

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE de Pharmacie

Année : 2006

Thèse N°

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Spécialité : Biophysique

Présentée et soutenue par

Redouane MOKRINI

Le 28 Avril 2006

MECANISMES RADICALAIRES DANS LA DEGRADATION DE
COMPOSES PHENOLIQUES EN CHIMIE SOUS
RAYONNEMENT : RADIOLYSE GAMMA DES CHALCONES ET
DE L'ACIDE FERULIQUE EN SOLUTIONS ALCOOLIQUES.

Jury :

TILQUIN B.	Professeur ordinaire	Louvain (Belgique)	Président
HOUEE-LEVIN C.	Professeur	Paris Sud	Rapporteur
LAZZARONI R.	Professeur ordinaire	Mons (Belgique)	Rapporteur
CLAVERE P.	Professeur	Limoges	
DUROUX J.L.	Professeur	Limoges	
TROUILLAS P.	Maître de Conférences (HDR)	Limoges	

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Jean-Luc Duroux, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. Pour son appui, sa confiance, ses conseils et le temps qu'il m'a consacré, mais aussi pour les responsabilités qu'il m'a données, je l'assure de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur Patrick Trouillas pour son implication dans ce travail de thèse. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour son aide, ses nombreux conseils, sa disponibilité. Merci pour son humanisme et son soutien sans faille au moments les plus difficiles.

J'exprime ma plus profonde gratitude à Monsieur le Professeur Bernard Tilquin qui m'a honoré en acceptant d'être le président de ce jury.

Bien entendu, je n'oublie pas Madame le Professeur Chantal Houée-Lévin qui a bien voulu examiner ce travail et pour sa présence dans le jury. Merci aussi pour tous les conseils pertinents tout le long de l'évolution de ce travail.

Je ne saurais oublier de remercier Monsieur le Professeur Roberto Lazzaroni qui a accepté avec enthousiasme et bienveillance de juger ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur Pierre Clavère d'avoir accepté de faire partie du jury.

Un remerciement tout particulier à Monsieur le Professeur Mourad Kaouadji qui a su me faire bénéficier de son expérience et de ses compétences. Je tiens également à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et ses précieux conseils qui ont fait progresser ce travail.

J'adresse mes remerciements à Madame Daovy-Paulette Allais pour sa collaboration et pour avoir suivi de très près l'évolution de ce travail en début de thèse. Merci pour ses conseils dans le domaine de la chromatographie.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Yves Champavier pour sa collaboration et ses précieux conseils concernant la RMN.

Un grand merci à Monsieur Claude-Alain Calliste pour l'aide qu'il m'a apportée, pour sa sympathie et sa disponibilité.

Je ne pourrais oublier de remercier mon ami David Kozlowski, avec qui j'ai eu le plaisir de partager le bureau, ainsi que Michel Kapela pour sa bonne humeur.

Je remercie également Monsieur Philippe Vignoles et Madame Marie-José Hyvernaud pour leur assistance et leur gentillesse.

Je témoigne ma reconnaissance à Monsieur Serge Battu pour ses conseils pertinents et sa disponibilité.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour mon épouse Ghizlane, dont le soutien ne m'a jamais fait défaut. Elle a su contribuer à sa façon à l'aboutissement de ce travail que je lui dédie.

RESUME

Dans la continuité des travaux sur les composés phénoliques effectués au sein de l'équipe Biomolécules EA 1085, nous avons étudié la radiolyse gamma d'une série de molécules appartenant à la famille des flavonoïdes. Nous avons suivi leur réaction avec les radicaux libres issus de la radiolyse des solvants, tels que les radicaux centrés sur le carbone, 1-hydroxyméthyl (HMR) et 1-hydroxyéthyl (HER) et leurs isomères centrés sur l'oxygène. Ces radicaux libres peuvent être impliqués dans de nombreuses maladies et les flavonoïdes sont des antioxydants puissants que l'on trouve dans l'alimentation.

La radiolyse de quatre flavonols, six chalcones et une dihydrochalcone sera présentée dans ce manuscrit. Les molécules ont été solubilisées dans des alcools (méthanol/éthanol) à différentes concentrations allant de $5 \times 10^{-5} \text{M}$ à 10^{-2}M , en milieu désaéré et non désaéré. L'irradiation est effectuée par rayonnements gamma provenant d'une source de ^{60}Co , à des doses allant de 0,1kGy à 24kGy. L'analyse des solutions irradiées montre la disparition de la chalcone étudiée et la formation de produits de radiolyse. Une étude analytique montre que la radiolyse des chalcones est un processus qui dépend à la fois de la concentration et de la dose absorbée. Chaque molécule donne naissance à des produits de radiolyse que nous avons isolés, purifiés puis identifiés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

L'identification des produits de radiolyse montre que la dégradation des chalcones peut être provoquée par une attaque, au niveau de la double liaison, des espèces réactives HMR/HER et de leurs isomères centrés sur l'oxygène. Elle montre aussi pour certaines molécules la formation d'un nouveau cycle pentagonal. Nous avons également étudié le rôle de l'oxygène dans la radiolyse de ces composés qui, de manière inattendue, protège les chalcones contre les attaques radicalaires. Un mécanisme de transformation détaillé des chalcones est proposé.

Ce type de réaction peut donc se produire lors de l'exposition de produits alimentaires à un rayonnement γ utilisé pour prolonger leur durée de conservation. Nous avons ainsi étudié les effets du rayonnement γ sur un jus d'orange en nous focalisant sur la variation de la teneur en composés phénoliques. Ces analyses montrent que l'acide férulique (un acide phénolique) est dégradé par l'irradiation. Cet acide présente une analogie structurale avec les chalcones (présence d'une chaîne tricarbonée α, β -insaturée, d'un carbonyle et d'un cycle aromatique). Ceci nous a amené à étudier la radiolyse de l'acide férulique. Les produits de dégradation identifiés montrent que l'acide férulique subit l'attaque des radicaux libres du solvant de la même façon que les chalcones, au niveau de la double liaison. Ces résultats sont une première étape pour mieux appréhender les effets du rayonnement gamma sur les fruits et légumes soumis à un traitement ionisant.

Mots-clé : Radiolyse, Chalcone, Ionisation, Antioxydant, HMR, HER, Flavonoïdes.

ABSTRACT

Radical mechanisms of the degradation of phenolic compounds in radiation chemistry:
gamma radiolysis of chalcones and ferulic acid in alcohol solutions

In regards to the previous studies carried out in our group (Biomolécules - EA 1085) on the radiolysis of phenolic compounds, we studied gamma radiolysis of a series of flavonoid compounds. We focused on their reactivity with the free radicals formed in the irradiated solvents. Those radicals are the carbon centered 1-hydroxymethyl radical (HMR), 1-hydroxyethyl radical (HER) and their oxygen centered isomers. Such free radicals are implicated in different diseases. Flavonoids are natural antioxidants consumed in diets rich in fruit, vegetables, spices and beverages like tea and red wine.

The radiolysis of four flavonols, six chalcones and one dihydrochalcone is presented here. Molecules were dissolved in alcohols (methanol/ethanol) with different concentrations from 5×10^{-5} M to 10^{-2} M, in aerated and deaerated solution. The irradiation is carried out with gamma radiations from a ^{60}Co source, with dose ranging from 0,1 kGy to 24 kGy.

The HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis of the irradiated solutions exhibits a decrease in chalcone concentration and the formation of new radiolytic products. The analytical study demonstrated that chalcone radiolysis is a concentration and dose dependent process. The radiolytic products have been isolated, purified and identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). On the basis of the chemical structure of those compounds, we proposed that the degradation mechanism starts by a HMR or HER attack of the α,β double bond, followed by addition and cyclization reactions the role of oxygen has also been investigated, and oxygen molecules appear to protect chalcones against the radical attack. A detailed mechanism of transformation of chalcones is proposed.

We then studied the effects of gamma irradiation on orange juice focusing on the variation in phenolic contents. Ferulic acid (a phenolic acid) appeared to be degraded in the irradiated orange juice. This acid mimics half of a chalcone (presence of α,β -unsaturated bond and an aromatic ring). This led us to study the radiolysis of ferulic acid in alcohol solution. In agreement with the chalcone degradation, the identified radiolytic products of ferulic acid were formed after the radical attack of the α,β double bond and addition of the different radical species present in the irradiated solutions. All of these results are considered as the first step in order to understand the behavior of phenolic compounds in irradiated fruits.

Keywords : Radiolysis, Chalcone, Ionisation, Antioxidant, HMR, HER, Flavonoids.

ABREVIATIONS

AcOEt	Acétate d'éthyle
BDE	Bond Dissociation Enthalpy
CI ₅₀	Concentration permettant d'Inhiber 50% du signal de référence
CCCM	Chromatographie Centrifuge sur Couche Mince
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CLMP	Chromatographie Liquide Moyenne Pression
COSY	COrrélation SpectroscopY
DPPH	1,1-DiPhenyl-2-Picryl-Hydrasyl
EtOH	Ethanol
FAB/LSIMS	Fast Atom Bombardment /Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
HER	1-HydroxyEthyl Radical
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMR	1-HydroxyMethyl Radical
MeOH	Méthanol
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
UV	Ultra Violet

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I LES COMPOSES PHENOLIQUES

INTRODUCTION.....	5
I. STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES	5
I.1. FLAVONES ET FLAVONOLS	6
I.2. FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS.....	7
I.3. CHALCONES ET AURONES.....	8
I.4. ORIGINE BIOSYNTHETIQUE DES FLAVONOIDES	8
II. PRESENTATION DETAILLEE DES CHALCONES.....	11
II.1 BIOSYNTHESE DES CHALCONES	11
II.2 DISTRIBUTION ET LOCALISATION DES CHALCONES.....	12
II.3. SYNTHESE ORGANIQUE DES CHALCONES	14
II.4.LES PROPRIETES BIOLOGIQUES.....	17
II.5.1. Activité antioxydante.....	17
II.5.2. Autres activités biologiques.....	20
III. LES ACIDES PHENOLIQUES.....	21
III.1 DEFINITION	21
III.2. STRUCTURE DE BASE.....	21
III.3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ACIDES PHENOLIQUES.....	22

CHAPITRE II IONISATION ET FORMATION DES RADICAUX LIBRES

INTRODUCTION.....	25
I. IONISATION DES FRUITS ET LEGUMES	25
I.1. PRINCIPE.....	26
I.2. RAYONNEMENTS IONISANTS	26
I.3. DEFINITION DE LA DOSE.....	28
I.4. AVANTAGE DE L'IONISATION	29
II. RADIOLYSE DES ALCOOLS ET FORMATION DES RADICAUX LIBRES.....	31

II.1. INTRODUCTION	31
II.2 RADIOLYSE DU METHANOL	33
II.3 RADIOLYSE DE L'ETHANOL.....	36
II.4. COURBE DE DILUTION.....	38
II.5. REACTIVITE DES RADICAUX LIBRES AVEC L'OXYGENE	39
II.6. REACTIVITE DES RADICAUX LIBRES HMR ET HER	41

CHAPITRE III MATERIELS ET METHODES

I. IRRADIATION	47
I.1. APPAREILLAGE.....	47
I.2. CONCENTRATIONS UTILISEES.....	47
II. ANALYSES DES ECHANTILLONS IRRADIES	48
II.1. PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)	48
II.1.1. Principe	48
II.1.2. Matériel.....	49
II.1.3. Mode opératoire.....	49
II.2. PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP) .	50
II.2.1. Principe	50
II.2.2. Appareillages	51
II.2.3. Mode opératoire.....	51
III. PURIFICATION DES ECHANTILLONS IRRADIES.....	52
III.1. COLONNE OUVERTE	52
III.1.1. Principe.....	53
III.1.2. Appareillage	53
III.1.3. Mode opératoire	53
III.2. CCM CENTRIFUGE	54
III.2.1. Principe.....	54
III.2.2. Appareillage	54
III.2.3. Mode opératoire	55
III.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À MOYENNE PRESSION (CLMP)	56
III.4. CLHP SEMI-PREPARATIVE.....	56
IV. ACETYLATION	57

IV.1 PRINCIPE.....	57
IV.2 MODE OPERATOIRE.....	59
V. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES.....	60
V.1. RMN.....	60
V.2. SPECTROSCOPIE DE MASSE FAB-LSIMS.....	60
VI. MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	61
VI.1 PRINCIPE.....	61
VI.2 MODE OPERATOIRE.....	63

CHAPITRE IV RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES : ETAT DE L'ART

INTRODUCTION.....	65
I. RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES EN MILIEU ALCOOLIQUE.....	66
II. ROLE DE L'OXYGENE DANS LA RADIOLYSE DES FLAVONOLS.....	73
III. MECANISME DE DEGRADATION DES FLAVONOLS.....	74

CHAPITRE V RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL ET L'ETHANOL

INTRODUCTION.....	79
I. RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL.....	79
I.1. RADIOLYSE DE LA 2,2',4'-TRIHYDROXYCHALCONE EN MILIEU DESAERE.....	79
I.2. PURIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES DE LA 2,2',4'- TRIHYDROXYCHALCONE.....	82
I.2.1. Etape 1 : colonne ouverte.....	82
I.2.2. Etape 2 : CCM centrifuge.....	83
I.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES DE LA 2,2',4'- TRIHYDROXYCHALCONE.....	84
I.3.2. Spectres RMN des produits P1, P2, P3, P4, P5 et P6.....	85
I.3.1.a. Produit P1.....	85
I.3.1.b. Produit P2.....	87
I.3.1.c. Produit P3.....	87

I.3.1.d. Produit P4.....	87
I.3.1.e. Produit P5.....	89
I.3.1.f. Produit P6.....	89
I.3.3. Spectres de masse des produits P1, P2, P3, P4, P5 et P6.....	90
I.4. PRODUITS MINORITAIRES	91
I.5. RENDEMENT RADIOLYTIQUE ET COURBE DE DILUTION.....	92
I.5.1. Courbe d'étalonnage.....	92
I.5.2. Evolution de la chalcone en fonction de la dose utilisée	93
I.5.3. Rendement radiolytique	95
II. RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL : GENERALISATION ..	96
II.1. ETUDE ANALYTIQUE DES CHALCONES.....	96
II.2. PURIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DES CHALCONES.....	99
II.2.1. La 2',4'-Dihydroxychalcone (Ch2)	100
II.2.2. La 2',4'-Dihydroxy-2-méthoxychalcone (Ch3).....	101
II.2.3. La 2',4'-Dihydroxy-4-méthoxychalcone (Ch4).....	101
II.2.4. La 2',4'-Dihydroxy-2-méthoxychalcone (Ch5).....	102
II.2.5. La 2',3',4'-trihydroxychalcone (Ch6)	102
II.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DES CHALCONES....	103
II.3.1. Spectres UV	103
II.3.2. Spectres RMN des produits de radiolyse.....	106
II.4. RENDEMENT RADIOLYTIQUE ET COURBE DE DILUTION	118
II.4.1. Courbe d'étalonnage.....	118
II.4.2. Evolution de la chalcone en fonction de la dose utilisée	120
II.4.3. Rendement radiolytique.....	122
III. RADIOLYSE DES CHALCONES DANS L'ETHANOL	123
III.1. ETUDE ANALYTIQUE DE Ch1	123
III.2. PURIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE Ch1.....	125
III.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE Ch1	127
III.3.1. Spectres UV.....	127
III.3.2. Spectres RMN	127
III.3.2.a. Produit P20	128
III.3.2.b. Produit P21	128
III.3.2.c. Produit P22	129
III.3.2.d. Produits P23, P24, et P25	129

III.3.2.e. Produits P26.....	130
III.3.3. Spectres de masse des produits P20/23 P21/24, P22/25	134
IV. ROLE DE L'OXYGENE DANS LA RADIOLYSE DES CHALCONES.....	136
IV.1. RADIOLYSE DE Ch1 DANS LE METHANOL EN MILIEU NON DESAERE	136
IV.1. RADIOLYSE DE Ch1 DANS L'ETHANOL EN MILIEU NON DESAERE ...	139
V. MECANISMES DE TRANSFORMATION DES CHALCONES EN MILIEU ALCOOLIQUE	143
V.1. ROLE DE LA DOUBLE LIAISON.....	143
V.2. MECANISMES DE DEGRADATION DES CHALCONES EN SOLUTION ALCOOLIQUE	144
VI. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES CHALCONES ET DE LEURS PRODUITS DE RADIOLYSE	154

CHAPITRE VI

RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE APPLICATION AU TRAITEMENT DES ALIMENTS PAR IRRADIATION

INTRODUCTION.....	157
I. IRRADIATION DU JUS D'ORANGE	158
I.1 LA COMPOSITION DU JUS D'ORANGE.....	158
I.2 TRAITEMENT DU JUS D'ORANGE.....	161
I.2.1. Préparation des jus	161
I.2.2. Extractions	161
I.2.3. Analyse des extraits	163
I.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DU JUS D'ORANGE	164
II. RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE	166
II.1. IRRADIATION DE L'ACIDE FERULIQUE.....	167
II.2. PURIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE	168
II.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE.....	169
II.3. 1. Spectres UV	169
II.3. 2. Spectres RMN.....	170
II.3.2.a. Produit AF1.....	170
II.3.2.b. Produit AF2	172

II.3.2.c. Produit AF3 et AF4.....	173
III. MECANISMES DE TRANSFORMATION DE L'ACIDE FERULIQUE.....	175
IV. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'ACIDE FERULIQUE ET DE SES PRODUITS DE RADIOLYSE	178
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	179
REFERENCES.....	183

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Appartenant à la grande famille des polyphénols, les flavonoïdes sont des substances colorantes naturellement présentes dans les plantes. Leur structure se caractérise par la présence d'un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols, les flavan-3,4-diols et les chalcones, caractérisées par un cycle C ouvert. Les céréales, les épices, les herbes aromatiques, les fruits et les légumes sont des sources importantes de flavonoïdes. De nombreuses études ont montré que les flavonoïdes ont une grande capacité à piéger les radicaux peroxydes (ROO^\bullet), alkoxydes (RO^\bullet), superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et hydroxydes ($^\bullet\text{OH}$) (*Jovanovic, 1994 ; Van Acker, 1996 ; Rice-Evans, 1996, Cotelle, 1996 ; Cao, 1997 ; Bors, 1997, Cos, 1998 ; Dugas 2000, Pietta, 2000*). Des études épidémiologiques ont également démontré qu'une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de développement des maladies cardiovasculaires et de l'apparition de certains cancers (*Hertog, 1993 ; Knekt, 1997*).

Dans les plantes, les chalcones sont des précurseurs de certains autres flavonoïdes. Catalysée par la chalcone synthase, la cyclisation des 6'-hydroxy chalcones forme des flavanones et finalement plusieurs classes de flavonoïdes, tels que les flavones, flavonols, dihydroflavonols, auronones et isoflavones (*Guignard, 2000*). Les chalcones sont particulièrement présentes dans le vin rouge, le thé, certains citrus, les pommes, l'acacia et le bois de réglisse (*Chinnici, 2004 ; Versari, 1997, Harborne, 1994*). Comme les autres flavonoïdes, les chalcones sont reconnues pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple des activités anti-allergiques, antivirales, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques et antioxydantes (*Rezk, 2002 ; Inamori, 1991 ; Lespagnol, 1971 ; Belofsky, 2004*). Ces activités sont dues en partie à leur capacité à piéger les radicaux libres.

Les radicaux libres centrés sur l'oxygène (l'électron libre est porté par l'atome d'oxygène) sont reconnus pour leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives souvent impliquées dans le développement de nombreuses pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (*Gutteridge, 1993*). Moins étudiés, les radicaux

centrés sur le carbone interviennent dans les phases d'initiation de la peroxydation lipidique ou encore dans la métabolisation des alcools au niveau du foie. Le radical 1-hydroxy-éthyl ($\text{CH}_3\cdot\text{CHOH}$ ou HER pour Hydroxy Ethyl Radical) a notamment été impliqué dans les dégâts et les maladies dus à la consommation abusive d'alcool.

La radiolyse de solutions alcooliques est un moyen d'obtenir ces radicaux centrés sur le carbone. Dans le méthanol et l'éthanol, les principaux radicaux formés sont le radical 1-hydroxy méthyl ($\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ ou HMR pour Hydroxy Methyl Radical), HER et leurs isomères centrés sur l'oxygène $\text{CH}_3\text{O}\cdot$ et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}\cdot$. On note également la présence des radicaux $\text{H}\cdot$ et des électrons solvatés qui peuvent également participer aux réactions redox avec le soluté.

Dans ce travail, nous étudions la radiolyse des flavonoïdes (et notamment des chalcones). La radiolyse des composés phénoliques permet d'une part d'étudier leur réactivité vis-à-vis des radicaux centrés sur le carbone, et d'autre part constitue une première étape dans la compréhension des effets de l'ionisation gamma sur les composés phénoliques présents dans les fruits et légumes. En effet, l'irradiation gamma est utilisée pour décontaminer les aliments en ralentissant le développement des micro-organismes pathogènes. On s'intéresse ici aux transformations que peuvent subir les composés phénoliques présents dans des aliments soumis à une ionisation gamma. Ces modifications sont susceptibles d'affecter les qualités nutritionnelles des aliments ionisés.

La radiolyse des flavonoïdes est effectuée dans le méthanol et l'éthanol ; ces deux solvants organiques permettent, par leurs caractéristiques physico-chimiques, la possibilité d'établir des comparaisons utiles avec l'eau. Le méthanol est un solvant dans lequel de nombreux composés phénoliques non solubles dans l'eau peuvent être dissous. C'est le solvant le moins éloigné de l'eau en terme de polarité et peut, en ces termes, simuler le comportement des produits dans leur milieu naturel, le fruit ou le jus de fruit. Cependant cette similitude est limitée, puisque, comme nous allons le voir dans le chapitre II, les espèces radicalaires les plus réactives formées dans les deux solvants (eau et méthanol) sont assez différentes : $\cdot\text{OH}$ pour l'eau et $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ pour le méthanol. Le radical centré sur l'oxygène ($\text{CH}_3\text{O}\cdot$) issu du méthanol est très vite « isomérisé » en $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$, radical centré sur le carbone et, par conséquent, a priori différent dans son rôle dans la dégradation des solutés.

En solution de radiolyse alcoolique non déaérée, la radiolyse des flavonols entraîne la formation de depsides, par ouverture du cycle central C. Les flavones, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols ne montrent aucune dégradation dans les mêmes conditions d'irradiation. A notre connaissance, aucune étude n'a été consacrée à la réactivité des chalcones vis-à-vis des radicaux libres issus de la radiolyse des alcools. Nous nous y intéressons parce que ces molécules sont certes des flavonoïdes, mais des flavonoïdes avec la particularité d'avoir un hétérocycle central C ouvert. Nous verrons à travers ce manuscrit que cette particularité change fondamentalement le comportement de ces flavonoïdes en chimie sous rayonnement. Dans ce travail, sont présentés les résultats de la radiolyse gamma de six chalcones et d'une dihydrochalcone en milieu alcoolique (méthanol et éthanol). Une étude analytique de la radiolyse réalisée par Chromatographie Liquide Haute Performance montre la dégradation des chalcones et la formation de produits de radiolyse. Le rôle de l'oxygène dans le processus de dégradation a été évalué en comparant la radiolyse en milieu désaéré et non désaéré. Sur la base des structures des produits identifiés et des connaissances relatives à la radiolyse des alcools, nous proposerons plusieurs mécanismes de transformation pour expliquer la formation des différents produits de radiolyse.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons étudié la composition en composés phénoliques d'un jus d'orange, suivi de son évolution sous rayonnement gamma. Cette étude montre que parmi les produits identifiés l'acide férulique est le plus dégradé par l'irradiation. Comme nous le verrons cet acide phénolique présente une analogie structurale avec les chalcones. Nous présenterons donc la radiolyse de l'acide férulique, en milieu méthanolique, compte tenu de sa faible solubilité *in vitro* en milieu aqueux (comme les chalcones et la plupart des autres flavonoïdes), et nous proposerons un mécanisme de transformation en établissant les similarités observées avec les chalcones.

CHAPITRE I

LES COMPOSES PHENOLIQUES

LES COMPOSES PHENOLIQUES

INTRODUCTION

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances naturelles. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction. Les composés phénoliques des végétaux sont les composés issus de deux grandes voies d'aromagenèse que sont la voie du métabolisme de l'acide shikimique et la voie du métabolisme des polyacétates. Certains sont issus d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate entraînant ainsi la formation de composés mixtes. Cette voie intermédiaire est notamment à l'origine de tous les flavonoïdes (*Bruneton, 1999*).

Les flavonoïdes sont donc des molécules d'origine naturelle que l'on retrouve dans tout le règne végétal, et notamment dans les plantes médicinales, les fruits et les légumes. La grande famille des flavonoïdes regroupe les flavanones, les flavonols, les flavones, les dihydroflavonols, les chalcones, les flavan-3-ols, les isoflavones, les isoflavanones, les aurones, les anthocyanes, les coumarines. Les chalcones sont précurseurs des autres flavonoïdes. Elles sont synthétisées dans les plantes par la chalcone-synthase mais peuvent également être synthétisées par la condensation de Claisen-Schmidt. Dans ce chapitre nous présenterons dans un premier temps la famille des flavonoïdes, puis nous détaillerons le cas des chalcones et leur distribution dans le règne végétal. Nous présenterons ensuite les différentes activités biologiques de ces composés. En fin de chapitre nous nous intéresserons également à des composés phénoliques plus petits, les acides phénoliques.

I. STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (*Bruneton, 1999*). Plus de quatre mille flavonoïdes différents ont été identifiés. Plus ou moins hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas notamment des flavonoïdes « jaunes » dont font partie les chalcones, les

aurones et les flavonols jaunes. Les anthocyanosides peuvent être de couleur rouge, bleue ou violette. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration en jouant le rôle de co-pigments, tels que les flavones et les flavonols incolores. Certaines de ces molécules absorbent également dans une zone proche de l'ultraviolet. La « coloration » de ces molécules n'est alors perçue que par les insectes qui vont permettre la pollinisation des végétaux assurant ainsi la survie de l'espèce.

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles au niveau desquelles ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement solaire.

Tous les flavonoïdes (au sens large) ont une origine biosynthétique commune ce qui explique le fait qu'ils possèdent le même élément structural de base qui est l'enchaînement 2-phénylchromane (**Figure 1**). Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

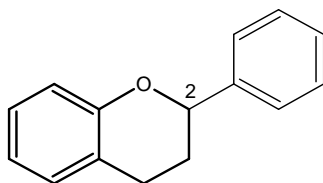


Figure 1 : Squelette de base commun d'un 2-phénylchromane

I.1. FLAVONES ET FLAVONOLS

Les flavones (R = H, **Figure 2**) sont dérivées de la 2-phényl-chromone : elles représentent avec les flavonols (R = OH, **Figure 2**) la plus grande classe des flavonoïdes connus.

