

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة سعد دحلب البليدة
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master

En : Chimie Moléculaire

Option : Chimie Organique

Intitulé

*Synthèse de nouvelles nitrones à activité
antioxydante potentiel*

Préparé par :

HAOUA Amina

Soutenu publiquement le 03 /11 /2015 devant le jury composé de :

Mr. M.KARS

Maitre assistant A

USDB Président

Mr. A. BOULAHOUACHE

Maitre assistant A

USDB Examineur

Mme HAMZA AITYAHIA Kahina.

Maitre assistante A

USDB Directrice de mémoire

MA-540-100-1

Promotion 2014-2015

Remerciements

Tout d'abord je rends grâce à ALLAH créateur de l'univers et maître des destinées de m'avoir permis de suivre la bonne voie, celle de la foi et du savoir, et pour m'avoir guidé et soutenu lors de l'élaboration de cet humble travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie physique moléculaire et macromoléculaire, département de Chimie Faculté des Sciences. Je remercie le directeur du laboratoire le Professeur R. BELAL

Je tiens à remercier d'abord Mme HAMZA AIT YAHIA Kahina, maitre Assistante A à l'université de Blida1 pour son encadrement, ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je ne veux surtout pas oublier Mr AIT YAHIA. Ahmed, maitre Assistant A à l'université de Blida, qui a toujours été là pour rendre service, merci pour ses conseils, merci pour son aide.

Je souhaiterai également remercier Pr Abdelkader Touati, Professeur à l'ENS de Kouba- et Responsable du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse à l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba-Alger pour m'avoir aidée à réaliser les spectres RMN ¹H, RMN ¹³C et les spectres de masse.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur M. Kars qui m'a honoré en acceptant de présider ce jury.

Je remercie également à Monsieur A. BOULAHOUACHE qui m'a fait l'honneur de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres du laboratoire pour leur disponibilité et les échanges toujours fructueux qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail, en particulier Asma, Amina et Mariam.

Je remercie de tout mon cœur tous ceux qui, de loin ou de près, m'ont aidée dans ce travail.

Avec une immense joie, je dédie ce modeste travail à :

A mes très chers parents

Mon père,

Ce travail est le fruit de tes prières, de tes sages conseils et sacrifices

Ma tante Fatiha

Tes prières et tes bénédictions m'ont accompagnée tous les jours dans mes études

A mes frères

« Mohamed, Ali, Ishak, Hossame »

A mes sœurs

« Nacera, Rania »

A mes grands parents ;

A mes tantes et oncles ;

A Razika, Mariam, Dalila,

Pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté,

Les dérivés phénoliques sont connus pour leurs propriétés antioxydantes. D'autre part depuis de nombreuses années, les nitrones ont été reconnues comme de bons pièges à radicaux libres, avec lesquels elles réagissent pour former des adduits de type oxyaminyle, ces derniers étant stabilisés par résonance et ayant une durée de vie supérieure à celle des radicaux dont ils sont issus, en particulier les radicaux oxygénés. Cette propriété des nitrones a été utilisée en biologie pour détecter la présence de radicaux libres oxygénés et également pour protéger les cellules contre un stress oxydant. Dans ce cadre, les travaux décrits dans ce manuscrit sont centrés sur la recherche de nouvelles molécules duales qui rassemblent les deux fonctions.

Dans la première partie de ce mémoire nous avons réalisé la synthèse des différents nitrones phénoliques par condensation des différents aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine. Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par différentes méthodes physiques et spectroscopiques tels que : SM, IR, RMN ^1H et RMN ^{13}C , nous a permis de vérifier l'existence des fonctions nitrones.

Dans la deuxième partie nous avons évalués l'activité antioxydante des nitrones synthétisés par trois tests chimiques : la méthode de β carotène, la méthode de FRAP « ferric réducting antioxydant » et la méthode de DPPH « 1,1-diphényl-2 picrylhydrazule ». Ces tests ont montré que les nitrones phénoliques ont un bon pouvoir antioxydant. Ce pouvoir peut être renforcé par l'addition d'un groupement méthoxy en l'ortho de la fonction hydroxyle.

L'utilisation des nitrones bis fonctionnelles a montré son efficacité avec les méthodes qui reposent sur le mécanisme de Transfer d'hydrogène.

Mots clés : nitrone, antioxydant, phénols, RMN H^1 , RMN C^{13} , DPPH, FRAP, β -carotène

تعرف المركبات الفينولية بخصائصها ضد تاكسدية، من جهة أخرى منذ عدة سنين عرفت النيتروونات كمفخحات جيدة للجنور الحرة، حيث تتفاعل معها من اجل اعطاء ناتج مستقر من نويامينيلى oxyaminyle ، هذه الاخيرة مستقرة بفعل التحريض الميزوميري و لديها أيضا مدة حياة أطول من حياة الجنور الحرة التي تكونت منها و خاصة الجنور الاكسجينية. هذه الخاصية استعملت أيضا في بيولوجيا من اجل الكشف عن الجنور الحرة الاكسجينية و أيضا من اجل الحفاظ على الخلايا ضد التوتر الاكسيدي.

في هذا الإطار الأعمال المقدمة في هذه المذكرة تتمحور على البحث عن جزيئات جديدة التي تجمع ما بين الوظيفتين. في الجزء الاول من هذه المذكرة قمنا بتحضير النيتروونات الفينولية بتكثيف مختلف الالدهيدات الارومانية على β -فينيل ادروكسيلامين. كل المركبات المحضرة قد تم تحليلها باستعمال مختلف الطرق الفيزيائية و المطيافية مثل ^{13}C RMNC, RMNH1, SM, IR قد سمحوا لنا بالتحقق من وجود وظيفة النيترون.

في الجزء الثاني قمنا بتحديد الفعالية ضد تاكسدية للنيتروونات المحضرة بثلاث طرق كيميائية طريقة β -carotène طريقة FRAP و طريقة DPPH. هذه التجارب بينت ان للنيتروونات الفينولية لديها فعالية جيدة للأكسدة. هذه الفعالية يمكن تقويتها بإضافة الوظيفة ميتوكسي بالموقع Ortho بالنسبة للهيدروكسي.

استعمال النيتروونات المزدوجة الوظيفة بينت الفعالية مع طرق التي تعتمد على آلية انتقال الهيدروجين.

كلمات البحث : النيترون, الأكسدة, فينول, ^{13}C RMN, H^1 RMN, β -carotène, FRAP, DPPH

Phenolics are well known for their antioxidant properties. On the other hand for many years, nitrones have been recognized as good free-radical scavengers, with which they react to form adducts type "oxyaminyle", the latter being stabilized by resonance and having a shelf life greater than radicals from which they come, especially oxygen radicals. This nitrones property was used in biology for detecting the presence of oxygen free radicals and also to protect cells against oxidative stress. In this context, the work described in this manuscript is focused on synthesis a new dual molecules that bring both functions.

In the first part of this work, we performed the synthesis of various phenolic nitrones by condensation of various aromatic aldehydes on the β -phénylhydroxylamine. All synthesized products were characterized by various physical and spectroscopic methods such as MS, IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR allowed us to check and identify the existence of nitrone functions.

In the second part, we evaluated the antioxidant activity of nitrones synthesized by three chemical tests, the method of β -carotene, the method FRAP "ferric Reducing antioxidant" and the method of DPPH "1,1-diphenyl-2-picrylhydrazule". These tests show that phenolic nitrones have a good antioxidant property. This power can be strengthened by the addition of a methoxy group on ortho position to the hydroxyl function.

The use of bifunctional nitrones shown efficiency with the methods based on hydrogen transfer mechanism.

Key words: nitrone, antioxidant, phenol, RMN H^1 , RMN C^{13} , DPPH, FRAP, β -carotene.

- Abs** : Absorbance
- AMPO**: 5-carbamoyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde
- Ar** : Aromatique
- BHA** : Butyle Hydroxyle Anisol
- BHT** : Butyle Hydroxyle Toluène
- Boc-MPO**: 5-tert-butoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde
- ¹³C** : carbone 13
- °C** : Degrés Celsius
- cat** : catalyseur
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- DEPMPO**: 2-diéthoxyphosphoryl-2-méthyl-3,4-dihydro- 2H-pyrrole-1-oxyde
- DIPPMPO**: 5-diisopropoxyphosphoryl-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde
- DMPO** : 5,5 diméthylpyrroline-N-oxyde
- DMSO**: Dimethylsulfoxyde
- DPPH**: 2, 2-Diphenylpicrylhydrazyl
- E** : Trans
- EAR** : Espèces Réactives de l'Azote
- EMPO**: 2-éthoxycarbonyl-2-méthyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxyde
- EOR**: Espèces Réactives de l'Oxygène
- éq** : équivalent
- eV** : électron-volt
- FRAP**: Ferrie reducing antioxidant power
- h**: heure
- ¹H** : proton
- HPLC**: Chromatographie liquide haute Pression
- Hz** : Hertz
- I** : Iode
- IR** : spectrométrie Infra-Rouge
- ispr** : isopropyle
- j**: jour
- J** : Constante de couplage à distance de x liaisons entre les noyaux
- KBr** : Bromure de potassium
- Me** :Méthyle
- (m/z)** : masse/charge

Remerciements	
Dédicaces	
ملخص.....	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Introduction générale	01
Chapitre I : Mise au point bibliographique de la nitronne	
I.1 Définition des nitrones	02
I.2 Types de nitrones	03
I.3 Synthèses des nitrones.....	03
I.3.1.Oxydations	04
A-Oxydation d'amines	04
B-Oxydation de N-hydroxylamines	05
C-Oxydation d'imines	05
I.3.2 Condensation de N-hydroxylamines avec des composés carbonylés	06
A- Aldéhydes	06
B- Cétones	06
I.3.3 Alkylation d'oximes	07
I.4 Réactivité	07
I.4.1 Cycloadditions 1,3-dipolaires	08
I.4.2 Additions nucléophiles	08
I.4.3 Inversion de polarité (<i>Umpolung</i>) des nitrones	09
I.5 Domaine d'application des nitrones	09
I.5.1. piégeage de spin : cycliques et linéaires	10
I.5.1.1.Les spin-traps cycliques	10
I.5.1.2.Les spin-traps linéaires	11
I.5.2.Utilisation d'antioxydants de type nitronne à propriétés thérapeutiques	12
I.5.2.1.Activité neuroprotectrice	12
I.5.2.2.Activité sur la vision et l'ouïe	12
I.5.2.3.Autres activités protectrices	13
I.5.2.4.Activité sur le vieillissement	13

Chapitre II : Partie expérimentale

II.1 Appareillages et produits	14
II.1.1 Produits	14
II.1.2 Appareils	15
II.2 Synthèse des nitrones	15
II.2.1 Synthèse de la β -phénylhydroxylamine	15
II.2.2 Synthèse de bisvanilline.....	17
II.2.3 Condensation des aldéhydes aromatique sur la β -phénylhydroxylamine.....	19
II.3 Purification et séparation par chromatographie flash	20
II.3.1 Choix de l'éluant	21
II.3.2 Remplissage de la colonne	21
II.3.3 Déposition de l'échantillon	22
II.3.4 La séparation.....	23
II.4 Tests d'activité antioxydant des nitrones	23
II.4.1 La méthode de piégeage du radical DPPH	23
II.4.2 La méthode de FRAP (Ferrie reducing antioxidant power)	24
II.4.3 La méthode de la β -carotène.....	25

Résultats et discussions

Chapitre III : Synthèse et caractérisation des nitrones

III.1 Préparation des nitrones	27
III.1.1 Synthèse de la β -phénylhydroxylamine	27
III.1.2 Synthèse et caractérisation de la bis-vanilline	28
III.1.2.1 Caractérisation spectroscopique du bis-vanilline.....	29
III.1.3 Condensation des aldéhydes sur la β - phényl hydroxylamine	30
III.1.4 Purification et séparation par chromatographie flash	33
III.1.5 Caractérisation spectroscopique des nitrones	33
III.1.5.1 Etude par spectrophotométrie infrarouge	33
III.1.5.2 Spectroscopie de masse	36
III.1.5.3 Etude en RMN ^1H	40
III.1.5.4 Etude en RMN ^{13}C	44
III.6 Conclusion.....	48

Chapitre IV : Activité antioxydant des nitrones

IV.1 L'activité antioxydante des nitrones	49
IV.1.1 La méthode de piégeage du radical DPPH	51
IV.1.2 La méthode de la β -carotène.....	55
IV.1.3 La méthode FRAP.....	57
IV.1.4 Conclusion.....	59
Conclusion générale	60
Références bibliographiques	

Introduction Générale

Introduction générale

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées et azotés réactives et les défenses antioxydantes. Ce phénomène est associé à de nombreuses pathologies telles que des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires ou des cancers. Pour contrecarrer les dégâts causés par le stress oxydant, l'utilisation d'antioxydants synthétiques s'est avérée intéressante. Ce dernier, doit être stable et non toxique dans les conditions de l'expérience, il doit interagir sélectivement avec les radicaux libres visés et les valeurs de vitesse de piégeage doivent être élevées. Les molécules pièges les plus couramment utilisées pour piéger les radicaux sont les nitrones, Parmi ces nitrones, la 5,5 diméthylpyrroline-N-oxyde (DMPO), l' α -phényl-N-tertbutylnitronone (PBN) ainsi que la α -4-pyridyl-1-oxide-N-tert-butyl nitronone (POBN) se sont révélées, durant de longues années, comme des antioxydants très efficaces in vitro ou in vivo.

Cependant, malgré la grande capacité que possèdent ces nitrones à piéger de nombreux radicaux libres, elle présente quelques limitations telle que l'insolubilité en milieu biologique. La recherche de nouvelles nitrones synthétisés, plus performantes dans les milieux biologiques est en progression continue.

Notre travail rentre dans ce contexte, il vise à synthétiser de nouvelles nitrones phénoliques. Ces dernières regroupent les propriétés antioxydantes très intéressantes des phénols à celles des nitrones.

Ce manuscrit est organisé en trois parties :

Une partie théorique sur les nitrones, leurs méthodes de synthèse et leurs applications.

La deuxième partie est la partie expérimentale. Elle comporte le matériel et les méthodes utilisées.

La troisième partie est consacrée aux résultats expérimentaux. Cette partie sera subdivisée en deux chapitres.

- Le premier chapitre sera consacré à la synthèse et caractérisation d'une série de nitrones phénolique.
- Le deuxième chapitre comportera les résultats des tests de l'activité antioxydante des nitrones phénoliques synthétisées

On terminera par une conclusion générale.

Chapitre I

Les nitrones

La chimie des composés à double liaison C=N représente actuellement une méthode de choix pour la synthèse de composés aminés. Parmi ces substrats, les nitrones offrent de nombreux avantages. Elles sont souvent stables et cristallines, et sont plus réactives que les autres composées à double liaison C=N(Figure1) [1].

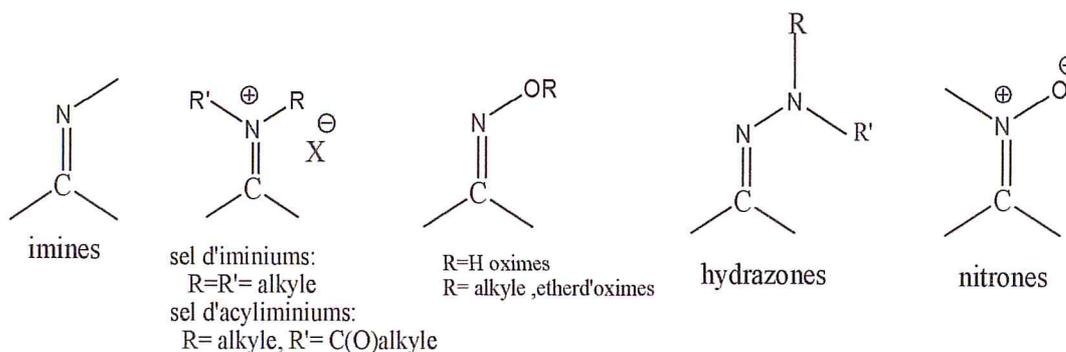
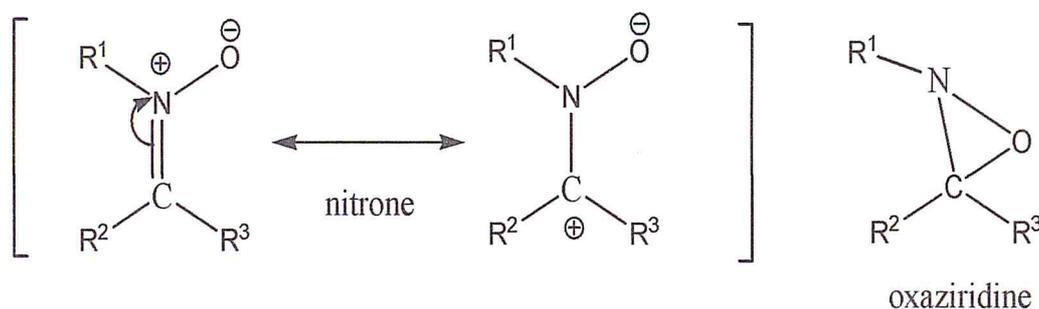


Figure (1): les composés à double liaison C=N

I.1 Définition des nitrones

Les nitrones sont découverts en 1890, par Beckmann sont des composés stables possédant une double liaison carbone-azote et une liaison de coordinance azote-oxygène qui leur confère une structure de type anion allylique. Ces composés dont le siège d'une mésomérie et l'écriture des formes limites de résonance met en évidence leur caractère 1,3-dipolaire [1] (Figure2). Au début du 20^{ème} siècle, la structure envisagée pour ce type de composé était une structure cyclique à trois chaînons de type oxaziridine (Figure2), où l'atome d'oxygène était relié au carbone [2].

Le nom nitrone provient de la contraction des termes anglais « nitrogen » et « ketone » qui illustre une analogie entre les nitrones et les composés carbonylés [2].



Figure(2) : Stabilisation des nitrones par résonance

I.2. Types de nitrones

Par analogie avec les aldéhydes et cétones, on différencie deux types de nitrones : les aldonitrones et les cétonitrones. Les premières comportent un proton sur l'atome de carbone de la fonction nitrone, contrairement aux secondes (**Figure 3**). Les cétonitrones sont réputées d'être moins stables et moins faciles d'accès.

La présence de la double liaison C=N implique des relations d'isomérisation *Z/E* dans ces structures [2,3]. Dans le cas des nitrones acycliques, une cétonitronne pourra adopter les deux configurations (la *E* possédant un moment dipolaire plus élevé) [2], et une aldonitronne sera exclusivement de configuration *Z* stabilisée par hyperconjugaison, généralement cristalline et stable [4] et lorsqu'elles sont cycliques, elles ne peuvent évidemment présenter que la géométrie (*E*) (**Figure 3**).

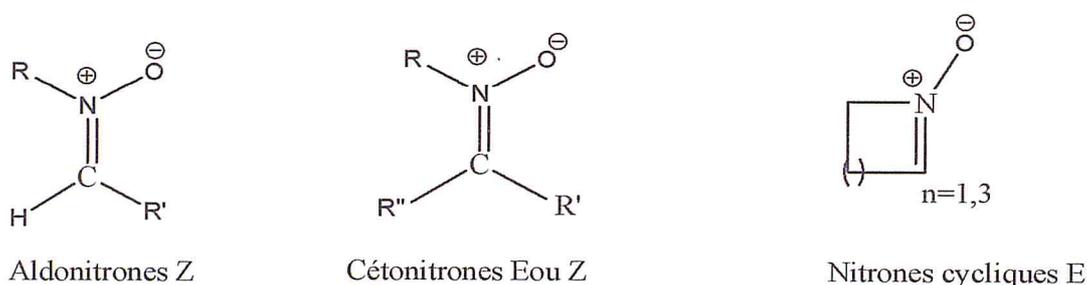


Figure (3) : Types de nitrones

I.3. Synthèses

La littérature est relativement riche en ce qui concerne la préparation des nitrones, la disponibilité des composés précurseurs étant l'argument principal pour le choix de l'une ou l'autre d'entre elles. Les nitrones sont obtenues par oxydation d'amines, d'imines ou de *N*-hydroxylamines, par *N*-alkylation d'oximes, ou encore par condensation d'une *N*-hydroxylamine sur un dérivé carbonyle (**Figure 4**) [1]. Ci-dessous, nous citerons quelques méthodes de synthèses des nitrones .

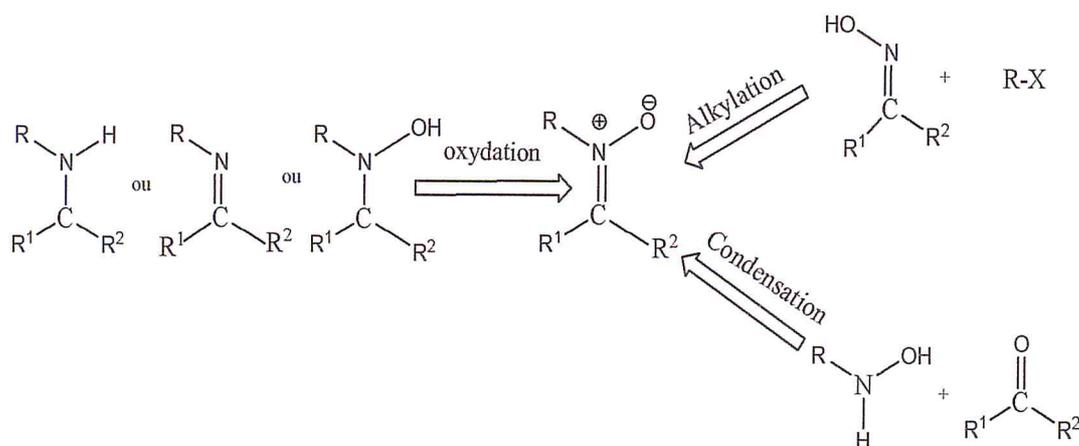


Figure (4) : Approches possibles pour la préparation des nitrones

I.3.1. Oxydations

A-Oxydation d'amines

L'oxydation des amines secondaires conduit à la formation de nitrones en présence d'un catalyseur métallique et d'un agent oxydant (Figure 5). La méthode générale consiste à utiliser comme agent oxydant une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% ou son complexe urée- H_2O_2 (UHP), solide [5]. Les catalyseurs les plus utilisés pour ces transformations sont le tungstate de sodium dihydraté (Na_2WO_4) [6], le dioxyde de sélénium (SeO_2) [7], et le méthyltrioxorhénium (CH_3ReO_3) [8] (Figure 5).

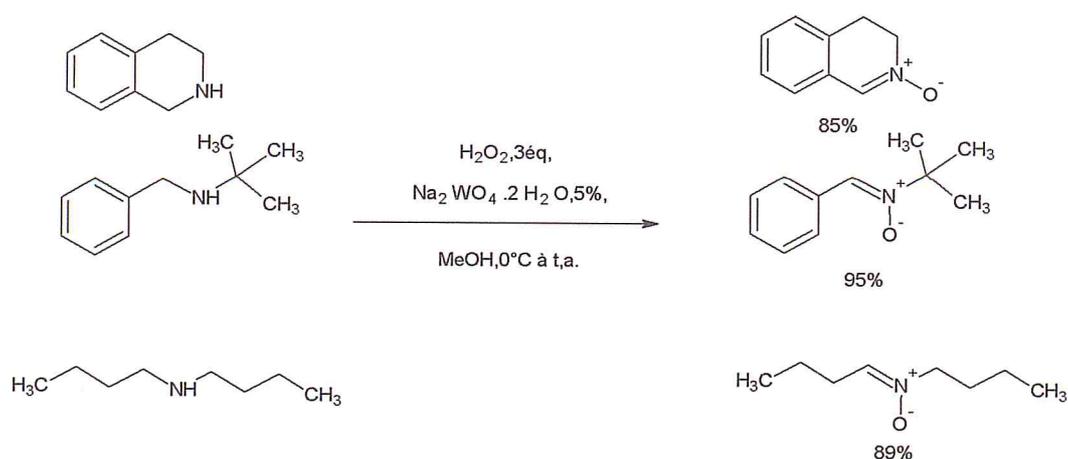


Figure (5) : Oxydation d'amines secondaires

B-Oxydation de *N*-hydroxylamines

Les *N*-hydroxylamines sont les intermédiaires non isolés des réactions d’oxydation d’amines en nitrones. Il est donc possible de les oxyder pour conduire à la formation des nitrones correspondantes. Les agents métalliques d’oxydation de *N*-hydroxylamines conduisant aux nitrones sont variés (cuivre, plomb, argent).

