLER-MCCONNELL

Les spectres RPE de tous les nitroxydes présentent au moins 3 raies à cause de l'interaction hyperfine entre l'électron célibataire et le noyau de l'azote de spin 1.

Ce signal typique des adduits nitroxydes peut être démultiplié par les interactions hyperfines avec les noyaux paramagnétiques (si présents) en position  $\beta$  et, plus rarement,  $\gamma$  par rapport au centre radicalaire.

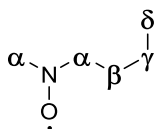


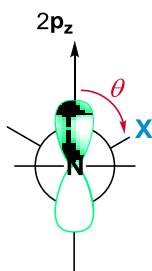
Figure 58 : Représentation des positions des atomes dans le cas d'un radical nitroxyde

Les hfsc d'un noyau X en position  $\beta$  dépendent de l'angle dièdre  $\theta$  entre le plan défini par les noyaux X-C $\alpha$ -N et le plan défini par la liaison C $\alpha$ -N et l'axe de l'orbitale 2p de l'azote. La variation de  $\theta$  est décrite par la relation de Heller-McConnell :

$$a_{X\beta} = (B' + B'' \cos^2 \theta) \rho_N$$

où  $B'$  est une constante qui représente la contribution de la polarisation de spin au couplage et généralement elle est négligeable;  $B''$  est la constante de proportionnalité de l'hyperconjugation qui varie en fonction du radical piégé et  $\rho_N$  est la densité de spin sur l'azote.

Dans le cas où la liaison entre C $\alpha$ -C $\beta$  peut effectuer une libre rotation, la valeur de l'angle  $\theta$  et en conséquence de la constante de couplage dépendent de la conformation favorisée.



**Figure 59** : Projection de Newman selon la liaison N-C $\alpha$  qui visualise l'angle dièdre  $\theta$

Dans la projection de Newman (Figure 59) on peut observer que si  $\theta=0^\circ$  alors la superposition de l'orbital  $p_z$  de l'azote et l'orbitale de X sera maximale et pourra donner le maximum du couplage. Inversement, si  $\theta=90^\circ$  on aura le minimum de superposition entre les orbitales et donc le couplage ne sera pas observé.



Les nitrones constituent une classe de composés portant la fonction  $C=N(+)-O\cdot$  qui additionnent les radicaux libres pour former des adduits nitroxyde  $>N-O\cdot$  détectables par résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette propriété, nommée spin trapping, est exploitée depuis 50 ans dans la mise en évidence indirecte par RPE de radicaux non persistants aux spectres de résonance caractéristiques. Plus récemment, les nitrones linéaires telles que l' $\alpha$ -phényl-*N-tert*-butylnitronne (PBN) et ses dérivés ont été proposées comme nouvelles thérapeutiques dans des pathologies à stress oxydant (formation non contrôlée d'espèces réactives de l'oxygène), ces molécules pouvant piéger des radicaux primaires tels que l'anion superoxyde ( $O_2\cdot^-$ ), le radical hydroxyle ( $HO\cdot$ ) et les radicaux issus de leur action sur les biomolécules. Dans ce contexte, nous avons synthétisé une vingtaine de PPNs originales, dérivés  $\beta$ -phosphorylés de la PBN dont l'un des groupements Me est remplacé par un groupe  $(EtO)_2P(O)$  et dont le groupe phényle a été substitué par des groupes ayant des effets électroniques ou stériques sur la fonction nitronne, ou a été conçu de manière à former un fragment phénolique présent dans certains antioxydants naturels. Il s'agissait de combiner le bon outil de détection par RPE que sont les PPNs (une série limitée de composés avait été décrite dans la littérature) vis-à-vis des radicaux impliqués dans le stress oxydant (tels que  $O_2\cdot^-$ ,  $HO\cdot$  et des dérivés secondaires alcoxy  $RO\cdot$ ) aux éventuels effets antioxydants et donneurs d'oxyde nitrique (un agent radicalaire de signalisation cellulaire impliqué dans la vasorelaxation et la régulation de la pression sanguine) de ces nitrones. Nous avons réalisé une évaluation des propriétés antioxydantes des nouvelles PPNs au moyen de différents tests biochimiques et physicochimiques, ainsi qu'une étude par RPE permettant de déterminer leur réactivité in vitro sur plusieurs types de radicaux libres d'intérêt biologique. Suite à ce premier screening, nous avons sélectionné les PPNs ayant les meilleures propriétés globales afin d'examiner leur impact pharmacologique et leur intérêt de sondes de RPE dans un modèle d'endothélium aortique de rat soumis à un stress oxydant. Dans une deuxième partie, nous avons greffé sur les 3- et 4-hydroxyphényl-PPN des chaînes alkyles de différentes longueurs dont la terminaison iodure de triphénylphosphonium confère à ces nitrones une affinité particulière pour la mitochondrie, principale source cellulaire de production radicalaire. Nous avons ensuite évalué par RPE la capacité de ces 5 nouvelles mito-PPNs à piéger les radicaux libres alkyle et alcoxy in vitro.

*Mots clés: dérivés de la PBN, nitrones  $\beta$ -phosphorylées, mitochondrie, RPE, spin trapping, stress oxydant, propriétés antioxydantes*

---

#### **NEW FUNCTIONALIZED $\beta$ -PHOSPHORYLATED DERIVATIVES OF PBN AND THEIR MITOCHONDRIA-TARGETED ANALOGUES. INVESTIGATION OF THEIR SPIN TRAPPING, ANTIOXIDANT AND VASORELAXANT PROPERTIES**

Nitrones are a class of diamagnetic compounds commonly used as probes to monitor biological free radical formation by the spin trapping (ST) / electron paramagnetic resonance (EPR) coupling. In addition,  $\alpha$ -phenyl-*N-tert*-butylnitronne (PBN) and some analogues have demonstrated protective effects in several pathological conditions related to oxidative stress. The growing interest in the therapeutic potential of PBN derivatives led researchers to develop analogs having improved protective properties and bioavailability. Among these, PPNs are  $\beta$ -phosphorylated analogues of PBN which form more persistent spin adducts than PBN toward oxygen-centered radicals. In this context, we have synthesized twenty new hybrid PPNs having their aromatic ring substituted either by groups which can bring electronic and steric effects to the nitronne function or mimic natural antioxidant moieties. We evaluated the antioxidant properties of the new PPNs with a series of specific assays and we used ESR to study (1) PPNs properties in ST toward a wide array of biologically-relevant free radicals, and (2) their intrinsic nitric oxide releasing properties. The most promising compounds were then tested as vasorelaxant and antioxidant free radicals detectors in rat aortic rings treated either with phenylephrine for vasoconstriction or in presence of the superoxide generators for oxidative stress induction. Protection by PPNs was assessed by measuring vascular response preservation and biochemical indices in aortic tissue. The second purpose dealt with the synthesis of new mitochondrial targeted PPNs with the aim to reach the primary biological source of endogenous production of free radicals. Using EPR, we have assessed their ability to scavenge alkyl and alkoxy free radicals in vitro, which allowed us to envisage a potential use of this probe against lipid peroxidation at mitochondrial level.

*Key words: PBN derivatives,  $\beta$ -phosphorylated nitrones, mitochondria, EPR spin trapping, oxidative stress, antioxidant properties*