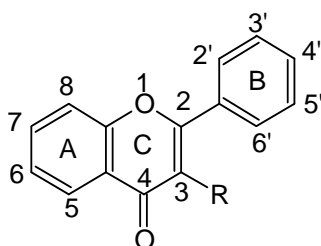


Figure 2 : Squelette de base des flavones (R = H) et flavonols (R = OH)

Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux groupes hydroxyles en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. L'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des fréquences variables notamment en C-6 et C-8, où l'on peut observer des groupements hydroxyles libres ou étherifiés, des isoprénylations, des méthylations, ou encore des liaisons carbone-carbone avec un sucre.

Le cycle B, substitué dans 80% des cas en C-4', peut être 3', 4'-disubstitué, 2', 4'-disubstitué, voire 3', 4', 5'-trisubstitué. Les substituants sont des groupements hydroxyles ou méthoxyles. La position 6' est très exceptionnellement substituée.

Les flavonols diffèrent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3.

I.2. FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison 2,3 et donc par la présence d'un ou de deux centres d'asymétrie. Les dihydroflavonols se différencient des flavanones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 (**Figure 3**). Pour les flavanones naturelles, le carbone C-2 est normalement de configuration *S*. La presque totalité des dihydroflavonols sont de configuration *2R*, *3R*. Le phényle et l'hydroxyle de ces molécules sont *trans*, mais des formes *cis* ont également été observées (Chosson, 1998 et Tofazzal, 2000). Les variations structurales de ces composés sont les mêmes que celles décrites pour les flavones et flavonols. Ces composés sont toutefois moins fréquents que leurs homologues insaturés.

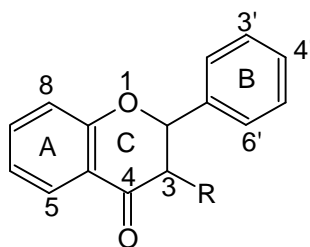


Figure 3 : Squelette de base des flavanones (R = H) et dihydroflavonols (R = OH)

I.3. CHALCONES ET AURONES

Les chalcones (**Figure 4**) sont dépourvues du cycle pyranique central et sont, chimiquement parlant, des 1,3-diaryl-2-propen-1-ones. Ces composés sont caractérisés par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α,β -insaturé. On remarquera sur la **Figure 4** que la numérotation est inversée par rapport à celle des autres flavonoïdes (**Figures 2 et 3**). Sur le noyau A les substitutions en C-2' et C-4' sont courantes, comme pour les autres flavonoïdes. Les atomes C-6', C3', C2, C-3 et C-4 sont peuvent également être substitués par des groupes hydroxyles ou méthoxyles. Les aurones (**Figure 4**) sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène-coumaranone.

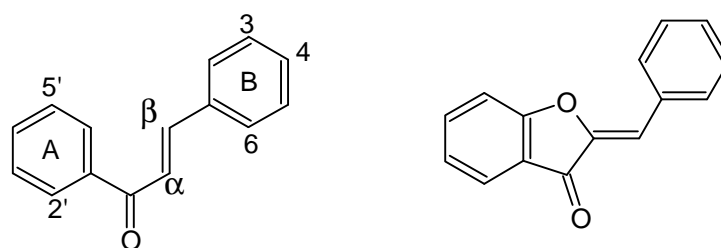


Figure 4 : Squelettes de base des chalcones et des aurones

Les dihydrochalcones sont des molécules privées de la double liaison au niveau de la chaîne aliphatique. Les exemples les plus connus et les plus étudiés sont la phloridzine et son équivalent aglycone qui est la phlorétine (2,4,4',6-tétrahydroxychalcone) (*Kutner, 1987a; Silfen, 1988*)

I.4. ORIGINE BIOSYNTHETIQUE DES FLAVONOÏDES

Les chalcones occupent une place importante parmi les produits naturels, ce sont des intermédiaires clés dans la biosynthèse des autres flavonoïdes. Elles peuvent être obtenues par condensation aldolique de dérivés d'acétophénones et de benzaldéhydes substitués (catalyse acide ou basique).

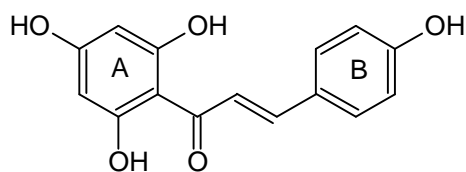


Figure 5 : structure de la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone

Comme nous le détaillerons dans le paragraphe suivant, la formation des chalcones est catalysée par la chalcone-synthase (CHS). Les chalcones sont les métabolites principaux dans la biosynthèse des flavonoïdes (**Figure 6**), en réalité, le précurseur commun des flavonoïdes est la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone racémique. En effet, la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme, la chalcone-isomérase (CHI), qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle central (C), c'est une addition *syn* sur la double liaison *E* conduisant à la (2-*S*)-flavanone. Sous l'action de la flavone-synthase ou de la β -hydroxylase (F_3H), cette flavanone se métabolise pour donner la formation de la flavone ou du dihydroflavonol, respectivement (**Figure 6**). Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3 en présence de l'oxoglutarate, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3 de façon univoque. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol-synthase ou de la dihydroflavonol-4-réductase (DFR), se métabolise respectivement en flavonol ou en flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidol) (**Figure 6**). Le mécanisme de formation des anthocyanosides se fait par glucosylation sous l'action de l'uridine flavonoïde glycosyl-transférèse (UFGT). Tous ces composés sont substitués différemment (groupements hydroxyyles, méthoxyyles ou encore des sucres) sur les deux cycles aromatiques A et B et sur le cycle C en C3.

Une majorité de ces produits se trouve, à l'état naturel, sous forme de glycosides, une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyyles sont alors glycosylées.

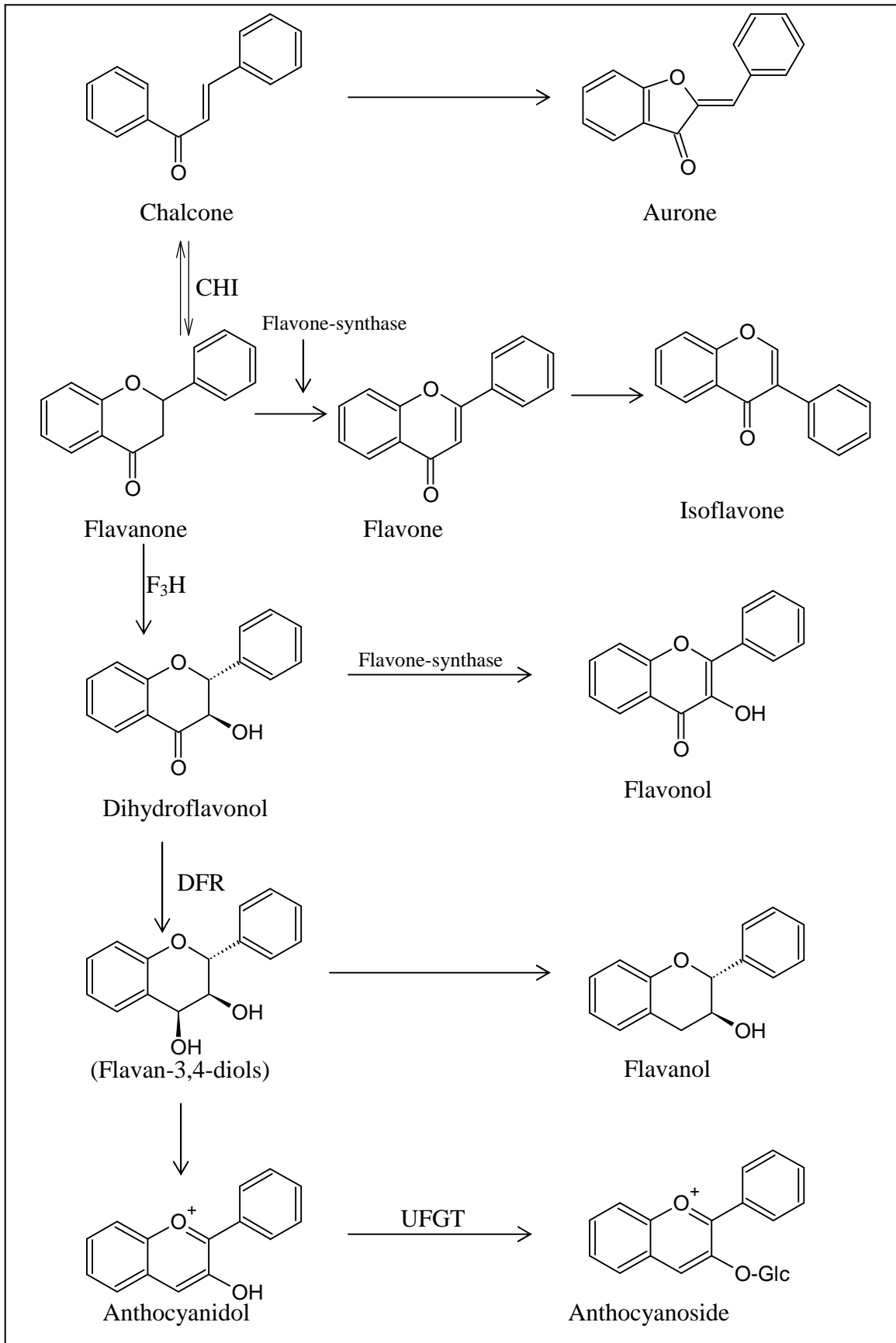


Figure 6 : La biosynthèse des principaux types de flavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Guignard, 2000).

De ce qui précède, nous constatons l'importance des chalcones dans la biosynthèse des flavonoïdes, ainsi que leur rôle dans le processus de métabolisation des plantes, fruits et légumes.

II. PRESENTATION DETAILLEE DES CHALCONES

II.1 BIOSYNTHESE DES CHALCONES

La biosynthèse des chalcones se fait principalement par condensation d'un triacétate (cycle A) et d'un acide cinnamique (4-coumaroylCoA, cycle B), après addition de trois malonates et d'un cinnamoyl-CoA (**Figure 7**).

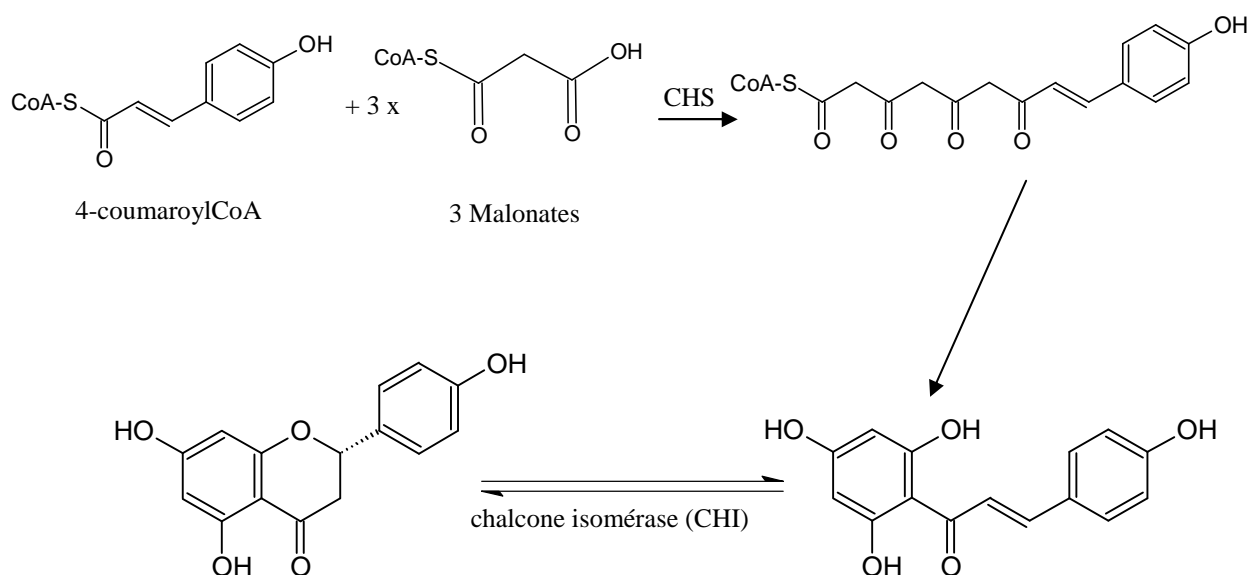


Figure 7 : Formation du noyau chalcone, point de départ de la biosynthèse des flavonoïdes (*Guignard, 2000 ; Moore, 2002 ; Eckermann, 2003*).

Les chalcones peuvent se trouver dans le règne végétal sous forme glycosylées ou non, substituées différemment sur les deux cycles A et B. La chalcone la moins hydroxylée et la plus facile à synthétiser est la 2'-hydroxychalcone. Dans les fruits et légumes on retrouve les chalcones privées de la double liaison, les dihydrochalcones. La phlorétine est la dihydrochalcone la plus courante, elle est présente notamment dans les pommes.

Du fait de leur capacité à interagir avec les différentes enzymes et hormones végétales, les chalcones possèdent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, des fruits et des légumes. Certaines d'entre sont synthétisées par les plantes pour jouer le rôle de phytoalexine, un métabolite chargé de lutter contre les infections causées par des champignons ou par des bactéries.

II.2 DISTRIBUTION ET LOCALISATION DES CHALCONES

Ces dix dernières années, de nombreux travaux ont montré leurs effets bénéfiques sur la santé des flavonoïdes et plus particulièrement des chalcones (*Bronner, 1995; Hollman, 1996; Crozier, 1997*). Le **tableau 1** résume la distribution des chalcones et de leurs dérivés (chalcones glycosilées et dihydrochalcones) dans le règne végétal.

Chalcones	Sources	Références
Isosalipurpurin (4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone)	Pommes, citron	<i>Tomas-Barberan, 2000</i>
Retrochalcone		
Pinostrobin chalcone	<i>Propolis brazillien</i>	<i>Yong, 2002</i>
2',4' dihydroxy-6'-méthoxydihydrochalcone	Fruit de la <i>Cedrelopsis grevei</i> (Madagascar)	<i>Koorbanally, 2003</i>
2'-hydroxy-4',6'-diméthoxychalcone		
2'-hydroxy-3,4,5,4',6'- pentaméthoxychalcone	<i>Neoraputia</i> (brésil)	<i>Tomazela, 2000</i>
2'-hydroxy-3,4,5,4',-tétraméthoxy-5',6'- (2'',4''-diméthylpyrano)chalcone		
Naringénine-chalcone	Tomates	<i>Le gall, 2003</i> <i>Arabbi, 2004</i>

Phloridzine	Différentes variétés de pommes et de poires	<i>Vrhovsek, 2004</i> <i>Chinnici, 2004</i>
3-hydroxyphloridzine		
phlorétine-xyloglucoside		
2',4'-dihydrox-3'-(2,6- dihydroxybenzyl)-6'méthoxychalcone	<i>Desmos chinoise</i> (plante médicinale)	<i>Rahman, 2003</i>
2',4'-dihydroxydihydrochalcone	<i>Muntingia calabura</i> (Pérou)	<i>Bao-Ning, 2003</i>
2'-hydroxy-4,5,4',5',6'- pentaméthoxychalcone	Citron	<i>Barua, 1978</i>
2',4'-dihydroxy-5',6'-diméthoxychalcone	<i>Uvaria dulcis</i>	<i>Chantrapromma,</i> <i>2000</i>
2',4'-dihydroxy-5',6'- diméthoxydihydrochalcone		
2',4'-dihydroxychalcone	<i>Zuccagnia punctata</i>	<i>Svetaz, 2004</i> <i>De la rocha, 2003</i>
2',4'-dihydroxy-3'-méthoxychalcone		
3',5'-dihydroxy-2',4',6'- triméthoxydihydroxychalcone	<i>Lindera Lucida</i>	<i>Leong, 1998</i>
2'-O-(6''-Oacetylglucopyranosyl)-4,4',6'- trihydroxydihydrochalcone	<i>loiseleuria</i> <i>procumbens</i>	<i>Cuendet, 2000</i>
2',3,4',6'-tetrahydroxy-4-méthoxy- 3',5-di-(3,3-diméthylallyl)-dihydrochalcone	Fruit <i>demetrodorea</i> <i>nigra</i>	<i>Adolfo, 1995</i>
Phlorétine	Pommes, citron	<i>Versari, 1997</i>
4,2',4'-trihydroxychalcone		

Tableau 1 : Résumé la distribution des chalcones et leurs dérivés dans le règne végétal.

II.3. SYNTHÈSE ORGANIQUE DES CHALCONES

La 2'-hydroxychalcone occupe une place centrale dans la biogénèse mais également dans la synthèse des différents flavonoïdes. La condensation de Claisen-Schmidt entre la 2-hydroxyacétophénone (cétone) et un benzaldéhyde (aldéhyde) en milieu alcalin est la réaction la plus ancienne (**Figure 8**), la plus simple et la plus fréquemment utilisée pour la synthèse des chalcones (*Dhar, 1981 ; Rani, 1986 ; Babber, 1987*). La réaction est effectuée en milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) à température ambiante pendant 24 à 48 heures ou à reflux pendant 1 à 2 heures, en présence de potasse ou de soude. Les rendements de la réaction obtenus sont relativement faibles et dépendent des conditions expérimentales utilisées, la formation de produits secondaires n'est pas exclue. La condensation entre l'acétophénone et le benzaldéhyde dans un rapport 1/1 aboutit à la formation de la chalcone, alors que dans un rapport 2/1, la formation de la chalcone est défavorisée au profit de la formation du benzylidènediacétophénone (*Dhar, 1959*). D'autres produits secondaires ont été observés, notamment suite à la réaction de Cannizzaro qui peut être favorisée par une forte concentration d'alcali (catalyseurs basiques). Cette réaction peut être limitée par l'emploi d'un excès de benzaldéhyde.

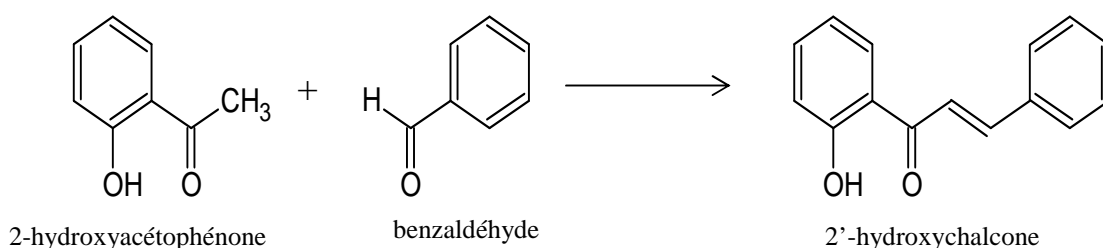


Figure 8 : Réaction de synthèse des chalcones selon la condensation de Claisen-Schmidt.

Plusieurs réactifs de condensation et conditions expérimentales ont été évalués dans la réaction de Claisen-Schmidt :

- ✓ La réaction est réalisable en présence de chlorure de triéthyle benzyle ammonium (TEBA) dans des conditions homogènes (NaOH / H₂O / C₂H₅OH / TEBA pendant 24h à 30°C),
- ✓ Une catalyse par l'hydroxyde de baryum partiellement déshydraté, permet d'obtenir des rendements intéressants (*Alcantara, 1987 ; Santhyanarayana, 1988*).

Plusieurs autres réactifs ont été utilisés comme catalyseurs, on peut citer le méthoxyde ou l'éthoxyde de sodium, le borax, le chlorure d'aluminium, le trifluorure de bore ou encore l'acide fluorhydrique (Dhar, 1959).

Il existe d'autres voies de synthèse des chalcones autres que la condensation de Claisen-Schmidt :

✓ Méthode 1 : c'est une méthode qui consiste à faire interagir les éthers phénoliques **A** (particulièrement ceux contenant un substituant en *para* du groupement alkoxy) avec le chlorure de cinnamoyle **B** en présence de chlorure d'aluminium (**Figure 9**). Ceci permet de synthétiser la 2'-méthoxy-5'-méthylchalcone **C**. Il est à noter toutefois qu'un excès de chlorure d'aluminium entraîne une déméthylation et mène à la 2'-hydroxy-5'-méthylchalcone.

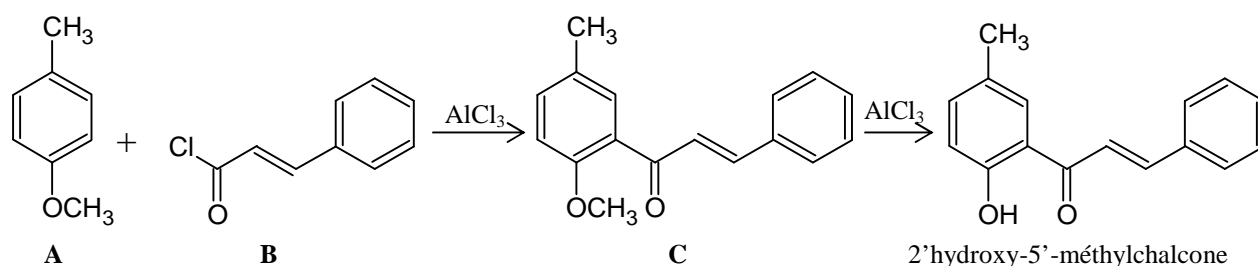


Figure 9 : Réaction de synthèse des chalcones à partir d'éthers phénoliques et le chlorure de cinnamoyle.

✓ Méthode 2 : on peut synthétiser les polyhydroxychalcones selon la réaction de Behn qui consiste à mettre en réaction les polyhydroxyphénols (**D**) avec le chlorure de cinnamoyle (**E**) en présence du nitrobenzène et de chlorure d'aluminium (**Figure 10**). La 2',4'-dihydroxychalcone peut ainsi être obtenue.

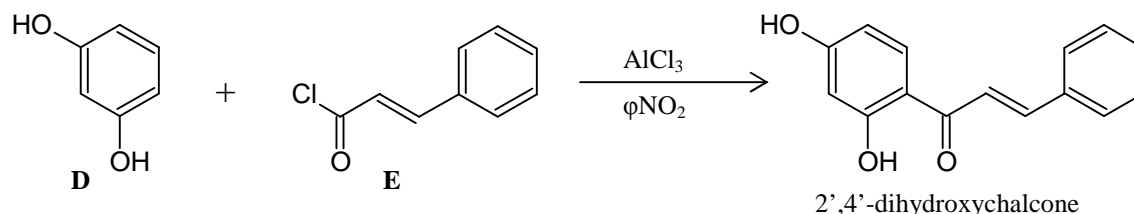


Figure 10 : Réaction de synthèse 2',4'-dihydroxychalcone à partir du résorcinol et le chlorure de cinnamoyle.

✓ Méthode 3 : la 2',4'-dihydroxychalcone peut être obtenue par condensation entre le résorcinol et l'acide cinnamique (au lieu de cinnamoyle) en présence de l'acide fluorhydrique. Par contre, la réaction entre le phloroglucinol (F) et le cinnamoyle (G) aboutit à la formation de la 2',4',6'-trihydroxychalcone qui se cyclise pour donner la formation 5,7-dihydroxyflavanone (**Figure 11**).

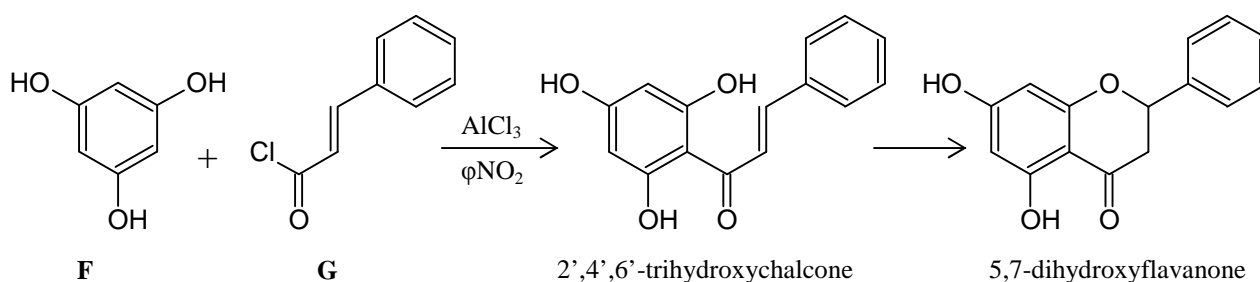


Figure 11 : Réaction de formation de la 2',4',6'-trihydroxychalcone à partir du phloroglucinol et le chlorure de cinnamoyle.

✓ Méthode 4 : cette méthode de synthèse des chalcones consiste en l'ouverture de l'hétérocycle central de la flavanone. En effet, l'interconversion entre ces deux classes, au moyen d'acides ou de bases, est relativement aisée. Il existe en fait un équilibre chimique entre une flavanone et la 2'-hydroxychalcone correspondante. Cet équilibre dépend de nombreux facteurs tels que le pH, la température, le solvant utilisé ou encore le motif de substitution. Ainsi en règle générale, en milieu alcalin, les flavanones se réarrangent en 2'-hydroxychalcones.

Il a été rapporté dans la bibliographie que les chalcones peuvent se transformer en flavanones, en milieu acide (*Geisman, 1962, Harborne 1975*), suivant le schéma réactionnel suivant :

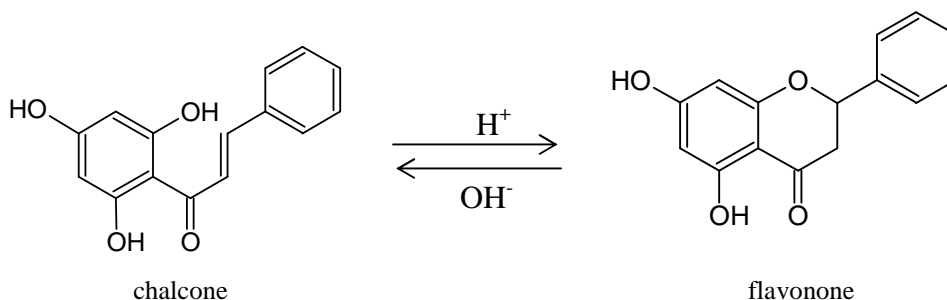


Figure 12 : Equilibre chimique entre chalcone et flavanone.