Parmi les agents d’oxydation connus, le meilleur est l’oxyde de mercure (II) qui permet d’obtenir des nitrones avec de très bons rendements (>95%) et une bonne régio-sélectivité pour les nitrones cycliques, mais des régiosélectivités faibles dans le cas de nitrones acycliques (**Figure 6**) [9].

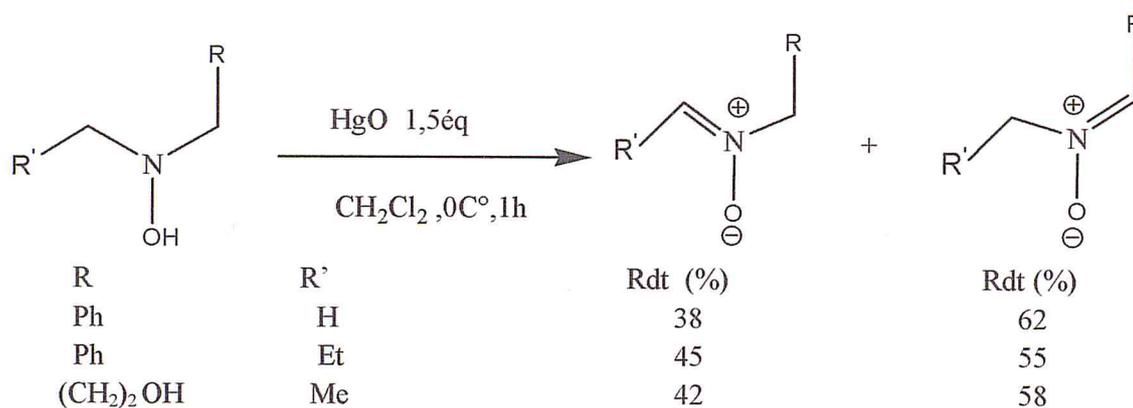
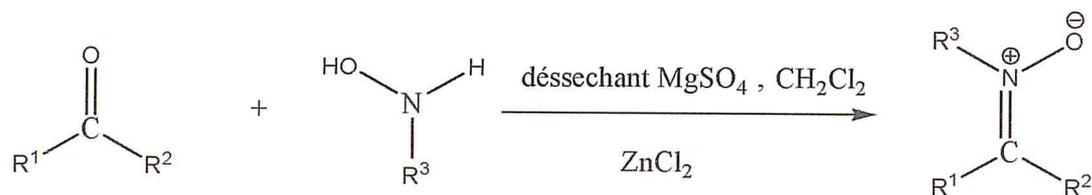


Figure (6) : Oxydation de *N*-hydroxylamines

L’oxyde de mercure utilisé est de plus en plus remplacé par le dioxyde de manganèse moins toxique [10].

C-Oxydation d’imines

L’oxydation d’imines peut conduire à la formation de nitrones. Cependant, leur utilisation présente deux inconvénients majeurs : les imines nécessaires ne sont pas toujours stables et leur oxydation conduit à un mélange de nitron et d’oxaziridine. Ainsi, certains agents d’oxydation énoncés précédemment (peroxyde d’hydrogène, UHP) [11], ainsi que l’acide *m*-chloroperbenzoïque dans certains cas [12] conduisent principalement, voire complètement aux oxaziridines[13].

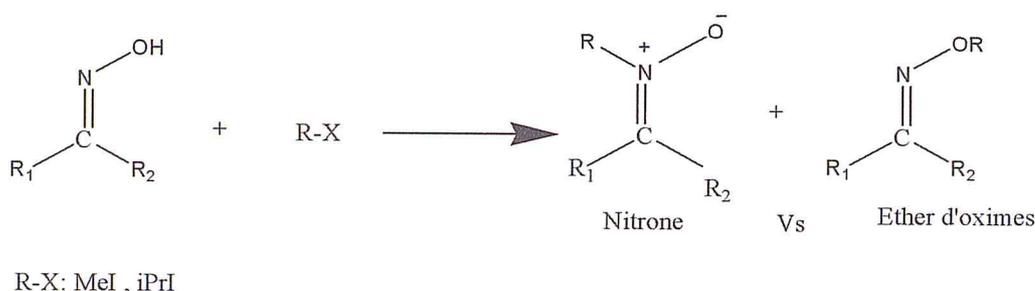


Figure(9) : Condensation de N-hydroxylamines avec les cétones

I.3.3 Alkylation d'oximes

Lors de l'alkylation des oximes, la chimiosélectivité est gouvernée par la configuration de ces dernières qui va conduire aux composés *N*-alkylés (nitrones) ou *O*-alkylés (éther d'oximes) (Figure10).

Dans le cas d'aldoximes, la configuration *Z* ($R_1 = H$) conduira majoritairement à une nitrone car les doublets électroniques libres de l'oxygène sont encombrés (par le groupement R_2) et celui de l'azote est le plus disponible. Inversement, la configuration *E* ($R_2 = H$) conduira préférentiellement aux éthers d'oximes [17].



Figure(10) : Alkylation d'oximes

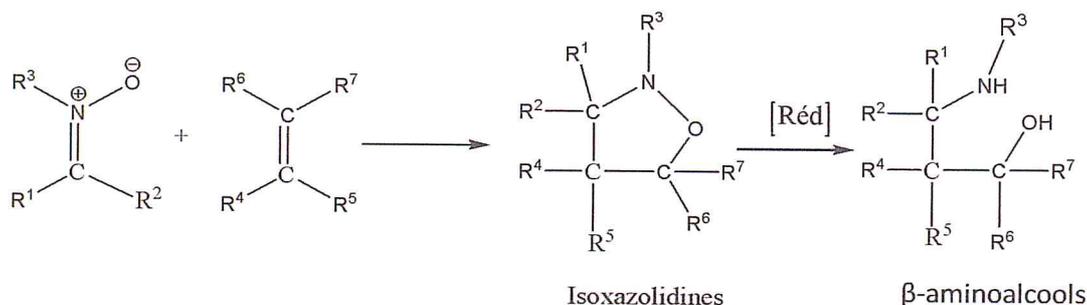
I.4. Réactivité

La présence de l'atome d'oxygène électronégatif et d'un atome d'azote chargé positivement implique que la double liaison $C=N$ est polarisée, rendant le carbone électrophile, donc très réactif. Ces composés réagissent aussi bien avec des électrophiles (sur l'atome d'oxygène) qu'avec des nucléophiles (sur l'atome de carbone)[1].

D'autre part, il existe de nombreuses ressemblances entre les nitrones et les composés carbonyles : par exemple, l'acidité des protons en α , le caractère électrophile du carbone de la double liaison ou leur réduction par les hydrures métalliques [3]. Les cycloadditions 1,3-dipolaires restent néanmoins les réactions les plus connues avec les nitrones.

I.4.1 Cycloadditions 1,3-dipolaires

Les nitrones ont également été très employées dans des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire [18]. Ces réactions permettent la création de cycles de type isoxazolidines, précurseurs de 1,3-aminoalcools obtenus par réduction de la liaison N-O.



Figure(11): La réaction de Cycloadditions 1,3-dipolaires

Cette propriété explique aussi la dimérisation des nitrones énolisables. En effet, une cycloaddition 1,3-dipolaire entre la nitronne et son tautomère *N*-hydroxyénamine forme le produit de cycloaddition(Figure 12)[19].

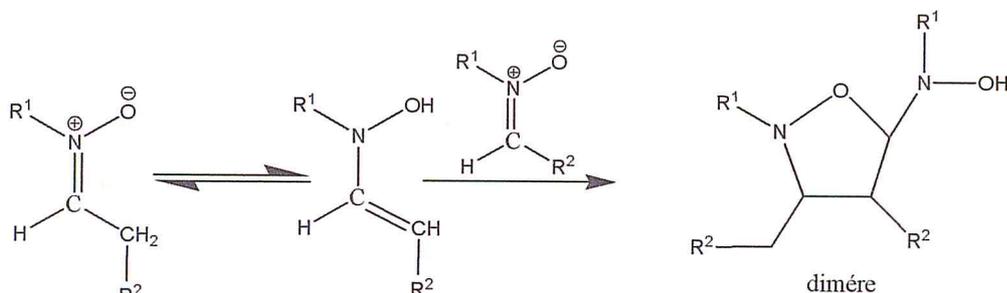
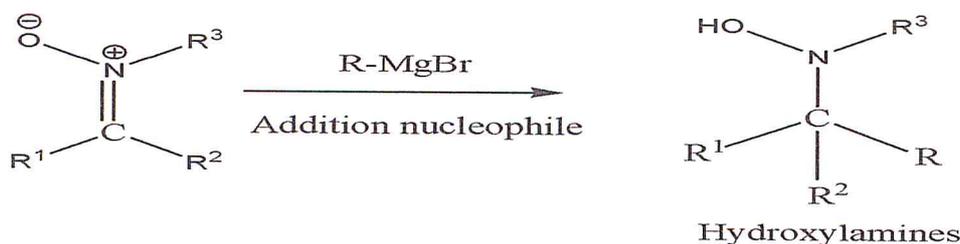


Figure (12) : dimérisation des nitrones énolisables

I.4.2 Additions nucléophiles

Le caractère électrophile des nitrones en fait aussi de bons partenaires dans le cadre d'addition de nucléophiles. Les additions nucléophiles sur les doubles liaisons C=N sont très utilisées pour la synthèse de composés aminés. Les nitrones réagissent avec un grand nombre de nucléophiles tels que les ions cyanures ou divers dérivés organométalliques. Ces réactions d'additions nucléophiles permettent un accès faciles aux *N*-hydroxylamines fonctionnalisées (Figure13) [20].



Figure(13) : Addition nucléophiles sur les nitrones

I.4.3 Inversion de polarité (*Umpolung*) des nitrones

Au début des années 2000, un nouvel aspect de la réactivité des nitrones : en présence de diiodure de samarium (SmI_2) la polarité de la double liaison carbone-azote est inversée (*Umpolung*) par réduction. L'espèce ainsi réduite peut alors réagir avec des électrophiles comme des dérivés carbonylés ou des esters α,β -insaturés[21] (Figure14).

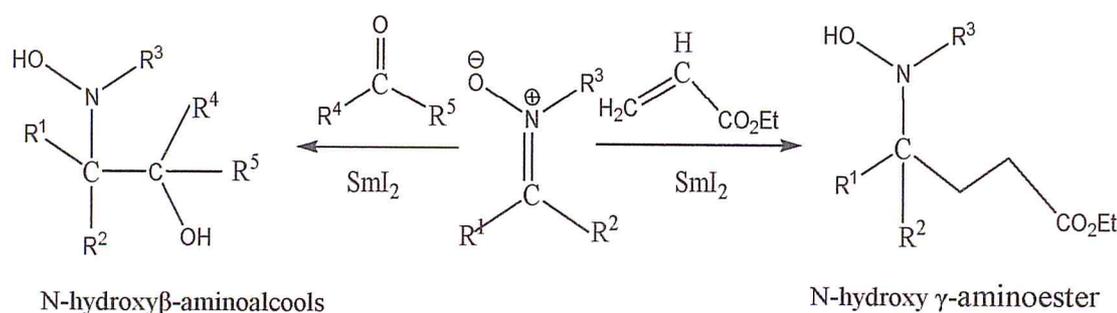


Figure (14) : Inversion de polarité des nitrones

I.5. Domaine d'application des nitrones

Les nitrones sont des intermédiaires synthétiques importants qui ont servi d'une manière extensive en chimie organique. Quelques nitrones ont été utilisées pour le piégeage et l'identification des radicaux libres[22], particulièrement dans les études biologiques. De nos jours, les nitrones ne représentent pas seulement un outil largement utilisé pour la détection des radicaux libres, mais aussi comme agents chimiothérapeutiques prometteurs au niveau cérébral et autres pathologies[23].

I.5.1. Piégeage de spin

A l'heure actuelle, les nitrones sont une classe de molécules diamagnétiques très couramment utilisée dans la technique de piégeage des radicaux (spin trapping) [24]. Un exemple de piégeage d'un radical ($R\cdot$) par une nitronne est représenté sur la **figure (15)**.

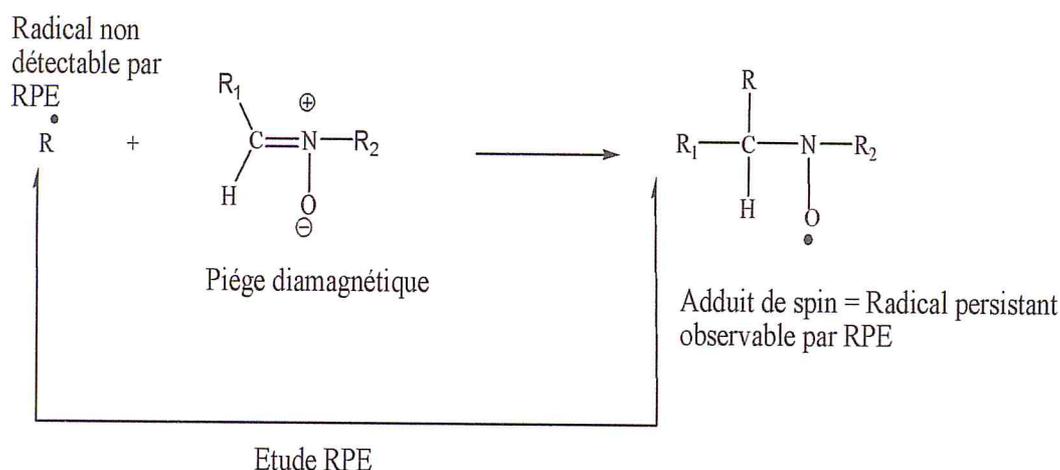


Figure15 : Principe de la technique de piégeage de spin par une nitronne

La nitronne réagit avec le radical libre par l'intermédiaire du carbone situé en position α de l'atome d'azote, ce qui conduit à la formation d'un adduit de spin de type nitroxyde. L'atome d'hydrogène qui se trouve à deux liaisons du groupement nitroxyde est nommé hydrogène β .

Parmi ces nitrones, la 5,5 diméthylpyrroline-N-oxyde (DMPO), l' α -phényl-N-tertbutylnitronne (PBN) ainsi que la α -4-pyridyl-1-oxide-N-tert-butylnitronne (POBN) se sont révélées, durant de longues années, particulièrement bien adaptées à l'étude du piégeage de nombreux radicaux libres *in vitro* ou *in vivo*.

I.5.1.1. Les spin-traps cycliques

La DMPO est encore actuellement l'un des pièges les plus utilisés [25], car elle présente d'excellentes propriétés de piégeage des radicaux oxygénés de type hydroxyle, superoxyde et perhydroxyle [26,27].

Cependant, malgré la grande capacité que possède cette nitronne cyclique à piéger de nombreux radicaux libres, elle présente quelques limitations comme :

- sa faible solubilité dans l'eau,

- sa sensibilité aux attaques nucléophile en milieu aqueux ainsi qu'à d'autres réactions de dégradation,
- la très faible stabilité de l'adduit de spin formé par piégeage du radical : Exemple superoxyde (DMPO-O₂H), qui la particularité de se décomposer très rapidement en adduit hydroxyle (DMPO-OH), et dont le temps de demi-vie est 45 secondes en milieux aqueux [25-28-29].

C'est ainsi que de nouveaux spin-traps dérivés de la DMPO, ont été synthétisés afin d'améliorer ses capacités de détection et d'identification de radicaux libres en milieu biologique [30, 31], toujours dans le but d'augmenter le temps de demi-vie des adduits de spin formés. La figure 16 présente quelques analogues, avec notamment :

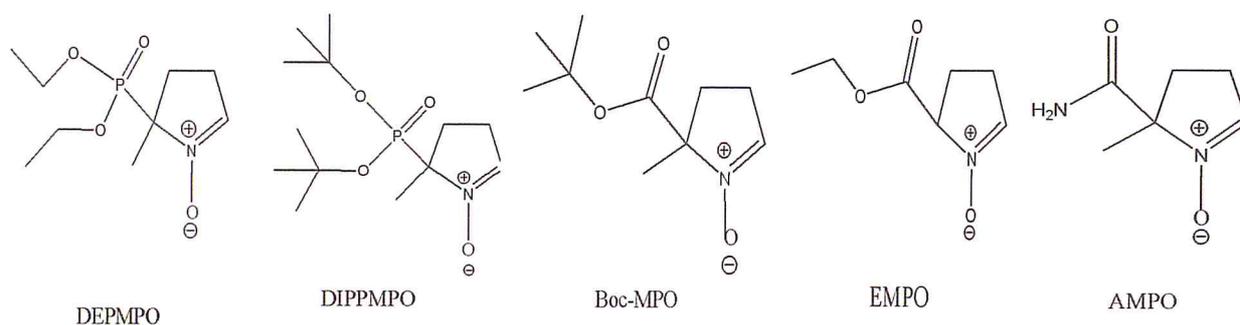


Figure 16: Structures chimiques de quelques spin-traps cycliques

I.5.1.2. Les spin-traps linéaires :

La PBN est également utilisée dans des études de piégeage de spin malgré des propriétés de piégeage plus faibles que son analogue cyclique, conduisant à des adduits de spin moins persistants [32]. En effet, l'adduit de spin formé par piégeage du radical superoxyde, PBN-O₂H, a un temps de demi-vie de seulement 10 secondes. Cependant, son hydrophobie plus élevée rend la PBN plus adaptée que la DMPO pour piéger des radicaux carbonés en milieu organique [33] comme en milieu aqueux [34]. De plus, cette hydrophobie supérieure lui confère une meilleure distribution tissulaire et une meilleure pénétration transmembranaire lors d'expériences en milieu biologique.

I.5.2.Utilisation d'antioxydants de type nitrone à propriétés thérapeutiques

Les nitrones ont également été utilisées dans le cadre d'expériences biologiques afin d'évaluer si leurs propriétés de pièges à radicaux libres pouvaient avoir un effet protecteur sur des cellules ou des organismes exposés à un stress oxydant.

I.5.2.1.Activité neuroprotectrice

En 1985, Novelli et col ont découvert que la PBN possédait une activité protectrice dans les cas d'ischémies cérébrales[35]. ces études ont été confirmées par McKennie *et col.* en 1986[36] et par Hamburger *et col.* en 1989[37].

Le mécanisme d'action de la nitrone comme neuroprotectrice implique l'inhibition du processus de capture de signal accentué qui sert d'intermédiaire de la régulation de gène qui produit les neurotoxines [38,39].

I.5.2.2.Activité sur la vision et l'ouïe

De nombreuses recherches ont montré que le stress oxydant joue un rôle primordial dans l'induction de maladies touchant l'oreille interne et dans la perte de l'audition lors d'exposition à des nuisances sonores excessives [40].

Les travaux de Fechter *et col.* ont démontré que de nombreux composés comme, le monoxyde de carbone, le cyanure d'hydrogène et l'acrylonitrile peuvent, en association avec des nuisances sonores, engendrer une perte de l'audition par une surproduction d'EOR et d'EAR dans l'oreille interne[41]. la PBN a été testée sur des rats soumis à une exposition sonore intense et en présence de monoxyde de carbone ou d'acrylonitrile et il a été démontré que l'administration de PBN avant et pendant la période d'exposition à la toxine et l'intensité sonore permettait de diminuer fortement la perte auditive chez les rats[42] . La PBN s'est également montrée à plusieurs reprises capable de réduire les effets néfastes des radicaux libres sur un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne, qui consiste à exposer des rats à une lumière intense[43].

I.5.2.3. Autres activités protectrices

La streptozotocine (STZ) est une molécule capable de reproduire les diabètes insulino-dépendants en induisant la formation de radicaux libres et une hyperglycémie.

Cette hyperglycémie peut être inhiber par la PBN tout en réduisant très fortement la production de radicaux[44].

les dommages induits par des agents anticancéreux anthracycliques ou des agents anti-angiogéniques peut être réduit par PBN qui est capable de diminuer la cardiotoxicité de la doxorubicine[45] en maintenant son activité cytotoxique[46].

De plus, la PBN est également capable de réduire l'action tératogène de la thalidomide par pré-traitement, indiquant que la toxicité de ce xéniobiotique pourrait être liée à la formation d'espèces radicalaires[47].

I.5.2.4. Activité sur le vieillissement

De nombreuses études ont mis en évidence le fait que l'administration de PBN chez des sujets âgés s'accompagnait d'un allongement de la durée de vie.

En 1991, Carney *et col* [48], démontrèrent pour la première fois les effets bénéfiques d'une administration chronique de PBN sur la restauration des fonctions cognitives de rats âgés. Ces résultats ont été confirmés par Sack *et col.* [49] et Saito *et col.* [50].

La PBN possède donc une activité anti-âge marquée qui serait en partie due, d'après Saito, à sa capacité à former des radicaux nitroxydes *in vivo*.

Chapitre II

Partie expérimentale

II.1 Appareillages et produits

II.1.1 Produits

Les produits utilisés dans notre travail et leurs origines sont rassemblés dans le tableau (1).

Tableau (1) : produits utilisés ainsi que leurs origines et degré de pureté.

Produits	Origine	Pureté (%)
Ethanol absolu	Sigma-Aldrich	99,9
Diéthyl éther	Sigma-Aldrich	99,5
Ether de pétrole	Sigma-Aldrich	95
Nitrobenzène	Panreac PA	99,5
Chlorure d'ammonium(NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich	99,5
Zinc en poudre	Panreac PA	99
Chlorure de sodium	Sigma-Aldrich	99
MgSO ₄	Sigma-Aldrich	99
Benzaldéhyde	Sigma-Aldrich	99
Acétate d'éthyle	Sigma-Aldrich	99,5
Vanilline	Sigma-Aldrich	98
Isovanilline	Sigma-Aldrich	95
Sulfate de fer	Sigma-Aldrich	99
Persulfate de sodium	Sigma-Aldrich	98
Soude NaOH	Sigma-Aldrich	99,5
Acide chlorhydrique	Sigma-Aldrich	38
Chloroforme	Pro labo	99,6
Dichlorométhane	Sigma-Aldrich	99
DMSO	Panreac PA	99,9
DPPH	Fluka	99
β -carotène	Pro labo	99,5
Acide linoléique	Fluka	98
Tween 40	Pro labo	98
FeCl ₃	Fluka	99
[K ₃ Fe(CN) ₆]	Fluka	99
TCA	Fluka	99
BHA	Fluka	99
2,6di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT)	Fluka	99
-Nitrone IX (C-3-méthoxy-4-hydroxy phényl, N-phényl nitrone) -Nitrone X (C-3-hydroxy-4-méthoxy, phényl, N-phénylnitrone)	Les nitrones utilisées sont synthétisées, identifiées au laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba.	

II.1.2 Appareils

Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont:

- Les points de fusion des nitrones synthétisés ont été mesurés en tube capillaire, à l'aide d'un appareil de type Stuart.
- Les spectres Infra Rouge des nitrones ont été réalisés à l'aide d'un appareil de marque IR-FT JASCO-4100. Les composés solides sont greffés sur des pastilles en KBr. Les nombres d'onde des bandes de vibration d'élongation (ν) sont donnés en cm^{-1} .
- Les spectres UV- visible ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, de marque JASCO, type V-630 à doubles faisceaux.
- Les spectres de masse ont été réalisés à l'aide d'un appareil de marque NERMAG R 10-10 dans les conditions d'impact électronique (IE).
- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de silice sur aluminium, les CCM sont révélés en lumière ultraviolette à 254 nm.
- Les spectres RMN ^1H réalisés en solution dans le DMSO à 200 MHz ont été obtenus à l'aide d'un appareil de type Bruker AC 200. Les déplacements chimiques sont indiqués en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) servant d'étalon inerte, les constantes de couplage en Hz et les abréviations utilisées dans la description des spectres sont : s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; dd : doublet de doublet ; dt : double triplet ; m : multiplet.

II.2 Synthèse des nitrones

Les nitrones sont préparées par condensation de la β -phénylhydroxylamine sur les aldéhydes aromatiques. Les modes opératoires de la synthèse de l'hydroxylamine et quelques aldéhydes aromatique ainsi que sa condensation sur les aldéhydes aromatiques sont donnés ci-dessous:

II.2.1 Synthèse de la β -phénylhydroxylamine

La β -phénylhydroxylamine est préparée par réduction du nitrobenzène ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) par le zinc (Zn), en présence de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), Cette réaction se fait sous contrôle thermique car, elle est exothermique et si on laisse la température dépasser 65°C , on aura la réduction complète de la fonction nitro (Formation d'aniline). Le mode opératoire général est comme suit :

Dans un erlenmyer de 500 ml, équipé d'un thermomètre, on fait introduire 25g de chlorure d'ammonium, 200 ml d'eau distillée et 50 g (41,6mL, 0,41mol) de nitrobenzène fraîchement distillé. On agite vigoureusement en ajoutant pendant 15 minutes 59 g (0,83mol) de zinc en poudre. La vitesse de

cette addition doit être contrôlée de façon à ce que la température du mélange reste entre 60 et 65°C jusqu'à ce que tout le zinc soit rajouté. On continue l'agitation pendant 15 min supplémentaires (le temps pour que la réaction de réduction s'achève). La fin de la réaction se manifeste par une chute de température. On filtre le mélange et on lave le zinc oxydé avec 100 ml d'eau chaud. Le filtrat est saturé avec 300g de chlorure de sodium et extrait avec le diéthyl éther pour éliminer toute trace de composés inorganiques. La phase organique récupérée est séchée avec du sulfate de sodium. Après filtration, on évapore à sec pour obtenir un solide jaunâtre. La recrystallisation de ce dernier dans l'éther de pétrole nous donne 25.4g de β -phénylhydroxylamine sous forme de cristaux blanc [51]. Le protocole de synthèse de base mis en œuvre est schématisé dans la figure (17).

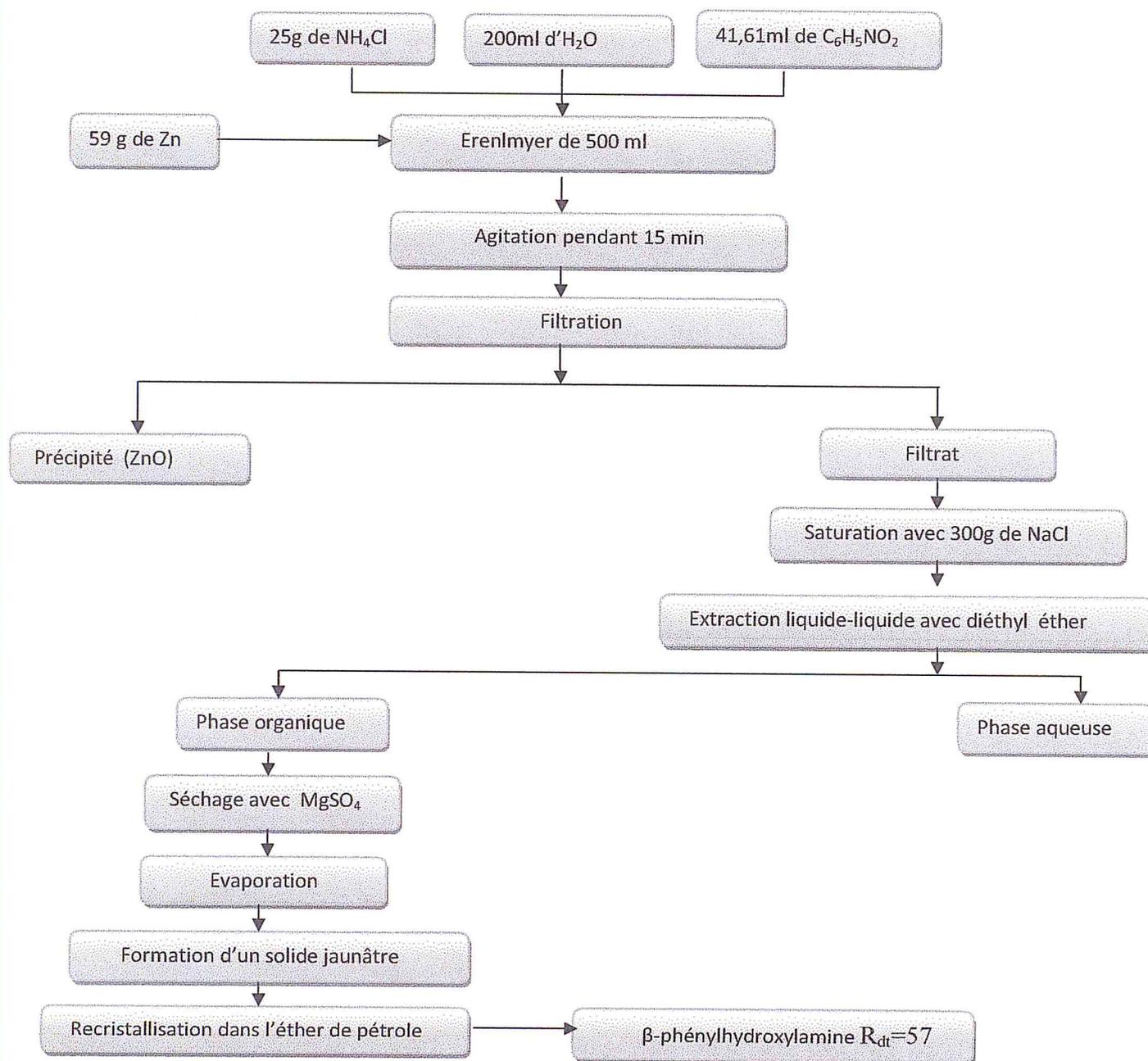


Figure (17) : Organigramme de synthèse de β - phénylhydroxylamine

II.2.2 Synthèse de la bisvanilline

La synthèse de bisvanilline a lieu selon la réaction et le mode opératoire général suivant :

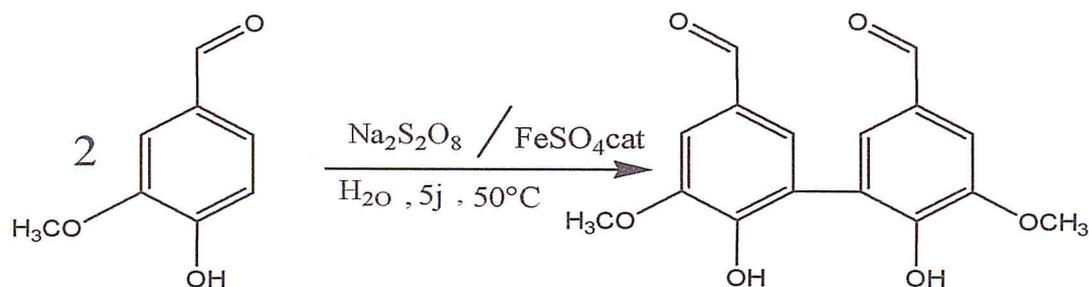


Figure (18) : Synthèse de la bisvanilline

Dans un ballon de 1L on introduit 10,64g de vanilline en suspension dans 700 ml d'eau, on ajoute 0,4g de sulfate de fer. Le mélange est mis sous agitation avec chauffage à 50°C (On remarque après l'agitation qu'il y a formation de suspension blanche). Après 10min de chauffage à 50°C on ajoute 8,93g de persulfate de sodium (on remarque que le mélange réactionnel vire du blanc au noir). à la fin de l'addition du persulfate de sodium la couleur du mélange devient marron clair). On maintient le mélange réactionnel sous agitation à 50°C pendant 5 jours. Le mélange est filtré sous vide pour récupérer un précipité marron clair très fin. Ce dernier est purifié par solubilisation dans une solution de NaOH 2M suivi d'une précipitation par addition d'une solution de HCl 2M. Le solide formé est filtré, séché à l'air libre. 9g de la bisvanilline est obtenu sous forme d'une poudre de couleur marron clair [52].

Le protocole de synthèse de base mis en œuvre est schématisé dans la **figure (19)**.

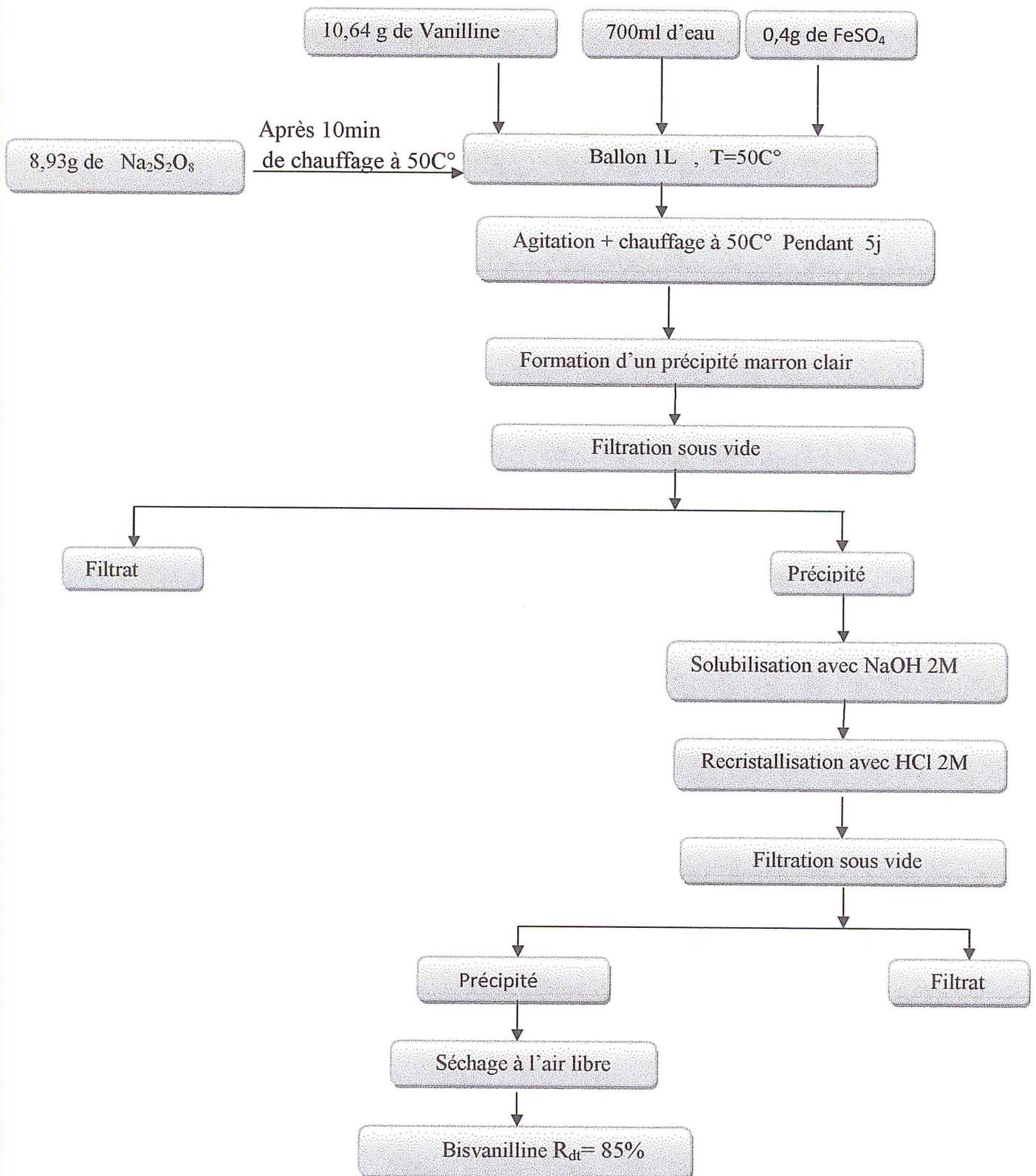


Figure (19) : Organigramme de synthèse de bisvanilline

II.2.3 Condensation des aldéhydes aromatiques sur la β - phényl hydroxylamine

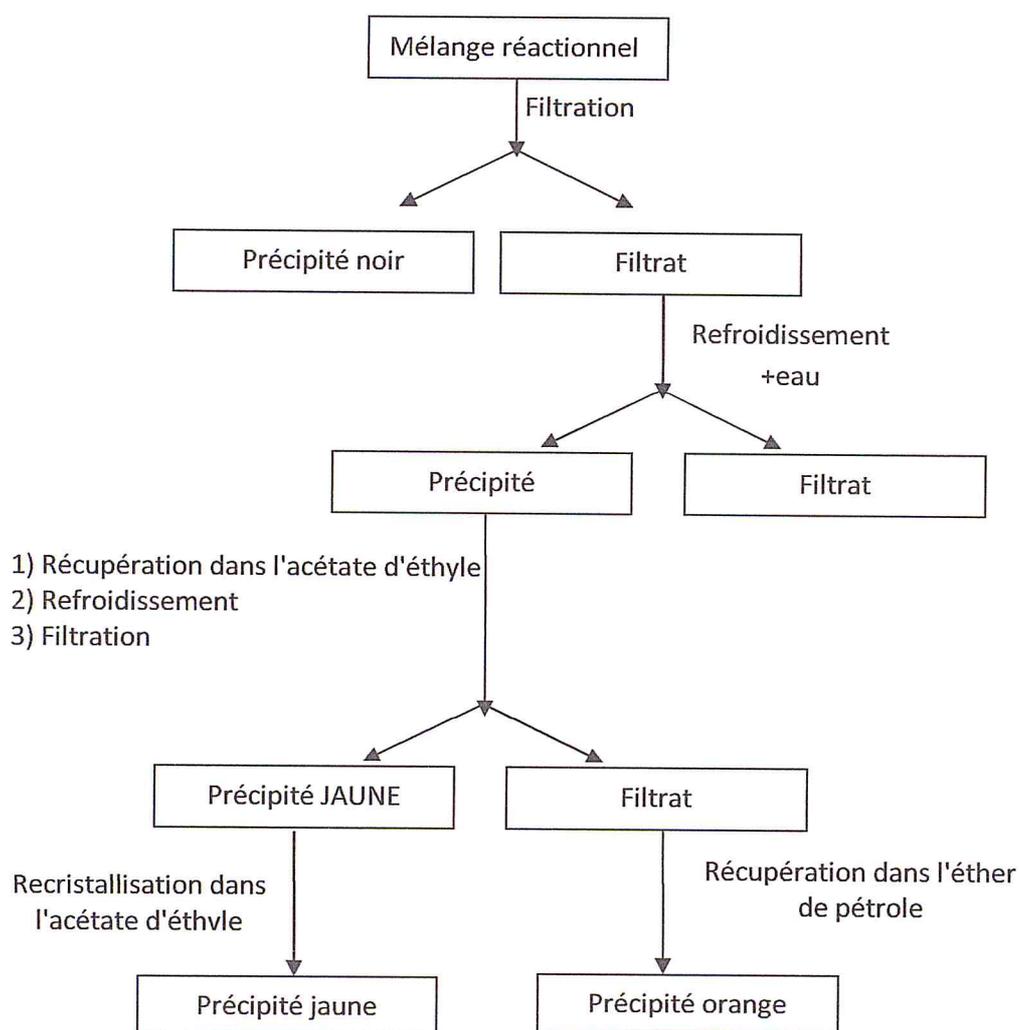
La série de nitrones est synthétisée par condensation des aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine. Cette synthèse a été réalisée selon le mode opératoire général suivant :

A une solution d'aldéhyde approprié dans l'éthanol (50 ml), on ajoute une solution de β -phénylhydroxylamine dans l'éthanol (50 ml). On maintient ce mélange sous agitation à température ambiante pendant 6 h. On laisse décanter à température ambiante. On filtre et on récupère un composé solide [53]. Le tableau (2) rassemble les quantités des réactifs utilisés et des produits obtenus :

Tableau (2): Quantités de réactifs utilisés et de nitrones obtenues en grammes et en moles et rendements de réaction.

Nitronne	Mélange réactionnel	Quantité utilisée (g)	Nombre de moles	Rdt (%)
I	β -phénylhydroxylamine	2	0,018	68
	Benzaldéhyde	1,91	0,018	
II	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	67
	Vanilline	4,1	0,026	
III	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	65
	Isovanilline	4,1	0,026	
IV	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	9
	Syringaldehyde	4,9	0,027	
V	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	25
	3,4-dihydroxybenzaldihyde	3,72	0,027	
VI	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	7
	Isophthalate	2,41	0,018	
VII	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	6
	4-hydroxyle Isophthalate	0,8	0,005	
VIII	β -phénylhydroxylamine	3	0,027	5
	Bis-vanilline	8,31	0,027	

Ces nitrones sont recristallisés dans l'acétate d'éthyle. On obtient des nitrones attendues sous forme de cristaux ou de poudre. L'analyse par CCM des mononitrones a donné un spot ce qui prouve initialement leur pureté. L'analyse des bisnitrones a donné plus d'un spot, cela nous a poussés à faire une séparation par solvant selon l'organigramme suivant :



Figure(20) : Organigramme de séparation par solvant

II.3 Purification et séparation par chromatographie flash

Les nitrones qui ont montré plus d'un spot lors de l'analyse par CCM ont été soumis à une séparation par chromatographie flash.

II.3.1 Choix de l'éluant

La première étape de ce travail est de trouver la phase mobile qui donne un R_f entre 0,2 et 0,3. En suite on a préparé 400 ml de cet éluant (Tableau 3).

Tableau(3) : Solvants de solubilisation et d'élution en chromatographie flash et CCM.

Nitrones	Solvant de solubilisation	Eluant pour chromatographie flash	Eluant pour CCM
IV	CH ₂ Cl ₂	99% éther de pétrole 1% acétate d'éthyle	95% éther de pétrole 5% acétate d'éthyle
VI	CH ₂ Cl ₂	70% éther de pétrole 30% acétate d'éthyle	65% éther de pétrole 35% acétate d'éthyle
VIII	DMSO	93% dichlorométhane 7% méthanol	93% dichlorométhane 7% méthanol

II.3.2 Remplissage de la colonne

- On a pesé dans erlenmeyer 30g de gel de silice et on ajoute la phase mobile pour l'élution.
- À l'aide d'un entonnoir, on a versé ce mélange régulièrement, en ouvrant légèrement le robinet de la colonne.
- le liquide s'écoulant goutte à goutte entraîne la silice qui se répartit régulièrement.
- à la fin de l'opération le niveau supérieur de la silice doit être bien horizontal (**Figure 21**).
- au cours de la manipulation, la silice doit être toujours imprégnée de solvant sinon il se produit des fissures dans la colonne, les zones d'adsorption se décalent et la séparation n'est plus aussi nette.

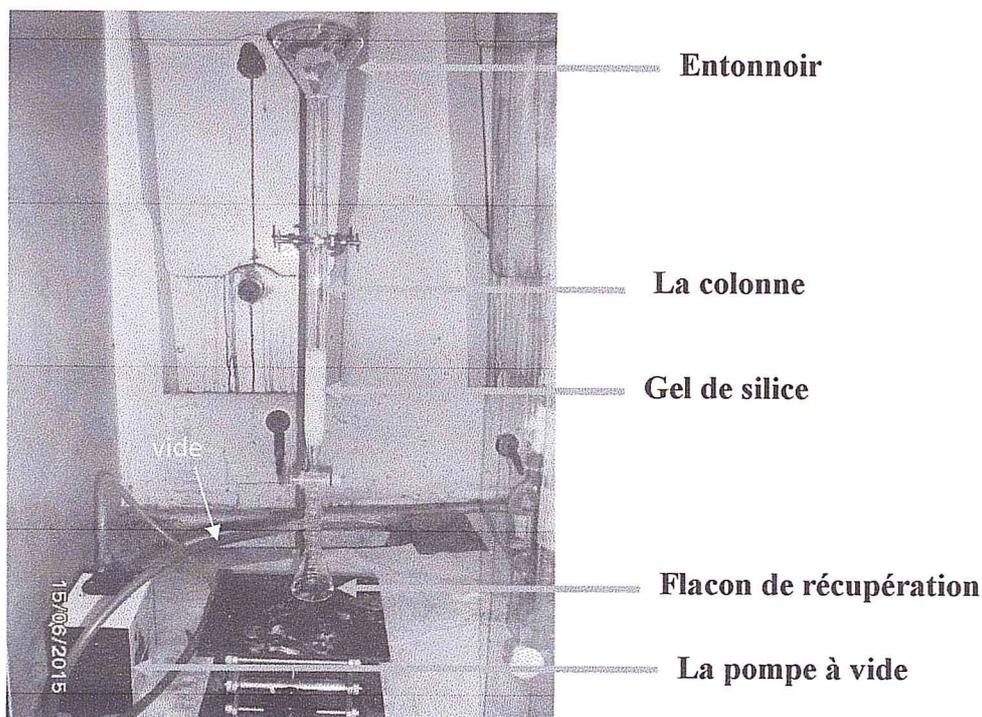


Figure (21) : dispositif de la chromatographie flash

II.3.3 Déposition de l'échantillon

L'échantillon brut à séparer (200 mg) a été dissout dans environ 2 ml de solvant. Le mélange a été introduit très délicatement à l'aide d'une pipette de Pasteur de façon homogène sur les bords de la colonne (Figure 22), le plus bas possible (la solution contenant le mélange doit être régulièrement répartie sur la surface de la silice) Quand le produit est en tête de colonne, le robinet doit être fermé pour éviter le séchage de la colonne pendant qu'on rince le flacon ayant contenu l'échantillon).

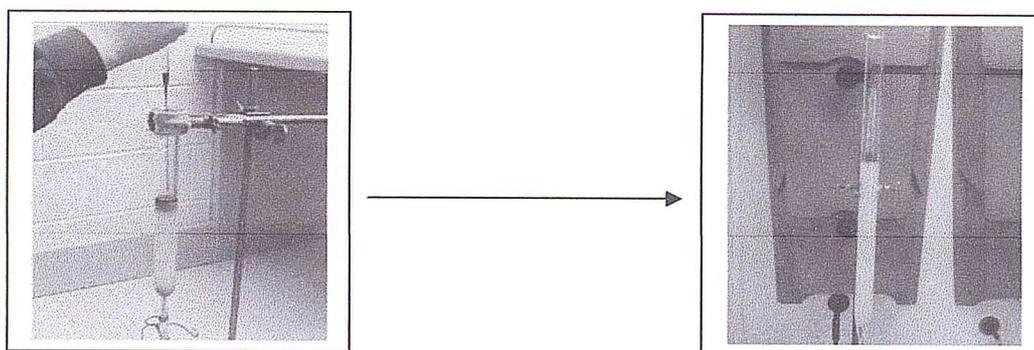


Figure (22) : Déposition de l'échantillon sur la colonne

II.3.4 La séparation

La séparation des produits est obtenue par l'écoulement continu de la phase mobile à travers la colonne en récupérant des fractions de 1 cm³ dans des tubes à essais. Les fractions récupérées ont été posées sous hôte pour éliminer le solvant. L'analyse par CCM nous a permis de déterminer les fractions qui se ressemblent.

II.4 Pouvoir antioxydant des nitrones phénoliques

Le pouvoir antioxydant de notre nitrone a été testé par trois méthodes : la méthode de piégeage du radical libre 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), la méthode de blanchissement de la β -carotène et la méthode de réduction de fer ferrique (FRAP).

II.4.1 La méthode de piégeage du radical DPPH

La mesure de l'activité antiradicalaire a été testée selon la méthode de BLOIS [54]. Le radical libre DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est solubilisé dans l'éthanol absolu à une concentration de 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol. Les solutions de nitrone de concentration de 5 mmol/L ont été fraîchement préparées. En parallèle, des solutions des antioxydants de synthèse : hydroxytoluène butylé (BHT) et hydroxyanisole butyle (BHA) ont été préparées avec la même concentration que les nitrones.

Dans des tubes secs, on introduit un volume de 200 μ l des solutions à tester et on complète à 1 ml avec de l'éthanol, on ajoute 1 ml de la solution DPPH, après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante (25°C) pendant 30 min. Le test est répété 4 fois. La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml.

L'activité est mesurée par la relation suivante :

$$\% \text{ activité} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{control}} * 100$$

Soit :

Abs_{control} : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution éthanol + DPPH.