II.4.LES PROPRIETES BIOLOGIQUES

La présence de la double liaison et du groupe carbonyle dans les chalcones leur confère plusieurs activités biologiques. Parmi ces activités on peut citer les activités antibiotique, anti-fongique, anti-inflammatoire (*Svetaz, 2004 ; Pappano, 1985 ; Tsuchiya, 1994 ; Iwata, 1997*). Ces propriétés dépendent du nombre et de la position des groupements hydroxyles greffés sur les deux cycles aromatiques, de la présence ou non de la double liaison ainsi que des groupements fixés sur la chaîne aliphatique.

II.5.1. Activité antioxydante

Les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre (*Halliwell, 1994*) :

- ✓ Le piégeage direct des espèces réactives oxygénées (ROS).
- ✓ L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- ✓ La protection des systèmes de défense antioxydants.

La xanthine-oxydase est considérée comme une source biologique importante de radicaux libres. Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique, produisant ainsi des radicaux superoxydes. La 3,3',4,4'-tetrahydroxychalcone a été testée dès les années 50 par des chercheurs sur des rats (*Beiler, 1952*), et a révélé une bonne activité inhibitrice de la xantine oxydase. Des tests *in vivo*, sur des rats, de la naringénine-chalcone, l'hesperidine-chalcone et la phoridzine ont démontré les mêmes activités inhibitrices de la xantine oxydase (*Beiler, 1952*). L'inhibition de ces molécules dépend de la position et du nombre des groupements hydroxyles greffés sur les deux cycles aromatiques.

Il a été montré que l'activité antioxydante des flavonoïdes est due principalement aux groupements OH greffés sur les cycles aromatiques. La **Figure 13** donne un aperçu général du rôle des différents groupes fonctionnels présents dans les chalcones dans l'activité antioxydante, sur la base des concentrations nécessaires pour inhiber 50% (CI50) de radicaux peroxy-nitrites (PON) et de la peroxydation lipidique (LPO). Les résultats montrent que le groupe phénol ne présentant qu'un seul groupe OH, est un faible antioxydant. Plus on augmente le nombre de groupements OH, plus l'activité antioxydante augmente : phloroglucinol > résorcinol > phénol. Elle est encore plus importante en présence du groupe carbonyle (2,4,6-trihydroxyacétophénone).

La phlorétine (une dihydrochalcone) présente une forte activité antioxydante, et inhibe la peroxydation lipidique (**Figure 13**). La forte activité de la 2,6-dihydroxyacétophénone est due à la stabilisation de son radical par tautomérie. La CI50 de la phlorétine est de 3,1 μM pour l'inhibition du PON et 24 μM pour l'inhibition de la LPO (**Figure 13**). Le remplacement de deux groupes OH par le glucose dans la phloridzine diminue les activités antioxydantes par rapport à la phlorétine. Les groupes hydroxyles du sucre n'ont aucun rôle dans l'activité antioxydante de la phloridzine, la CI50 du glucose étant de plus de 1000 μM (*Rezk, 2002*).

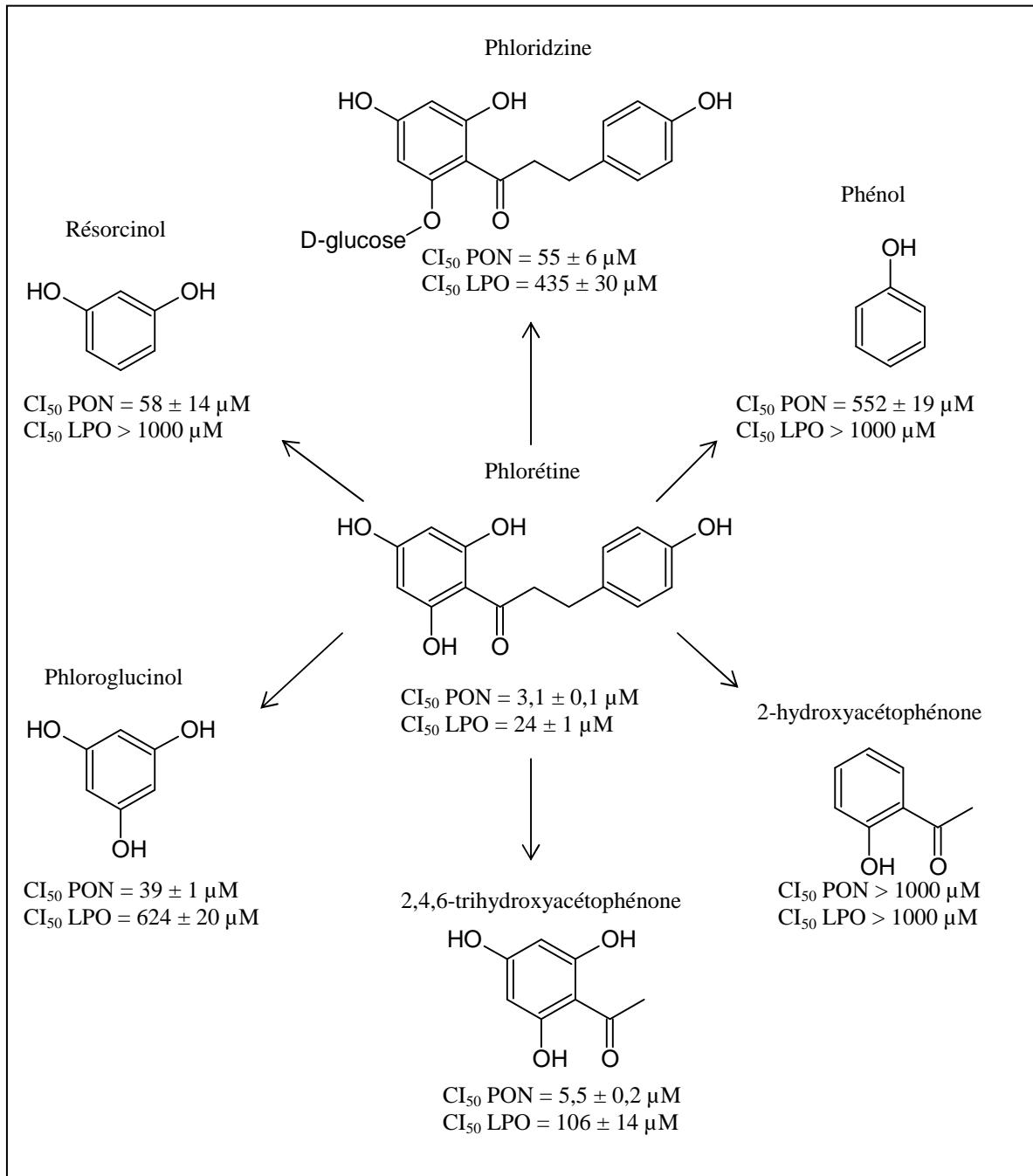


Figure 13 : Comparaison de l'activité antioxydante des dihydrochalcones (phlorétine et phloridzine) et de quelques phénols. L'activité est exprimée par la concentration nécessaire pour inhiber 50% du peroxy-nitrite (PON) et la peroxydation lipidique (LPO) (Rezk, 2002).

II.5.2. Autres activités biologiques

L'activité antibiotique des chalcones est associée à la présence de la double liaison, l'amélioration de l'activité antibiotique dépend de la substitution de la double liaison. Des tests *in vitro* ont montré que les chalcones présentent une activité antibiotique importante ainsi que les furanes analogues des chalcones (*Lespagnol, 1971 ; Belofsky, 2004*).

L'activité antibactérienne des chalcones est reliée à la présence à la fois de la double liaison et de la fonction carbonyle (*Inamori, 1991*). Des tests *in vivo* ont montré que la 3'-nitro-4'-hydroxy-2-méthoxychalcone possède une action antibactérienne élevée. Les chalcones substituées par des halogènes (chlore, brome, iode et fluor) sur les cycles aromatiques ont également des activités antibactériennes intéressantes (*Dahr, 1981*).

Plusieurs chalcones (2'-hydroxychalcone, 2',4'-dihydroxychalcone et 2-hydroxy-2'-carboxy-chalcone) possèdent une activité anti-fongique importante (*Boeck, 2005 ; Zheng-xiang, 2004*).

Ces molécules sont également reconnues comme des agents médicinaux précieux pour les maladies cardio-vasculaires et le dysfonctionnement endocrine (*Dahr, 1981*) ; l'héspéridine méthylcarboxy-chalcone exerce une action thérapeutique dans le traitement des maladies chroniques de l'oeil et des reins, en incluant des maladies rhumatoïdes et l'arthrose. Des tests sur des rats ont montré que l'héspéridine-méthylchalcone, incorporée dans l'alimentation (0,2%), a un effet inhibiteur des caries dentaires (*Liming, 2004*).

On peut également noter que certaines chalcones sont utilisées dans les produits insecticides, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, jouant ainsi un rôle dans la protection des plantes (*Dhar, 1981*). Des dérivés des chalcones (4-aminochalcone) sont utilisés en anesthésie (*Hosni, 1975*).

Les chalcones sont très utilisées sous forme d'extraits de plantes médicinales dans les pays d'Afrique et d'Asie contre le malaria (*Dominguez, 2005 ; Liu, 2004*). Elles possèdent des activités anti-inflammatoires (*Viana, 2003*) et antioxydantes (*Yoshimasa, 2003*).

III. LES ACIDES PHENOLIQUES

III.1 DEFINITION

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant une fonction carboxylique et un groupe hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

Ils sont à l'origine de la biosynthèse de nombreuses molécules naturelles, par exemple l'acide cinnamoyle, dérivé de l'acide cinnamique, est un métabolite clé dans la synthèse des chalcones (**Figure 7**).

III.2. STRUCTURE DE BASE

Les acides-phénols en C₆-C₁ (**Figure 14**), dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque sont des composés très communs dans la nature. On trouve ces composés aussi bien sous forme libre que combinés, à l'état d'ester ou d'hétéroside.

Les acides-phénols en C₆-C₃ (**Figure 14**), dérivés de l'acide cinnamique tels que les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique ont une distribution très large. Ces composés sont rarement présents sous forme libre. On les trouve sous forme estérifiée notamment sous la forme d'esters d'alcools aliphatiques (ac. mono- et dicaféyl-tartrique, féruloyl-tartrique, etc...), ou encore d'esters de l'acide quinique (ac. chlorogénique) et de depsides (ac. rosmarinique) (**Figure 14**).

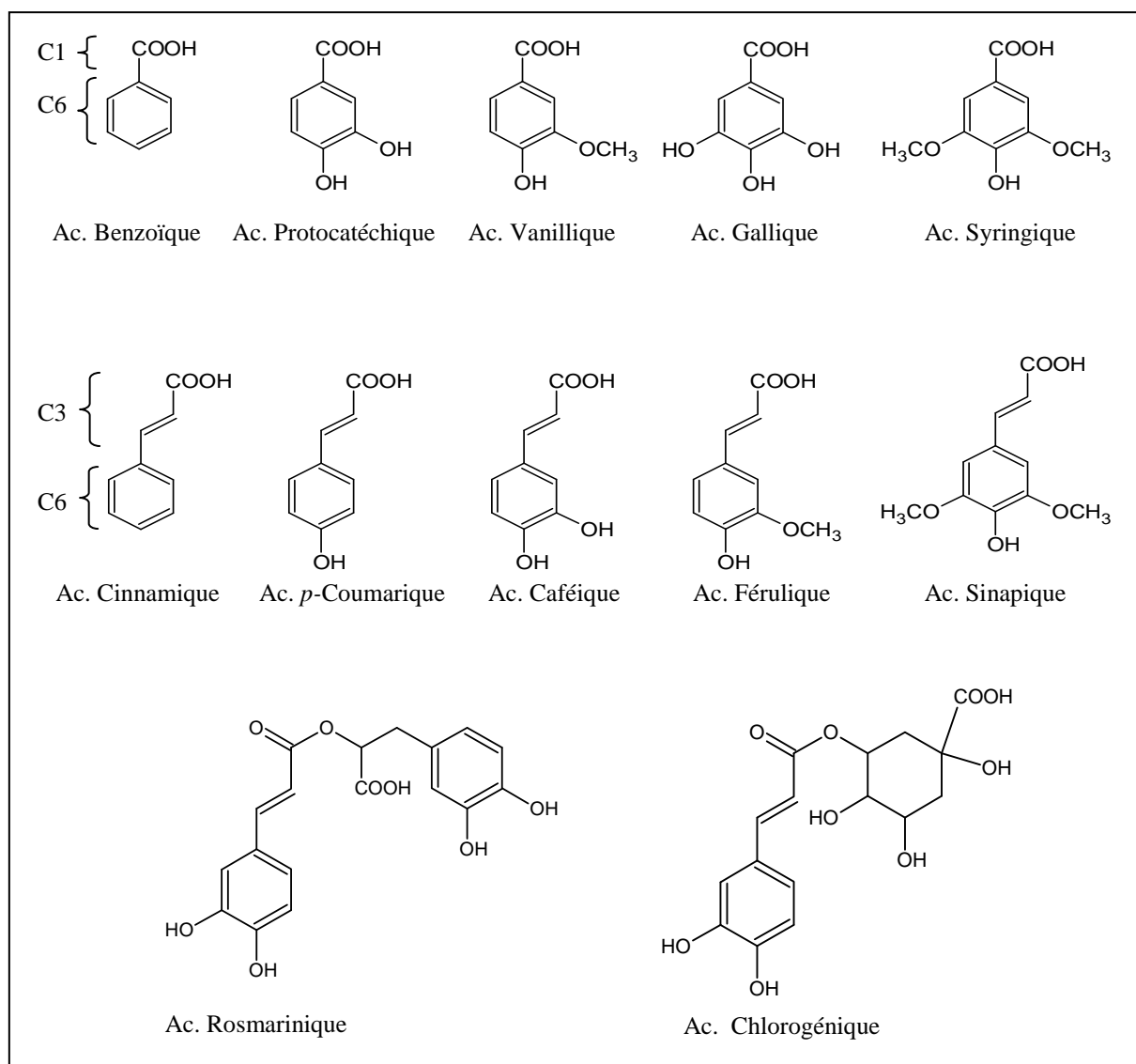


Figure 14 : Quelques exemples d'acides-phénols dérivés de l'acide benzoïque (C1-C6) et de l'acide cinnamique (C3-C6) les plus courants (*Bruneton, 1999*).

III.3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ACIDES PHENOLIQUES

L'activité antioxydante des acides-phénols dépend de plusieurs critères. Le premier critère est le nombre de groupements hydroxyles greffés sur la molécule. Les composés polyphénoliques présentent une activité antioxydante supérieure aux composés monophénoliques, ainsi l'acide gallique possède une activité plus importante que l'acide protocatechique (*Cuvelier, 1992 ; Natella, 1999 ; Terao, 1993*). Le deuxième critère est la présence ou non d'un groupement méthoxyle sur le cycle aromatique. La présence d'un ou

deux groupements méthoxyles en *ortho* par rapport à un hydroxyle va permettre d'augmenter l'activité d'une molécule. Cette substitution en *ortho* par un groupement méthoxyle va, en effet, permettre, grâce à sa propriété électrodonneur, d'augmenter la stabilité du radical aryloxy après l'oxydation de la molécule, et donc d'augmenter son activité antioxydante (Cuvelier, 1992 ; Natella, 1999 ; Terao, 1993).

Enfin, les dérivés de l'acide cinnamique présentent une meilleure activité antioxydante que leurs homologues dérivés de l'acide benzoïque (Rice-Evans, 1996 ; Cuvelier, 1992 ; Natella, 1999). Cette différence d'activité serait due à la double liaison de la chaîne latérale des dérivés cinnamiques. Celle-ci aurait un effet stabilisateur du radical phénoxy par un effet de résonance (Natella, 1999).

Comme les chalcones, les acides-phénols sont des composés connus pour leurs propriétés antioxydantes. Cette capacité à piéger les radicaux libres leur permet d'intervenir dans de nombreux phénomènes biologiques.

Certaines études ont montré que les propriétés antioxydantes de ces composés permettent de protéger la cellule contre un stress oxydant. Des composés tels que l'acide gallique et l'acide protocatéchique (**Figure 14**) sont capables d'augmenter le taux de survie de cellules de la peau soumises à un stress oxydant important (Masaki, 1997).

Les acides-phénols ne sont pas seulement connus pour leur activité antioxydante. Des études ont montré qu'ils présentent également des activités anti-inflammatoire et anti-carcinogène. Certains acides phénoliques, particulièrement l'acide caféique, exercent une activité anti-inflammatoire en inhibant de manière spécifique la synthèse des leucotriènes (Koshihara, 1984). Ces composés, impliqués dans l'initiation des phénomènes inflammatoires, sont synthétisés à partir d'un lipide membranaire particulier, l'acide arachidonique. L'acide caféique bloque la synthèse de ces composés en inhibant de manière spécifique l'enzyme responsable de leur biosynthèse, la 5-lipoxygénase.

L'activité anti-carcinogène des acides-phénols a été démontrée à plusieurs reprises lors d'études réalisées *in vitro* et *in vivo*. Une de ces études a montré que l'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque), administré oralement, peut diminuer le pouvoir carcinogène qu'exerce le diéthylnitrosamine sur les cellules hépatiques de rat (Tanaka, 1993).

CHAPITRE II

IONISATION ET FORMATION DES RADICAUX LIBRES

IONISATION ET FORMATION DES RADICAUX LIBRES

INTRODUCTION

L'irradiation est une technique permettant de réduire, dans certains aliments, la présence de microbes et autres micro-organismes responsables des toxi-infections alimentaires, importantes dans le monde. Elle permet ainsi de prolonger la durée de vie, ou précisément la durée de consommation, des produits alimentaires. Son application est freinée par le consommateur méfiant face à des mots tels que « radiations », « rayonnement ionisant », « radioactivité »... Néanmoins une bonne information du consommateur a déjà permis la commercialisation de certains produits. L'avenir de cette technologie s'avère particulièrement intéressant pour les produits crus.

I. IONISATION DES FRUITS ET LEGUMES

Les besoins alimentaires mondiaux continuent de croître alors même que certains pays sont confrontés à des limitations voire des pénuries, liées notamment aux méthodes de production. En outre les problèmes de stockage et de traitement rendent indispensable la recherche de procédés efficaces de remplacement des méthodes de conservation actuelles. En effet, ces méthodes sont coûteuses en énergie et parfois difficiles à mettre en œuvre à grande échelle dans certaines zones. En conséquence, il paraît nécessaire d'envisager comme possibilité de rechange le recours aux rayonnements ionisants pour le stockage et la conservation des denrées alimentaires, à condition que cette technique n'ait pas d'effet indésirable sur la salubrité et les qualités nutritionnelles des aliments.

Depuis la fin du XVIII^{ème} siècle, les techniques de conservation les plus utilisées sont le traitement par la chaleur (stérilisation, pasteurisation) et par le froid (réfrigération et surgélation). Dans les années 60, apparaît un autre mode de préservation, l'irradiation. C'est

un procédé physique qui consiste à exposer les aliments à un rayonnement ionisant. Les premiers essais ont été réalisés sur des pommes de terre en 1960 afin d'éviter leur germination. Depuis, les autorités de quarante pays ont autorisé l'irradiation de plus de deux cents catégories d'aliments très diversifiés : épices, céréales, viande, fruits et les légumes.

I.1. PRINCIPE

Avec le même but *in fine* (détruire les micro-organismes), la pasteurisation utilise la chaleur, la surgélation utilise les basses températures et l'irradiation utilise l'énergie des rayonnements ionisants.

Le traitement ionisant des aliments (*Vasseur, 1991*) a pour but de les assainir et d'augmenter leur durée de conservation. Ce traitement consiste à soumettre les aliments soit à des rayonnements γ issus du cobalt 60, soit à des rayons X d'énergie inférieure à 5 MeV, soit à un faisceau d'électrons accélérés de moins de 10 MeV. Dans ces conditions, il n'y a aucun risque pour l'aliment parce qu'aucune radioactivation n'est possible à ces énergies et donc aucune contamination radioactive ne peut être induite. Les produits ionisés ne présentent aucune potentialité toxique pour le consommateur comme l'ont reconnu tant l'OMS que les instances nationales françaises.

Les aliments sont alors irradiés dans une chambre aux murs épais, contenant une source de rayonnements ionisants qui passent à travers l'aliment et détruisent les insectes, les bactéries et les autres micro-organismes. Quel que soit le type de rayonnement utilisé (faisceau d'électrons, rayons X ou γ), le processus est le même : l'énergie véhiculée par le faisceau est transférée aux molécules du produit alimentaire irradié, ionisant ou excitant ainsi les atomes du milieu. Les ions ou radicaux ainsi formés détruisent les fonctions normales des différents micro-organismes, diminuent leur activité et par conséquent, diminue l'altération de l'aliment.

I.2. RAYONNEMENTS IONISANTS

Un rayonnement ionisant est un rayonnement dont l'énergie est suffisante pour ioniser les atomes et les molécules qu'il rencontre sur son chemin, c'est-à-dire pour leur arracher un ou plusieurs électrons. Dans le cas où l'apport d'énergie fourni par le rayonnement est trop

faible pour éjecter l'électron hors de l'atome cible, on dit que le rayonnement est non ionisant.

Il existe différents types de radiations ionisantes :

- ✓ Les rayonnements alpha (α) : il s'agit d'un noyau d'hélium He^{2+} (2 protons + 2 neutrons). Ce rayonnement émis par des éléments radioactifs naturels tels que l'uranium et le radium, est très peu pénétrant, il ne traverse pas une feuille de papier.

- ✓ Les rayonnements bêta (β) (**électrons accélérés**) : il s'agit d'électrons se déplaçant à haute vitesse. Ce rayonnement est arrêté par une plaque de plexiglas de 1 cm d'épaisseur. Le traitement par faisceau d'électrons, improprement nommé rayonnement bêta, est reconnu comme une technologie de choix pour provoquer une modification chimique à un niveau moléculaire dans les polymères en couches minces, comme par exemple les tubes thermorétractables et l'isolation des fils et des câbles. Avec les équipements de nouvelle génération (hautes énergies), cette technologie s'est avérée un complément utile à la gamme de procédés de stérilisation disponibles pour stériliser les dispositifs médicaux, les pansements et les produits pharmaceutiques.

- ✓ Les rayonnements gamma (γ) : il s'agit d'ondes électromagnétiques, comme la lumière, mais possédant une très grande énergie. Les rayons γ sont émis par le noyau de l'atome. Le rayonnement γ est en général très pénétrant, il est utilisé dans des domaines très différents. A titre d'exemple d'utilisation du rayonnement γ , citons la radiographie de soudures et la radiothérapie médicale. Ils sont aussi utilisés pour ioniser les denrées alimentaires. On utilise principalement comme source de rayonnements le cobalt 60 (^{60}Co) ou le césium 137 (^{137}Cs).

- ✓ Les rayonnements X : ils résultent de l'interaction d'électrons, préalablement accélérés, avec une cible solide (métal lourd tel que le tungstène). L'interaction de ces électrons avec les atomes du matériau cible se traduit par un transfert d'énergie et donc un ralentissement des particules incidentes. Une fraction de l'énergie cinétique perdue par ces électrons est convertie en chaleur. Une autre partie est rayonnée hors de la cible sous la forme de photons X dont l'énergie peut être variable. Le rayonnement X est également très pénétrant puisqu'il possède des énergies voisines de celles des rayonnements γ . L'application la plus connue des rayons X est naturellement la radiographie dans le diagnostic médical.

L'application de l'irradiation en agro-alimentaire consiste à exposer des aliments, pour un temps donné, à un faisceau d'électrons ou dans la plupart des cas, de rayons γ . A l'inverse des micro-ondes qui ont pour effet de produire de la chaleur et de cuire la nourriture, l'irradiation n'entraîne pas une élévation marquée de la température au sein de l'aliment. C'est pourquoi le processus d'irradiation est souvent appelé pasteurisation froide.

I.3. DEFINITION DE LA DOSE

Pour quantifier l'action du rayonnement ionisant sur la matière, on calcule la dose absorbée. C'est la mesure de l'énergie que le rayonnement dépose par unité de masse de matière. L'unité de dose absorbée est le Gray (Gy) qui correspond à une énergie de 1 Joule (J) déposée par kilogramme (kg) de matière :

$$D = \frac{E}{m}$$

L'unité de dose est le Gy :

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.kg}^{-1}$$

Les industriels ont commencé à s'intéresser aux radiations pour limiter ou ralentir l'altération des produits alimentaires dès les années 50. Les experts de l'OMS ont essayé de statuer à de nombreuses reprises et ont finalement reconnu l'innocuité de ce traitement (*comité mixte d'experts OMS/FAO/AIEA, 1981*). Il faut noter que c'est la première fois qu'un tel effort a été apporté pour s'assurer de la non toxicité d'un procédé et ce, préalablement au véritable développement industriel.

Le groupe d'étude de l'OMS (*OMS, 1997 et 1999*) a même décidé de ne fixer aucune limite de dose, tant toxicologique que nutritionnelle, car l'application industrielle de ce traitement est toujours limitée. L'OMS est d'autant plus en faveur du développement de ce procédé qu'elle est de plus en plus inquiète des accidents dus à divers contaminants de la chaîne alimentaire. Dans tous les cas les doses les plus utilisées ne dépassent pas 10 kGy. Cette dose a été reconnue par le Codex Alimentaire comme non dangereuse pour la santé humaine.

I.4. AVANTAGE DE L'IONISATION

Les rayonnements ionisants provoquent des changements d'ordre structurel, biochimique et biophysique. Comme pour d'autres traitements physiques tels que le traitement thermique dont les effets dépendent de la température utilisée, les effets des rayonnements varient selon la dose appliquée. Ces effets diffèrent d'un micro-organisme à l'autre et d'un aliment à l'autre. Les fruits possédant une certaine acidité, seront préférentiellement la cible des champignons microscopiques ou des moisissures. Les légumes peu acides ou légèrement basiques, verront également leur qualité atteinte par des bactéries, entraînant des phénomènes de pourriture. Le traitement ionisant permet de ralentir notablement le développement de ces bactéries et des levures (*Scandella, 1987*). Elle détruit les germes pathogènes dans les viandes, en particulier le porc et la volaille fortement contaminés par *Salmonella* ou *Campylobacter*, il faut noter que l'on procède rarement à l'ionisation des viandes car elles changent de couleur et deviennent difficile à commercialiser. Les doses de traitement, bien que théoriquement comprises entre 1 et 10 kGy se limitent le plus souvent à 3 ou 4 kGy. Les doses les plus couramment utilisées en agro-alimentaire varient de 0,10 kGy à 10 kGy. Les principales conséquences sont les suivantes (*Urbain, 1986*) :

- ✓ Désinsectisation : appliqués à des doses faibles (0,02 – 0,15 kGy), les rayonnements ionisants peuvent empêcher la reproduction ou tuer les insectes et autres parasites.