Abs_{test} : Absorbance à 517 nm de l'échantillon

II.4.2 La méthode FRAP (Ferrie reducing antioxidant power)

Ce test a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu [55]. Dans un tube à essais contenant 100 μ l de solution mère des nitrones synthétisées à 5mmol/L dilué dans l'éthanol sont mélangés avec 1,25 ml de solution tampon phosphate (0,2M ; PH=6,6) et 1,25 ml d'héxacyano ferrate de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] à 1%. Les mélanges est chauffé à 50C° au bain marie pendant 30min .Un volume de 1,25ml de TCA (10%) est ensuite ajouté. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. Enfin 1,25 ml du surnageant ont été mélangés avec 1ml d'eau distillée et 0,2 ml de $FeCl_3$ (0,1%).L'absorbance est mesurée à 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions, le lecteur est mesuré à 700nm, le BHT et BHA est utilisé pour le contrôle positif. Le protocole de la méthode FRAP est schématisé dans la **figure(23)**.

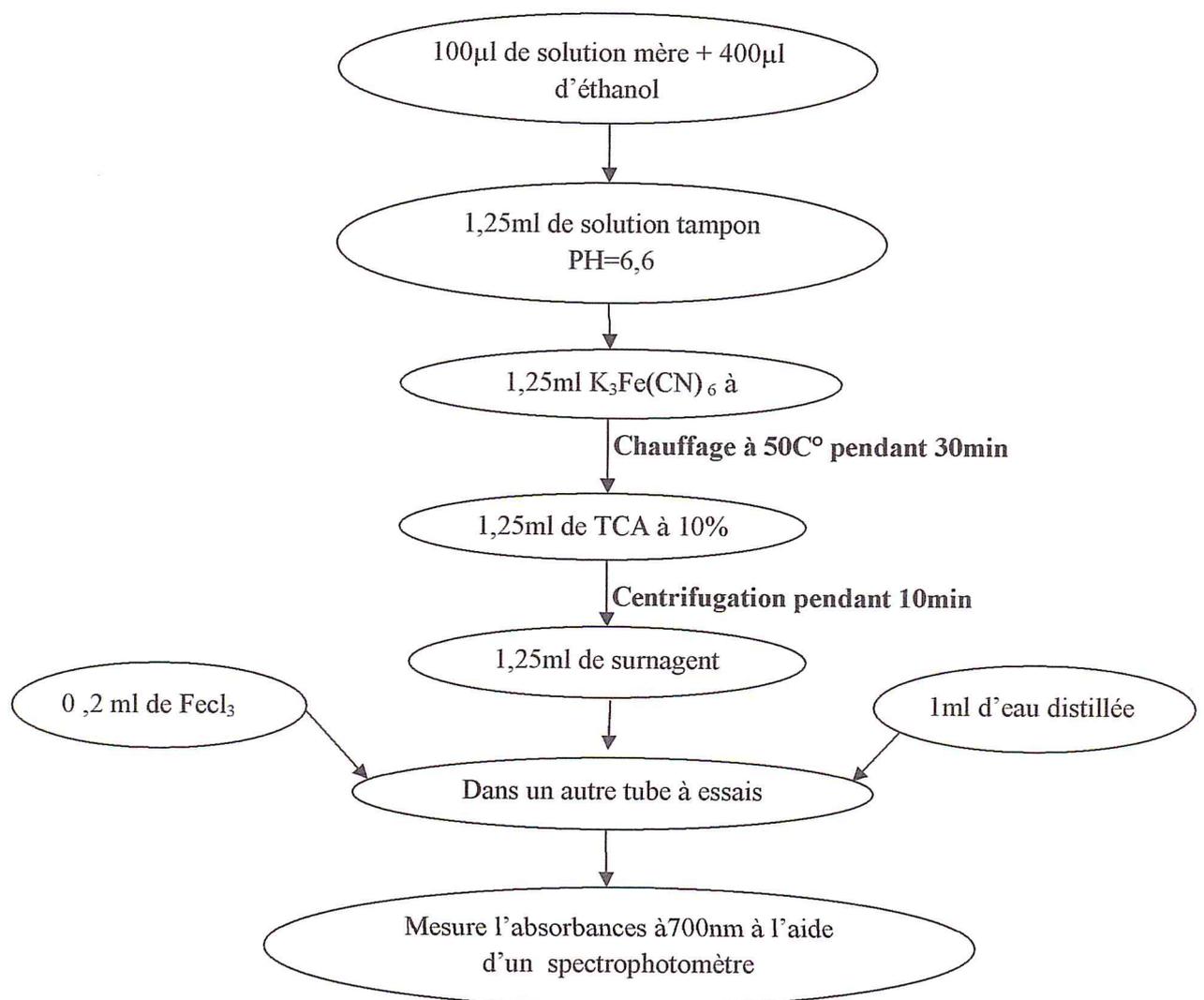


Figure (23) : Organigramme de la méthode FRAP

II.4.3 Méthode de blanchiment de la β -carotène

La méthode décrite par Tepe et ces collaborateurs [56] a été employée. Une émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1ml de chloroforme, ensuite 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé par évaporateur rotative et 100 ml d'eau sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

À 2,5 ml du mélange précédent, 350 μ l de chaque solution de nitrones synthétisées (à une concentration de 5mmol/ml dans l'éthanol), trois répétitions ont été effectuées pour chaque solution de nitrone. Les mélanges ont été incubés en obscurité et chauffé à 50C° au bain marie pendant 2h. Des contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure, en remplaçant les solutions de nitrones par des solutions des antioxydants de référence BHT, BHA (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l d'éthanol. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490nm à des intervalles de temps réguliers pendant 2heures. L'activité antioxydant relative des extraits (AAR) est calculée après 2 heures selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}2\text{h} (\text{échantillon}) / \text{Abs}2\text{h} (\text{BHT})] \times 100.$$

Où :

AAR : activité antioxydant relative ;

Abs 2h (échantillon): absorbance de l'échantillon après 2 heures ;

Abs 2h (BHT): absorbance du BHT après 2 heures.

Le protocole de la méthode blanchiment de la β -carotène est schématisé dans la **figure (24)**.

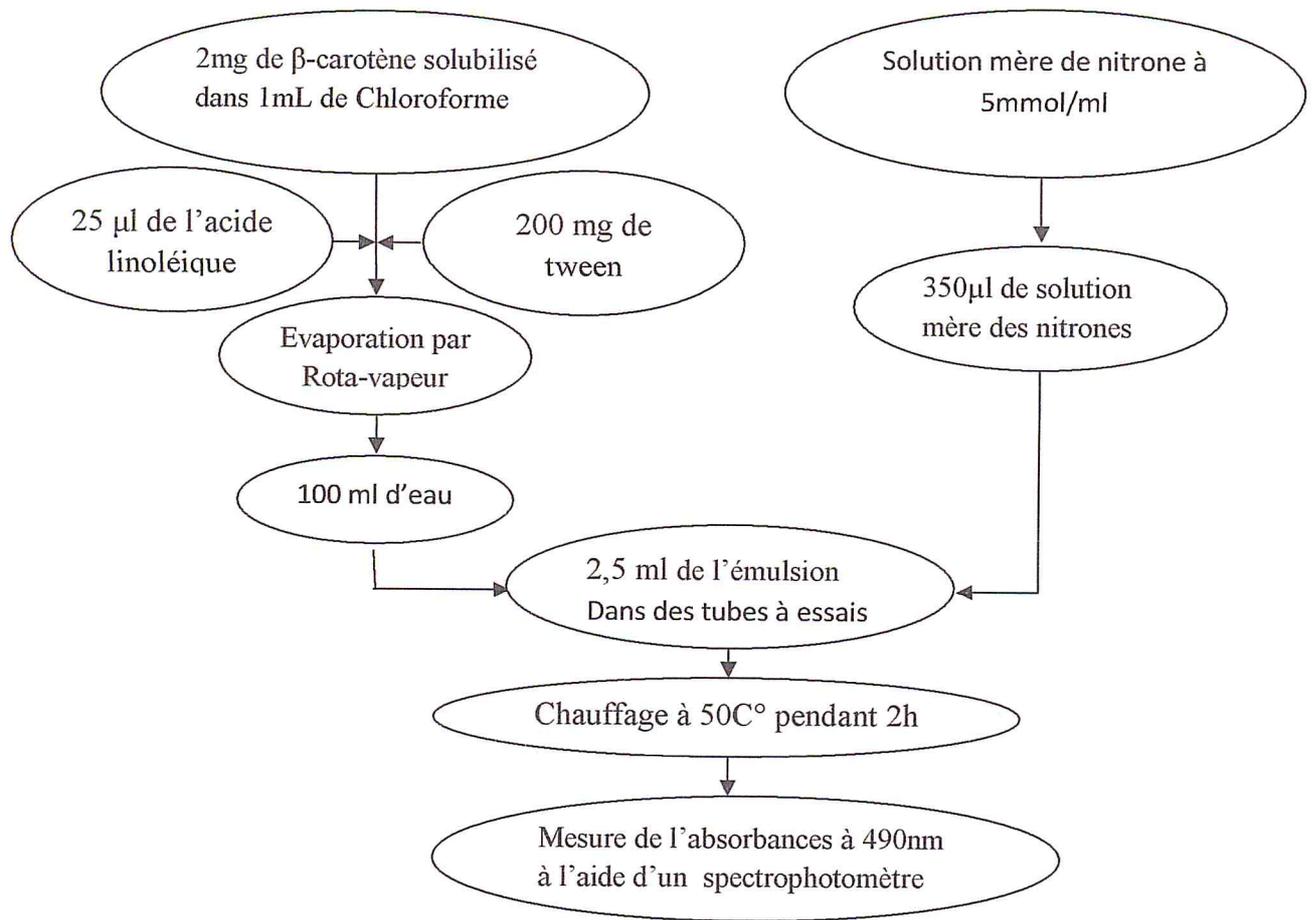


Figure (24) : Organigramme de la méthode blanchiment de la β -carotène

Résultats et discussions

Chapitre III
Synthèse et
caractérisation des
nitrones

Il est bien connu que les produits phénoliques possèdent une très bonne activité antioxydante. D'autre part, comme on la bien décrit dans la partie théorique, les nitrones sont des agents antioxydants et thérapeutique intéressants. Pour relier entre le pouvoir de ces deux fonctions, nous avons synthétisé des nitrones phénoliques. D'autre part, et dans le but de promouvoir ce pouvoir nous avons préparé des bisnitrones phénolique. La synthèse de ces nitrones passe par la préparation de la β -phénylhydroxylamine.

III.1 Préparation des nitrones

La série des nitrones phénoliques préparés est obtenue par condensation de la β -phénylhydroxylamine sur des aldéhydes correspondants [51].

III.1.1 Synthèse de la β -phénylhydroxylamine

La β -phénylhydroxylamine est un réactif très instable car, elle s'oxyde par un simple contact avec l'air [57]. Cette dernière est préparée par réduction du nitrobenzène avec du Zinc en poudre en présence du chlorure d'ammonium [58].

La réaction chimique de la synthèse de la β -phénylhydroxylamine peut être décrite par la figure (25).

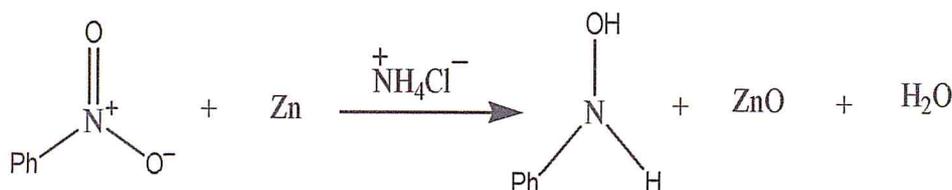


Figure (25) : synthèse de la β -phénylhydroxylamine

Les caractéristiques physiques de la β -phénylhydroxylamine sont regroupées dans le tableau(4).

Tableau (4) : Caractéristiques physiques et rendement de la β -phénylhydroxylamine.

Aspect et couleur	Rdt (%)	R _f *	P _f (°C)
Cristaux blancs	57	0,52	82

* : CCM sur plaque de silice, éluant: diéthyléther - éther de pétrole (50/50%) (V/V)

III.1.2 Synthèse et caractérisation de la bis-vanilline

Dans le but de préparer ces nitrones bis fonctionnelles à base de produit naturel (vanilline) nous avons passé à dimériser cette dernière. La bisvanilline (5,5'-bisvanilline ou 6,6'-dihydroxy-5,5'-diméthoxybiphényl-3,3'dicarbaldéhyde) est synthétisée par couplage oxydant. Ainsi, l'utilisation du persulfate de sodium en présence d'une quantité catalytique de sulfate de fer en milieu aqueux, permet de dimériser la vanilline en position ortho par rapport à l'hydroxyle phénolique. La vanilline est mise en réaction dans l'eau puis chauffée à 50 °C pendant 5 jours [52]. Le mécanisme de cette réaction est proposé dans la figure (26) suivante :

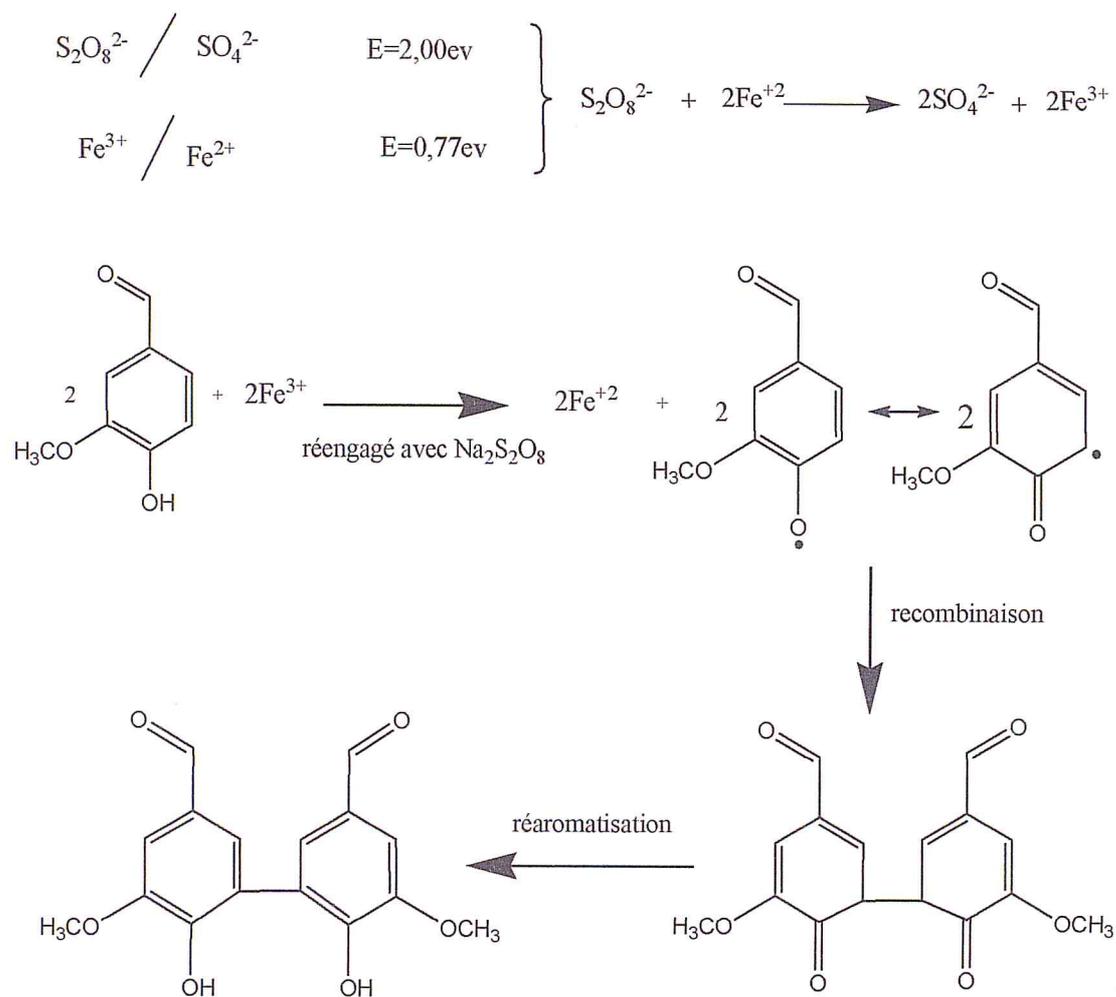
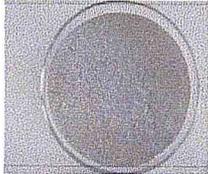


Figure (26) : Mécanisme du couplage oxydant par le fer [59]

Les caractéristiques de la bisvanilline sont regroupées dans le **tableau (5)**.

Tableau (5) : Caractéristiques physiques et spectrales et rendement de la bisvanilline.

Aspect et couleur	Formule brute	Rdt (%)	R _f *	P _f (°C)	λ _{max} (nm)	ε _{max}
Poudre marron clair 	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	85	0,4	297	λ = 303	14300 mol ⁻¹ . L. cm ⁻¹ .

* : CCM sur plaque de silice, éluant: éther de pétrole -diéthyléther (60/40%) (V/V)

IV.1.2.1 Caractérisation spectroscopique de la bis-vanilline

A-Spectre FTIR :

Le spectre IR de la bisvanilline dans KBr est représenté sur la figure (27). Les principales bandes de vibration sont regroupées dans le tableau (6) : On observe une large bande à 3281 cm⁻¹ correspondant à la vibration d'élongation de la liaison OH. La bande à 3020 cm⁻² est due aux vibrations d'élongation de la liaison C-H de cycle aromatique. Les deux bandes à 2941 et 2967 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations d'élongation de la liaison C-H de groupement aldéhyde. A 1674cm⁻¹ on observe une bande correspondant à la vibration d'élongation de la liaison C=O de groupement aldéhyde, ainsi que les bandes 1586 et 1456cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations d'élongation de la liaison C=C de noyau aromatique. La bande caractéristique à 1488 cm⁻¹ est due à la vibration de déformation de la liaison C-C du cycle aromatique. La bande à 1258cm⁻¹ correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-OCH₃.

Tableau (6) : Principales bandes IR de bisvanilline synthétisées.

Bis aldéhyde	Fréquence d'absorption (cm ⁻¹)						
	v (OH)	v(C-H) arom	v(C-H) de gpt aldéhyde	v(C=O)	v(C=C) arom	C-C arom	v(C- OCH ₃)
Bis- vanilline	3281	3020	2941-2967	1674	1586-1456	1488	1258

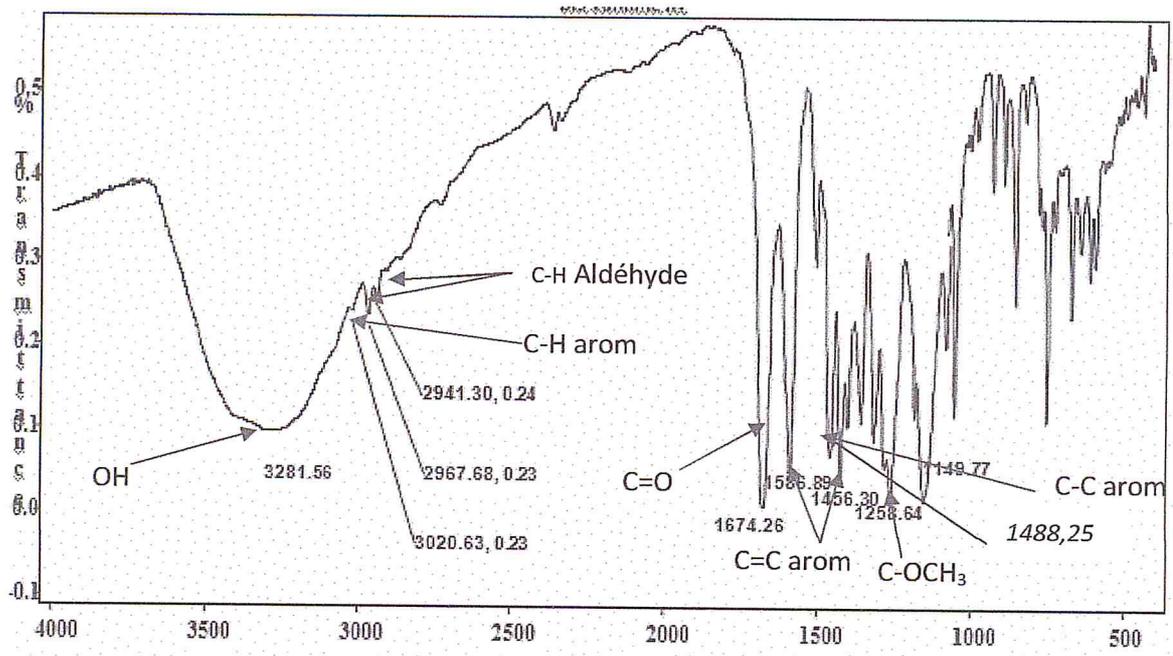


Figure (27) : Spectre IR en pastille de KBr de bisvanilline.

III.1.3 Condensation des aldéhydes sur la β - phényl hydroxylamine

Cette condensation se fait en solubilisant les deux réactifs dans l'éthanol absolu à température ambiante (Figure 28). Ainsi, nous avons obtenu une série de nitrones (tableau 7).

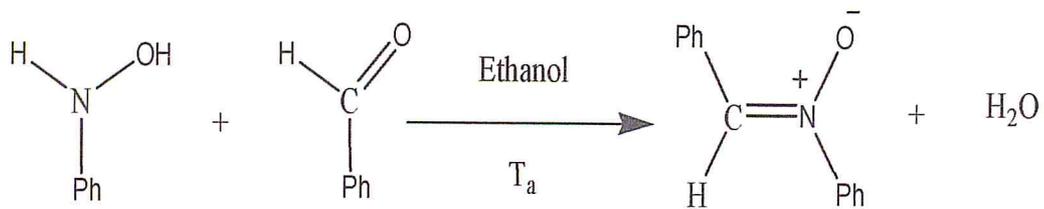


Figure (28) : Condensation des aldéhydes sur la β - phényl hydroxylamine.