- ✓ Blocage des centres végétatifs : à des doses comprises entre 0,1 et 0,5 kGy, la germination des bulbes et tubercules est inhibée. De très bons résultats ont été obtenus sur l'oignon, l'ail et la pomme de terre (*Brunelet, 1960*). Le traitement peut alors être employé en remplacement des inhibiteurs chimiques. Appliqué à ces doses, le traitement ionisant stoppe la croissance des tiges et bourgeons notamment pour l'asperge (*Broddrick, 1983*).

- ✓ Des doses de 0,15 à 3 kGy permettent de réduire les populations d'insectes (destruction des embryons et larves, stérilisation des adultes) qui détruisent les céréales, les fruits ou légumes secs. Elles permettent également d'éliminer complètement certains parasites des viandes (trichines dans la viande de porc par exemple). L'ionisation permet également la réduction voire la destruction du nombre total de micro-organismes pathogènes : les plus grands ennemis des fruits et légumes frais sont les micro-organismes qui vont les atteindre et

déprécier leur qualité. Elle peut être envisagée pour remplacer d'une part le froid et d'autre part les produits chimiques appliqués juste avant ou juste après la récolte.

- ✓ Des doses de 2 à 5 kGy sont applicables à la conservation des viandes pré-découpées ou séparées mécaniquement, ainsi que des poissons et des crustacés. Le but est de réduire très sensiblement les populations des micro-organismes impliqués dans la dégradation de ces produits et d'éliminer les micro-organismes pathogènes ou pouvant élaborer des substances toxiques.

- ✓ Des doses de 5 à 10 kGy peuvent être utilisées pour traiter des charcuteries, des semi-conserves, des plats cuisinés, des épices, des aromates, des gommes, des additifs alimentaires... Ces derniers constituent des milieux particulièrement favorables à la prolifération des micro-organismes contaminants, accentuant parfois la radiorésistance.

- ✓ Augmentation de la durée de survie après la récolte : par son action sur le métabolisme cellulaire, l'ionisation retarde la maturation (banane, mangue) ou la sénescence (fraise, framboise) de certains fruits.

Le **Tableau 2** récapitule les gammes de doses appliquées pour chaque procédé d'utilisation des rayonnements ionisants :

Dose (kGy)	Effets
0,04 à 0,10	Inhibition de la germination
0,03 à 0,20	Incapacité à se reproduire des insectes
1 à 3	Mort des insectes
1 à 4	Destruction partielle ou totale de la charge microbienne
1 à 6	Destruction des germes pathogènes (équivalent d'une pasteurisation)
15 à 50	Stérilisation

Tableau 2 : Effets positifs du traitement ionisant des aliments (*Raffi, 2001*).

- ✓ Cette méthode a aussi l'avantage indéniable de remplacer l'utilisation d'agents de fumigation, notamment l'utilisation du dibromure d'éthylène qui est de plus en plus controversée, il est interdit en Australie, au Canada, au Japon et aux Etats-Unis depuis 1984.

L'ionisation pourra également remplacer l'utilisation d'autres agents de stérilisation comme l'oxyde d'éthylène et les nitrites. Ces substances chimiques peuvent favoriser le développement de cancers (*Vasseur, 1991*).

II. RADIOLYSE DES ALCOOLS ET FORMATION DES RADICAUX LIBRES

II.1 INTRODUCTION

La radiolyse est l'ensemble des transformations chimiques provoquées dans la matière par l'absorption de l'énergie d'un rayonnement ionisant. Elle résulte de l'interaction Energie-Matière, au même titre que la photolyse. Ces interactions sont quantifiées par le rendement radiolytique G donné par l'équation suivante (*Fricke, 1966*) en $\mu\text{mol J}^{-1}$:

$$G = \frac{\Delta M}{D \times \rho} \times 10^6 \mu\text{mol J}^{-1}$$

où ΔM est la concentration en mol/l (M), D est la dose et ρ la densité du milieu irradié.

Le schéma de la **Figure 15** résume l'ensemble des processus qui peuvent se produire depuis l'absorption initiale de l'énergie d'un rayonnement ionisant jusqu'à la formation des produits stables. Il inclut les réactions de recombinaison à tous les stades, éventuellement des réactions d'attachement électronique (dissociatif ou non) et des réactions en chaîne de polymérisation amorcées par les ions.

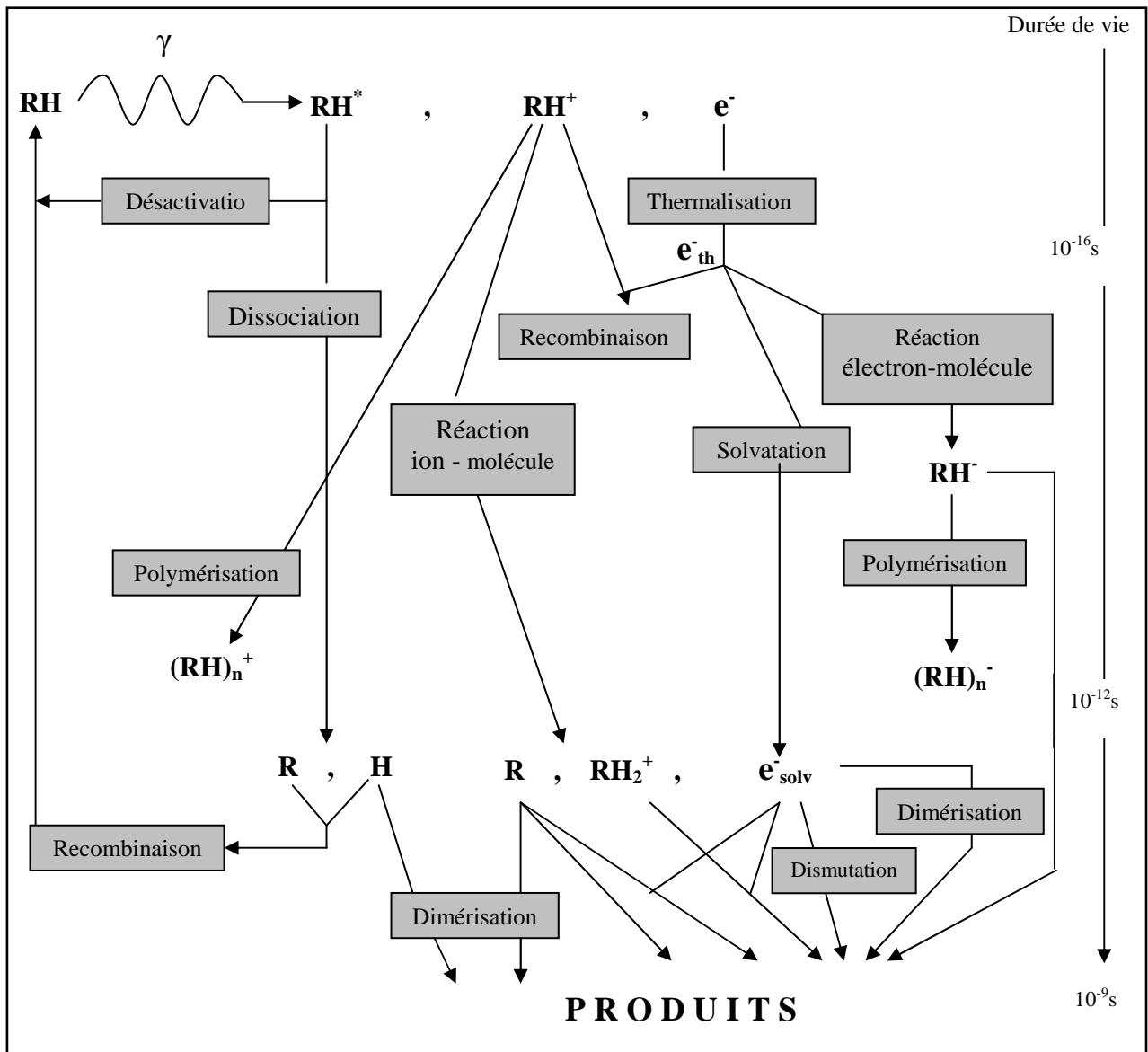


Figure 15 : Différentes étapes du processus d'ionisation des solvants organiques (Belloni, 2001).

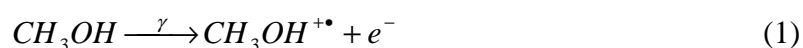
L'ensemble des réactions qui se produisent dans le milieu réactionnel, donne lieu à la formation de plusieurs espèces réactives, notamment les radicaux libres. On appelle radical libre toute espèce chimique (atome ou molécule) qui possède un ou plusieurs électrons célibataires. La perte d'un électron et la formation d'un radical ne sont que transitoires et sont compensées très rapidement par des recombinaisons ou des transferts d'électrons. Les radicaux libres sont souvent présents dans des étapes transitoires et notamment des réactions d'oxydoréduction. Les radicaux libres formés par la radiolyse des solvants vont notamment pouvoir réagir avec le soluté, pouvant engendrer la dégradation de ce dernier. Il est donc important d'établir une liste la plus exhaustive possible de toutes les espèces réactives qui

seront formées dans les solvants irradiés. La radiolyse de l'eau a été largement étudiée depuis de nombreuses années et a permis de dresser une telle liste. Nous nous proposons maintenant de présenter les différentes étapes de la radiolyse d'une façon générale, puis celles particulières au méthanol et à l'éthanol. Nous présenterons également et d'une manière générale les interactions avec le soluté et nous terminerons ce chapitre par le comportement de l'oxygène moléculaire avec les espèces réactives présentes dans le milieu de radiolyse.

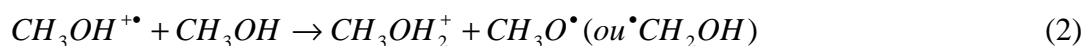
II.2. RADIOLYSE DU METHANOL

Le méthanol est un solvant particulièrement intéressant à divers égards. D'une part, c'est un solvant qui a fait l'objet d'une longue recherche, beaucoup d'études ont développé récemment sa réactivité avec les rayonnements ionisants (*Getoff, 1993; Brik, 1993; Bugaenko, 1993; Bernas, 1994; Zhang, 1994; Abramczyk, 1994; Parenteau, 1994; Harris, 1995*). Il est le solvant le plus universellement utilisé, du fait de sa polarité qui permet de solubiliser une grande partie des molécules organiques.

Le méthanol peut ainsi être utilisé comme solvant pour étudier la radiolyse de divers solutés solubles dans ce milieu et non solubles dans l'eau telles que les chalcones. La première réaction du méthanol pur après absorption d'un rayonnement ionisant est l'ionisation primaire :



Elle serait suivie par la réaction très rapide (*Ellison, 1972*) de transfert de proton



Divers travaux (*Wargon, 1972; Baxendale, 1975; Shiotani, 1976, 1978; Getoff, 1993*) ont indiqué que l'espèce radicalaire primaire CH_3O^\bullet est formée préférentiellement par rapport au radical 1-hydroxyméthyl $\bullet CH_2OH$ noté HMR. Quant à l'électron éjecté, il perd son énergie par ionisations et excitations successives et devient thermalisé, puis solvaté (e_s^-) (*Pépin, 1994, 1996*). Au cours de son ralentissement, il peut également subir la réaction de recombinaison géminée:



CH_3OH^* représente une molécule de méthanol excitée qui peut, à son tour, donner les deux radicaux H^\bullet , $^\bullet CH_2OH$ (ou CH_3O^\bullet) ou encore une molécule d'hydrogène H_2 et une molécule de formaldéhyde H_2CO . Il a, par ailleurs, été avancé que l'électron e^- pouvait donner lieu, en compétition avec la solvataion, à des réactions chimiques et en particulier réagir rapidement avec le méthanol pour produire H^\bullet et CH_3O^- (*Ferradini, 1990*) :

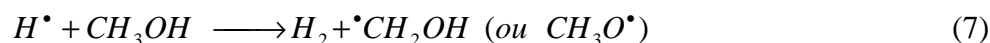


L'électron solvaté e_s^- a été détecté dans le méthanol liquide par radiolyse pulsée (*Taub, 1963*) peu de temps après la découverte de l'électron hydraté (e_{aq}^-). Le temps d'apparition d'une forme relativement stable de l'électron dans le méthanol à $\sim 20^\circ C$ est de l'ordre de 6 à 10 ps (*Chase, 1975 ; Wang, 1980 ; Kenney-Wallace, 1982 ; Hirata, 1990*), c'est-à-dire environ dix fois supérieur au temps d'apparition de (e_{aq}^-).

Les réactions suivantes sont envisageables, en compétition avec la diffusion:



La constante de vitesse de la réaction est : $k_6 = 5,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (*Baxendale, 1975*) suivie par la réaction de disparition de H^\bullet suivante :



de constante de vitesse $k_7 = 8,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (*Zhang, 1994*), soit un temps de demi-réaction de 3,5 ns.

Le radical CH_3O^\bullet conduit par réaction avec une autre molécule de solvant, au radical isomère $^\bullet CH_2OH$, thermodynamiquement plus stable:



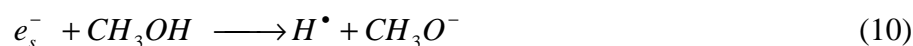
La constante de vitesse de la réaction est : $k_8 = 2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (*Ellison, 1972*).

Les électrons solvatés peuvent régir entre eux selon la réaction de dismutation suivante :



D'après Fletcher et Richards, la valeur de la constante de vitesse de cette réaction est de l'ordre de $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fletcher, 1971). En adoptant la même valeur, Johnson et Salmon ont montré que cette réaction de dismutation de e_s^- ne peut pas intervenir d'une façon notable dans les zones hétérogènes (Johnson, 1977a ; Johnson, 1977b).

Les électrons solvatés peuvent en outre réagir sur le solvant selon une réaction de pseudo-premier ordre:



dont la valeur de la constante de vitesse est donnée égale à $k_{12} = 8,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Johnson, 1977a). Les électrons solvatés peuvent également réagir avec le radical $\bullet CH_2OH$ selon la réaction suivante :



La constante de vitesse de la réaction est : $k_{11} = 8,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Johnson, 1977b)

En compétition avec la réaction précédente, le radical $\bullet CH_2OH$ conduit à des produits stables, tels que l'éthylène glycol $(CH_2OH)_2$ et le formaldéhyde H_2CO , tandis qu'une réaction de neutralisation acido-basique intervient entre les ions résiduels CH_3O^- et $CH_3OH_2^+$:



La constante de vitesse de la réaction est : $k_{12} = 7,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fowles, 1971)

L'ensemble du mécanisme précédemment décrit conduit à des produits moléculaires (H_2 , $(CH_2OH)_2$ et H_2CO), ioniques (H^+ sous la forme $CH_3OH_2^+$) et radicalaires (e_s^- , H^\bullet et $\bullet CH_2OH$). Ces espèces, comme nous venons de le voir, réagissent entre elles durant leur coexistence. Les valeurs de leurs rendements d'apparition ne sont pas indépendantes et, à chaque instant, vérifient une relation stoechiométrique traduisant la décomposition radiolytique de la molécule de méthanol :



Pour un temps précis, il est difficile d'évaluer expérimentalement les rendements radiolytiques, étant donné la complexité du mécanisme des réactions mises en jeu. En nous basant sur les résultats obtenus par de nombreux auteurs (*Baxendale, 1972 ; Shiotani, 1976 ; Lind, 1979 ; Getoff, 1992 ; Getoff, 1993 ; Zhang, 1994*), les rendements radiolytiques à l'étape homogène communément admis pour les principales espèces formées lors de la radiolyse du méthanol sont répertoriés dans le **Tableau 3**.

Espèce	e_s^-	H^\bullet	CH_3O^\bullet	$\bullet CH_2OH$	H_2	H_2CO	$(CH_2OH)_2$
Rendement ($\mu\text{mol J}^{-1}$)	0,20	0,10	0,36	0,44	0,56	0,20	0,32

Tableau 3 : Rendements radiolytiques des espèces radicalaires et moléculaires formées lors de la radiolyse du méthanol à l'étape homogène (*Baxendale, 1972 ; Shiotani, 1976 ; Lind, 1979 ; Getoff, 1992 ; Getoff, 1993 ; Zhang, 1994*).

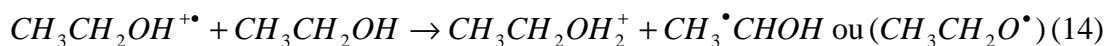
II.3 RADIOLYSE DE L'ETHANOL

Les premiers résultats concernant la radiolyse de l'éthanol ont été publiés à la fin des années 50 (*Burton, 1958*). Depuis ce temps, les chercheurs se sont intéressés à l'étude de la radiolyse de ce solvant, et le travail de ces quatre dernières décennies consacré à l'étude de l'éthanol, a permis d'accumuler une grande quantité de données expérimentales (*Taub, 1962 ; Shiotani, 1976 ; Jin, 1996 ; Wang, 1999*). Des progrès considérables ont été faits permettant de mieux comprendre le comportement de ce solvant sous rayonnement. En rassemblant les résultats expérimentaux de la littérature, on constate que la radiolyse de l'éthanol est similaire à celle du méthanol. A partir des résultats disponibles dans la littérature à propos de ce sujet, le schéma suivant a été adopté.

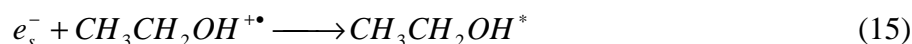
La première réaction de l'éthanol pur après absorption d'un rayonnement ionisant est l'ionisation primaire :



Elle est suivie par la réaction très rapide (*Jore, 1988*) de transfert de proton



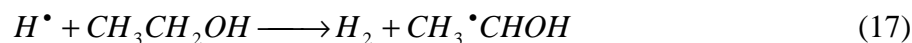
Simultanément à cette réaction, l'électron éjecté perd son énergie par ionisations et excitations successives et devient thermalisé, puis solvatoé (e_s^-). Après l'étape de solvation, l'électron solvatoé peut subir la réaction de recombinaison géminée :



Les réactions précédentes (13-15) aboutissent à la formation de $CH_3\bullet CHO$, $CH_3CH_2O\bullet$, e_s^- et $CH_3CH_2OH_2^{+\bullet}$, elles sont en compétition avec les réactions qui se produisent au cours de l'étape de diffusion :

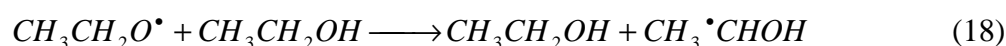


et la réaction rapide de transfert d'hydrogène qui conduit à la formation du radical 1-hydroxyéthyl ($CH_3\bullet CHO$: HER) :



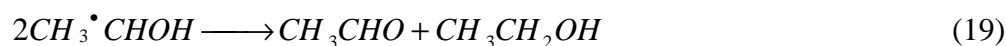
de constante de vitesse : $k_{17} = 2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$

Le radical HER est très présent dans la radiolyse de l'éthanol, il peut aussi être formé par isomérisation du radical éthoxyl :



(constante de vitesse $k_{18} = 1,1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)

Par recombinaison de deux radicaux HER, on obtient le 2,3-butanediol et de l'acétaldéhyde :



Le rapport des deux constantes de vitesse est : $k_{19}/k_{20} = 0,9$ avec $k_{22} = 7,5 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$

En rassemblant les résultats obtenus par de nombreux auteurs (*Taub, 1962 ; Shiotani,*

1976; Jin, 1996 ; Wang, 1999 ; Sun, 1999), on peut donner les rendements radiolytiques à l'étape homogène (10^{-9} s) des différentes espèces radicalaires (e^-_s , H^\bullet , $CH_3CH_2O^\bullet$, $CH_3^\bullet CHO$) et moléculaires (H_2 , $(CH_3CHOH)_2$, CH_3CHO) présentés dans le **Tableau 4**.

Espèce	e^-_s	H^\bullet	$CH_3CH_2O^\bullet$	$CH_3^\bullet CHO$	H_2	CH_3CHO	$(CH_3CHOH)_2$
Rendement ($\mu\text{mol J}^{-1}$)	0.17	0.15	0.30	0.38	0.47	0.24	0.21

Tableau 4 : Rendements radiolytiques des espèces radicalaires et moléculaires formées lors de la radiolyse de l'éthanol (Taub, 1962 ; Shiotani, 1976 ; Jin, 1996 ; Wang, 1999).

II.4. COURBE DE DILUTION

En présence d'un soluté dans le milieu de radiolyse, celui-ci intervient dans le processus de la radiolyse. Si le soluté est dilué (concentration $< 10^{-2}$ M), il ne réagit qu'en phase homogène. Mais s'il est concentré, il peut intervenir dans l'étape diffusionnelle. Si le soluté est encore plus concentré, il peut être directement ionisé par le rayonnement, c'est ce qu'on appelle l'effet direct.

L'ensemble des réactions redox entre le soluté et les espèces radiolytiques du solvant se traduit par le rendement de disparition du soluté, noté $G(-S)$ et donné par la formule (éq. 1).

La courbe représentant l'évolution de cette grandeur en fonction de la concentration du soluté S (courbe de concentration) a, dans la plupart des cas, l'allure indiquée sur la **Figure 16** (Ferradini, 1983).

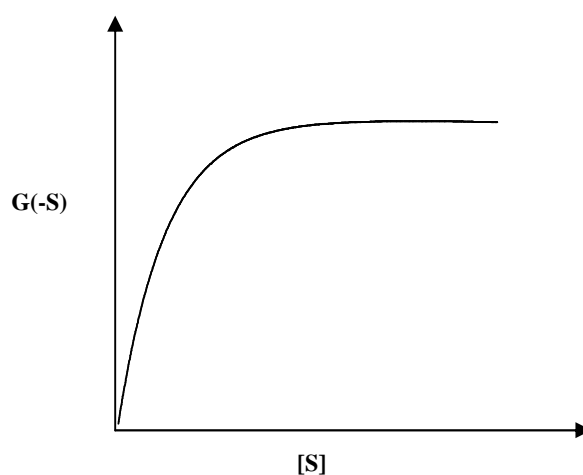


Figure 16 : allure générale d'une courbe de dilution.

Le rendement de disparition du soluté G(-S) traduit l'ensemble des réactions redox du milieu de radiolyse. Toutefois pour que la capture par le soluté des espèces radicalaires soit totale, il faut que celui-ci soit suffisamment concentré pour inhiber les réactions des radicaux entre eux ou avec les produits moléculaires.

On observe que le rendement croît jusqu'à atteindre un palier correspondant à la capture complète, par le soluté, de l'ensemble des espèces radiolytiques qui ont été formées à partir de la radiolyse du solvant. Le fait qu'au palier le rendement soit indépendant de la concentration du soluté, constitue ce qu'on appelle l'effet de concentration.

II.5. REACTIVITE DES RADICAUX LIBRES AVEC L'OXYGENE

Le métabolisme normal de l'oxygène dans l'organisme produit des dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS pour reactive oxygen species). Nous ne rentrerons pas dans le détail de ce métabolisme, mais d'une manière générale on sait que des équilibres, biochimiques, s'établissent pour favoriser l'effet positif par rapport à l'effet toxique. Un stress oxydant est en fait un dérèglement de cet équilibre et dans ce cas les ROS, intrinsèquement très toxiques, vont produire de nombreuses réactions avec leur environnement. L'irradiation produit un stress oxydant, et l'irradiation en milieu non désaéré va favoriser les réactions impliquant l'oxygène et ces dérivés réactifs.

En raison de sa solubilité dans tous les liquides, l'oxygène omniprésent de l'air est un soluté (dilué) particulier qui joue un rôle très important dans la radiolyse et en radiobiologie, sauf si les échantillons sont sous vide ou désaérés. Il réagit notamment avec de nombreux radicaux R^\bullet en formant par addition des radicaux peroxydes ROO^\bullet dont la particularité est d'amorcer une réaction en chaîne détruisant d'autres molécules RH. La peroxydation se propage avec un rendement de destruction de RH alors bien supérieur au rendement des espèces primaires ayant formé R^\bullet . Ce mécanisme est responsable, sous irradiation et en présence d'oxygène d'une forte dégradation des molécules notamment organiques, polymériques ou biologiques. La concentration d'oxygène dans l'eau en équilibre avec l'air est de $2,5 \times 10^{-4}$ M, l'azote qui est aussi présent ne réagit pas avec les radicaux de radiolyse (*Baldacchino, 2004*).

Parmi les réactions les plus courantes en milieu de radiolyse, on trouve la réaction

entre l'électron solvaté et l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ (Ruddock, 1981) selon la réaction suivante :



La réaction de l'oxygène moléculaire avec les radicaux libres organiques, issus de la radiolyse des solvants, donne la formation des radicaux peroxydes qui sont relativement stables (Woods, 1994)



avec $R^\bullet = \bullet CH_2OH$ pour le méthanol et $CH_3\bullet CHO$ pour l'éthanol

Dans le méthanol, $\bullet CH_2OH$, en milieu aéré et en présence de l'oxygène dans le milieu de radiolyse, réagit avec l'oxygène et donne la formation d'un radical peroxyde suivant la réaction suivante :



La constante de réaction est : $k_{23} = 4,2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ (Spinks, 1990).

Aucun produit distinctif dû à la réaction de CH_3O^\bullet avec l'oxygène n'a été rapporté, il semble cependant vraisemblable que cette réaction mène également à la formation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et de l'acide formique $HCHO$.

Dans l'éthanol, l'oxygène réagit avec HER pour donner le radical peroxyde $CH_3CH(OH)OO^\bullet$, suivant la réaction suivante :



La constante de réaction est : $k_{24} = 4,6 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ (Ferradini, 1988).

De la même façon que dans le méthanol, le radical peroxyde donne la formation de l'aldéhyde, du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène.

Les radicaux peroxydes sont généralement moins réactifs que les radicaux desquels ils sont issus, leur durée de vie est plus longue que HMR et HER.

Le radical peroxyde réagit cependant avec les molécules de solvant en arrachant un atome d'hydrogène, pour former un hydroperoxyde :



Les réactions 24 à 27, constituent une chaîne de réactions type, responsables de l'autoxydation d'une large variété de composés organiques tels que le méthanol et l'éthanol.

La radiolyse de l'éthanol, en présence d'oxygène, donne lieu à la formation d'hydrogène, de peroxyde d'hydrogène, d'acétaldéhyde et de 2,3-butanediol. Ces produits se forment principalement après la formation du radical HER. Le tableau suivant résume les rendements des produits moléculaires formés au cours de la radiolyse de l'éthanol, en milieu saturé ou non en oxygène.

Produit	G (produit) ($\mu\text{mol.J}^{-1}$)	
	Non Saturé en oxygène	Saturé en oxygène
H ₂	0,44	~ 0,06
H ₂ O ₂	~ 0,06	0,43
CH ₃ CHO	0,20	0,27
2,3-Butanediol	0,17	0

Tableau 5 : Rendements radiolytiques des produits moléculaires issus de la radiolyse du méthanol en milieu oxygéné (*Spinks, 1990*).

On constate que le rendement des produits augmente en milieu saturé en oxygène, ce qui prouve le rôle de l'oxygène dans la radiolyse de l'éthanol et la réactivité de HER avec l'oxygène.

II.6. REACTIVITE DES RADICAUX LIBRES HMR ET HER

Les radicaux libres présents dans le milieu de radiolyse ont tendance à réagir avec toutes autres substances présentes dans ce milieu, mais bien évidemment tous ne réagissent pas de la même façon et avec la même vitesse. Leur réactivité est liée à plusieurs facteurs, notamment leur durée de vie, leur rendement radiolytique et leur potentiel redox. En comparant les rendements radiolytiques des espèces réactives présentes dans le milieu de

radiolyse (**tableaux 3 et 4**), nous constatons que HMR et HER possèdent les rendements radiolytiques les plus élevés, suivis de leurs isomères centrés sur l'oxygène, et en troisième position se trouve H[•]. Des études expérimentales antérieures ont confirmé que HMR et HER sont les radicaux les plus réactifs. Par exemple, *Lind* et ses collaborateurs (*Lind, 1979*) ont montré que l'oxydation de la bis-(p-methoxy-phenyl)telluride en milieu méthanolique se fait principalement par le radical HMR ; le mécanisme proposé montre la fixation de ce radical sur l'un des cycles aromatiques en position *mé*ta. Les mêmes conclusions ont été établies par cet auteur pour l'éthanol. En revanche, la radiolyse de la mélanine en milieu méthanolique et éthanolique (*Dunford, 1995*), montre que la mélanine est un bon piègeur des radicaux centrés sur le carbone (HMR et HER) et de leurs isomères centrés sur l'oxygène (CH₃O[•] et CH₃CH₂O[•]). La constante de réaction mélanine - radicaux HMR/HER est de l'ordre de 10⁷ M⁻¹.s⁻¹, tandis que la constante de réaction avec le radical centré sur l'oxygène est de l'ordre de 2,7 x 10⁴ M⁻¹.s⁻¹. Ceci montre que les radicaux centrés sur le carbone sont plus réactifs que les radicaux centrés sur l'oxygène, ce qui est en accord avec les rendements radiolytiques proposés dans la littérature. Une autre étude portant sur la radiolyse de l'acétophénone (*Haofang, 1996*) dans l'éthanol montre la formation de quatre produits de radiolyse. L'analyse des structures de ces produits permet de conclure qu'ils proviennent tous de l'addition de HER sur le cycle aromatique et sur la fonction cétone ; en revanche aucun produit n'a été détecté montrant la fixation des radicaux centrés sur l'oxygène. Que ce soit en milieu désaéré ou non, le radical centré sur le carbone est plus réactif que son homologue centré sur l'oxygène. Ceci a été mis en évidence par la radiolyse de la baicaline en milieu éthanolique (*Zhongli, 1995 & 1996*). La baicaline est une flavanone glucosylée (acideβ-Dglucopyranosiduronique-5,6-dihydroxy-oxo-2-phényl-4H-1-benzopyran-7-yl). En milieu désaéré (absence d'oxygène), l'analyse des produits issus de la radiolyse de la baicaline a montré que HER est le seul radical qui réagit avec la baicaline. En milieu aéré (présence d'oxygène) HER réagit avec l'oxygène présent dans le milieu donnant la formation du radical peroxy. Ce dernier vient se greffer sur la baicaline. Aucun des produits issus de la radiolyse de la baicaline ne démontre l'addition du radical centré sur l'oxygène, que ce soit en milieu désaéré ou non. Toutes ces études démontrent la forte réactivité et la forte implication du radical HER avec le soluté. Nous leur accordons donc maintenant une parenthèse toute particulière.

Comme nous l'avons vu précédemment, les premières étapes de l'irradiation de l'éthanol entraînent la formation d'un radical éthoxyl à partir d'une molécule d'éthanol. En

réalité l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur une molécule d'éthanol peut donner lieu à la formation de trois isomères : le radical éthoxyl ($CH_3CH_2O^\bullet$, isomère **1**), le radical 1-hydroxyéthyl (HER ou $CH_3^\bullet CHOH$, isomère **2**) et le radical 2-hydroxyéthyl ($^\bullet CH_2CH_2OH$, isomère **3**). La stabilité relative de ces trois isomères a été étudiée théoriquement sur la base d'une approche *ab initio* (Curtiss, 1995). Deux conformères ont été identifiés pour l'isomère **1**, deux pour le **2** et trois pour le **3**, comme le montre la **Figure 17**.

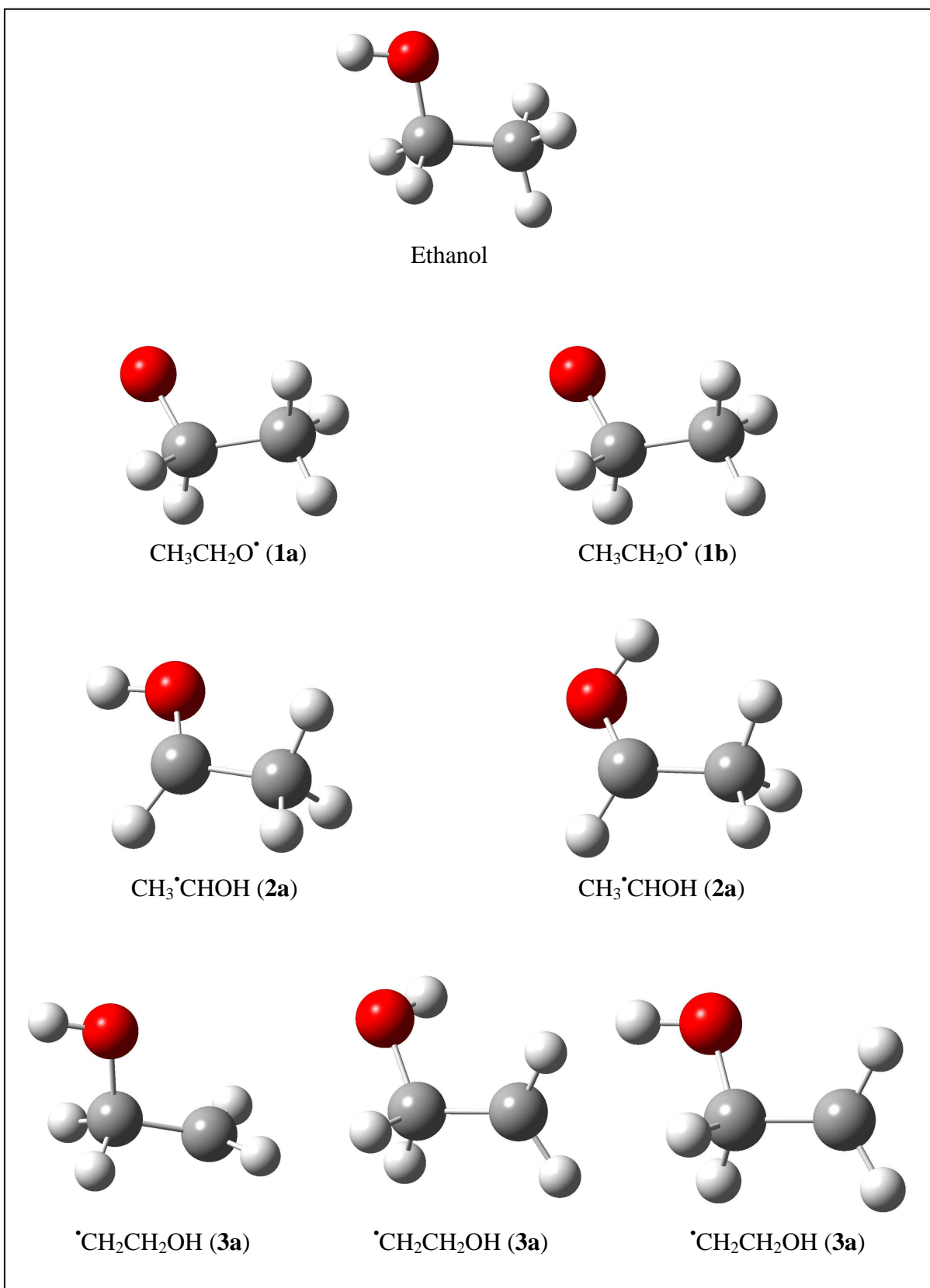


Figure 17 : Conformères identifiés théoriquement pour le radical HER (2) et ses deux isomères $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ (1) et $^\bullet\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (3) (Curtiss, 1995).

Le **tableau 6** récapitule les énergies relatives de chacun des conformères et montre clairement la plus grande stabilité de HER (**2**), 9,8 kcal/mol plus stable que son isomère centré sur l'oxygène (**1**) et 7,0 kcal/mol plus stable que l'isomère **3**. Les mêmes auteurs ont théoriquement démontré la plus grande stabilité de HMR par rapport à son isomère centré sur l'oxygène (*Curtiss, 1991*).

	MP2/6-31G(d)	G2
CH ₃ CH ₂ O• (1a)	8.9	10.7
CH ₃ CH ₂ O• (1b)	8.1	9.8
CH ₃ •CHOH (2a)	0.0	0.0
CH ₃ •CHOH (2b)	0.3	0.3
•CH ₂ CH ₂ OH (3a)	9.8	8.6
•CH ₂ CH ₂ OH (3b)	9.1	7.6
•CH ₂ CH ₂ OH (3c)	7.8	7.0

Tableau 6 : Energies théoriques relatives des différents isomères du radical HER (*Curtiss, 1991*).

L'isomère **3** n'a pas été identifié dans les milieux de radiolyse. Comme nous l'avons vu le radical éthoxyl (isomère **1**) a été identifié et il est probablement, comme décrit précédemment, directement formé par l'arrachement de l'atome d'hydrogène sur la molécule d'éthanol. Celui-ci est ensuite rapidement converti en HER (isomère **2**) par une réaction exothermique. Cependant, *Peter C. Burgers et Paul J. A. Ruttink* ont récemment montré, pour HMR, que cette isomérisation ne peut pas avoir lieu « seule » (*Burgers, 2005*). La barrière énergétique de l'isomérisation CH₃O• → HMR a été calculée à l'aide de la méthode CBS-QB3 et vaut 29,7 kcal.mol⁻¹. Ils ont également montré que cette barrière est diminuée jusqu'à 15 kcal.mol⁻¹ en présence d'une molécule de méthanol. Le radical CH₃O• formerait alors un complexe (CH₃O•---HO(H)CH₃⁺) au sein duquel l'isomérisation serait catalysée, en accord avec la réaction (6) proposée par *Ellison*.

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. IRRADIATION

I.1. APPAREILLAGE

Le laboratoire de Biophysique dispose d'un irradiateur expérimental de type Oris à base de Cobalt 60, installé à la Faculté de Pharmacie de Limoges depuis 1987. Il est constitué de barres de cobalt entre lesquelles le porte-échantillon peut descendre.

Le débit de dose délivrée par la source de Cobalt de l'irradiateur à l'instant t est donné par la loi de décroissance radioactive:

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{\ln 2}{T} t\right)$$

Avec :

D est le débit de dose à l'instant t (Gy/s).

D_0 est le débit de dose à l'instant $t = 0$ (date d'installation de l'irradiateur).

T est la période de la source radioactive ($T(^{60}\text{Co}) = 5,271 \text{ ans} = 1923,915 \text{ jours}$).

Le 20 août 1987 (date d'installation), le débit de dose dans l'air était $D_0 = 1,130 \text{ Gy/s}$.

A titre d'exemple, le 20 octobre 2005, une dose de 10 kGy correspondait à 23 heures et 11 minutes. La dosimétrie a été réalisée avec des pastilles à l'alanine et confirmée annuellement par dosimétrie de Fricke.

I.2. CONCENTRATIONS UTILISEES

Pour éviter que l'effet direct (l'interaction rayonnement-chalcone) ne se produise, nous avons utilisé une gamme de concentration allant de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ à 10^{-2} M . Les concentrations étudiées étaient : $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-4} M , $2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-3} M , $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ et 10^{-2} M .

En étude analytique les différentes molécules sont solubilisées dans le méthanol ou l'éthanol à plusieurs concentrations. Ensuite, elles sont irradiées dans des tubes de 1 ml munis

d'un septum, avec des doses allant de 0,1 kGy à 24 kGy en milieu désaéré. Nous avons désaéré les tubes en faisant barboter de l'hélium pendant environ 20 minutes.

II. ANALYSES DES ECHANTILLONS IRRADIES

II.1. PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

II.1.1. Principe

La chromatographie sur couche mince consiste à placer sur une feuille ou sur une plaque (papier, silice, plastique ou autre) une goutte de la solution et à faire éluer les produits par un solvant ou un mélange de solvants (appelé éluant), l'éluant diffusant le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit avec le support et l'éluant. La CCM est basée sur une interaction de type électrostatique / liaison hydrogène. Le principe du "qui se ressemble s'assemble", souvent rencontré en chimie permet encore d'expliquer ici la nature des phénomènes impliqués. Pour simplifier l'explication, considérons dans un premier temps un support « neutre » et considérons une goutte dans laquelle sont présents plusieurs composés dont certains sont polaires (P) et d'autre moins polaires, voire apolaires (A). Si l'éluant choisi est polaire, il fera migrer plus facilement, « plus loin » sur la feuille, le composé P, ayant plus de facilité à l'emmener dans la phase mobile. Considérons maintenant que l'éluant est « neutre » et que seul le support compte. Tout dépend alors de la nature des interactions entre les molécules du mélange et celles composant le support. Il s'agit généralement d'interactions de type liaison hydrogène. Supposons un support donneur d'hydrogène (D). Si dans le mélange se trouvent des composés accepteurs de liaisons hydrogènes (A), et d'autres « indifférents » à ce type de liaison (I), les premiers migreront moins facilement et donc « moins loin » que les composés indifférents aux liaisons hydrogènes.

La situation est souvent bien plus complexe que celle décrite dans les deux exemples précédents. Il n'existe donc pas de théorie pour la CCM permettant de choisir le bon éluant, c'est lui le plus difficile à sélectionner, le support étant généralement de la silice.

II.1.2. Matériel

Une goutte de chaque solution est déposée sur CCM analytique, les différentes plaques utilisées sont :

- ✓ Silice : ALUGRAM[®] SIL UV₂₅₄, plaques de 20 cm sur 20 cm d'aluminium recouvert de 0,2 mm de gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV₂₅₄.
- ✓ Polyamide : POLYGRAM[®] POLYAMID-6 UV₂₅₄, plaques de 20 cm sur 20 cm de plastiques recouvertes de 0,1 mm de polyamide avec indicateur de fluorescence UV₂₅₄.
- ✓ Cellulose : POLYGRAM[®] plaque de 20 cm sur 20 cm de plastique recouverte de 0,1 mm de cellulose-CCM 6 UV₂₅₄.

La migration se fait dans une cuve en verre munie d'un couvercle.

II.1.3. Mode opératoire

Une fois le dépôt de la goutte terminé, on place la plaque dans la cuve, on ferme et on laisse l'éluant diffuser, la migration est stoppée lorsque le front d'éluant est arrivé à 1 cm du haut de la plaque (cette opération prend 30 min environ, mais dépend du support et de l'éluant). Après avoir été séchée, la plaque est révélée sous lampe UV à différentes longueurs d'ondes. Dans le cas où les produits n'absorbent pas, on procède à une révélation avec la vanilline sulfurique. Ce révélateur est préparé de la façon suivante :

1 g de vanilline est solubilisé dans 100 ml d'éthanol, puis on ajoute à la solution 1 ml d'acide sulfurique concentré.

Afin de faire apparaître les tâches colorées, le révélateur doit être appliqué en plusieurs pulvérisations pour éviter toute formation de gouttelettes. La plaque est chauffée à 120°C pendant 15 min environ.

Plusieurs mélanges de solvants sont utilisés, dont :

Mélange M1 : CH₂Cl₂ / AcOEt / MeOH : 90 / 5 / 5

Mélange M2 : CH₂Cl₂ / AcOEt / MeOH : 96 / 3 / 1

Mélange M3 : AcOEt / CH₃COOH / HCOOH / H₂O : 100 / 10 / 5 / 5

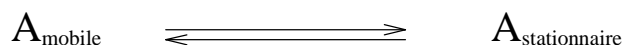
Certains mélanges de solvants sont retenus en fonction des résultats des CCM et utilisés en CCM centrifuge ou en chromatographie sur colonne.

II.2. PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

II.2.1. Principe

La **CLHP** est une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire par une phase mobile. La phase stationnaire est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane. La phase mobile est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant les molécules avec elle.

Dans le cas de la chromatographie en phase liquide comme dans toute méthode chromatographique, la séparation des constituants d'un mélange est basée sur la différence de distribution de ces constituants entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire et la phase mobile (solvant seul ou mélange de solvants). La distribution entre les deux phases est caractérisée par le coefficient de partage K entre la phase stationnaire et la phase mobile :



$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{avec } C_s : \text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}$$

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile

Le facteur de sélectivité α d'une colonne pour deux espèces A et B est défini comme le rapport des coefficients de partage K_A et K_B :

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} (\geq 1)$$

Si le composé B a une grande affinité pour la phase stationnaire et le composé A une grande affinité pour la phase mobile, le composé A sera élué plus rapidement. Son temps de rétention sera plus petit que le temps de rétention de B. Cette différence d'affinité pour les deux phases est le principe même de la chromatographie.

La CLHP est généralement associée à un détecteur UV. La phase stationnaire est balayée en permanence par un débit constant de phase mobile. Le mélange est injecté en début de colonne et élué par la phase mobile. A la sortie de la colonne, les composés sont récoltés en fonction de leur temps de rétention et le chromatographe couplé à un appareil de spectrophotométrie UV permet d'obtenir le spectre UV des différents produits séparés. La nature de la phase stationnaire et de la phase mobile est choisie en fonction de la polarité des molécules à séparer.

II.2.2. Appareillages

Les solutions irradiées sont analysées par CLHP. L'appareil utilisé est de marque Waters équipé de :

- ✓ une pompe quaternaire modèle 600.
- ✓ un détecteur UV/visible à barrette de diodes PDA 996.
- ✓ un contrôleur modèle 600.

Le système CLHP est combiné avec un logiciel (Millennium) qui permet de gérer la phase mobile de l'injection en cours, d'analyser et de stocker les résultats ainsi obtenus.

II.2.3. Mode opératoire

50 µl de chaque solution sont injectés avant et après l'irradiation dans le système CLHP en utilisant une colonne analytique C18 µBondapack (10µm : granulométrie des particules, 250 x 4,6 mm : longueur x diamètre).

La phase mobile est constituée de deux solvants :

- ✓ Le méthanol représente le solvant (**A**).
- ✓ Le solvant (**B**) est constitué du mélange eau / méthanol / acide acétique : 79% / 20% / 1%.

Tous les solvants sont filtrés par des filtres de 40µm de diamètre de pore et dégazés avec de l'hélium. Les analyses sont effectuées en utilisant le gradient linéaire suivant :

Temps (min)	Débit (ml/min)	A (%)	B (%)
0	1	20	80
40	1	100	0

Les extraits de jus d'orange étant très riches en produits et complexes à analyser, nous avons allongé la durée de la séparation pour avoir une meilleure résolution et adopté un autre système de gradient en augmentant la polarité progressivement par plusieurs paliers. Le système adopté est le suivant :

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	0	100
10	0	100
20	20	80
30	20	80
40	50	50
50	50	50
60	80	20
70	80	20
80	100	0

III. PURIFICATION DES ECHANTILLONS IRRADIES

La purification des produits irradiés est effectuée en plusieurs étapes en utilisant différents supports, et selon la complexité des solutions.

III.1. COLONNE OUVERTE

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative, car elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

III.1.1. Principe

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide remplit une colonne de longueur et de section variables. L'échantillon en solution est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité. On peut utiliser comme éluant un solvant unique. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. La séparation se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la récolte. La quantité d'adsorbant dépend de la difficulté de la séparation et de la masse d'échantillon. On peut considérer que pour chaque gramme d'échantillon, il faut 30 à 50 g d'adsorbant si la polarité des composants à séparer est très différente et jusqu'à 200 g si la séparation est difficile.

III.1.2. Appareillage

Dans un premier temps, on fait un tri des molécules présentes dans l'échantillon suivant leur taille à l'aide d'une colonne ouverte. La taille de la colonne utilisée est de 800 x 20 mm avec le Sephadex LH20 (Sigma) comme phase stationnaire, le solvant utilisé est le méthanol et le débit est de 1 ml/min.

III.1.3. Mode opératoire

✓ Remplissage de la colonne : c'est l'opération la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulle d'air. Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. La colonne étant verticale, elle est remplie aux deux tiers par le solvant, l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir, pendant l'addition on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

✓ Dépôt des produits à analyser : si c'est un liquide, il est déposé directement ; si c'est un solide, il sera dissous dans une quantité minimum de solvant. Ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne. On ajuste le niveau de solvant pour qu'il soit juste au dessus de celui de l'adsorbant. On peut placer un verre fritté ou une rondelle de papier filtre au-dessus de l'adsorbant pour prévenir d'une remise en suspension de l'adsorbant.

✓ Elution : on peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Les fractions sont récoltées en bas, à la sortie de la colonne.

III.2. CCM CENTRIFUGE

III.2.1. Principe

La Chromatographie sur Couche Mince Centrifuge appelée aussi cyclographe, est un système de centrifugation permettant d'accélérer les séparations en chromatographie sur couche préparative. Elle combine les avantages à la fois de la CCM préparative et de la chromatographie sur colonne, tout en donnant des séparations efficaces et rapides. L'échantillon est déposé à l'aide d'une pipette manuelle. Le solvant est ensuite envoyé à l'aide de la pompe en même temps que la rotation démarre (**Figure 15**). La force centrifuge sépare les composés suivant leur affinité entre la couche d'adsorbant et le solvant. Les composés ainsi séparés atteignent une rigole sur l'extérieur où ils sont collectés dans des piluliers. C'est une technique qui permet de séparer une grande quantité de produit, on peut déposer jusqu'à 1 g de produits selon l'épaisseur de la plaque utilisée.

III.2.2. Appareillage

L'appareillage de CCMC est constitué de :

- ✓ Plaque de séparation imprégnée de gel de silice haute performance avec du sulfate de calcium.
- ✓ Une pompe modèle 8924.
- ✓ Un moteur qui permet de faire tourner la plaque
- ✓ Une lampe UV.

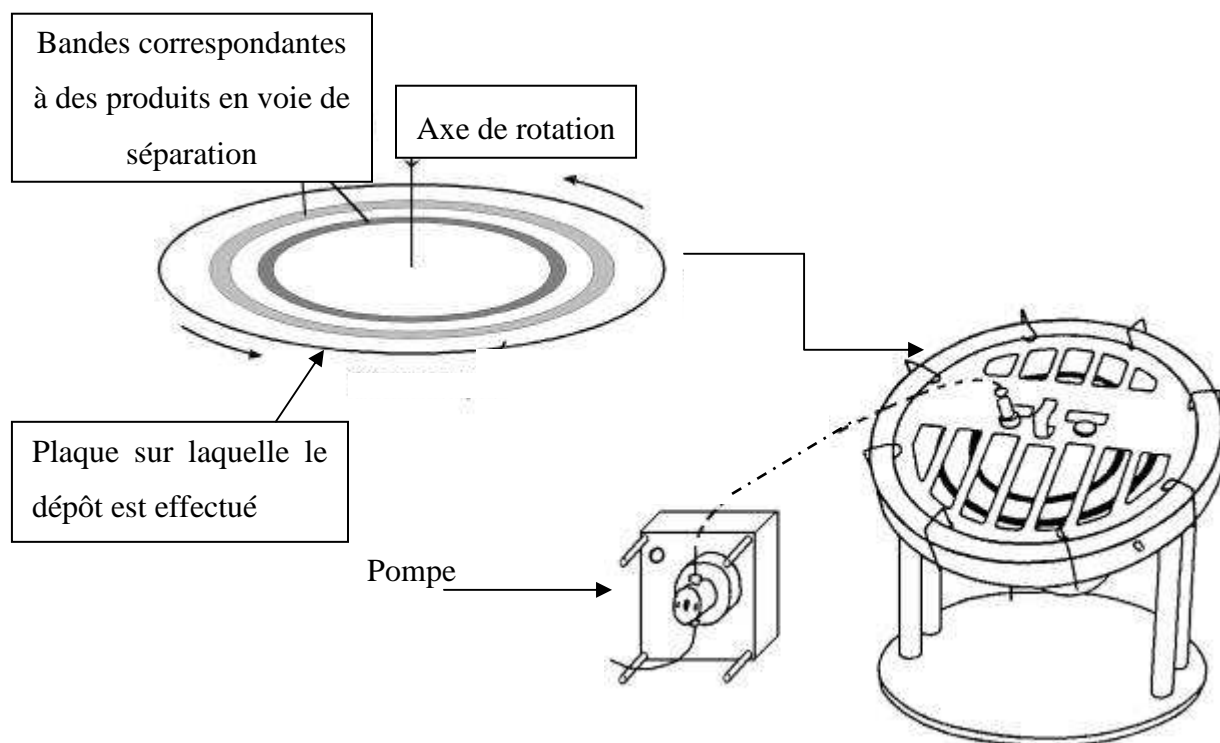


Figure 18 : les différents composants d'un cyclographe.

III.2.3. Mode opératoire

Avant de débiter une séparation, il faut tout d'abord préparer la plaque de séparation. Pour une plaque de 1 mm d'épaisseur, il faut 50 g de SiO_2 qu'on mélange à 100 ml d'eau, on agite bien le mélange pendant 30 secondes environ puis on l'étale sur la plaque tout en la faisant tourner, ceci permettra d'avoir une couche homogène. On laisse ensuite sécher la plaque à l'air libre pendant une nuit, on finit le séchage à l'étuve à 70°C pendant 5 heures. Enfin à l'aide des lames on gratte la plaque jusqu'à l'obtention du diamètre souhaité (1 mm).

Une fois la plaque prête, elle est posée sur le moteur de rotation. L'échantillon à purifier est solubilisé dans le minimum de solvant, puis déposé au centre de la plaque que l'on fait tourner. Les débits usuels sont de 4 à 5 ml/min. La pompe permet de passer d'un solvant faible à plus polaire au cours de la séparation, et donc de séparer des composés de polarités diverses. L'utilisation d'un solvant fort en fin d'analyse élimine les composés fortement absorbés.