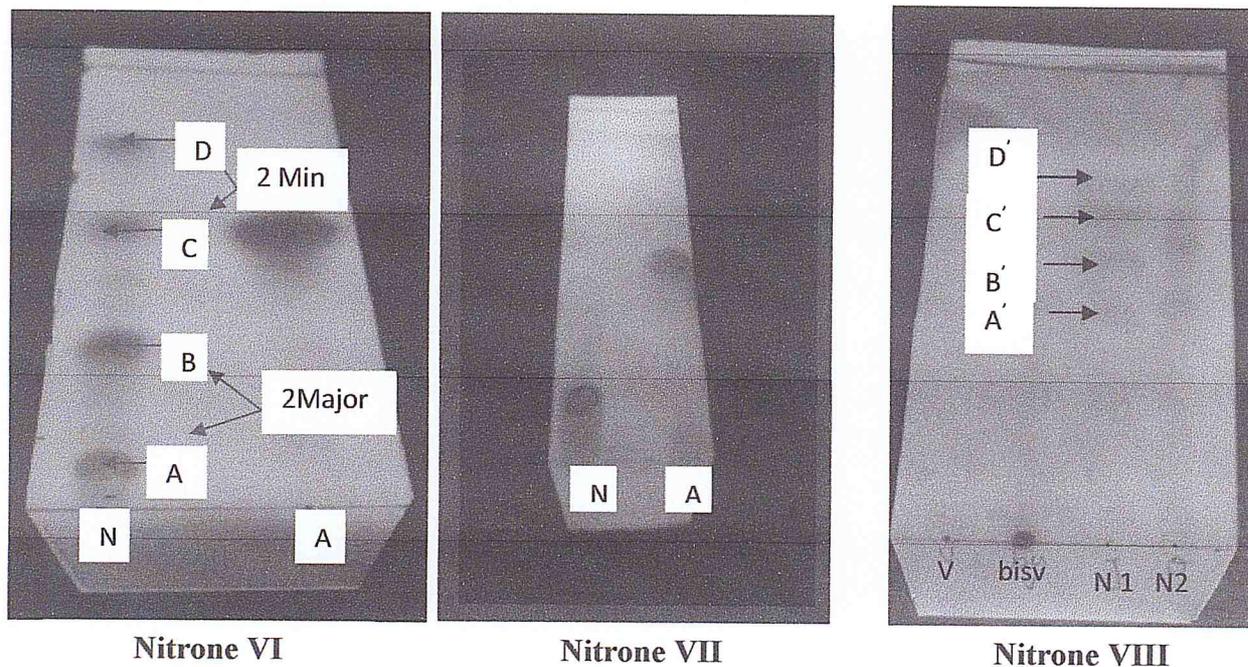
Tableau (7) : Nomenclatures et structures des mononitrones et bisnitrones synthétisées.

	nitrones	Ar	Nom systématique	Structure
<i>mononitrones</i>	I	Phényl	C, N-diphényl nitrone	
	II	3-méthoxy-4-hydroxy phényl	C-3-méthoxy-4-hydroxy phényl, N-phénylnitronne	
	III	3-hydroxy-4-méthoxy phényl	C-3-hydroxy -4-méthoxy phényl, N-phénylnitronne	
	IV	3,5-diméthoxy, 4-hydroxy phényl	C-4-hydroxy-3,5-diméthoxy phényl, N-phénylnitronne	
	V	3,4-dihydroxy Phényl	C-3,4-dihydroxy phényl, N-phényl nitronne	
<i>Bis nitrones</i>	VI	Phényl	bis (C-phényl, N-diphényle nitronne)	
	VII	4-hydroxy phényl	bis (C-4-hydroxy phényl, N-diphényl nitronne)	
	VIII	3-méthoxy, 4-hydroxy phényl	bis(C-3-méthoxy, 4-hydroxy phényl, N phényl nitronne)	

Tableau (8) : Aspects, Formule brute, rendements (Rdt), points de fusion (P_f), rapport frontaux (R_f) des nitrones synthétisées.

nitrone		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Formule brute		$C_{13}H_{11}ON$	$C_{14}H_{13}O_3N$	$C_{14}H_{13}O_3N$	$C_{15}H_{15}O_4N$	$C_{13}H_{11}O_3N$	$C_{20}H_{16}O_2N_2$	$C_{20}H_{16}O_3N_2$	$C_{28}H_{24}O_6N_2$
Aspect		cristaux blancs	Poudre Jaune	Cristaux jaunâtre	Cristaux jaune	Poudre Jaune	Poudre jaunâtre	Poudre jaune orange	Mélange orange
Rdt (%)		68	67	65	9	25	7	6	5 - 3
P_f (°C)		125	218	232	38	201,4		141,8	
CC M	R_f *	0,31	0.39		0,9	0,2	A=0,05 B=0.27 C=0.52 D=0,74	0,1	A=0,35 B=0,42 C=0,49 D=0,55
	Eluant : (V/V)	* (75/25)	** (25/75)		** (75/25)	* (60/40)	*** (65/35)	* (60/40)	* (60/40)

* : Éther de pétrole/ Diéthyl éther ** : Acétate d'éthyle/Heptane *** : éther de pétrole-Acétate d'éthyle



Figure(29) : Les plaques CCM des bisnitrones
 N : Nitrone ; A : Aldéhyde ; V : vanilline aldéhyde ; bisv : bisvanilline aldéhyde
 N1 : Nitrone jaune N2 : Nitrone orange

Les résultats du tableau n° 8 montrent que les rendements des bisnitrones sont très faibles. D'autre part, on remarque que les nitrones VI et VIII présentent plusieurs spots lors de l'analyse par CCM. Cela nous a incités à faire des séparations par chromatographie flash.

III.1.4 Purification et séparation par chromatographie flash

Afin de séparer les différents isomères des nitrones VI et VIII, nous avons utilisé la chromatographie flash. Cette dernière est une technique utilisée pour purifier un échantillon brut. C'est une technique de séparation qui est très appréciée car elle est simple, rapide et peu coûteuse (notamment en comparaison avec l' HPLC).

La particularité de la Flash chromatographie est qu'elle est basée sur l'interaction entre les composés que l'on souhaite séparer, la phase stationnaire et la phase mobile. La pression nécessaire est faible (moins de 320 psi) comparé à l'HPLC où elle est supérieure à 1000 psi. Le but est, à partir d'un échantillon brut, d'isoler et d'obtenir des composés purs. La séparation des composés d'un échantillon brut se base sur les différentes affinités des espèces contenues dans l'échantillon avec la phase mobile et la phase stationnaire. Ces différentes affinités et interactions vont engendrer des migrations qui vont différer selon les espèces en présence.

La séparation n'est possible que si tous les composés ont des propriétés d'adsorption et désorption différentes avec la phase mobile et la phase stationnaire [60].

L'analyse par CCM de la nitroène IV après recristallisation a révélé un seul spot. Ce qui nous laisse penser que la réaction a eu bien lieu. Seulement, cette nitroène présente l'inconvénient d'être très oxydable. La purification par recristallisation ne donne pas de bons résultats. La séparation de la nitroène IV par chromatographie flash en utilisant la phase mobile 99%-1% (éther de pétrole-acétate d'éthyle) nous a permis de récupérer cette dernière pure.

Pour les nitrones VI et VIII, l'analyse des plaques CCM a révélé la présence de plusieurs spots. La séparation avec la phase mobile 70%-30% (éther de pétrole-acétate d'éthyle) 93%-7% (dichlorométhane-méthanol) respectivement nous a permis de récupérer les deux produits majoritaires de chacun à savoir (VI A, VI B) et (VIII A', VIII B').

III.1.5 Caractérisation spectroscopique des nitrones

Les nitrones synthétisées ont été caractérisées par différentes méthodes spectroscopiques (SM, IR, RMN ¹H et RMN ¹³C).

III.1.5.1 Etude par spectrophotométrie infrarouge

D'après la littérature, La bande N-O apparaît à 1100 cm^{-1} pour les aldonitrones. Elle est très intense et dans plusieurs cas, elle se présente sous forme de doublet [61]. Une étude des spectres IR d'une série des nitrone a montré que cette bande est sensible à la nature des substituants de C-phényle [62]. Il a été aussi rapporté que la bande C=N apparaît entre 1560 et 1620 cm^{-1} [3].

Dans le tableau (9), on donne les fréquences des principales bandes d'absorption en infrarouge des nitrones aromatiques synthétisées. Leurs spectres IR sont donnés dans les figures (30) et(31).

Tableau (9): Caractérisations spectrales en infrarouge des nitrones synthétisées

nitrone	Fréquence d'absorption (cm^{-1})			
	N→O	C=N	C-X	
I	1064,36	1543,92		
II	1153	1581	C-OH	3450
			C-OCH ₃	1292
III	1058,18	1600,85	C-OH	
			C-OCH ₃	1263,73
V	1134,2	1592.2	C-OH	3350
VII	1045,61	1580,62	C-OH	3424,32

D'après l'analyse FTIR, on note l'absence de la bande d'absorption située entre 1695 et 1715 cm^{-1} , due à l'élongation de la liaison C=O des aldéhydes, et l'apparition des pics entre 1560 et 1620 cm^{-1} , caractéristique de la liaison C=N. De plus, des bandes intenses entre 1070 et 1280 cm^{-1} sont attribuées à la liaison N-O.

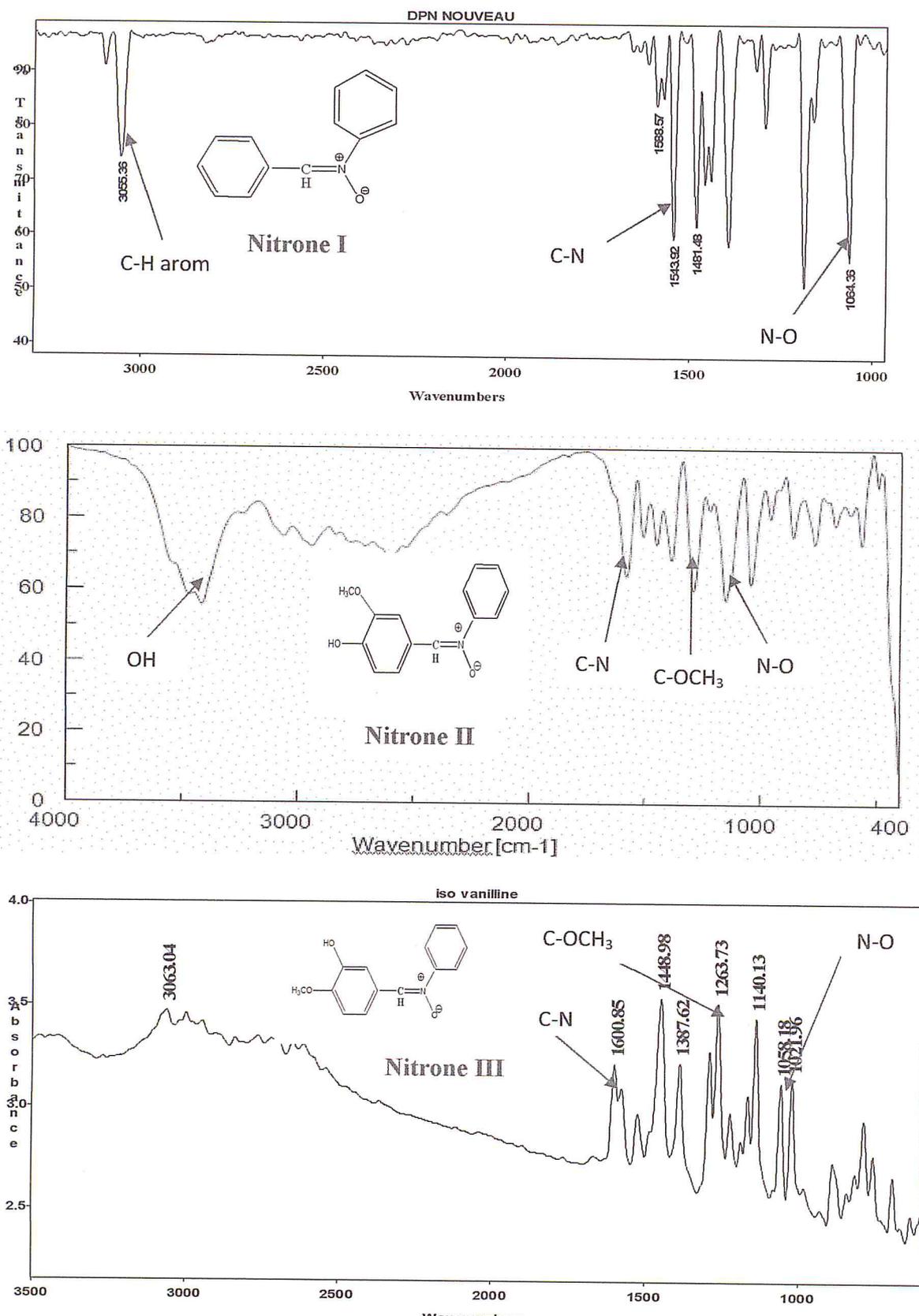


Figure (30) : Spectres IR en pastille de KBr des mononitrones I, II et III

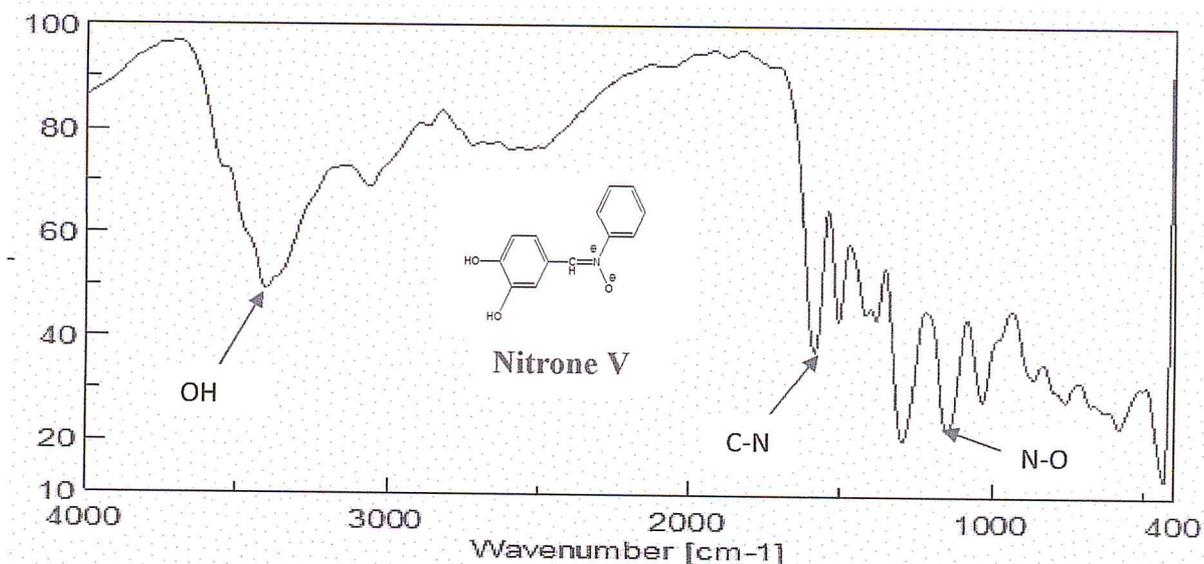


Figure (30) : Spectres IR en pastille de KBr de mononitron V

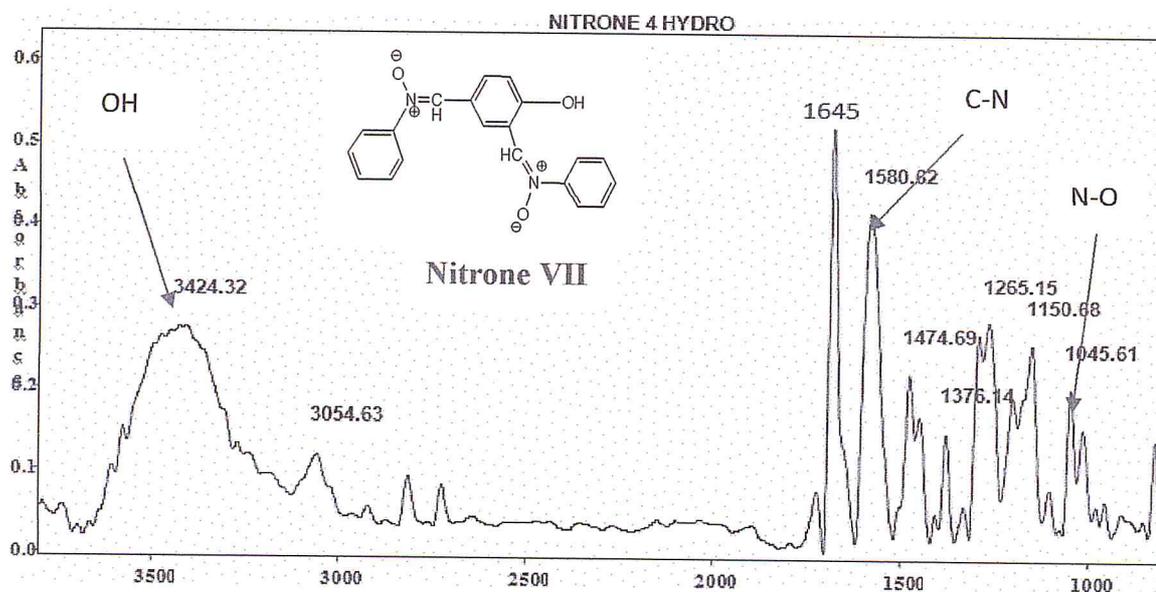


Figure (31) : Spectre IR en pastille de KBr de nitron VII (bisnitrones)

III.1.5.2 Spectroscopie de masse

La spectroscopie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines de la chimie appliquée [63].

La spectroscopie de masse des nitrones a été étudiée par différents auteurs [61]. Les fragmentations et réarrangements telles que la perte d'un groupement NO, d'un oxygène et la formation d'un ion acylium par la migration d'un oxygène sont très fréquentes [64]. Dans l'étude des spectres de masse en impact électronique des nitrones aromatiques synthétisées (II à VIII), nous avons identifié les pics moléculaires et pics de base des nitrones correspondantes comme le résume le **tableau (10)**. La présence de ces derniers confirme bien la formation des nitrones attendues.

Tableau (10) : Pics moléculaires et pics de base donnés par spectroscopie de masse en impact électronique des nitrones II à VIII.

Nitrones	Masse molaire théorique	Masse (M/Z)	
		Pic moléculaire	Pic de base
II	243	244	244
III	243	244	244
IV	273	274	199
V	229	230	230
VI	316 pour isomère A	317	317
	316 pour isomère B	317	226
VII	333	333	242
VIII	484 pour isomère A	485	485
	484 pour isomère B	485	394

Les spectres de masses des nitrones analysées sont donnés dans la figure (32) et (33).