En se basant sur les résultats de la CCM analytique, on peut choisir le système de solvants qui convient le mieux à la séparation de nos produits, ce système dépend de la nature et de la polarité des produits à séparer. En général nous avons commencé l'élution par le mélange suivant : C_6H_{14} / CH_2Cl_2 : 50 / 50. Dès que la plaque est complètement imbibée de solvant, on rajoute l'acétate d'éthyle progressivement. Lorsque les produits commencent à sortir, on rajoute le méthanol progressivement. Ce qui est intéressant dans la CCM centrifuge, est la possibilité de suivre l'élution des produits avec la lampe UV à différentes longueurs d'ondes. Ainsi, on peut contrôler l'avancement d'un produit par rapport à un autre en changeant la polarité des solvants d'élution.

III.3. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À MOYENNE PRESSION (CLMP)

La CLMP est très similaire à la chromatographie liquide sur colonne ouverte. La première différence entre les deux méthodes est que, comme son nom l'indique, la CLMP utilise la pression, en plus de la gravité pour trier les molécules. La deuxième différence est la possibilité d'utiliser plusieurs mélanges de solvants, et d'augmenter ou de baisser la polarité de l'éluant en cours de séparation. Enfin en CLMP, on peut suivre l'élution des produits à l'aide d'un détecteur UV que l'on peut brancher à la sortie de la colonne.

Notre séparation par CLMP fait appel à un appareillage Buchi comprenant :

- ✓ une pompe modèle 681.
- ✓ une colonne 460 x 26 mm.
- ✓ la phase stationnaire utilisée est le polyamide SC-6 < 70 μm (Macherey-Nagel).

Le débit utilisé est de 5 ml/min.

III.4. CLHP SEMI-PREPARATIVE

Cette technique de purification a été utilisée pour des faibles quantités que l'on n'a pas réussi à purifier avec les autres méthodes chromatographiques. La purification des produits de radiolyse est effectuée à l'aide du même système CLHP, en utilisant une colonne semi-préparative C18 μ Bondapack (10 μm : granulométrie des particules, 100 x 25 mm : longueur x diamètre).

La phase mobile est la même que celle utilisée pour la colonne analytique.

Le gradient adopté est le suivant :

Temps (min)	Débit (ml/min)	A(%)	B(%)
0	5	20	80
60	5	100	0

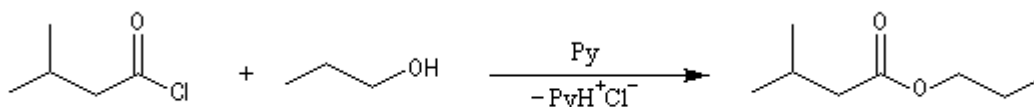
IV. ACÉTYLATION

Dans le but de pouvoir identifier le maximum de produits de radiolyse, on fait appel à l'acétylation. Elle permet de modifier la polarité des composés ceci facilitera leur purification en chromatographie.

IV.1 PRINCIPE

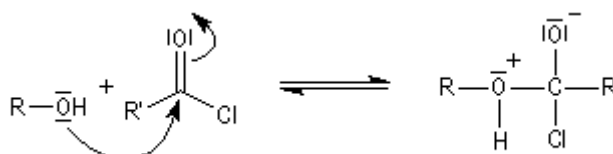
Une réaction d'acétylation (dite aussi acylation) consiste formellement à substituer l'atome d'hydrogène du groupe $-OH$ par un groupement acyle $R-CO-$. On peut y parvenir en effectuant la réaction entre l'alcool et l'acide carboxylique ou l'un de ses dérivés : halogénure d'acyle, anhydride ou ester. La réaction avec l'alcool et l'acide carboxylique halogéné est à la fois totale et rapide. Nous nous proposons ici de détailler la méthode d'acétylation par un chlorure d'acétyle ou un anhydride acétique.

On effectue la réaction entre l'alcool et le chlorure d'acétyle ou l'anhydride acétique en présence d'une amine tertiaire comme la pyridine ou la diméthylaminopyridine DMAP (catalyseur de Steglich).

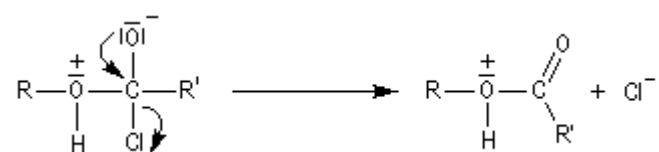


Il s'agit d'un mécanisme par addition-fragmentation :

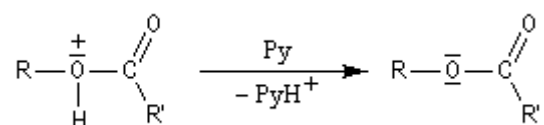
- l'addition nucléophile de l'alcool sur le chlorure d'acétyle conduit à un intermédiaire tétraédrique



- la fragmentation de cet intermédiaire fournit l'ester protoné

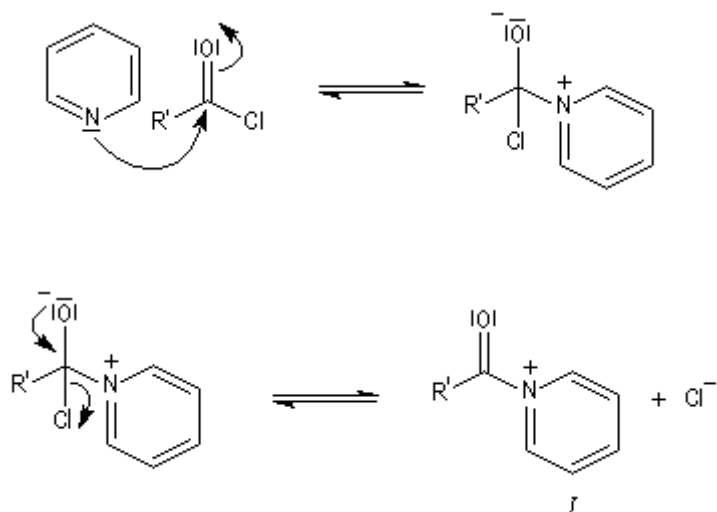


- en présence de pyridine qui joue le rôle de piège à protons, l'acide précédent fournit l'ester et le chlorure de pyridinium.

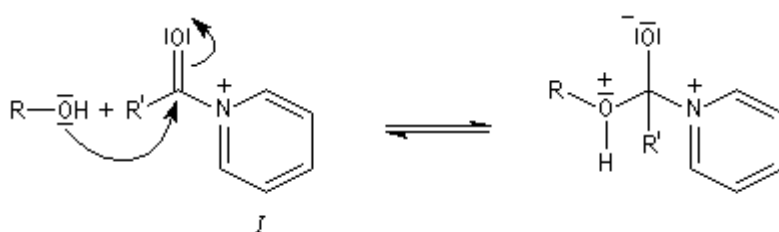


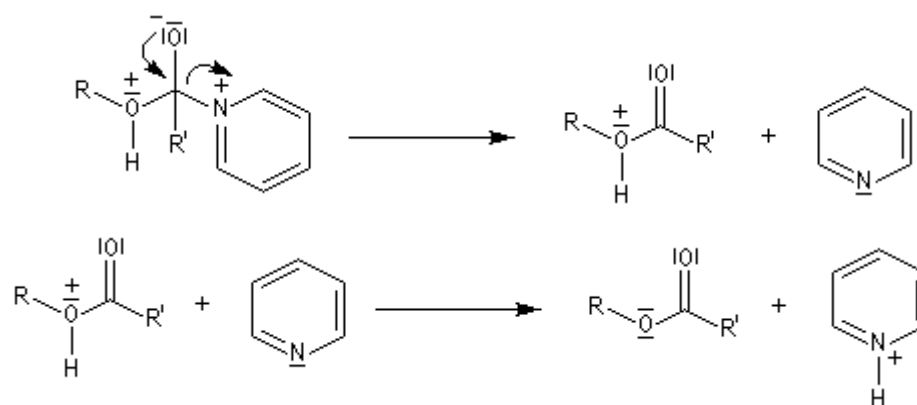
Dans cette réaction, la pyridine est plus qu'une simple base. Elle joue aussi un rôle cinétique. C'est un *catalyseur nucléophile*.

Plus précisément, la réaction entre le chlorure d'acétyle et la pyridine fournit un ion acylaminium intermédiaire *I*.



Cet intermédiaire est plus électrophile vis à vis de l'alcool que le chlorure d'acétyle car il possède une charge positive.

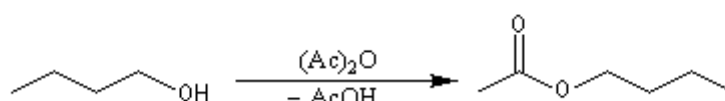




En résumé, la pyridine joue ici un double rôle :

- sur le plan cinétique elle permet l'activation du chlorure d'acyle par formation de l'intermédiaire *I*
- sur un plan thermodynamique, c'est une base qui fixe les ions H^+ .

Les alcools peuvent aussi être acétylés par l'anhydride acétique qui est un agent acétylant plus doux que les chlorures d'acyles. Le mécanisme de la réaction est tout à fait comparable.



IV.2 MODE OPERATOIRE

Pour pouvoir identifier les composés de radiolyse les plus polaires, et du fait de la faible quantité contenue dans la fraction, nous avons procédé à l'acétylation d'une fraction issue de la 2',4'-dihydroxychalcone (10 mg). Cette fraction est solubilisée dans 5 ml de pyridine qui joue le rôle de catalyseur, 2 ml d'anhydride acétique ont été ajoutés à la solution. On laisse le mélange en contact à température ambiante pendant 48 h (le temps nécessaire pour acétyler tous les groupements hydroxyles présents dans la solution). Des CCM analytiques de contrôle sont effectués toutes les 12 h, ce qui permet de suivre l'évolution de l'acétylation.

V. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES

L'identification des produits majoritaires de radiolyse est réalisée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par spectroscopie de masse (FAB/LSIMS).

V.1. RMN

Les analyses RMN sont réalisées sur un spectromètre Bruker 400 MHz DPX Avance.

Les spectres proton (^1H) et carbone (^{13}C) sont mesurés dans le méthanol et l'acétone deutérés (CD_3OD et $(\text{CD}_3)\text{CO}$) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne.

Les positions des différents protons et carbones sont déterminées à partir des spectres monodimensionnels et confirmées par les spectres bidimensionnels :

- COSY: $^1\text{H} - ^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy,
- HMQC: $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple Quantum Coherence,
- HMBC: $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

V.2. SPECTROSCOPIE DE MASSE FAB-LSIMS

Les spectres de masse haute et basse résolution ont été réalisés sur un spectromètre de masse haute résolution MS/MS ZabSpec TOF de Micromass possédant une géométrie **EBE TOF** (Secteurs magnétique (1) et électrique (2) avec Temps de Vol Orthogonal) au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (Rennes).

Les spectres de masse haute résolution et basse résolution ont été réalisés en ionisation **LSIMS** (Liquide Secondary Ion Mass Spectrometry) en mode positif à l'aide d'un canon césium. L'alcool méthanitrobenzylique (mNBA) a été employé comme matrice, les ions sont accélérés avec une tension de 8000V.

La détermination des masses précises en haute résolution est réalisée par balayage du champ électrique en utilisant les ions du Polyéthylène glycol (PEG) comme référence interne. La précision obtenue est inférieure à 5 ppm. Les spectres MS/MS sont obtenus à l'aide du second analyseur à Temps de Vol (TOF) en prenant le méthane comme gaz de collision.

Les produits ont été solubilisés dans le méthanol et introduits par infusion, les pics mesurés correspondent à l'ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

VI. MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

VI.1 PRINCIPE

L'activité antioxydante des chalcones et de l'acide férulique, ainsi des produits de radiolyse identifiés au cours de ce travail est évaluée en mesurant leur capacité à inhiber le radical 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). Ce radical est un radical stable et son inhibition mesure directement le potentiel redox du composé. Aucun effet de chélation ne perturbe la mesure du pouvoir redox, puisque que seul le radical et la molécule testées sont en solution. Ce n'est pas le cas par exemple lorsque l'on mesure l'inhibition du radical hydroxyle formé par la réaction de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$). Dans ce cas, en effet, l'activité de la molécule est soit l'action de piégeage direct du radical, soit un effet chélateur des ions Fe^{2+} , et il est souvent délicat de séparer les deux contributions.

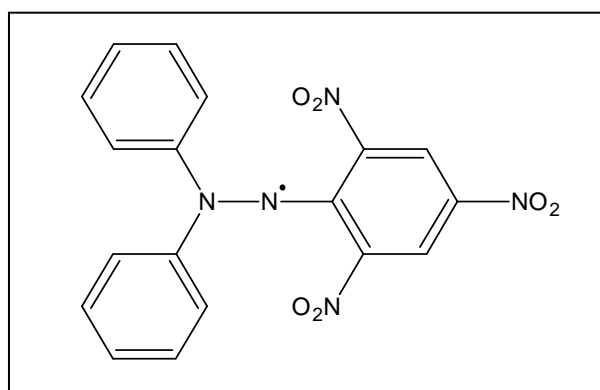


Figure 19 : Structure chimique du radical DPPH

Ce radical est donc largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante de nombreux composés, comme les composés phénoliques. Il présente également plusieurs autres avantages, tout d'abord il possède un spectre caractéristique en Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) et est facilement détectable. De plus il est stable au cours du temps et est utilisable avec de nombreux solvants.

Le signal RPE de référence (**Figure 20**) est obtenu en mélangeant, à volume égal, une solution méthanolique du radical DPPH (5×10^{-4} M) avec le solvant utilisé pour solubiliser les chalcones et les produits de radiolyse identifiés. La double intégration du signal obtenu est proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans la solution. La diminution du

signal obtenue pour une solution de DPPH et du produit à tester mesure le pouvoir antioxydant de ce produit. (**Figure 20**).

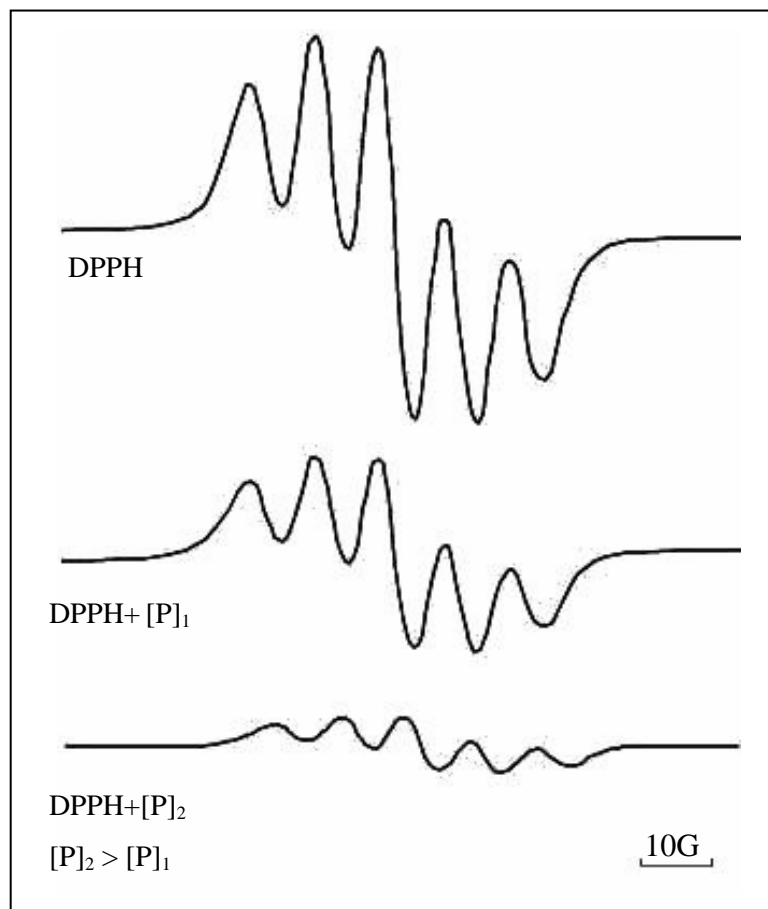


Figure 20 : Evolution du spectre RPE du radical DPPH en fonction de la concentration d'un antioxydant P.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du signal de référence par la formule suivante :

$$\%inhibition = \frac{ref - extrait}{ref - bdf}$$

Avec :

✓ *ref* représente la double intégrale du signal de référence composée du mélange DPPH + solvant.

✓ *extrait* représente la double intégrale du signal correspondant à la mesure du mélange qui se compose de DPPH et de la solution contenant le produit à tester.

✓ *bdf* représente la mesure du bruit de fond occasionné par le solvant seul (sans DPPH).

Le tracé de la courbe inhibition en fonction de la concentration permet la détermination d'une CI_{50} (concentration permettant l'inhibition de 50% du signal de référence).

Nous avons utilisé un appareil de type BRUCKER ESP 300E pouvant délivrer un champ magnétique de 3500 G.

VI.2 MODE OPERATOIRE

Nous mélangeons 50 μ l d'une solution méthanolique de DPPH (5×10^{-4} M) avec 50 μ l du composé à tester à différentes concentrations. Le mélange réactionnel est agité à l'aide d'un agitateur électrique pendant environ 10 secondes. Il est ensuite introduit dans un micro-tube en quartz de 100 μ l à l'aide d'une micropipette puis placé dans la cavité de la RPE. 3 min après, les spectres sont enregistrés sur le spectromètre en utilisant les paramètres suivants :

- ✓ modulation de fréquence : 100 kHz.
- ✓ fréquence micro-onde : 9,78 GHz.
- ✓ puissance micro-onde : 4 mW.
- ✓ modulation d'amplitude : 1,97 G.
- ✓ temps de conversion : 5,12 ms.
- ✓ constante de temps : 10,24 ms.

Pour chaque composé à tester, cette manipulation est effectuée avec différentes concentrations et à température ambiante, chaque mesure est réalisée 3 fois.

CHAPITRE IV

RADIOLYSE DES FLAVONOIDES : ETAT DE L'ART

RADYOLYSE DES FLAVONOÏDES :

ETAT DE L'ART

INTRODUCTION

La radiolyse des flavonoïdes a été étudiée depuis plusieurs années dans le méthanol (solvant générateur du radical HMR), l'éthanol (solvant générateur du radical HER) et des mélanges eau-méthanol (*Hryntsevich, 2005 ; Marfak, 2002, 2003, 2004*). Avant d'entamer la radiolyse des chalcones, j'ai participé aux travaux sur la radiolyse des flavonoïdes en milieu alcoolique. J'ai étudié l'influence de l'eau mais aussi le rôle de l'oxygène moléculaire dans la dégradation des flavonols. Suite aux dernières investigations, nous nous proposons ici de décrire le comportement d'une série de flavonoïdes (**Figure 21**) en chimie sous rayonnement, sur la base des travaux réalisés ces cinq dernières années (*Hryntsevich, 2005 ; Marfak, 2002, 2003, 2004*), mais également sur la base de nouvelles expérimentations. Les chalcones sont des flavonoïdes, mais ce sont des flavonoïdes structurellement « à part » (**Figure 4**). Nous verrons par la suite qu'ils démontrent un comportement, en chimie sous rayonnement, différent de ceux présentés dans ce chapitre.

Lorsque les effets directs du rayonnement peuvent être négligés (et c'est le cas pour les concentrations inférieures à 7×10^{-3} M), les effets de l'irradiation sont dus aux effets indirects, c'est-à-dire aux réactions chimiques entre le soluté et les espèces réactives présentes dans le milieu (radicaux, ions, molécules réactives). Ces espèces réactives sont issues de la radiolyse du solvant. On peut supposer que l'effet sur les flavonoïdes sera directement lié à la capacité redox de ces composés.

Les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à piéger les radicaux libres. De nombreuses études expérimentales d'activités antioxydantes *in vitro* ont permis d'établir les relations structure-activité (*Cotelle, 1996 ; Rice-Evans, 1995 ; Cos, 1998 ; Pietta, 2000*). Le milieu de radiolyse est très riche en nombreuses espèces très réactives que l'on ne retrouve pas dans les stress oxydants tels qu'ils sont habituellement étudiés *in vitro* et *in vivo*. Par

conséquent, de nombreuses réactions radicalaires spécifiques vont pouvoir se produire. En particulier, les réactions avec les radicaux centrés sur le carbone, produits par la radiolyse des alcools (HMR et HER).

I. RADIOLYSE DES FLAVONOÏDES EN MILIEU ALCOOLIQUE

Dans notre laboratoire, treize flavonoïdes parmi lesquels des flavonols, des flavones, des dihydroflavonols, des flavanones, des flavan-3-ols et des flavonoïdes glycosides ont été irradiés séparément dans le méthanol, l'éthanol et les mélanges eau-méthanol. Il s'agit de la quercétine, de la morine, du kaempférol, et de la galangine (des flavonols), de la lutéoline, de l'apigénine et de la chrysin (des flavones), de la taxifoline (une dihydroflavonol), de la naringénine et de l'ériodictyol (des flavanones), de la catéchine (une flavan-3-ol), de la rutine et de l'astragaline (des flavonoïdes glycosides) (**Figure 21**).

Ces molécules ont été choisies pour les différences qu'elles présentent dans leurs caractéristiques structurales : la présence (ou non) d'un groupe OH en position 3 du cycle C, la présence ou non de la double liaison C2-C3, la présence du groupement carbonyle en position 4, et le nombre et la position des groupes OH sur le cycle B. Le comportement de ces différentes molécules face au rayonnement nous permet d'établir la relation structure-activité spécifique au milieu de radiolyse et de présenter les mécanismes de dégradation des flavonoïdes en milieu alcoolique.

Ces composés ont été irradiés à différentes concentrations (5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-3} M) avec différentes doses allant de 0,2 kGy jusqu'à 20 kGy. Les solutions n'étaient pas désaérées et le débit de dose était 0,22 Gy/s. Ces solutions ont été ensuite analysées par CLHP.

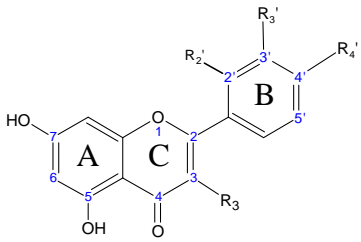
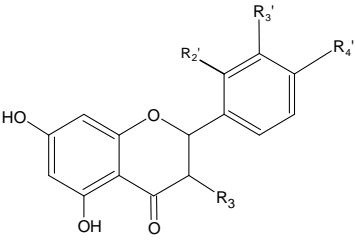
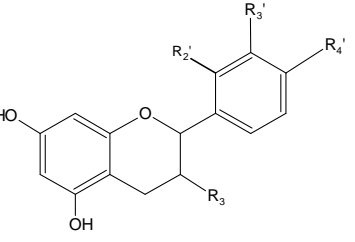
 <p><u>Flavonols ($R_3=OH$)</u> Quercétine: $R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$ Morine: $R_2=OH, R_3=H, R_4=OH$ Kaempférol : $R_2=H, R_3=H, R_4=OH$ Galangine: $R_2=H, R_3=H, R_4=H$</p> <p><u>Flavones ($R_3=H$)</u> Lutéoline: $R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$ Apigénine: $R_2=H, R_3=H, R_4=OH$ Chrysin: $R_2=H, R_3=H, R_4=H$</p> <p><u>Flavones glycosides ($R_3=Sucre$)</u> Rutine: $R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$ Astragaline: $R_2=H, R_3=H, R_4=OH$</p>	 <p><u>Dihydroflavonols ($R_3=OH$)</u> Taxifoline: $R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$</p>	 <p><u>Flavan-3-ols ($R_3=OH$)</u> Catéchine: $R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$</p> <p><u>Flavanones ($R_3=H$)</u> Ériodictiol: $R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$ Naringénine: $R_2=H, R_3=H, R_4=OH$</p>
---	--	--

Figure 21 : Structures chimiques des treize flavonoïdes étudiés dans notre laboratoire.

L'analyse des chromatogrammes obtenus avant et après irradiation de :

- la lutéoline, l'apigénine et la chrysin (des flavones : absence du groupe 3-OH),
- la taxifoline (un dihydroflavonol : présence du groupe 3-OH et absence de la double liaison C2-C3),
- la naringénine et l'ériodictiol (des flavanones : absence simultanée de la double liaison C2-C3 et du groupe 3-OH),
- la catéchine (une flavan-3-ol : présence du groupe 3-OH et absence simultanée de la double liaison C2-C3 et de la fonction 4-oxo),
- la rutine et l'astragaline (flavonoïdes glycosides : l'hydrogène du groupe 3-OH est remplacé par un sucre),

ne montre pas de modifications bien que ces neuf flavonoïdes aient été irradiés à des doses supérieures à 20 kGy.

Ces résultats montrent que les flavones, les dihydroflavonols, les flavanones, les flavan-3-ols et les flavonoïdes glycosides ne se dégradent pas au cours de la radiolyse. A une concentration de 5×10^{-3} M, une dose de 14 kGy produit la dégradation totale de tous les flavonols (quercétine, morine, kaempférol et galangine). Les pics CLHP de ces flavonols montrent que leur disparition est accompagnée de l'apparition de nouveaux produits radiolytiques. On constate également que la radiolyse de ces quatre molécules est un processus qui dépend à la fois de la concentration et de la dose appliquée. Pour les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), une dose de 4 kGy (pour 10^{-4} M), voire 2 kGy (pour 5×10^{-5} M), est suffisante pour causer la transformation totale de la quercétine en produits de radiolyse. Nous pouvons d'ores et déjà déduire que la présence simultanée du groupe 3-OH et de la double liaison C2-C3 est nécessaire pour engendrer la dégradation des flavonoïdes.

Les produits de radiolyse ont été purifiés par CLHP semi-préparative et identifiés par RMN et spectroscopie de masse (FAB-LSIMS). Deux produits ont été identifiés pour chaque flavonol et dans chaque solvant utilisé (**Figure 22**). Les composés de radiolyse identifiés constituent une nouvelle série de molécules appartenant à la famille des depsides. Trois types de depsides ont été isolés :

- (i) depsides hydroxylés en position C-8 et possédant une fonction acide, obtenus dans les deux solvants et dans les mélanges eau-méthanol.
- (ii) depsides méthoxylés en position C-8 obtenus dans le méthanol.
- (iii) depsides éthoxylés en position C-8 obtenus dans l'éthanol.

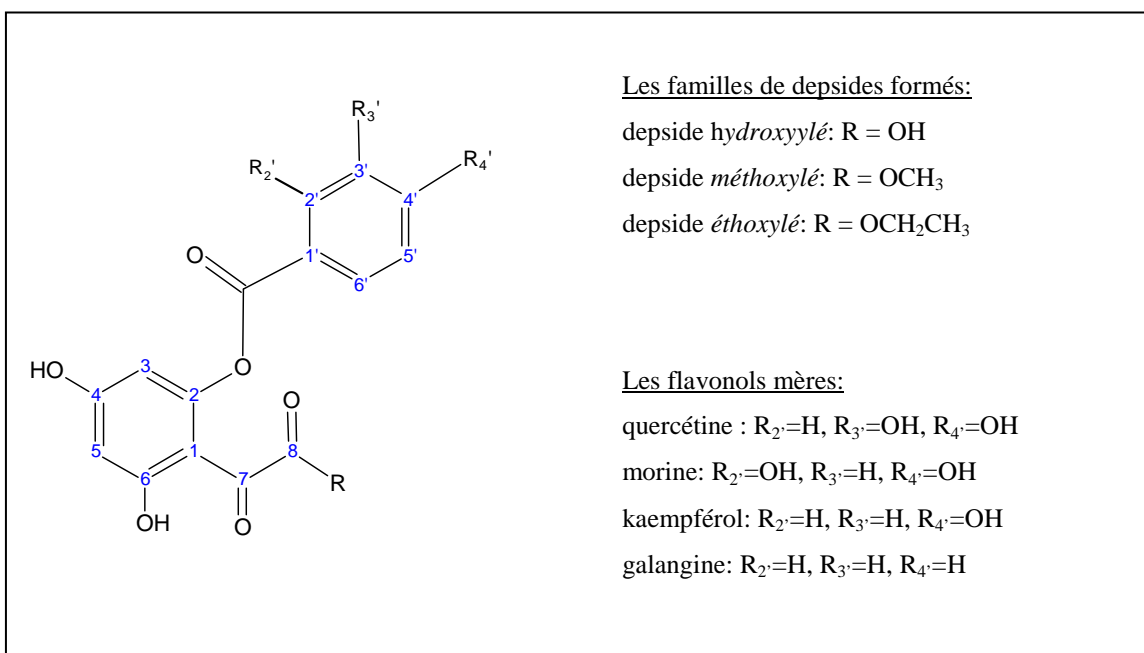


Figure 22 : Structure chimique des produits de radiolyse issus des différents flavonols. Depsides méthoxylés (R = OCH₃) dans le méthanol, depsides éthoxylés (R = OCH₂CH₃) dans l'éthanol et depsides hydroxylés (R = OH) dans les deux milieux de radiolyse. La formation de ce dernier groupe est favorisée en présence de l'eau en milieu de radiolyse.

En spectroscopie d'absorption UV, les flavonols présentent deux bandes d'absorption : la première bande entre 350 nm et 385 nm représentant la conjugaison entre les cycles B et C, et la deuxième bande allant de 240 nm à 280 nm, représentant la conjugaison entre les cycles A et C (Markham, 1989). Une augmentation dans le nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B induit un déplacement de la première bande de 3 nm à 10 nm.

Les produits de radiolyse présentent deux nouvelles bandes d'absorption entre 270 nm et 298 nm, et entre 222 nm et 227 nm, remplaçant respectivement la première et la deuxième bande. Ceci prouve la disparition des conjugaisons entre les cycles B et C, et entre les cycles A et C, c'est à dire l'ouverture du cycle C dans les produits de radiolyse.

Les flavonols sous rayonnement gamma se transforment donc en produits de radiolyse, les depsides. Ce sont les produits majoritaires de dégradation dans le méthanol de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine. A la différence des flavonols, les depsides sont dépourvus du cycle pyranique (C). Leur structure chimique est constituée de deux cycles aromatiques A et B et diffèrent entre eux par le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle B. Nous constatons que les deux cycles aromatiques A et B n'ont pas

été touchés par les rayonnements gamma. Les produits majoritaires (formés en plus grande quantité) sont caractérisés par la présence d'une fonction ester en C-8, remplacée par une fonction acide pour les produits minoritaires.

Comme nous l'avons mentionné dans le deuxième chapitre, parmi les espèces radicalaires qui peuvent réagir avec le soluté, les radicaux HMR, pour méthanol, et HER pour l'éthanol sont de bons candidats pour expliquer la réactivité avec les flavonoïdes. Ce sont généralement les radicaux les plus impliqués dans les réactions redox avec les solutés (Chapitre II). Il peut arriver, également, que leurs isomères, centrés sur l'oxygène, interviennent dans des réactions d'addition avec des radicaux intermédiaires issus des solutés. Nous re-discuterons de ce point dans la radiolyse des chalcones.

Pour nous rapprocher des conditions physiologiques existant dans les fruits et légumes et pour étudier l'influence de l'eau dans ces mécanismes de dégradation, nous avons introduit de l'eau dans le milieu de radiolyse. Les mêmes flavonols ont été irradiés à différentes doses (de 0,2 à 20 kGy) dans des mélanges eau/méthanol avec des proportions : 10/90, 15/85, 20/80 et 25/75 (seuil de solubilité des flavonols). Pour chaque mélange, l'étude est effectuée avec quatre concentrations (5×10^{-5} M, 10^{-4} M, 5×10^{-4} M et 5×10^{-3} M).

Les chromatogrammes CLHP enregistrés (**Figure 23**), à 5×10^{-3} M et 14 kGy, montrent la présence des mêmes pics que ceux obtenus dans le méthanol (R = OCH₃). En revanche, la surface du pic CLHP correspondant à chacun de ces composés varie en fonction de la quantité d'eau présente dans le milieu de radiolyse. Lorsque la proportion d'eau augmente, la disparition des flavonols et la formation des depsides méthoxylés (R = OCH₃) en C-8 (produit majoritaire) diminue. En contrepartie, la formation des depsides hydroxylés (R = OH) (produit minoritaire) augmente.

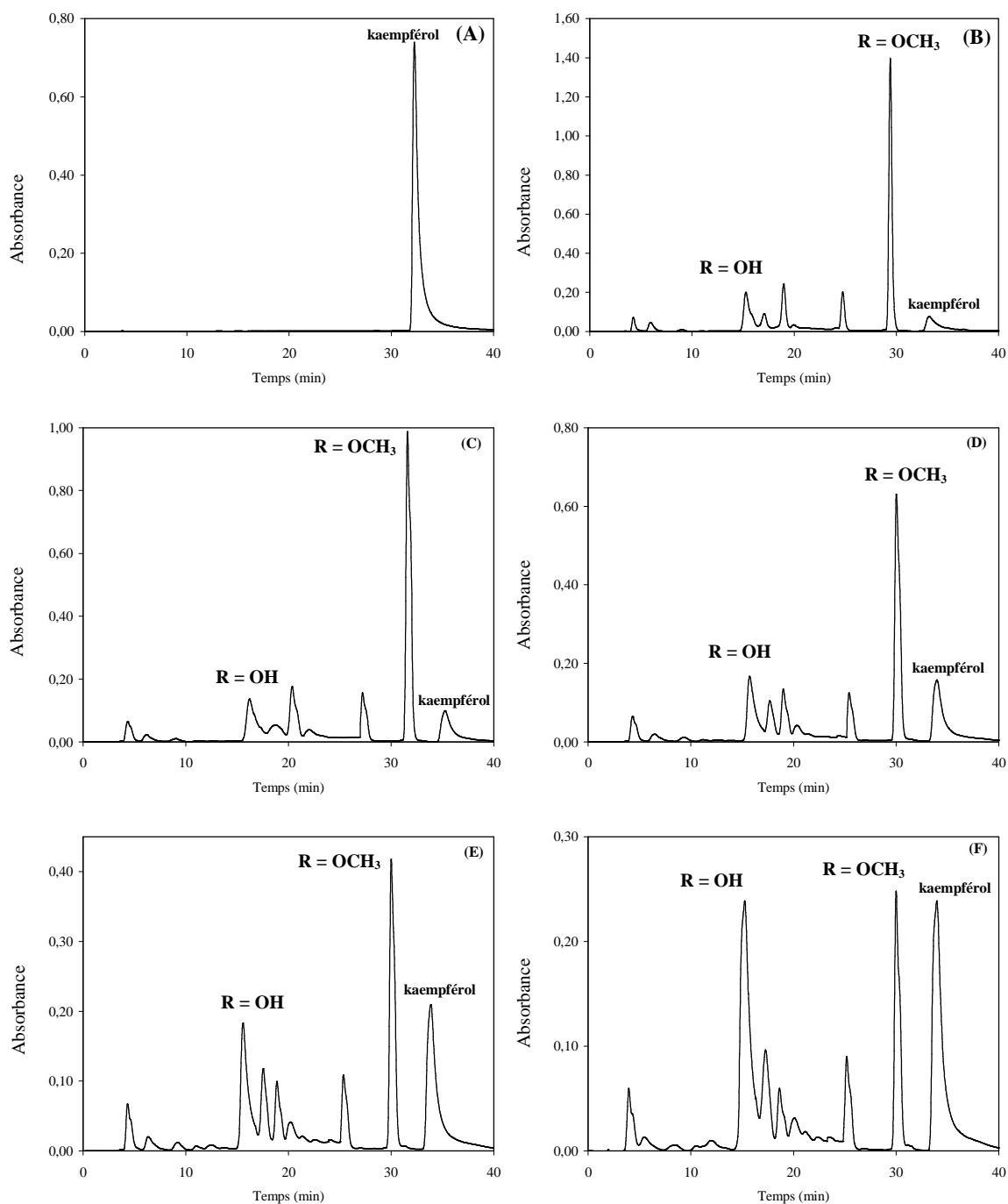


Figure 23 : Chromatogrammes du kaempférol à 5×10^{-3} M, (A) dans le méthanol avant irradiation, et dans des mélanges eau/méthanol (B) 0/100, (C) 10/90, (D) 15/85, (E) 20/80, (F) 25/75 irradiés à 14 kGy. Le débit de dose est 0,22 Gy/s. Depside hydroxylé (R = OH), depside méthoxylé (R = OCH₃), enregistrés à 280.

Lorsque la radiolyse est effectuée dans un mélange 25/75 (seuil de solubilité des flavonols), le depside méthoxylé n'est plus majoritaire puisqu'il est formé en quantité quasi égale à celle du depside hydroxylé. L'ensemble de ces résultats montre que l'eau et par conséquent les radicaux hydroxyles ne participent pas à l'initiation de la dégradation des flavonols, mais participent à la formation des depsides hydroxylés. En effet, la présence d'eau dans le milieu de radiolyse participe notamment à l'augmentation de la concentration des radicaux $\bullet\text{OH}$ et conduit à une baisse dans la concentration des espèces radiolytiques des alcools. Donc, bien que les flavonoïdes soient reconnus comme de bons piègeurs des radicaux $\bullet\text{OH}$, la baisse du rendement G de disparition des flavonols indique que les radicaux $\bullet\text{OH}$ ne participent pas probablement à la première étape de dégradation des flavonols, mais pourraient bien participer à la formation des depsides hydroxylés (**Figure 24**). Pour expliquer la présence de ce composé, minoritaire dans des solutions alcooliques, on peut supposer la présence de radicaux $\bullet\text{OH}$ en faibles concentrations. Rappelons que ces toutes ces études ont été réalisées en milieu non désaéré.

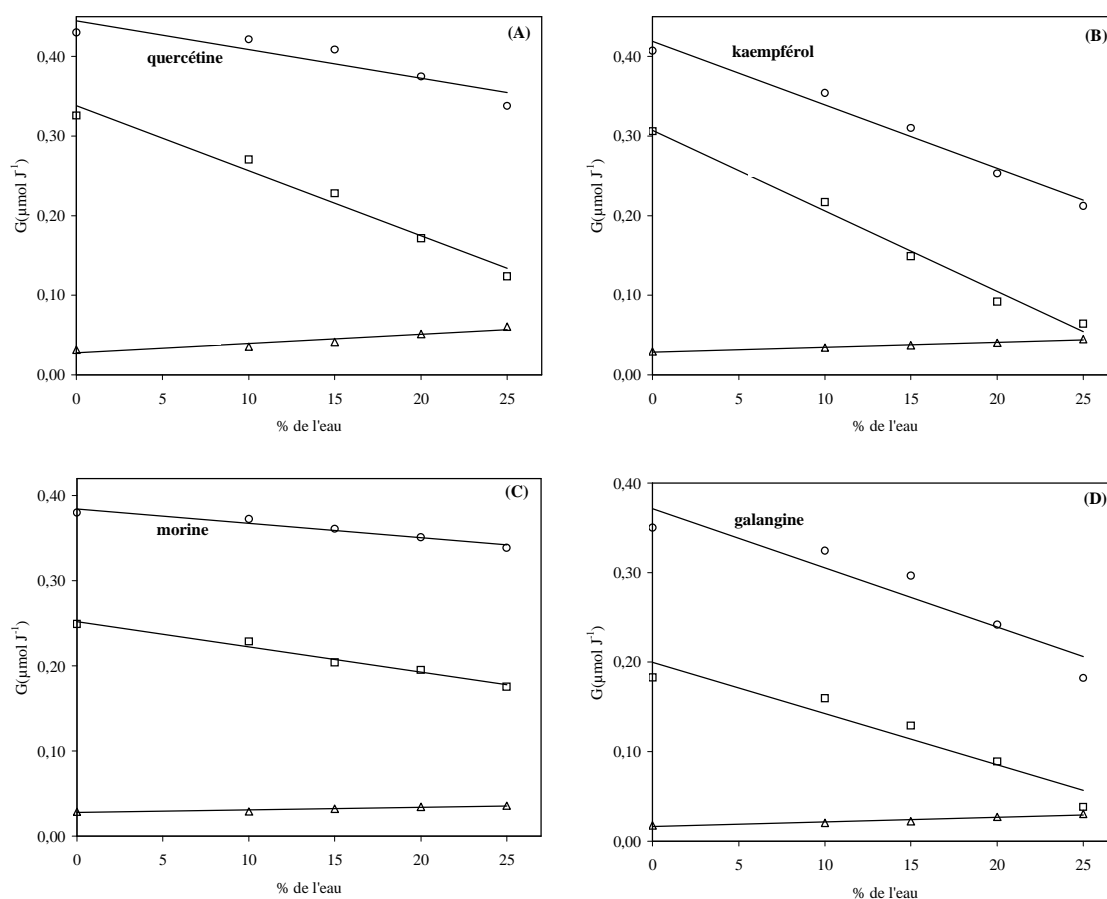


Figure 24 : Variation des rendements radiolytiques des flavonols : quercétine (A), kaempférol (B), morine (C), galangine (D) et leurs produits de dégradation correspondants (Δ) depside hydroxylé, (□) depside méthoxylé en fonction du pourcentage d'eau présente dans le mélange eau/méthanol.

II. ROLE DE L'OXYGENE DANS LA RADIOLYSE DES FLAVONOLS

En solutions non désaérées, l'oxygène moléculaire peut participer aux processus de dégradation des solutés en milieu de radiolyse (*Zhongli, 1995 et 1996*). Selon le comportement expérimental des flavonoïdes en milieu alcoolique aéré et sous rayonnement gamma, nous pouvons proposer que la deuxième étape du mécanisme de dégradation soit l'addition de l'oxygène moléculaire sur la position C-2. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons irradié des flavonols en milieu désaéré. La **Figure 26** représente la variation de la concentration de la quercétine en fonction de la dose appliquée en présence (milieu non désaéré) ou non (milieu désaéré) de l'oxygène moléculaire. Aucune dégradation du flavonol n'est observée dans les solutions privées d'oxygène, et ce, même pour des doses supérieures à 20 kGy.

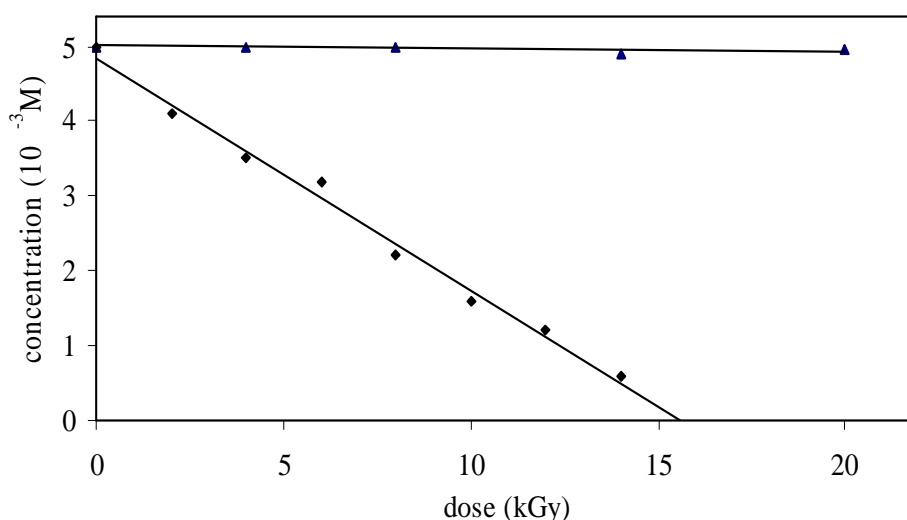
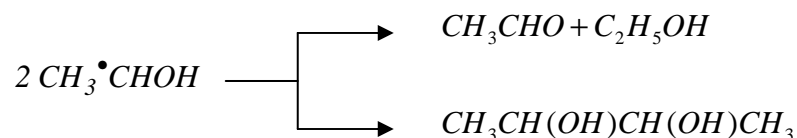


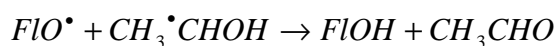
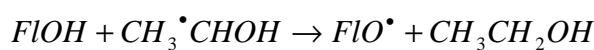
Figure 26 : Evolution de la concentration de la quercétine en fonction de la dose d'irradiation, en solution alcoolique à 5×10^{-3} M de concentration, en milieu désaéré (▲) et en milieu non désaéré (■).

Une étude récente (*Hryntsevich, 2005*) portant sur la radiolyse d'une série de flavonoïdes en milieu éthanolique désaéré a également montré que les flavonols ne se dégradent pas, confirmant le rôle principal de l'oxygène moléculaire dans le mécanisme de dégradation de ces composés. En revanche les auteurs ont montré une dégradation des flavones (absence du groupement 3-OH) et des flavanones (absence de la double liaison et du groupement 3-OH), indiquant un rôle protecteur de l'oxygène possible pour ces deux groupes de molécules. Aucune dégradation n'a été observée que ce soit en milieu non désaéré ou

désaéré pour les dihydroflavonols (absence de la double liaison et présence de 3-OH). Cette étude est réalisée dans des conditions (concentrations et doses) différentes des nôtres, en mesurant le rendement radiolytique de l'acétaldéhyde et du 2,3-butanediol, formés à partir de HER selon la réaction suivante:



Les flavonols en milieu désaéré réagissent avec le radical HER selon les réactions suivantes :



La non réactivité des flavonols en milieu désaéré peut s'expliquer par la conjugaison de la molécule qui la rend plus stable que les flavones ou les flavanones où la conjugaison a disparu. La radiolyse de l'acide caféique en milieu désaéré montre une forte dégradation, qui peut être expliquée par l'addition directe du radical HER sur la double liaison. D'autres études (Zhongli, 1996) ont montré le rôle de la double liaison dans le processus de dégradation de la baicaline. Dans ce cas les auteurs proposent également que le radical HER puisse attaquer la double liaison C₂-C₃ de la baicaline. Les flavonols ont donc démontré leur capacité à piéger les radicaux HER.

III. MECANISME DE DEGRADATION DES FLAVONOLS

Nous proposons maintenant les mécanismes de transformation des flavonols en milieu alcoolique non désaéré. La première étape de transformation est l'attaque de HMR ou HER qui arrache le proton du groupement hydroxyle en position 3. Le calcul des énergies de dissociation (BDE pour bond dissociation enthalpie) des groupements OH, en présence d'un solvant, montre la facilité à rompre la liaison O-H du groupement 3-OH (voir **Figure 23** dans le cas de la quercétine). Cette étape est suivie par la formation d'un radical phénoxy pour lequel la densité de spin a été calculée et vaut 0,44 sur l'atome C-2 (**Figure 24**), indiquant une

forte réactivité de cet atome dans ce radical phénoxy. Ce déplacement n'est rendu possible que par la présence de la double liaison C2-C3.

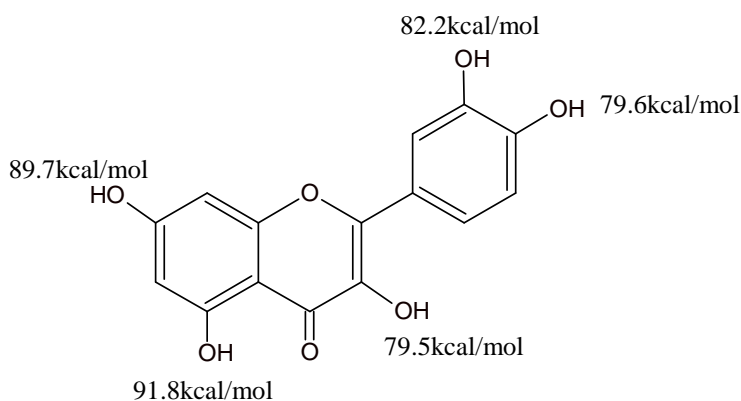


Figure 27 : BDE des groupements OH de la quercétine
(calculs PCM-(U)B3P86/6-311+6(d,p)).(Trouillas, 2005)

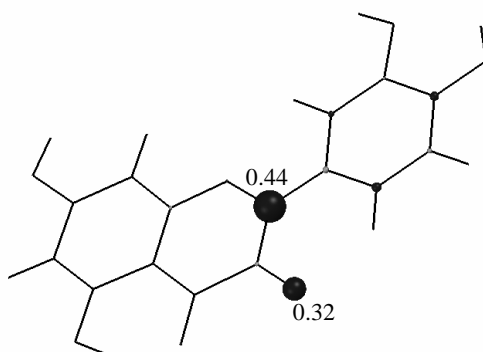


Figure 28 : Densité de spin du radical formé après « arrachement » de l'atome d'hydrogène du groupe 3-OH de la quercétine. (Trouillas, 2005)

En milieu non désaéré (présence d'oxygène), la deuxième étape est la formation d'un radical peroxyde, par addition d'oxygène en C-2. Deux chemins réactionnels sont alors envisageables (**Figure 29**) :

- ✓ Le premier propose un réarrangement du radical peroxyde par liaison de l'oxygène terminal avec l'atome C-3. Une rupture double des liaisons dans ce radical intermédiaire peu stable, suivi de l'addition d'un radical R^\bullet (**Figure 29**) explique la formation du depside.

- ✓ Le deuxième chemin réactionnel propose l'addition d'un radical H^\bullet sur le radical peroxyde pour former un peroxyde d'hydrogène. La liaison O-O de ce composé intermédiaire peut alors se rompre formant un radical RO^\bullet (**Figure 29**) qui va se stabiliser par rupture de la

liaison C2-C3, ouverture de l'hétérocycle central et addition de radicaux centrés sur l'oxygène et présents dans le milieu de radiolyse ($\bullet\text{OCH}_3$, $\bullet\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ou $\bullet\text{OH}$) et formation du depside.

La compréhension complète du mécanisme de dégradation des flavonols fait l'objet d'une étude théorique soumise à publication à *Free Radical Biology & Medicine*, et effectuée dans le cadre de la thèse de David Kozlowski. Cette étude semble privilégier la deuxième voie puisque l'addition de $\text{H}\bullet$ est probablement favorisée dans le milieu de radiolyse.

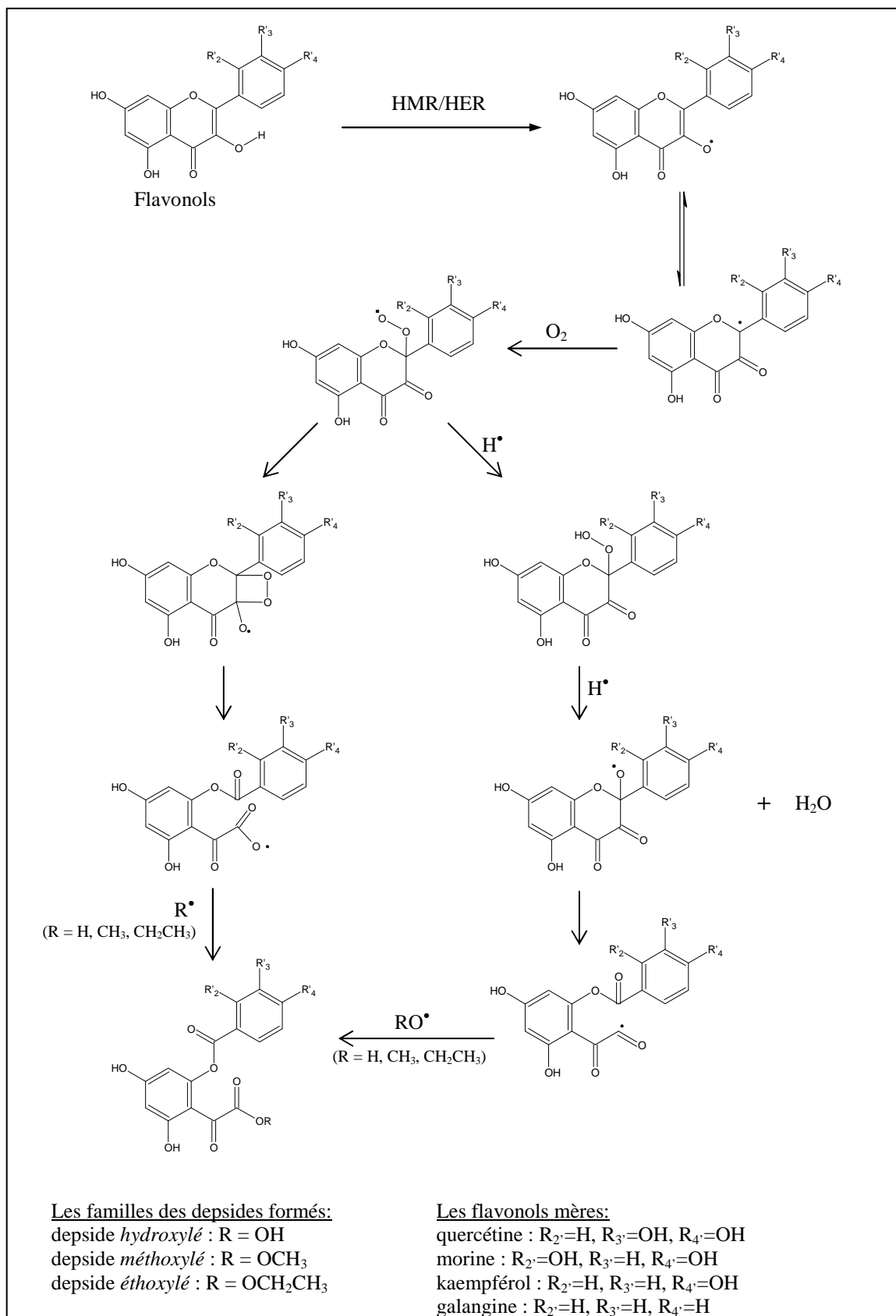


Figure 29 : Mécanismes réactionnels proposés pour la formation des depsides à partir des flavonols quercétine, morine, kaempférol et galangine.