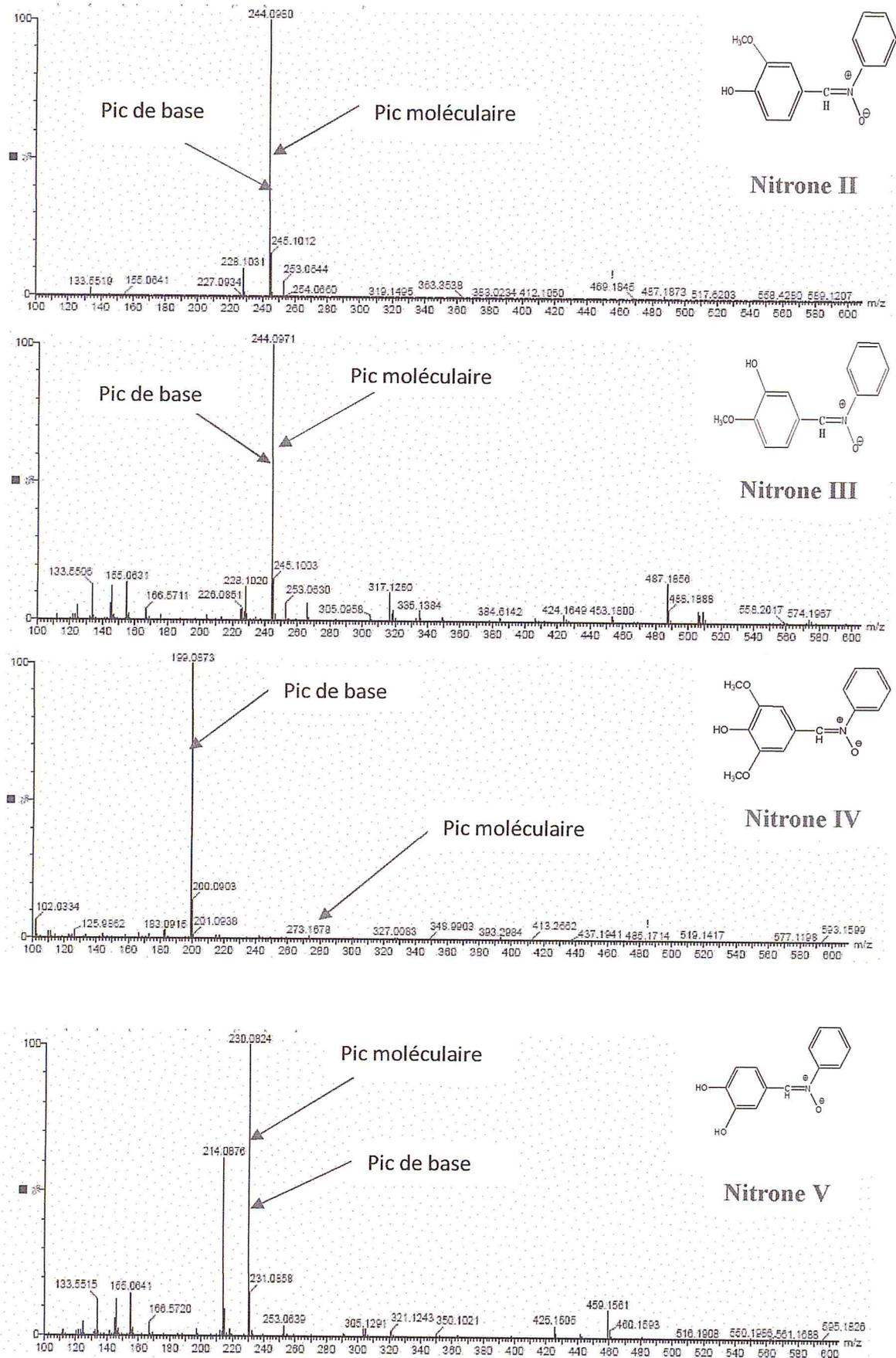


Figure (32) : Spectres de masse en impact électronique des mononitrones II à V

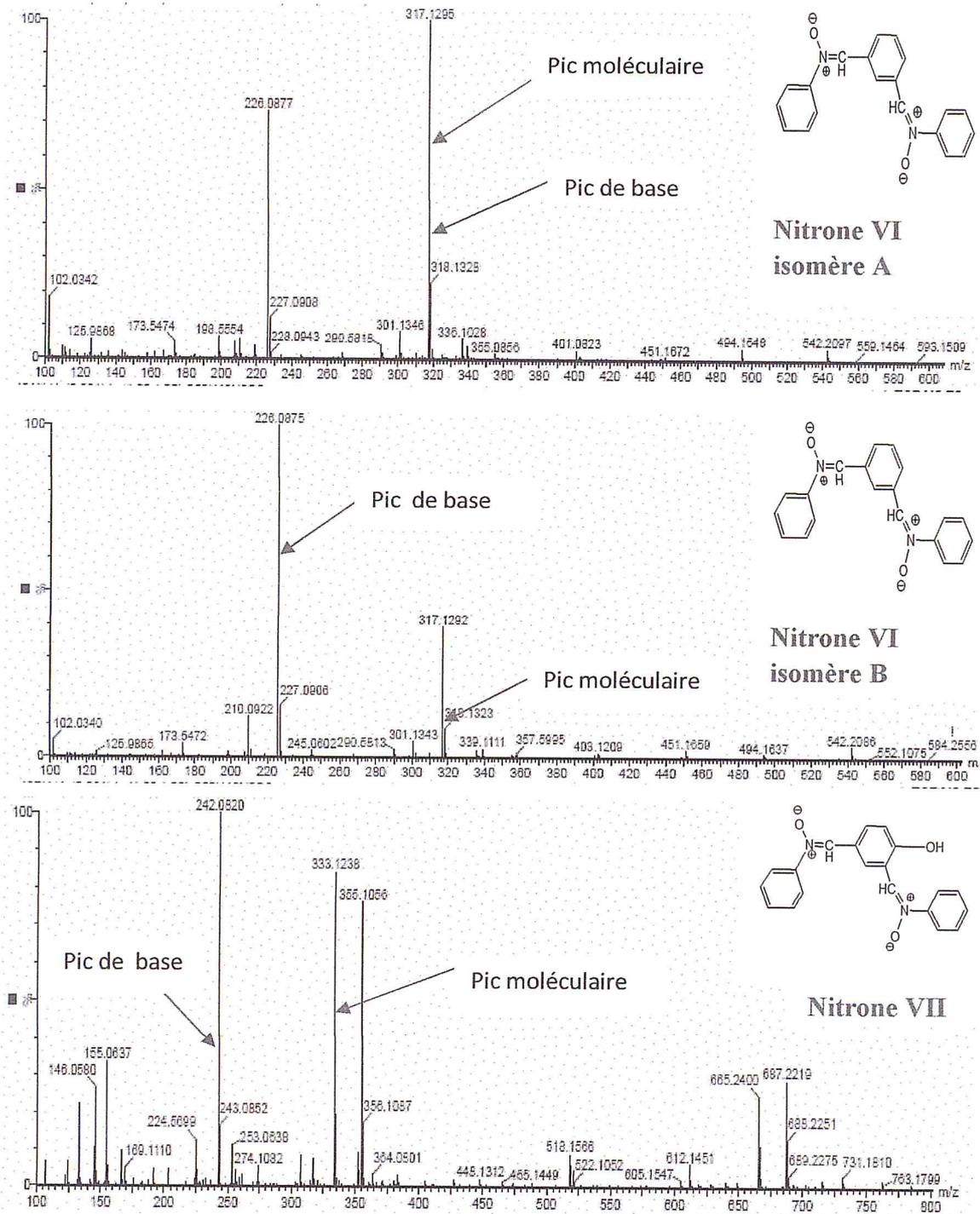


Figure (33) : Spectres de masse en impact électronique des bisnitrones VI à VII

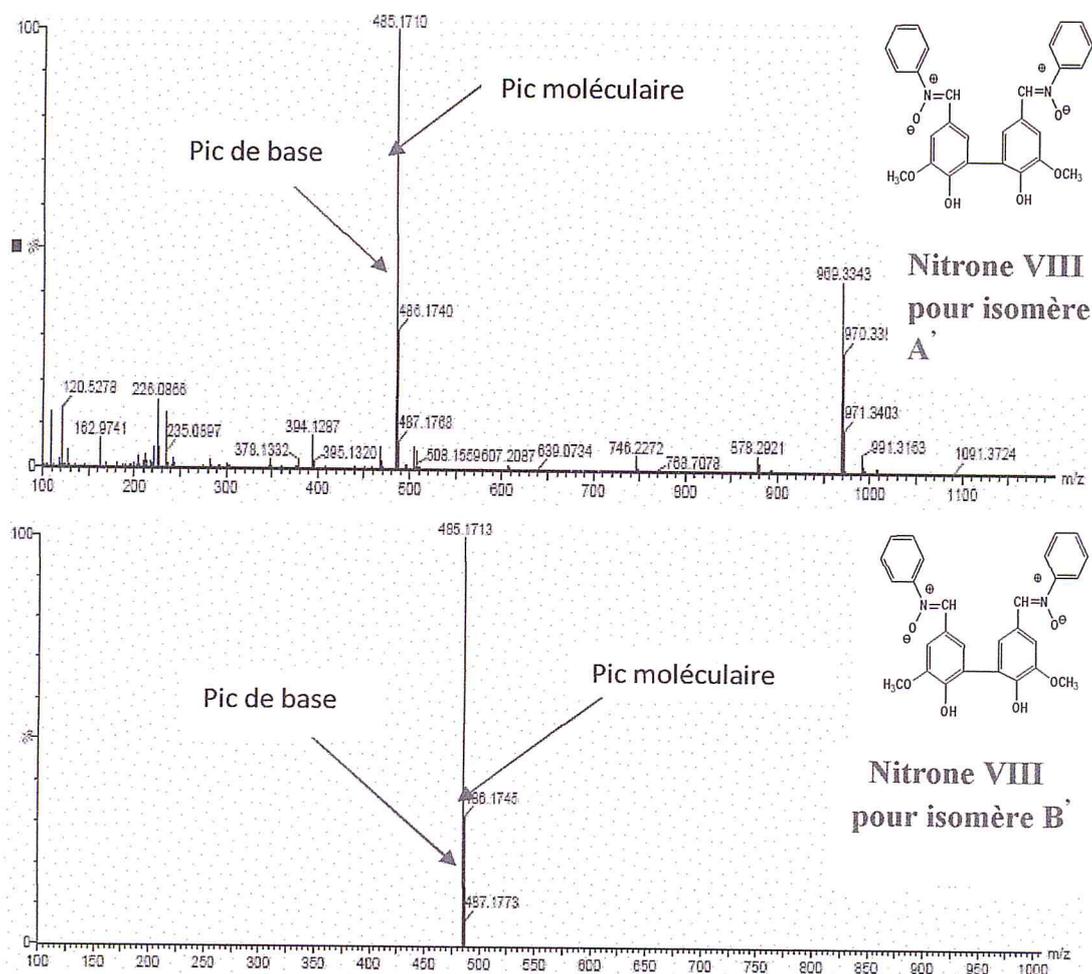
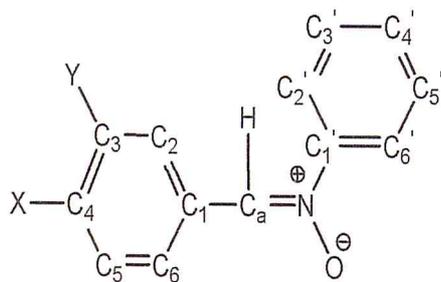


Figure (33) : Spectre de masse en impact électronique de bisnitron VIII

III.1.5.3 Etude en RMN ¹H

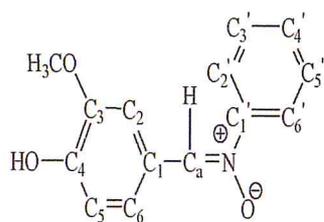
Les spectres RMN ¹H sont obtenus à 200 MHz (Bruker AC-200) pour les solutions de nitron dans le DMSO en utilisant le TMS comme référence interne. Les signaux des protons des mononitrones et bisnitrones sont attribués et donnés dans le tableau (11) et (12).

Tableau (11) : Caractéristiques spectrales en RMN ¹H des mononitrones synthétisées dans DMSO.

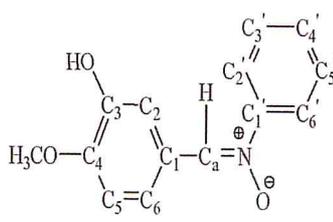


Nitronone	OH 1H S	H _a 1H, S	H-2 1H, S	H-5 H, d	H-6 H, d	H-2,6 2H, d	H-3', 4', 5' 3H, m	CH ₃ 3H, S
II	9,78	8,32	7,55	8,41	6,87	7,44	7,87	3,81
III	9,27	8,32	3,35	8,21	7,04	7,87	7,49	3,84
V	9,61- 9,27	8,24	3,35	7,84	6,81	7,64	7,49	/

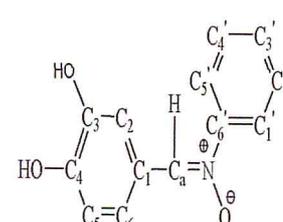
Les spectres RMN ¹H des mononitrones analysées sont donnés dans la figure (34).



Nitronne II



Nitronne III



Nitronne V

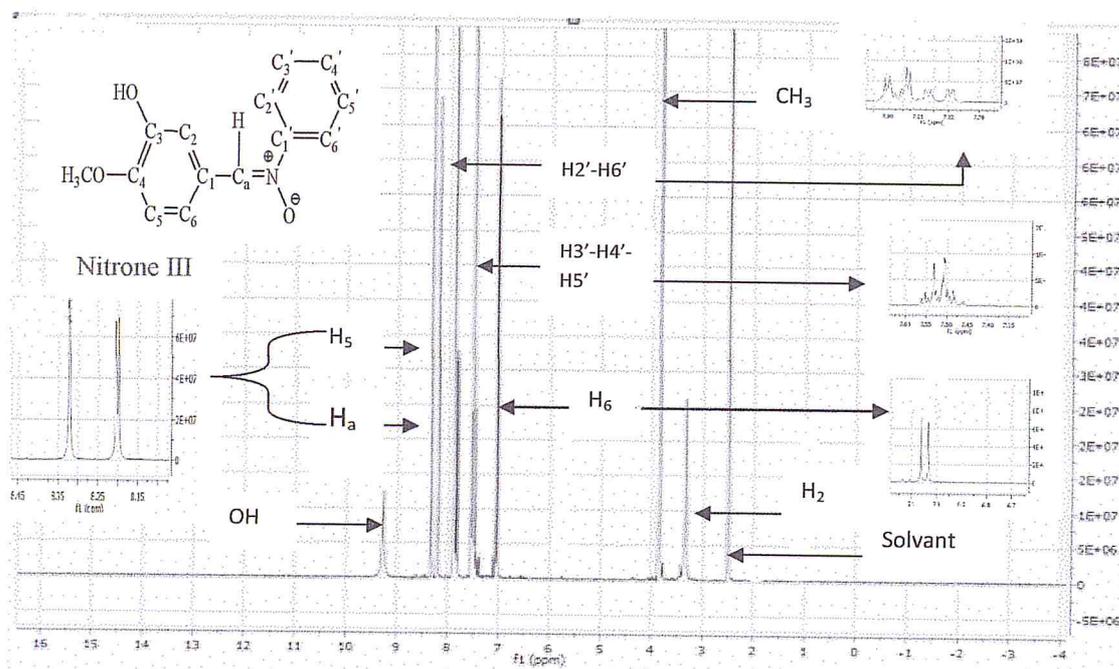
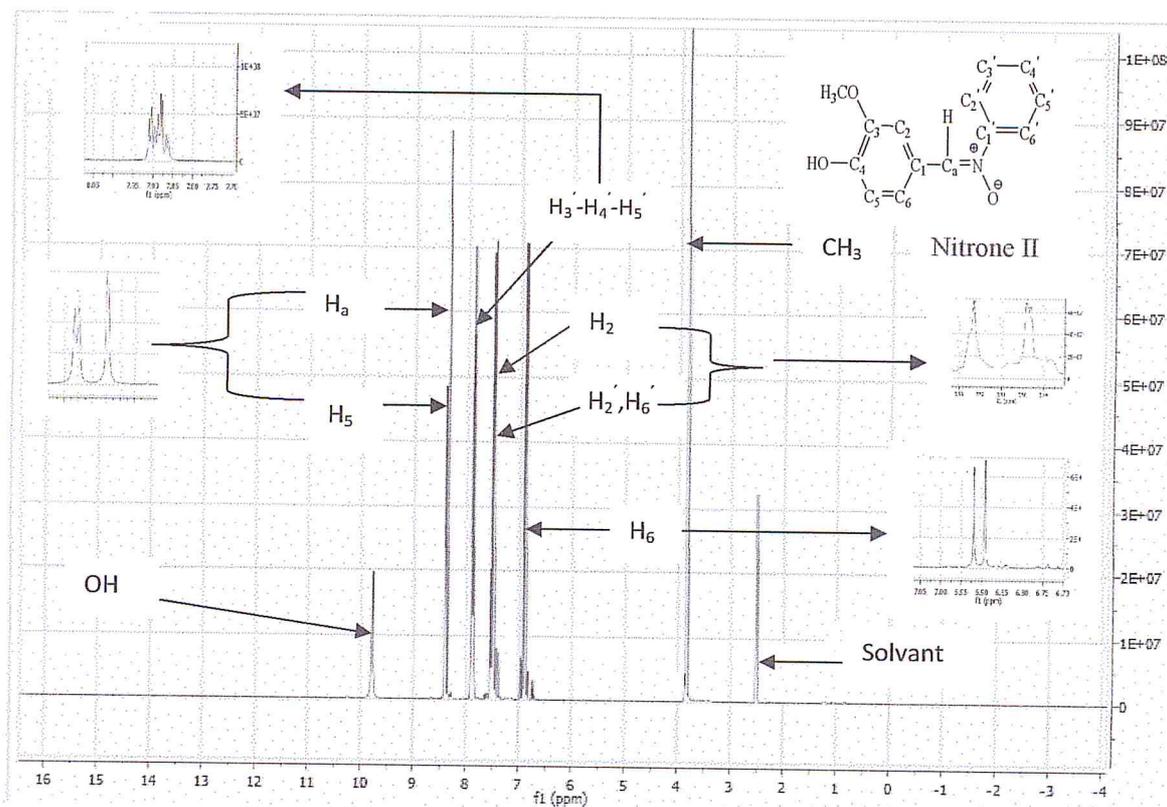


Figure (34) : Spectres RMN ¹H des nitrones II, III dans DMSO.

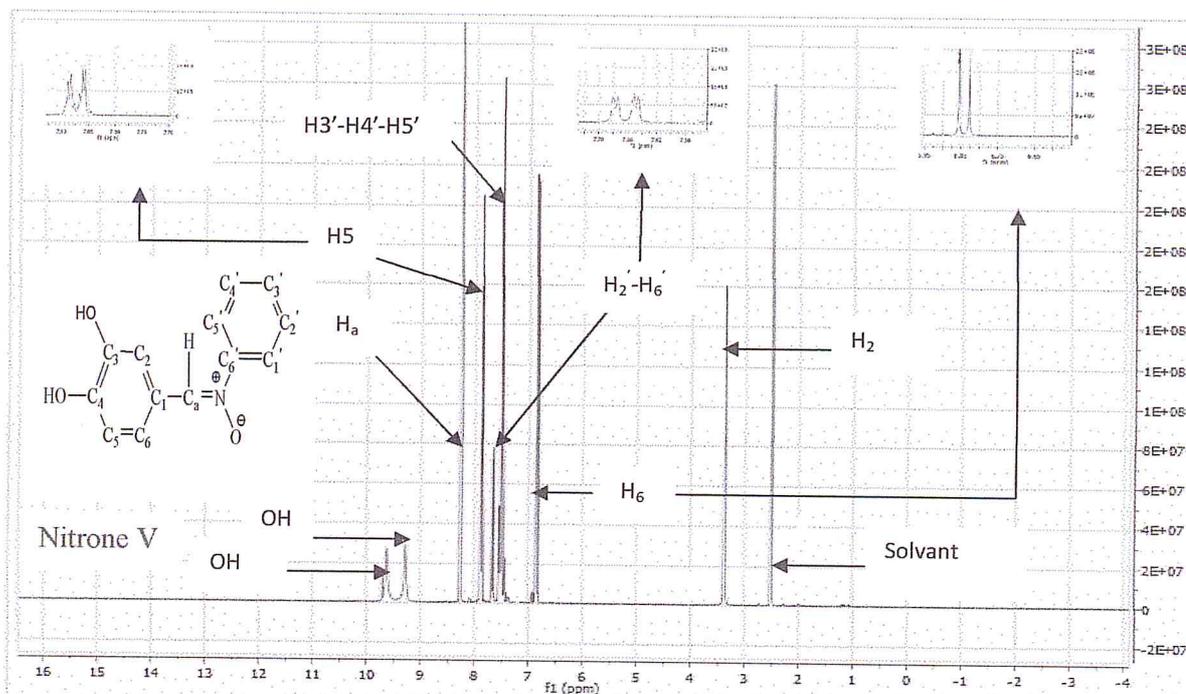
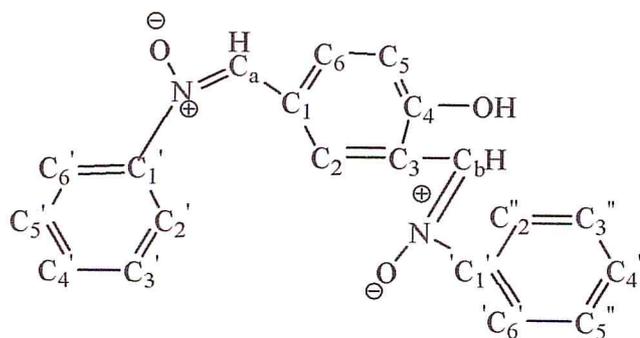


Figure (34) : Spectre RMN ¹H de nitron V dans DMSO.

Tableau (12) : Caractéristique spectrale en RMN ¹H de bisnitron VII synthétisée dans DMSO.



nitron	OH	H _a	H _b	H-2	H-5	H-6	H-2, 6, 2', 6'	H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5''
	1H, S	1H, S	1H, S	1H, S	1H, d	H, d	4H, d	6H, m
VII	13,7	8,81	9,84	3,33	8,61	7,07	7,95	7,59

Le spectre RMN ¹H de nitron VII (bisnitron) analysées est donné dans la figure (35).

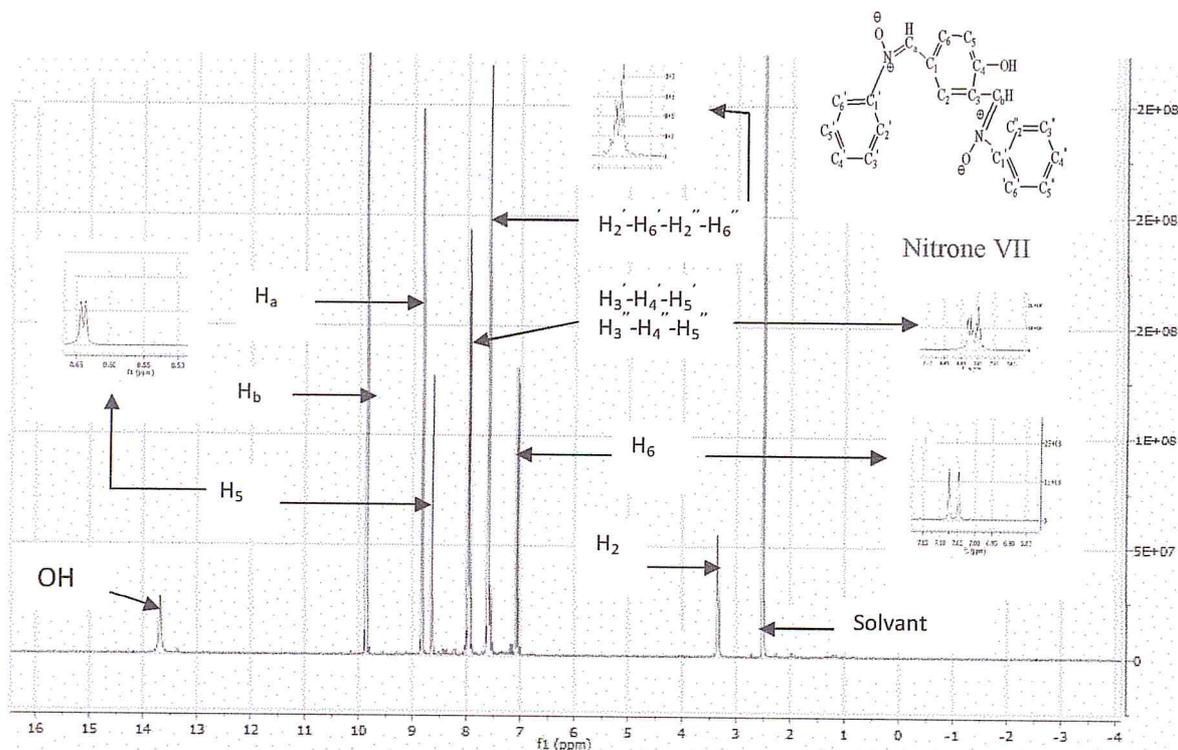


Figure (35) : Spectre RMN ^1H de nitronne VII (bisnitronne) dans DMSO.

L'étude par spectroscopie RMN ^1H des nitrones a montré : Que le déplacement chimique du proton de la fonction OH phénolique de la nitronne VII est très important. Cela peut être interprété par la formation des liaisons hydrogène intramoléculaires qui stabilise cette fonction. Cela peut être confirmé par la formation d'un seul isomère comparé à nitronne VI ou on obtient un mélange d'isomères. En plus des pics associés aux protons aromatiques, on distingue entre 7,8 et 8,2 ppm, un seul pic associé au proton du carbone de la fonction nitronne sous forme de singulet, ce qui confirme aussi la formation d'un Z.

III.1.5.4 Etude en RMN ^{13}C

Les spectres RMN ^{13}C dans DMSO sont obtenus à 90.56 MHz pour les nitrones synthétisées en utilisant le TMS comme référence interne à température ambiante. Les signaux des carbones des mononitrones et bisnitrones sont attribués et donnés dans le tableau (13) et (14).

Tableau (13) : Caractéristiques spectrales en RMN ^{13}C des mononitrones synthétisées, solvant DMSO.

Nitrones	Déplacement chimique δ (ppm)											
	C_a (CH)	C-1 (C)	C-2 (CH)	C-3 (C)	C-4 (C)	C-5 (CH)	C-6 (CH)	C-1' (C)	C-2', 6' (CH)	C-3', 5' (CH)	C-4' (CH)	CH_3
II	129,67	123,04	124,27	148,89	150,12	128,82	121,34	147,19	115,46	112,53	55,81	133,84
III	130,52	124,27	128,82	150,12	148,51	120,96	123,04	145,58	115,46	111,68	55,81	133,64
V	133,46	123,04	130,14	148,89	148,04	128,82	121,34	145,1	123,04	116,7	115,09	

Les spectres de RMN ^{13}C des mononitrones analysées sont donnés dans les figures (36).

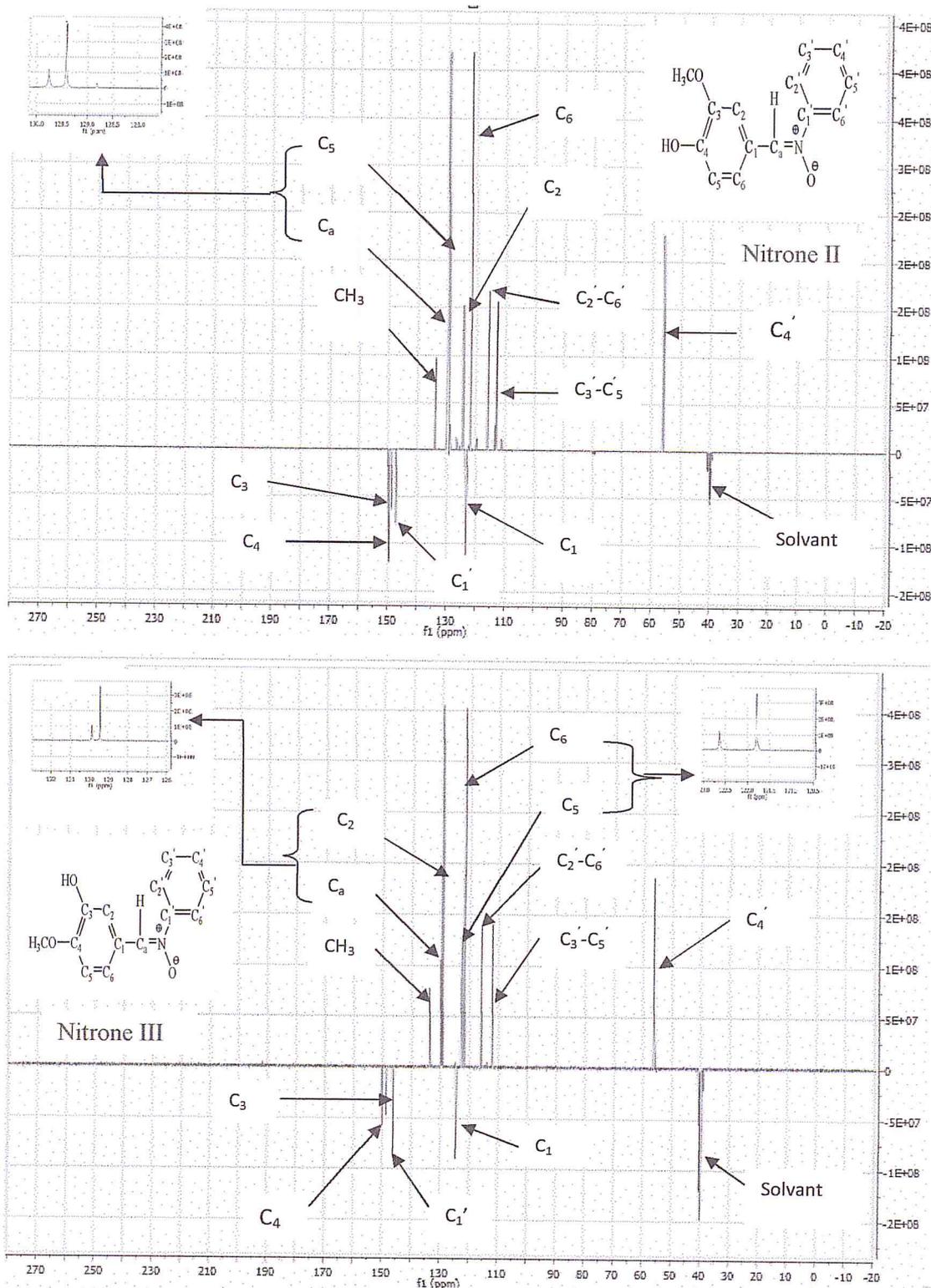


Figure (36) : Spectres RMN ^{13}C des mononitrones II, III dans DMSO.

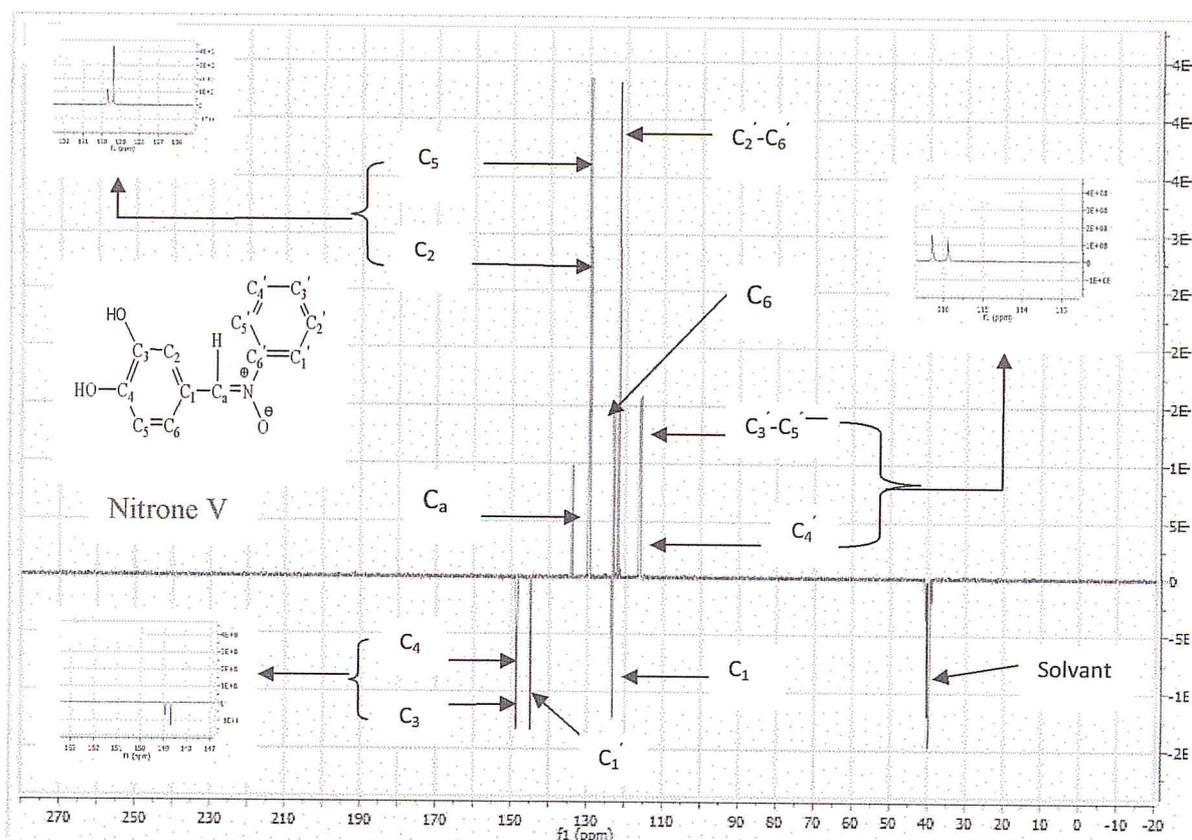


Figure (36) : Spectres RMN ¹³C de nitron V dans DMSO.

Tableau (14) : Caractéristiques spectrales en RMN ¹³C de bisnitron VII synthétisée, solvant DMSO.

nitron												
	C _a	C _b	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C1'-1''	C2'-6'-2''-6''	C3'-5'-3''-5''	C4'-4''
VII	138,48	191,03	128,44	136,39	118,02	164,33	134,69	130,9	145,96	129,67	122,19	119,63

Le spectre de RMN ¹³C de bisnitron VII analysées est donné dans la figure (37).

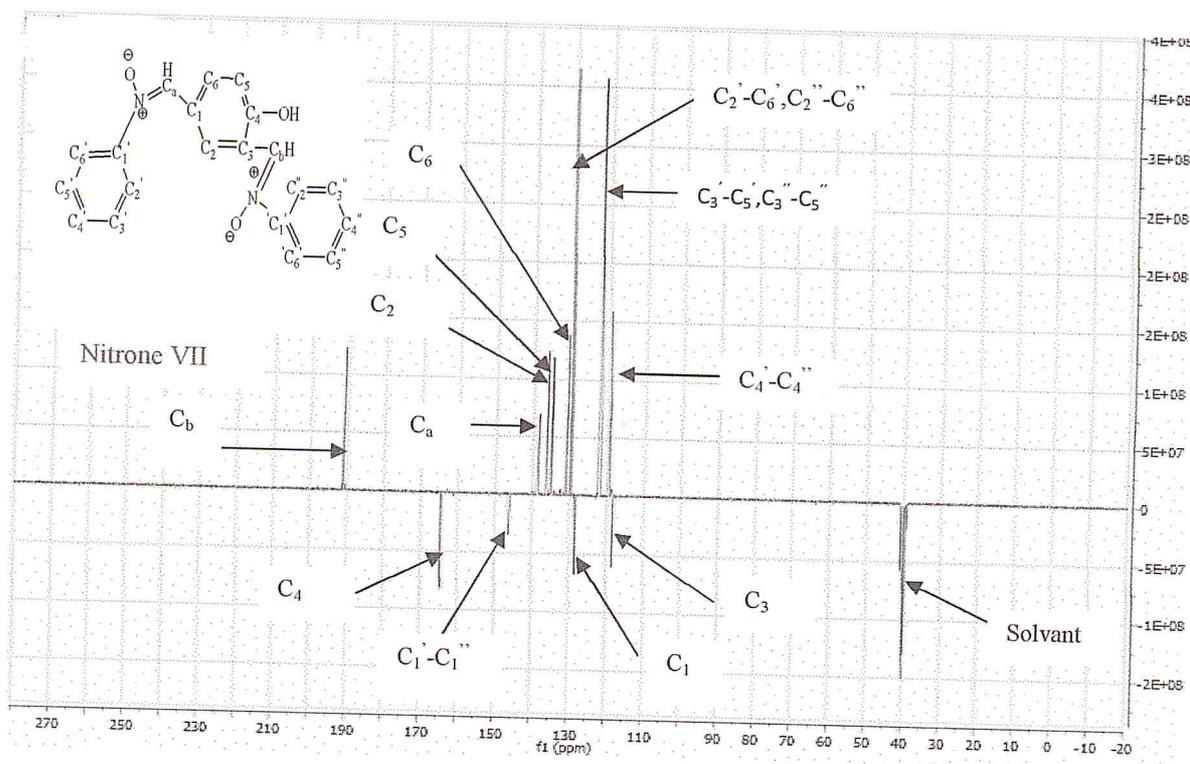


Figure (37) : Spectre RMN ^{13}C de nitrone VII dans DMSO.

Les spectres RMN ^{13}C , présentent tous un seul pic attribué au carbone de la fonction nitrone C, cela confirme aussi la formation d'un seul isomère Z.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats de la synthèse d'une série de nitrones aromatiques. Les rendements des mononitrones sont satisfaisants alors que les rendements des bisnitrones sont globalement faibles. L'analyse par CCM des mononitrones à montré que ces derniers sont purs. Cela à été confirmé lors de leur caractérisation par différentes méthodes physiques et spectroscopiques (RMN ^1H , RMN ^{13}C , SM, et IR.). L'analyse des bisnitrones par CCM à montrée que ces derniers se présentent sous forme de plusieurs isomères. La séparation de ces isomères par chromatographie flash nous a permis la récupération de quelques un. Ces derniers ont été analysés par les mêmes méthodes physiques et spectroscopiques précédente.

Chapitre IV
Activité anti oxydante
des nitrones

IV.1 Activité antioxydant des nitrones

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, ou atome, capable d'avoir une existence indépendante (« libre») en contenant un électron célibataire (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé [65].

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN [66], les lipides (peroxydation), les protéines [67]...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) [68] et la dégradation des cellules et des tissus [69].

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme pour protéger les cellules il ya une seule méthode qui est les antioxydants. Ces derniers peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires [70].

Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes.

Les nitrones sont utilisées d'une part, comme de bonnes sondes pour la mise en évidence des radicaux libre par RPE et d'autre part, comme des antioxydants en médecine.

L'étude de l'activité antioxydante des nitrones est le sujet de recherche de plusieurs équipes [71,72]. Plusieurs structures de ces molécules ont été proposées (nitrones à base de produits naturels tels que les sucres [73] et le cholestérol [74], nitrones à propriétés tensioactives [75], nitrones associées aux molécules cages [76]...). Dans notre travail, nous avons synthétisé des nitrones phénoliques qui associe le pouvoir antioxydant très importants à celui des nitrones, ces derniers, par synergie donnerons en principe une très bonne activité

antioxydante. Aussi, nous avons essayé d'introduire des nitrones bifonctionnels dans le but de multiplier leur pouvoir antioxydant.

Pour compléter cette étude, nous avons rajouté aux nitrones synthétisés les nitrones IX, X. D'autre part, les nitrones IV, VI et VIII n'ont pas été testé à cause de la faible quantité qu'on a obtenue. Des antioxydants synthétiques (BHA, BHT) ont été testés dans les mêmes conditions pour qu'ils servent de références. Le choix de ces derniers est basé sur leur structure phénolique en accord avec nos produits. La série de produits testés est donnée dans la figure (38).

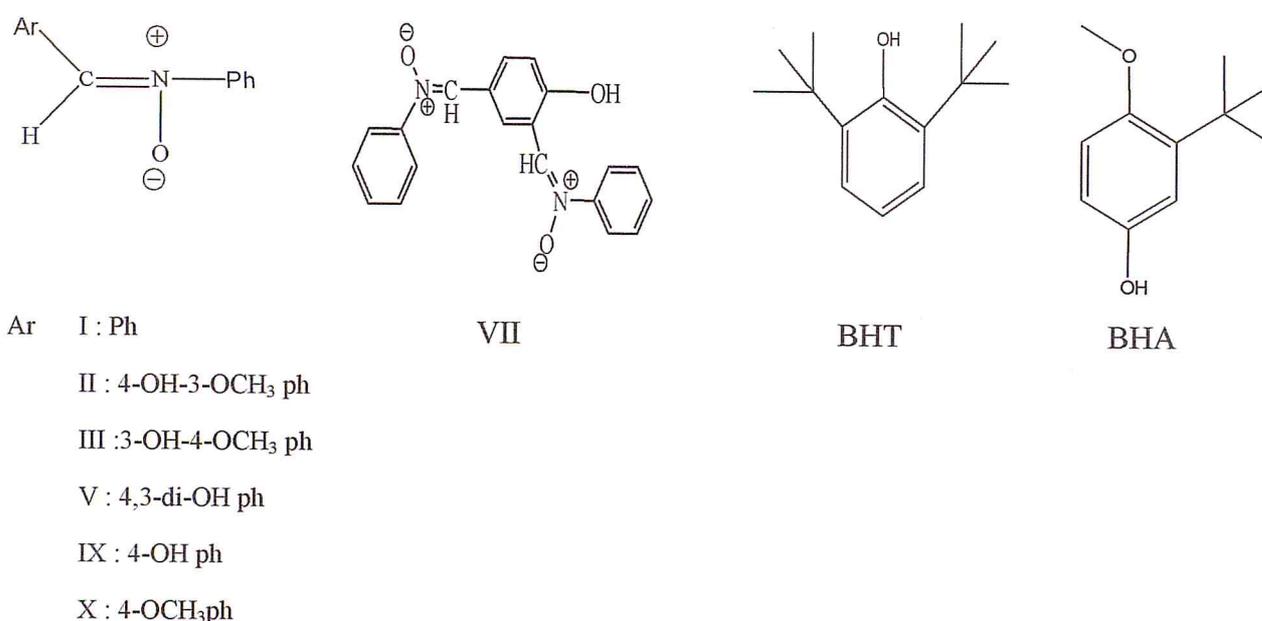


Figure (38) : Structure chimique des différents produits testés

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos échantillons est réalisée par trois tests chimiques, chacun de ces tests correspond à un des trois mécanismes de réaction qui sont :

- Mécanisme de réaction HAT « transfert d'atome d'hydrogène » réalisé par la méthode de β carotène.
- Mécanisme de réaction SET « simple transfert d'électron » réalisé par la méthode de FRAP « ferric reducing antioxydant ».
- Mécanisme de réaction HAT et SET à la fois réalisé par la méthode de DPPH « 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole ».

IV.1.1 Méthode de piégeage du radical DPPH

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (Diphényl picryl hydrazyl) en solution dans l'éthanol. Ce dernier possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Figure39**). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, et le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable a température ordinaire. Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncée, caractérisé par une absorbance en solution d'éthanol mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

L'addition d'un antioxydant qui peut céder un atome d'hydrogène ou un électron libre conduit à la formation de la forme réduite DPPH-H (2) avec une décoloration de la solution. Cette décoloration est directement proportionnelle à la capacité antioxydant du produit ajouté. Elle peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Cette méthode fournit donc un moyen pratique de mesurer l'activité antioxydant des nitrones.

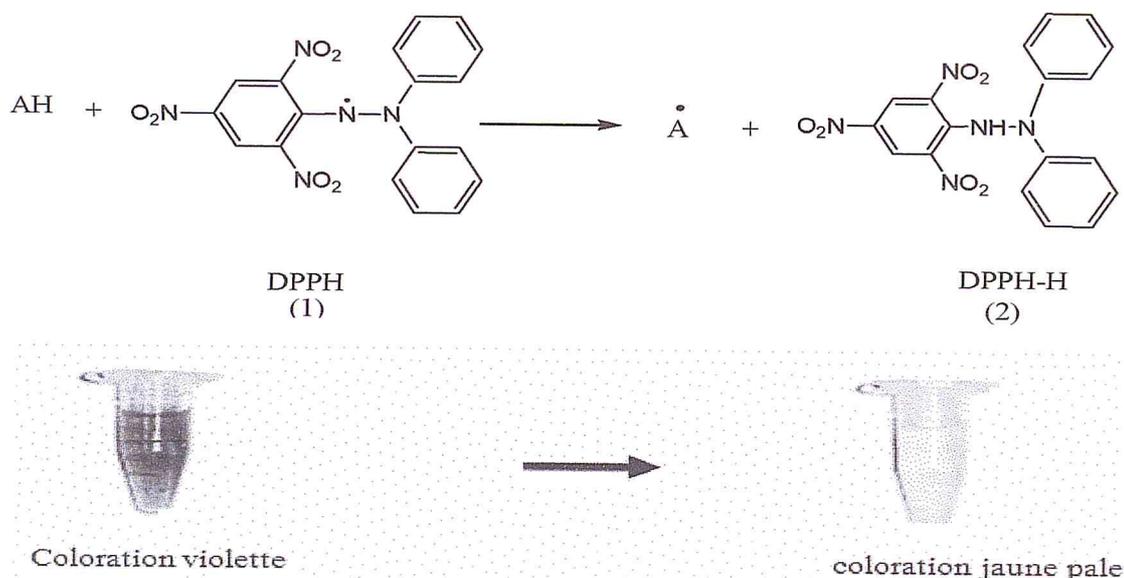
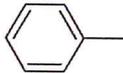
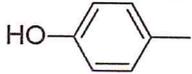
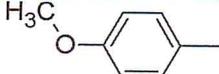
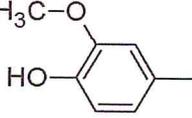
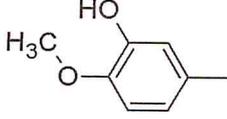
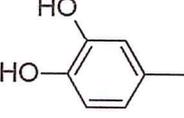


Figure (39) : Réaction de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant

Les résultats de l'activité de piégeage du radical libre DPPH par la série des nitrones sont donnés dans le tableau (15).

Tableau (15) : Absorbance à 517nm des produits testés lors du test de l'activité de piégeage du radical libre DPPH

antioxydant	Ar	Abs	A%
Mononitrones	I 	0,5472	8,6561
	IX 	0,5052	15,6678
	X 	0,5656	5,5760
	II 	0,1518	74,666
	III 	0,4633	22,6600
	V 	0,0775	87,0673
Bisnitrone	VII	0,0527	91,2053
références	BHT	0,0902	84,9300
	BHA	0,0604	89,9100
	Blanc	0,5987	

La figure (40) représente l'histogramme de la variation de l'activité antioxydant des nitrones synthétisé lors du test de DPPH.

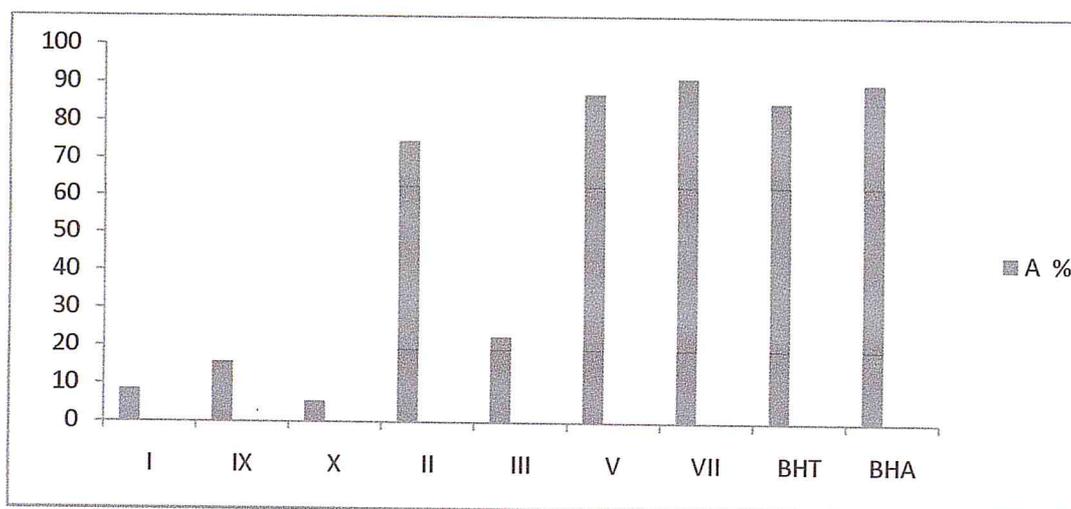


Figure (40) : Histogrammes de La variation de l'activité des nitrones lors du test de DPPH

Ces résultats montrent que toutes les nitrones synthétisées possèdent le pouvoir de piégeage des radicaux libre. Cette activité varie selon le substituant porté par le C-aryle de la nitron. Si on compare l'activité de la C,N-diphényle nitron à celle de la nitron *para* méthoxylé et *para*-hydroxylé, on remarquera que l'introduction du substituant méthoxy réduit cette activité alors que, la fonction hydroxyle l'augmente. Cela à été attribué à la double action que possède cette nitron. La première action est due à la présence de la fonction nitron qui réagit avec le radical libre par l'intermédiaire du carbone situé en position α de l'atome d'azote, ce qui conduit à la formation d'un adduit de spin de type nitroxyde. L'atome d'hydrogène qui se trouve à deux liaisons du groupement nitroxyde est nommé hydrogène β (Figure41).

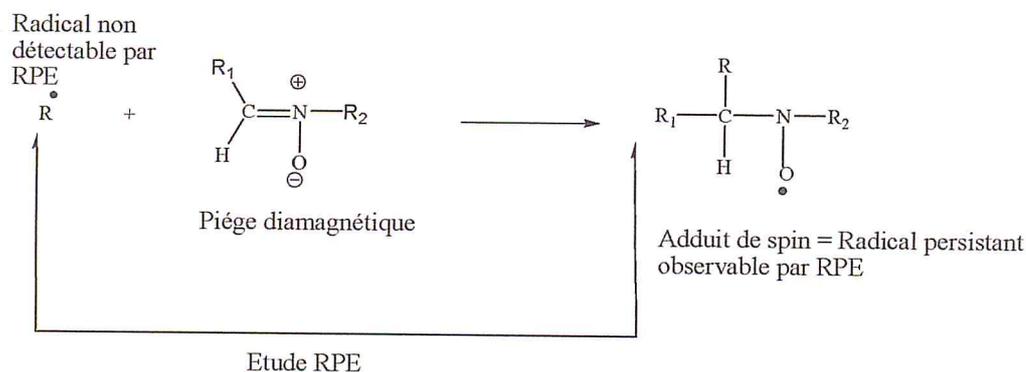


Figure (41) : Principe de la technique de piégeage de spin par une nitron

La deuxième action est due à la présence de la fonction phénol. Les composés phénoliques connus par leurs fortes activités à piéger les radicaux libres selon le mécanisme présenté par la figure (42).

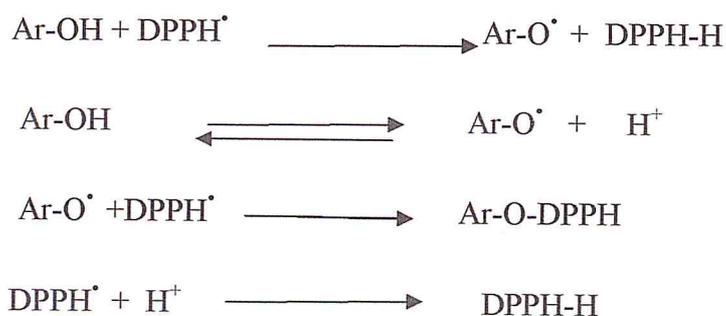


Figure (42) : mécanisme expliquant l'activité anti radicalaire des phénols

Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical DPPH, et le radical ArO^{\bullet} (Forme oxydée). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif.

L'introduction de la fonction methoxy à la nitronne II augmente largement son activité comme la montre la ligne 4 du tableau 15. Cela peut être expliqué par la stabilité du radical libre par résonance comme le montrent les formes limites suivantes:

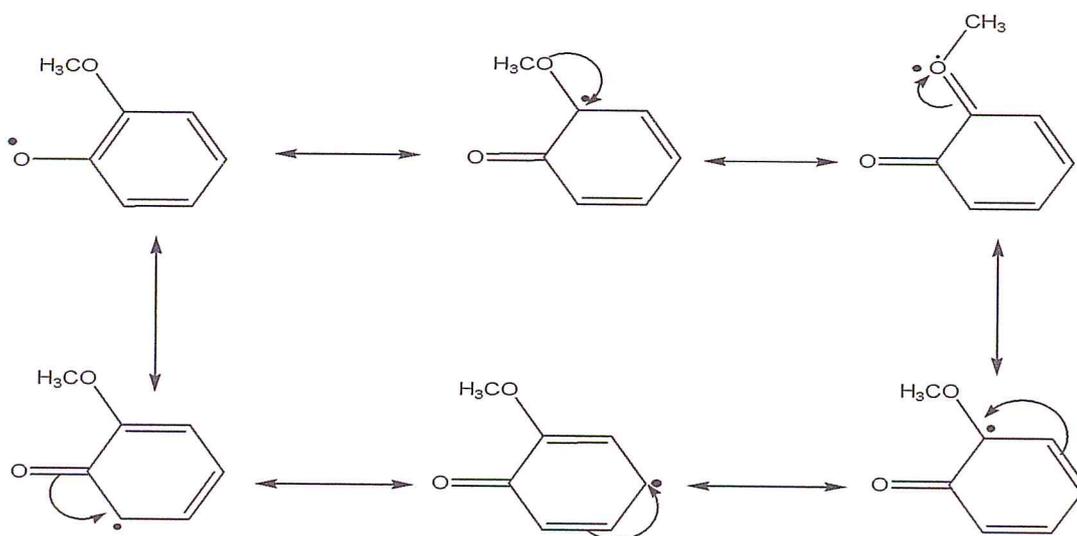
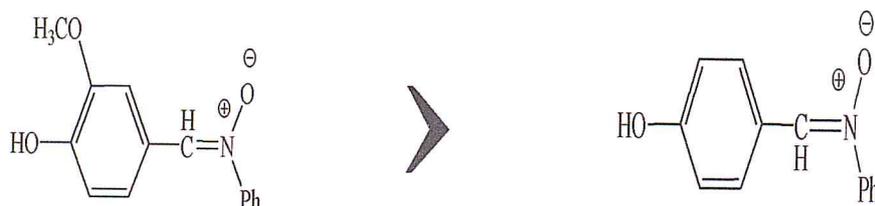


Figure (43) : Formes limites montrant la stabilité du radical phénoxy par le groupement méthoxy adjacents.

Des études similaires ont été réalisées par Bouguerne [77], Ce dernier a montré que la présence d'un groupement méthoxy en *ortho* de l'hydroxyle phénolique améliore les propriétés antioxydantes. Ceci peut s'expliquer par le fait que le radical phénoxy formé lors de l'oxydation, est stabilisé par le groupement méthoxy adjacent.



Les résultats du tableau 15 montre aussi que l'inversion des substituant hydroxy et méthoxy comme c'est le cas de la nitrone III n'améliore pas l'activité alors que l'adition d'un hydroxyle à la place d'un méthoxy donne de meilleure résultats puisque l'activité passe de 74,666% à 87,0673%. Cette activité est similaire à celle des antioxydants de référence.

D'autre part, doubler la fonction nitronium sur le même noyau phénolique donne une activité meilleure que celle des antioxydants de référence.

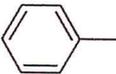
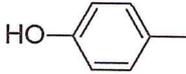
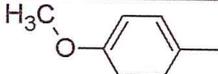
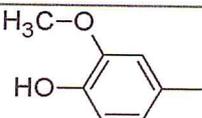
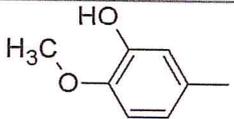
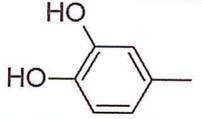
IV.1.2 Méthode de blanchiment de la β -carotène

Cette méthode se base sur la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween 40. L'addition d'antioxydants induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. La couleur jaune si elle persiste, indiquent la présence de substances antioxydants.

Cette méthode a été appliquée sur les nitrones synthétisés avec un suivi de perte de la couleur du β -carotène pendant 2 heures. Ce suivi est estimé par la mesure de l'absorbance des échantillons par spectrophotomètre UV-vis à une longueur d'onde de 490nm.

Les résultats du test de l'activité par la méthode β -carotène par la série des nitrones sont donnés dans le tableau (16).

Tableau (16) : Absorbances des nitrones lors du test de l'activité par la méthode β -carotène à 490nm.

antioxydant	Ar	Abs	A%
Mononitrones	I 	0,1803	20,8849
	IX 	0,26925	31,1884
	X 	0,2157	24,9855
	II 	0,2845	33,036
	III 	0,2055	23,8040
	V 	0,2778	32,1788
Bisnitrone	VII	0,4619	53,51117
références	BHT	0,8601	99,6293293
	BHA	0,8632	99,9942
Contrôle négatif	Eau	0,0653	7,5639

La figure (44) représente l'histogramme de la variation de l'activité antioxydant des nitrones synthésisé lors du test de la β -carotène.

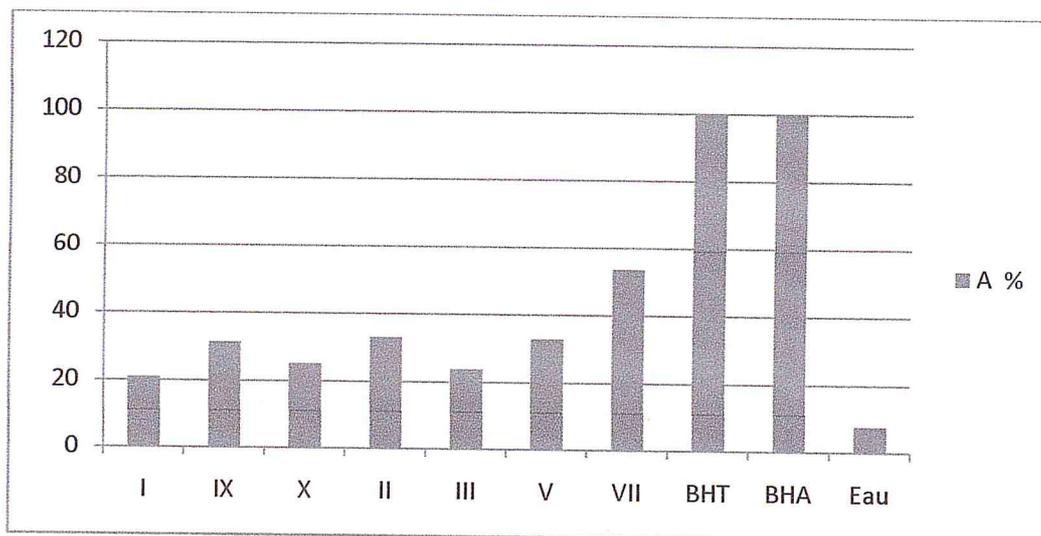


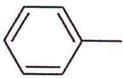
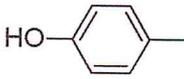
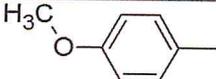
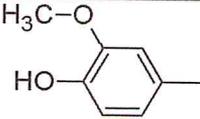
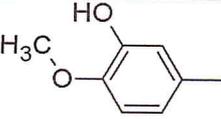
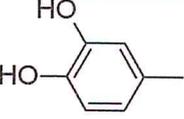
Figure (44) : Histogrammes de la variation de l'activité antioxydant des nitrones synthésisé lors du test de la β -carotène

Les résultats de ce tableau montrent que les nitrones testées ont un bon pouvoir de protection de la β -carotène. Cela s'illustre en comparant l'activité de ces derniers par rapport au contrôle négatif. Néanmoins, ce pouvoir est faible comparé aux antioxydants de références. L'activité relative des nitrones est semblable aux résultats du test DPPH. La nitrone IX par son double action, phénolique et nitrone présente une meilleure activité comparé à la nitrone I et X. L'addition d'un groupement hydroxyle ou méthoxy (nitrones V et III) améliore l'activité. Alors que l'utilisation des bisnitrones reste le moyen le plus efficace pour la protection de la β -carotène.

IV.1.3 Méthode FRAP (Ferrie reducing antioxidant power)

C'est une méthode universelle, le principe de cette méthode est basé sur la réduction de fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux Fe^{2+} . En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Une augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel à 700 nm correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des antioxydants testés.

Tableau (17) : Absorbances des nitrones lors du test de l'activité par la méthode FRAP à 700nm.

antioxydant	Ar	Abs	
Mononitrones	I		0,5251
	IX		0,7292
	X		0,5853
	II		1,5915
	III		0,3839
	V		0,9038
Bis nitrone	VII	0,7402	
références	BHT	0,5599	
	BHA	0,5599	
	blanc	0,0641	

La figure (45) représente l'histogramme de la variation de l'absorbance des nitrones synthétisé lors du test FRAP.

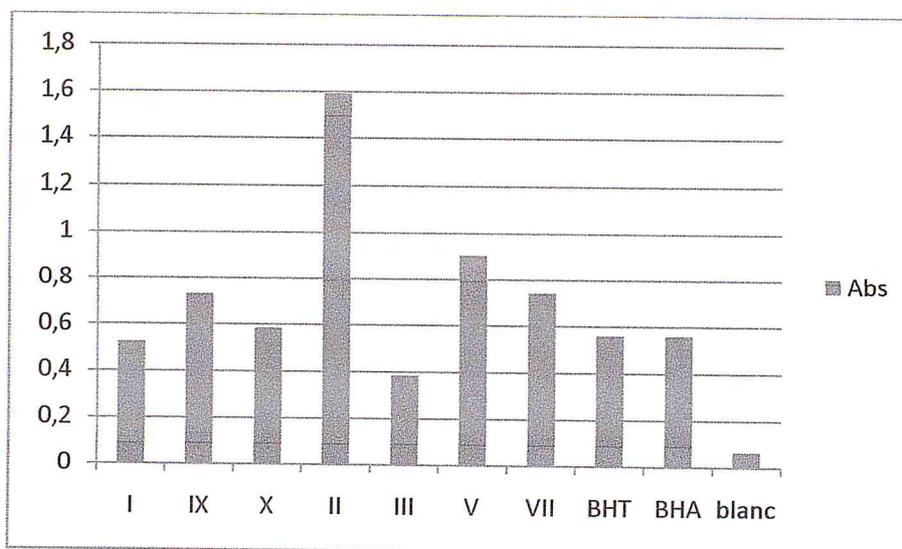


Figure (45) : Histogrammes de la variation de l'absorbance des nitrones synthétisé lors du test FRAP.

La comparaison des absorbances du contrôle négatif à celles des nitrones testées montre bien leur pouvoir réducteur. Ce pouvoir est meilleur ou semblable à celui des antioxydants de référence. Contrairement aux résultats des deux méthodes précédentes ou on a vu que la bis nitrone présente la meilleure activité. La méthode frap a révélé que la vaniline présente une meilleure activité

Conclusion

L'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones synthétisées par trois méthodes qui reposent sur différents mécanismes, nous a permis de conclure que les nitrones phénoliques ont un bon pouvoir antioxydant. Ce pouvoir peut être renforcé par l'addition d'un groupement méthoxy à l'ortho de la fonction hydroxyle. La nitrone ainsi obtenue (III) a montré une très bonne activité par les trois méthodes utilisées. L'utilisation des nitrones bis fonctionnelles (VII) a montré son efficacité avec les méthodes qui reposent sur le mécanisme de Transfer d'hydrogène.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a principalement été consacré à la synthèse de nouvelles nitrones phénoliques et leurs activités antioxydantes.

Nous avons préparé des mononitrones et bisnitrones par condensation d'une série d'aldéhydes aromatiques et β -phénylhydroxylamine. Les rendements des mononitrones sont satisfaisants alors que ceux des bisnitrones sont globalement faibles. L'analyse par CCM des mononitrones a montré que ces dernières sont pures. Cela a été confirmé lors de leur caractérisation par différentes méthodes physiques et spectroscopiques (RMN ^1H , RMN ^{13}C , SM, et IR.). L'analyse des bisnitrones par CCM a montré que ces dernières se présentent sous forme de plusieurs isomères. La séparation de ces derniers par chromatographie flash nous a permis la récupération de quelques uns. Ces derniers ont été analysés par les mêmes méthodes physiques et spectroscopiques précédentes.

L'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones par trois méthodes qui reposent sur des différents mécanismes, a montré que le jumelage des propriétés antioxydantes des phénols à celles des nitrones donne de très bons résultats. D'autre part ; la synthèse d'une nitrone phénolique à base de produit naturel (vanilline) a donné des résultats importants (surtout par la méthode FRAP). Quelques unes de ces nitrones ont présenté des activités meilleures que celles des antioxydants de référence.

La synthèse de nitrones bis fonctionnelles ouvre la porte sur de nouvelles recherches. L'étude d'une nouvelle série de multi-nitrones phénoliques donnera en principe de meilleurs résultats.

Références

Bibliographiques

- [1] Breuer, E. Patai, S.; Rappoport, Z., *Nitrones, Nitronates and Nitroxides*, Ed. Wiley: 1989, Chap. 3, 245-312.
- [2] Smith, L. I. Aliphatic Diazo Compounds, Nitrones and Structurally Analogous Compounds. Systems Capable of Undergoing 1, 3-Additions. *Chem. Rev.* 1938, 23, 193-285.
- [3] Hamer, J., Macaluso, A., Nitrones. *Chem. Rev.* 1964, 64, 473-495.
- [4] Thesing, J.; Sirremberg, W. La Chimie des Nitrones. *Chem. Ber.* 1958, 91, 1978-1980.
- [5] Marcantoni, E.; Petrini, M.; Polimanti, O, Oxidation of Secondary Amines to Nitrones Using Urea-Hydrogen Peroxide Complex (UHP) and Metal Catalysts, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3561-3562.
- [6] Murahashi, S.I.; Mitsui, H.; Shiota, T.; Tsuda, T.; Watanabe, S. Tungstate-catalyzed oxidation of secondary amines to nitrones. α -substitution of secondary amines via nitrones. *The Journal of Organic Chemistry*, 1990. 55(6), 1736-1744.
- [7] Murahashi, S.-I.; Shiota, T. Oxidation of Secondary Amines to Nitrones: 6-Methyl-2, 3, 4, 5-Tetrahydropyridine N-Oxide, *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 2383-2386.
- [8] Goti, A. Nannelli, L. Oxydation d'amines. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 6025-6028.
- [9] Ali, S. A.; Azhar Hashmi, S. M.; Siddiqui, M. N.; Wazeer, M. I.M. Regiochemistry of Mercury(II) oxide Oxidation of Unsymmetrical N,N-Disubstituted Hydroxylamines *Tetrahedron* 1996, 52, 14917-14928.
- [10] Cicchi, S.; Marradi, M.; Goti, A.; Brandi, A. Manganese dioxide oxydation of hydroxylamines to nitrones. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 6503-6505.
- [11] Leung, C. H.; Voutchkova, A. M.; Crabtree, R. H.; Balcells, D.; Eisenstein, O. Atom economic synthesis of amides via transition metal catalyzed rearrangement of oxaziridine. *Green Chem.* 2007, 9, 976-979.
- [12] Christensen, D.; Jørgensen, K. A. Oxydation d'imines. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 126-131.
- [13] Dondoni, A.; Franco, S.; Junquera, F.; Merchán, F.; Merino, P.; Tejero, T. Synthesis of N-benzyl nitrones. *Synth. Commun.* 1994, 24, 2537-2550.
- [14] Franco, S.; Merchán, F. L.; Merino, P.; Tejero, T. Oxydation d'imines en présence d'un permanganate de potassium. *Synth. Commun.* 1995, 25, 2275-2284.
- [15] Aschwanden, P. Kværnø, L.; Geisser, R. W.; Kleinbeck, F.; Carreira, E. M. Condensation de N-hydroxylamines avec des composés carbonylés. *Org. Lett.* 2005, 7, 5741-5742.

- [16] Hay, M. B.; Wolfe, J. P. *Angew.*, A New Strategy for the Stereoselective Synthesis of Isoxazolidines via Pd-Catalyzed Carboetherification of N-Butenylhydroxylamines, *Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6492-6494.
- [17] Buehler, E. Alkylation of syn- and anti-benzaldoximes, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*(2), 261-265.
- [18] Torrsell, K. B. G. *Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis*; **1988**, VCH: Weinheim.
- [19] Resmer, R. A.; Sletzinger, M.; Shikai, I. La réaction cycloaddition 1,3-dipolaire *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3447-3450.
- [20] Bloch, R., Addition of Organometallic Reagents to C=N Bonds: Reactivity and Selectivity, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1407-1438.
- [21] Riber, D.; Skrydstrup, T. SmI₂-Promoted Radical Addition of Nitrones to α,β -Unsaturated Amides and Esters. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 229-231.
- [22] Fanny choteau-mary, ((Développement de nouveaux agents anti-radicalaires de type nitroxyde et nitrone utilisables comme sondes et agents thérapeutique)). Thèse Doctorat, université d'avignonnet des pays de vaucluse, **2011**.
- [23] Chiacchio, U.; Corsano, A. Iannazzo, D.; Rescifina, A.; Piperno, A. Romeo, G. Synthèse des isoxazolidines par réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 entre nitrones et oléfines *Tetrahedron. Lett.* **2001**, *42*, 1777-1780
- [24] Janzen, E. G.; Blackburn, B. J., Detection and identification of short-lived free radicals by electron spin resonance trapping technique (spin trapping). Photolysis of organolead, -tin, and-mercury compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 4481-4490.
- [25] Sankurati N., Kotake Y., Janzen E. G., Studies on the stability of oxygen radical spin adducts of a new spin trap: 5-methyl-5-phenylpyrroline-1-oxide (MPPO). *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, *21*, 889.
- [26] Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E., J. Paxton J., Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol.*, **1979**, *16*, 676-685.
- [27] Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E., Spin trapping Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 4994 - 4999.
- [28] Tsai P., Ichikawa K., Mailer C., Pou S., Halpern H., J., Robinson B. H., Nielsen R., and Rosen G. M., Esters of 5- carboxyl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a family of spin traps for superoxide. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 7811- 7817.

- [29] Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts .*Mol. Pharmacol.* **1982**, 21, 262-265.
- [30] Frejaville C., Karoui H., Tuccio B., Le Moigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R., Tordo P. 5- Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO): a new phosphorylated nitron for the efficient in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. *J. Chem. Soc., Chem. comm.*, **1994**, 1793-1794.
- [31] Frejaville C., Karoui H., Tuccio B., Le Moigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R., Tordo P. 5- Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) : a new phosphorylated nitron for the efficient in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals, *Med. Chem.*, **1995**, 38, 258-265.
- [32] Kotake Y., Janzen E. G., Decay and fate of the hydroxyl radical adduct of .alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) in aqueous media, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9503-9506.
- [33] Janzen E. G., Blackburn B. J., Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique .*J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5909-5910.
- [34] Buettner G. R., Spin trapping: ESR parameters of spin adduct .1474- 1528, *Free Rad. Biol. Chem.*, **1987**, 3,259-303.
- [35] Novelli G. P., Angiolini P., Tani R., Consales G., Bordi L., Phenyl-t-butyl-nitron is active against traumatic shock in rats .*Free Rad. Res. Commun.*, **1985**, 1, 321-327.
- [36] McKechnie K., Furman B. L., Parrat J. R., Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats. *Circ. Shock*, **1986**, 19, 429-439.
- [37] Hamburger S. A., McCay P. B., Endotoxin-induced mortality in rats in reduced by nitrones. *Circ. Shock*, **1989**, 29, 329-334.
- [38] R.A.Floyd, K.Hensley, M.J.Forester, Mech.Ageni. Activité neuroprotectrice des nitrones. *Dev*, 2002, 123(8), 1021.
- [39] E.Sakiniene,L.V.Collins.Combined antibiotic and free radical trap treatment is effective at combating Staphylococcus-aureus-induced septic. *Arthritis Res*, **2002**, 4(3), 196.
- [40] Henderson D., Bielefeld E. C., Harris K. C., Hu B. H., , The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss .*Ear Hear.*, **2006**, 27, 1-19.
- [41] Fechter L. D., Liu Y., Pearce T. A., Cochlear protection from carbon monoxide exposure by free radical blockers in the guinea pig .*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1997**, 142, 47-55.
- [42] Fechter L. D., Klis S. F., Shirwany N. A., Moore T. G., Rao D. B. Acrylonitrile produces transient cochlear function loss and potentiates permanent noise-induced hearing loss *Sci.*, **2003**, 75, 117-123.

- [43] Choteau F., Durand G., Ranchon-Cole I., Cercy C., Pucci B. Cholesterol-based α -Phenyl-*N*-*tert*-butyl nitronone derivatives as antioxydants against light-induced retinal degeneration. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2010**, 20, 7405-7409.
- [44] Tabatabaie T., Kotake Y., Wallis G., Jacob J. M., Floyd R. A., Spin trapping agent α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone protects against the onset of drug-induced insulin-dependent diabetes mellitus, *FEBS Lett*, **1997**, 407,148-152.
- [45] Jotti A., Paracchini L., Perletti G., Piccinini F. Cardiotoxicity induced by doxorubicin in vivo: protective activity of the spin trap alpha-phenyl-*tert*-butyl nitronone. *Pharm. Res.*, **1992**, 26, 143-150.
- [46] Paracchini L., Jotti A., Bottiroli G., Prosperi E., Supino R., Piccinini F. The spin trap alpha-phenyl-*tert*-butylnitronone protects against myelotoxicity of cardiotoxicity of adriamycin while preserving the cytotoxic activity. *Anticancer Res.*, **1993**, 13, 1607-1612.
- [47] Parman T., Wiley M. J., Wells P. G. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nature Medicine*, **1999**, 5, 582-585.
- [48] Carney J. M., Starke-Reed P. E., Olivier C. N., Landum R. W., Wu J. F., Floyd R. A. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound α -phenyl-*N*-*tert*-butyl-nitronone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 3633-3636.
- [49] Sack C. A., Succi D. J., Crandall B. M., Arendash G. W., Antioxidant treatment with α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone (PBN) improves the cognitive performance and survival of aging rats, *Neuroscience Lett*, **1996**, 205,181-184.
- [50] Saito K., Yoshioka H., Cutler R. G., A spin-trap, α -phenyl-*N*-*tert*-butyl-nitronone, extends the life span of mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **1998**, 62, 792-794.
- [51] H. Mallesha, K. R. Ravi Kumar, B.K. Vishu Kumar, K. Mantelingu, K. S. Rangappa, Histidine as a catalyst in organic synthesis: A facile *in situ* synthesis of α , N-diarylnitrones, *Chemical Sciences Indian Acad Sci*, **2001**, 113(4), 291.
- [52] Delomenede M, Bedos-Belval F, Duran H, Vindis C, Baltas M, and Negre-Salvayre, Development of Novel Antiatherogenic Biaryls: Design, Synthesis, and Reactivity. *J. Med. Chem*, **2008**, 51, 3171–3181,
- [53] K.Hamza, A. TOUATI, A. AIT YAHIA, A. MEKLAT, mise en évidence de l'activité antimicrobienne de deux séries de nitrones et d'isoxazolidines synthétisées, *Sciences et Technologie*, **2008**, 28, 65-72.
- [54] Brand-Willims,W ;Cuvelier,M.E ;Berset,C.Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel – Wissenschaft und technologie*, **1995**,28,25-30.

- [55] OYAIZU M. Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine, *Jpn J. Nutr*, **1986**, 44, 307 – 314.
- [56] Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* **2006**, 95,200-204.
- [57] H. Azfar, M. I. M. Wazeer, A. Sk. Asrof, *Oxidation of N-benzyl-N-methylhydroxylamines to nitrones. A mechanistic study.* *J.Chem. Soc.,Perkin Trans*, **1998**,2, 393.
- [58] A. Zeghdaoui, Nitrones as 1, 3-dipoles for the synthesis of biologically active five membred heterocycles separation of cycloadducts isomers chromatographically. Thèse de magister, **1988**, E.N.S Kouba-Alger.
- [59] N,Belkheiri, Dérives phénoliques a activités antiathérogènes. Thèse de doctorat, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, **2010**.
- [60] Site Web: <http://interchim.blogspot.com/2014/02/flash-chromatographie>
- [61] K. B. G. Torsell, Nitrile Oxides, Nitrones, and Nitronates in Organic Synthesis. Novel Strategies in Synthesis; VCH Publisher: New York, **1988**.
- [62] Y. Iwakura, K. Uno, S. J. Hong, et T. Hongu, *Bul.Substituent Effect of Dipole and Dipolarophile in the Reaction of Nitrones with N-(Substituted phenyl) maleimides.* *Chem. Soc. Jap*, **1972**, 45(1), 192.
- [63] Site Web: http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectroscopie_de_masse.
- [64] A. Baranski.Synthesis and Properties of Azoles and Their Derivatives. Regio-and Stereoselectivity of [2+3] Cycloaddition Reaction of E-b-Nitrostyrene to Z-C-Aryl-N-phenylnitrones. *Polish J. Chem.*, **2000**, 74, 767.
- [65] Goudable, J. & Favier, A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **1997**, 11,115-120.
- [66] Hadj Salem, J. Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE, **2009**.
- [67] Jacob, L. L'insuffisance rénale aiguë. *Edition Springer*, **2007**. 88.
- [68] Pincemil, J. & Defraigne, J.-O. Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, **2003**. 18 (2), 55-60.
- [69] Bonnet, C., Alamigeon, F. & Micheels, P. Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie.*Edition Eyrolles*, **2010**, 14.

- [70] Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Leverve, X. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, 2006, 255.*
- [71] Hussam Hamza Salman, Synthesis of New Azomethine -N-oxide compounds and Study of their Antifungal and Antioxidant Activities, *Basrah Researches ((Sciences)), 2013, 39(4), 91-99.*
- [72] Umamheswari Mani, Synthesis of novel α, β -unsaturated N-methyl aldonitrone used as antioxidant agent, *International journal of pharmaceutical research and development, 2014, 6(01), 109-122.*
- [73] Jean MJ Tronchet, Eva Mihaly, *Dérives C-glycosyliques Nitrones de sucres, Carbohydrate Research, 1976, 46, 127-132.*
- [74] Choteau F, Durand G, Ranchon-Cole I, Cercy C, Pucci B, Les dérivés de nitroène α -phényl-N-tert-butyle à base de cholestérol que des antioxydants contre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière, *Bioorg Med Chem Lett, 2010, 24, 15-20.*
- [75] Ouari O, Polidori A, Pucci B, Tordo P, Chalier F, Synthèse d'un glycolipidique Amphiphile nitroène comme un piège New Spin, *J Org Chem, 1999, 64 (10): 3554-3556.*
- [76] David Bardelang Dr, Laurence Charles Prof., Jean-Pierre Finet Dr, Laszlo Jicsinszky Dr, Hakim Karoui Dr, Sylvain R. A. Marque Dr, Valérie Monnier Dr, Antal Rockenbauer Prof, Roseline Rosas, Paul Tordo Prof, α -Phényl- N - tert -butylnitroène-type dérivés Rebond à la β -cyclodextrines: Synthèses, Thermokinetics d'auto-insertion et l'application du superoxyde spin trapping, *Chimie - A European, 2007, 13(33), 9344-9354.*
- [77] Bouguerne Benaïssa, Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques Vis-à-Vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose), Thèse de doctorat, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2012.