CHAPITRE V

RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL ET
L'ETHANOL

RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL ET L'ETHANOL

INTRODUCTION

Nous venons de le voir, l'étude de la réactivité des flavonoïdes en milieu de radiolyse montre que certains d'entre eux se dégradent. Ceci nous a amené à étudier la réactivité des chalcones, dans les mêmes conditions, avec les espèces radiolytiques des alcools, notamment celles formées durant la radiolyse du méthanol et de l'éthanol. C'est cette étude que nous présenterons dans ce chapitre. Six chalcones et une dihydrochalcone ont été irradiées séparément dans le méthanol et une dans l'éthanol.

I. RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL

I.1. RADIOLYSE DE LA 2,2',4'-TRIHYDROXYCHALCONE EN MILIEU DESAERE

Nous avons irradié des solutions méthanoliques de la 2,2',4'-trihydroxychalcone à différentes concentrations (5×10^{-5} M, 10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M, $2,5 \times 10^{-3}$ M, 5×10^{-3} M, 10^{-2} M) et à différentes doses allant de 0,1 kGy jusqu'à 24 kGy. Nous avons désaéré les solutions en faisant barboter de l'hélium, puis irradié ces solutions avec un débit de dose est de 470 Gy/h. L'analyse est effectuée par CLHP et par CCM analytique.

La **Figure 30** représente les chromatogrammes d'une solution désaérée de la 2,2',4'-trihydroxychalcone à 5×10^{-3} M non irradiée (le contrôle) et irradiée avec les doses suivantes : 4 kGy, 8 kGy et 12 kGy. Nous observons que la hauteur du pic de la 2,2',4'-trihydroxychalcone (temps de rétention : $t_r = 26$ min) diminue en fonction de la dose

absorbée. De nouveaux pics apparaissent, ils indiquent la formation des produits de radiolyse. Presque 50 % de la 2,2',4'-trihydroxychalcone est dégradée et transformée en d'autres produits à une dose de 8 kGy, et la dégradation complète est effective pour 12 kGy.

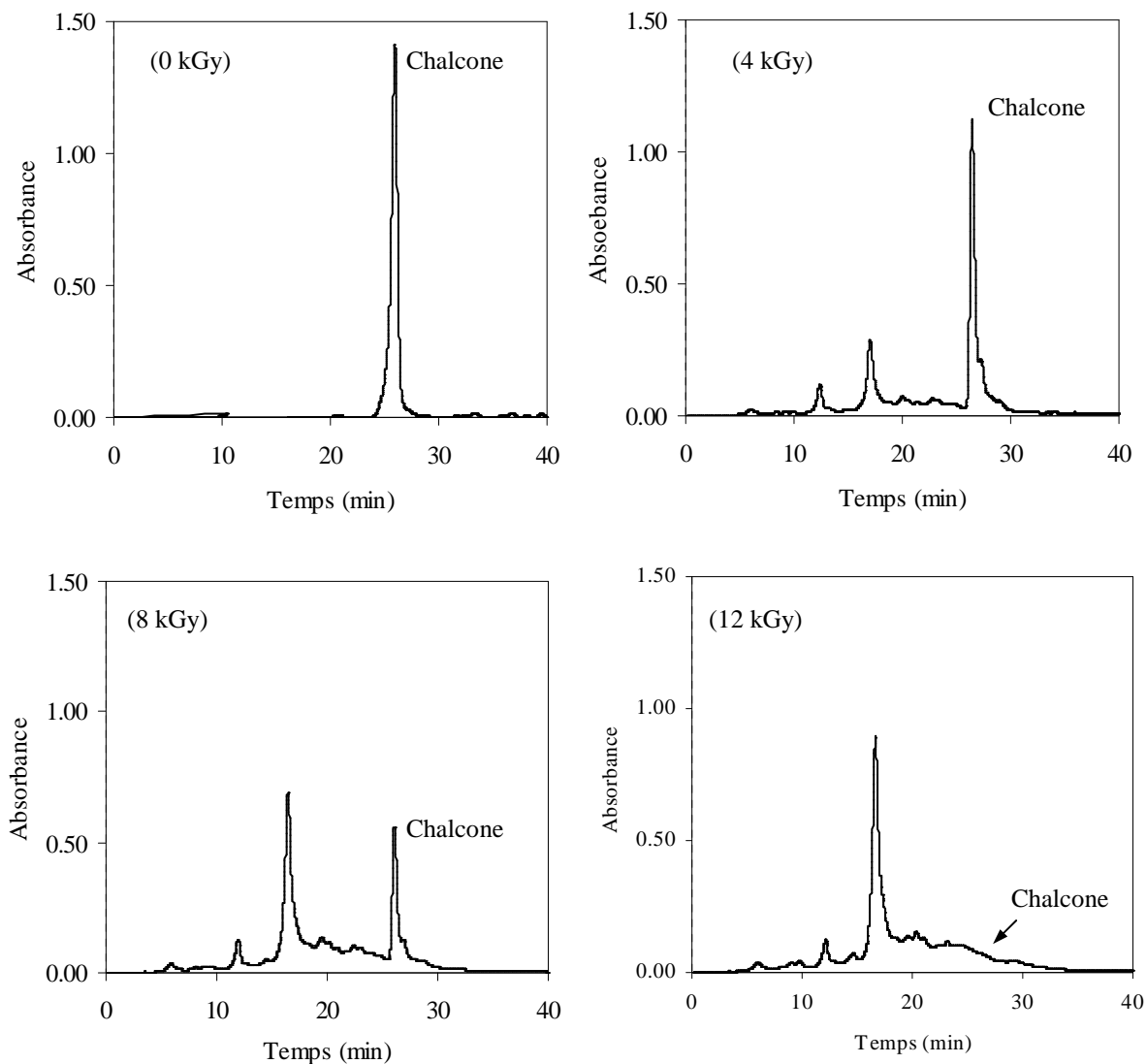


Figure 30 : Chromatogrammes obtenus par CLHP, enregistrés à 280 nm, d'une solution de la 2,2',4'-trihydroxychalcone (5×10^{-3} M) avant et après irradiation avec des doses de 4 kGy, 8 kGy et 12 kGy, en milieu désaéré.

Pour les faibles concentrations ($2,5 \times 10^{-4}$ M), une dose de 0,75 kGy est suffisante pour causer la dégradation totale de la 2,2',4'-trihydroxychalcone (**Figure 31**). Nous constatons donc que la radiolyse est un processus qui dépend à la fois de la concentration et

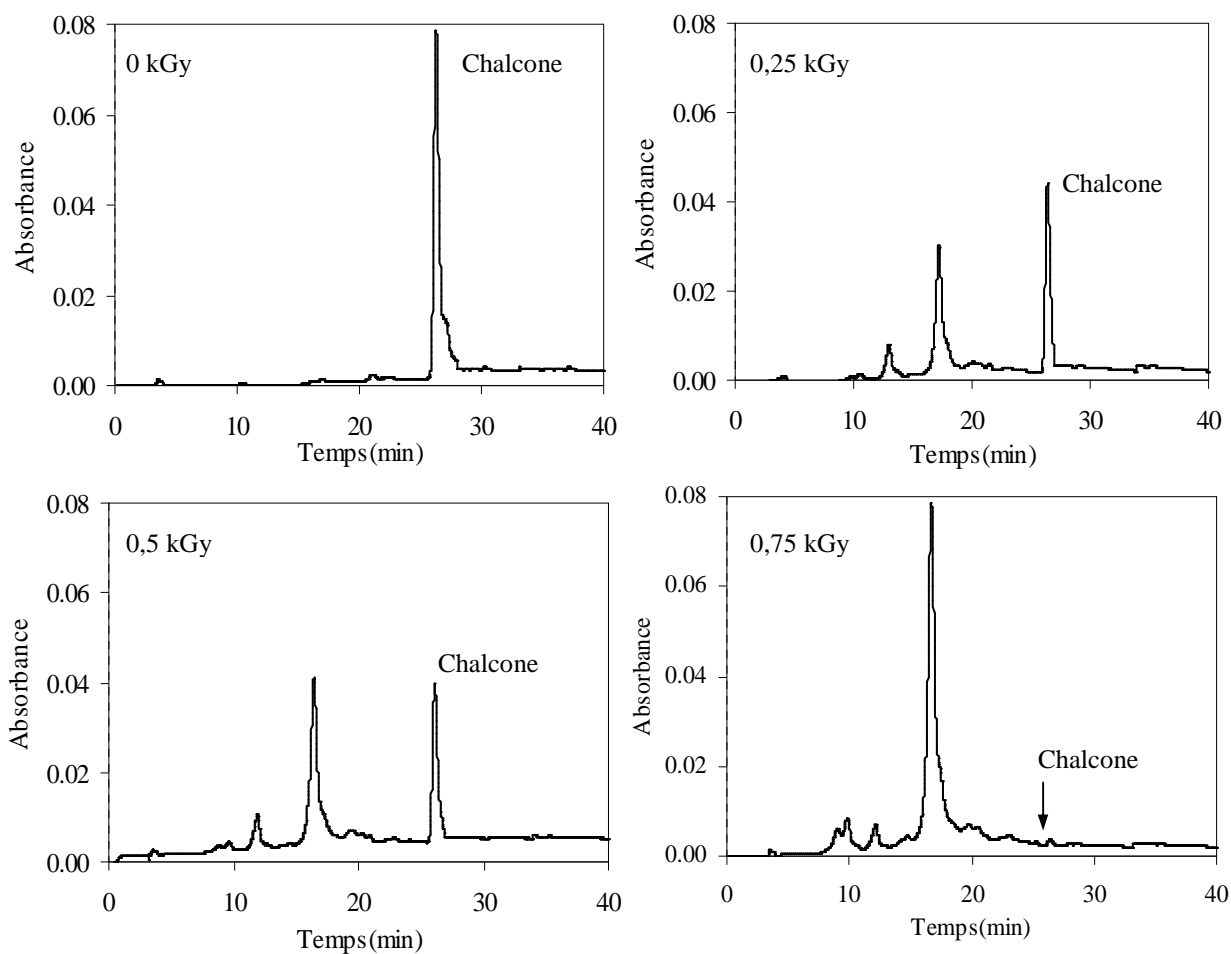


Figure 31 : Chromatogrammes obtenus par CLHP, enregistrés à 280 nm, d'une solution de la 2,2',4'-trihydroxychalcone ($2,5 \times 10^{-4}$ M) avant et après irradiation avec des doses de 0,25 kGy, 0,5 kGy et 0,75 kGy, en milieu désaéré.

On peut noter que pour le pic élué à 12 min, et surtout pour les faibles concentrations (Figure 31), ce pic subit une légère diminution visible sur les deux chromatogrammes obtenus à 0,5 kGy et 0,75 kGy. Ceci peut être expliqué par la radiolyse du produit élué à 12 min et nous conduit à ne pas exclure la possibilité de « radiolyse de la radiolyse » .

I.2. PURIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES DE LA 2,2',4'-TRIHYDROXYCHALCONE

Pour identifier les produits de radiolyse plusieurs étapes de purification sont nécessaires. Pour ce faire, 200 mg de 2,2',4'-trihydroxychalcone sont dissous dans le méthanol à une concentration de 5×10^{-3} M, et irradiés à une dose de 13 kGy, ce qui permet d'avoir une dégradation totale de la chalcone. Le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme enregistré à 12 kGy (**Figure 30**) en étude analytique. L'irradiation est réalisée en milieu désaéré.

I.2.1. Etape 1 : colonne ouverte

La première étape de purification des produits de radiolyse est réalisée à l'aide d'une colonne ouverte de sephadex (LH20), cette phase permet de séparer les molécules en fonction de leur taille. Dix huit fractions ont été récoltées à la sortie de la colonne et analysées par CLHP et CCM. Aucun produit pur n'a été récupéré à l'issue de cette étape. Les fractions intéressantes qui contiennent les pics majoritaires et qui ont un profil similaire ont été regroupées dans le but de réaliser une deuxième séparation. Le chromatogramme du regroupement est représenté sur la **Figure 32**.

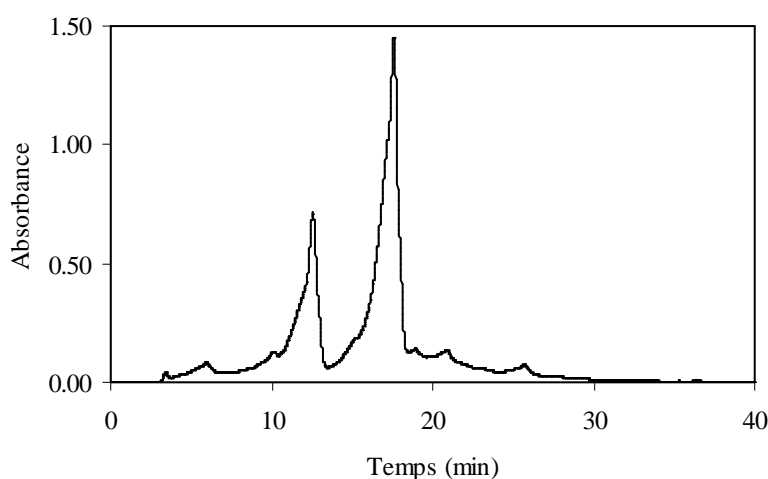


Figure 32 : Chromatogramme obtenu par CLHP analytique des fractions regroupées issues de la colonne ouverte de sephadex.

Nous constatons que la colonne ouverte de Sephadex nous a permis d'éliminer l'ensemble des produits élués entre 19 et 26 min. La **Figure 32** présente le chromatogramme des fractions regroupées. La suite de la séparation utilisera la CCM centrifuge pour les fractions regroupées.

I.2.2. Etape 2 : CCM centrifuge

Cette méthode de purification se base sur une répartition par polarité. Vingt et une fractions ont été récoltées, évaporées sous vide et pesées puis analysées par CCM et CLHP. Une analyse CCM de toutes les fractions révèle que six d'entre elles ne contiennent qu'un seul produit chacune. Les rapports frontaux de ces produits (**Tableau 7**) montrent que l'on est en présence de six produits différents notés **P_i** (i = 1 à 6). L'injection de ces six fractions en CLHP donne un résultat inattendu : une séparation moins précise qu'en CCM. **P1** et **P2** sont élués quasiment au même temps de rétention (16 min), de même que **P3** et **P4** (17 min), et **P5** et **P6** (12 min).

Le **tableau 7** récapitule les masses obtenues pour chaque produit, le temps de rétention (t_r) et le facteur de rétention (rapport frontal R_f).

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t_r) (min)	Rapport frontal (R_f)
P1	8,5	16	0,42
P2	7,2	16	0,47
P3	9,7	17	0,45
P4	5,6	17	0,28
P5	2,7	12	0,86
P6	2,4	12	0,81

Tableau 7 : Masses obtenues, temps de rétention (obtenus en CLHP) et rapports frontaux relevés sur silice en utilisant le mélange M1 : CH_2Cl_2 / AcOEt / MeOH : 90 / 5 / 5 (décrit dans matériels et méthodes).

Les masses indiquées dans le **tableau 7** représentent la quantité de chaque produit pur. Toutefois on doit noter la présence de ces produits dans d'autres fractions, démontrant que les quantités formées de chaque produit sont supérieures à la masse indiquée dans le **tableau 7**.

I.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOLYTIQUES DE LA 2,2',4'-TRIHYDROXYCHALCONE

I.3.1. Spectre UV

Le spectre UV des chalcones présente deux bandes d'absorption entre 320-370nm (bande I) et 220-254 nm (bande II) (*Dhar, 1981 ; Mabry, 1970*). Elles sont liées à la présence des deux groupements benzoyle et cinnamoyle. Le spectre UV de la 2,2',4'-trihydroxychalcone est donc caractérisé par deux bandes d'absorption centrées autour de $\lambda_{1\max} = 366$ nm et $\lambda_{2\max} = 253$ nm, ainsi que par un épaulement à 312 nm (**Figure 33**). Nous constatons que pour les produits de radiolyse, la bande I à 366 nm a disparu. Ceci indique que la conjugaison totale de la molécule n'a plus lieu, ce qui semble indiquer la disparition de la double liaison au cours de la radiolyse. Pour les produits **P1**, **P2**, **P3** et **P5**, une nouvelle bande d'absorption apparaît entre 277 et 281 nm qui pourrait être attribuée au cycle B non conjugué. Pour **P4** et **P6** notons la disparition de l'épaulement à 312 nm qui est dû à la conjugaison entre le cycle B et le groupement carbonyle (**Figure 33**).

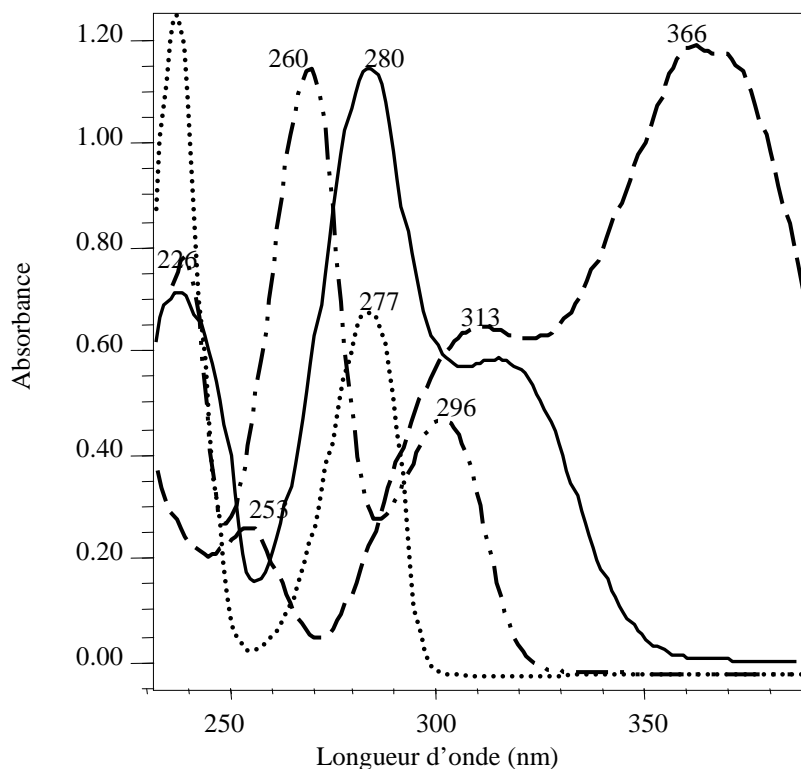


Figure 33 : Spectres UV de la 2,2',4'-trihydroxychalcone (-----) et des produits de radiolyse: (——) **P1**, **P2**, **P3** et **P5** ; (·····) **P4** ; (— · —) **P6**, à une concentration de 5×10^{-4} M).

I.3.2. Spectres RMN des produits P1, P2, P3, P4, P5 et P6

Les composés formés au cours de la radiolyse de la 2,2',4'-trihydroxychalcone sont identifiés par RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC.

I.3.1.a. Produit P1

Le spectre proton ^1H de P1 (**Tableau 8**) montre la présence de sept protons aromatiques et cinq protons aliphatiques :

✓ Quatre d'entre eux sont détectés à 6,81 ppm (H-3_B) ; 7,01 ppm (H-4_B) ; 6,75 ppm (H-5_B) et 7,20 ppm (H-6_B), ils sont attribués au cycle aromatique B.

✓ Trois autres protons sont détectés à 6,28 ppm (H-3_A) ; 6,42 ppm (H-5_A) et 7,91 ppm (H-6_A) montrant la présence du deuxième cycle aromatique A.

✓ Cinq signaux correspondant aux protons aliphatiques: un groupe oxyméthylène à (3,90 ppm et 3,81 ppm, H-4), un groupe méthylène lié au carbonyle (3,52 ppm et 3,42 ppm, H-2) et un groupe méthine (3,82 ppm, H-3). Les positions de tous ces protons sont déterminées à partir du spectre COSY du couplage proton-proton (**Tableau 8**).

Le spectre carbone ^{13}C *J*mod (**Tableau 8**) est constitué de seize signaux, quatre sont attribués à la partie aliphatique et les douze autres à la partie aromatique:

✓ La partie aliphatique est constituée d'un carbonyle quaternaire (205,3 ppm, C-1), un carbone tertiaire C-lié (40,4 ppm, C-3), un carbone secondaire C-lié (39,6 ppm, C-2) et un carbone secondaire O-lié (65,8 ppm, C-4).

✓ La partie aromatique est constituée de cinq carbones quaternaires, dont trois sont O-liés (156,2 ppm, C-2_B ; 165,6 ppm, C-2_A ; 166,4 ppm, C-4_A), deux sont C-liés (129,7 ppm, C-1_B ; 114,3 ppm, C-1_A), et sept carbones tertiaires (116,8 ppm, C-3_B ; 128,3 ppm, C-4_B ; 120,5 ppm, C-5_B ; 130,0 ppm, C-6_B ; 103,6 ppm, C-3_A ; 108,8 ppm, C-5_A ; 133,9 ppm, C-6_A).

Les positions de tous les carbones sont déterminées à partir des spectres HMQC et HMBC du couplage ^1H - ^{13}C (**Tableau 8**).

Finalement **P1** est identifié comme un nouveau diarylbutanone : 1-[2,4-dihydroxyphényl]-3-(2-hydroxyphényl)-4-hydroxy-butanone (**Figure 34**).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P1				
Cycle-B				
1			129,7	
2			156,2	
3	6,81 dd (8,0 ; 1,2)	H-4 _B ; H-5 _B	116,8	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,01 ddd (8,0 ; 7,5 ; 1,7)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,3	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,75 br ddd (7,5 ; 1,2)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,5	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,20 dd (7,6 ; 1,6)	H-4 _B ; H-5 _B	130,0	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			114,3	
2			165,6	
3	6,28 d (2,4)	H-5 _A	103,6	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,4	
5	6,42 dd (8,8 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,8	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,91 d (8,9)	H-5 _A	133,9	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
butanone				
1			205,3	
2	3,52 dd (16,2 ; 5,9)	H-2 ; H-3	39,6	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
	3,42 dd (16,2 ; 7,4)	H-2 ; H-3	39,6	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,82 m	H-2 ; H-4	40,4	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	3,90 dd (12,3 ; 7,7)	H-3 ; H-4	65,8	C-2 ; C-3 ; C-1 _B
	3,81 m	H-3 ; H-4	65,8	C-2 ; C-3 ; C-1 _B
P2				
Cycle-B				
1			129,1	
2			156,5	
3	6,74 br d (7,7)	H-4 _B ; H-5 _B	116,5	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,00 ddd (7,8 ; 1,4)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,6	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,73 br t (7,7)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,6	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,11 dd (7,8 ; 1,2)	H-4 _B ; H-5 _B	130,1	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			114,5	
2			166,4 ^a	
3	6,21 d (2,3)	H-5 _A	103,6	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,2 ^a	
5	6,32 dd (8,9 ; 2,3)	H-3 _A ; H-6 _A	109,0	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,79 d (8,9)	H-5 _A	134,0	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
butanone				
1			205,8	
2	3,41 dd (15,6 ; 7,5)	H-2 ; H-3	40,2	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
	3,32 dd (15,6 ; 5,8)	H-2 ; H-3	40,2	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,74 m	H-2 ; H-4	41,2	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	3,86 dd (10,0 ; 5,5)	H-3 ; H-4	65,8	C-2 ; C-3 ; C-1 _A ; OCH ₃
	3,78 m	H-3 ; H-4	65,8	C-2 ; C-3 ; C-1 _A ; OCH ₃
OCH ₃	3,35* s		49,9	C-4

*3H; ^aValeurs sont interchangeable

Tableau 8 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P1** et **P2** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

I.3.1.b. Produit P2

Les spectres ^1H et ^{13}C de **P2** sont presque similaires à ceux de **P1** (**Tableau 8**). Ils indiquent que le composé **P2** est constitué des mêmes cycles aromatiques A et B, et de la même partie aliphatique. La seule différence observée est la présence d'un groupe méthoxyle pour **P2**, représenté par un carbone à (49,9 ppm, OCH_3) et un singulet de trois protons à (3,35 ppm). La constante de corrélation 3J observée en HMBC entre le proton à 3,35 ppm et le carbone à 65,8 ppm (C-4) montre que le groupe méthoxyle est lié au groupe oxyméthylène (**Tableau 8**). Par conséquent **P2** est identifié comme le 1-[2,4-dihydroxyphényl]-3-(2-hydroxyphényl)-4-méthoxy-butanone, un nouveau diarylbutanone (**Figure 34**).

I.3.1.c. Produit P3

Les résultats RMN ^1H et ^{13}C J_{mod} de **P3** (**Tableau 9**) montrent la présence des deux cycles aromatiques A et B comme le composé **P1** et on note trois différences dans la partie aliphatique entre **P1** et **P3** (**Tableaux 8 et 9**).

Le groupe méthylène attaché au carbonyle pour **P1** a été remplacé par un groupe méthine (4,10 ppm, H-2 et 55,0 ppm, C-2) pour **P3**, la présence d'un groupe oxyméthylène (3,82 ppm, 3,44 ppm, 62,6 ppm, 2- CH_2OH) et un groupe méthoxyle (3,06 ppm, 56,9 ppm, 3- OCH_3). Les liaisons entre les différents éléments de la partie aliphatique et la partie aromatique ont été déduites des analyses HMBC. Ainsi **P3** est identifié comme le 1-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-3-méthoxy-3-(2-hydroxyphényl)-propanone, un nouveau diarylpropanone (**Figure 34**).

I.3.1.d. Produit P4

Les résultats RMN ^1H et ^{13}C J_{mod} de **P4** (**Tableau 9**) montre aussi la présence des deux cycles aromatiques A et B, la principale différence entre **P1** et **P4** (**Tableaux 8 et 9**) est l'absence du carbonyle pour **P4** et la présence d'un signal correspondant à un carbone quaternaire (90,8 ppm, C-2), O-lié à un groupe hydroxyméthylène (3,68, ppm 3,63 ppm, 69,7 ppm, 2- CH_2OH). On note aussi la formation d'un cycle tetrahydrofurane (**Figure 34**). La structure de **P4** est confirmée par les résultats RMN-2D incluant les corrélations observées en ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C et en HMBC (**Tableau 9**).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P3				
Cycle-B				
1			126,4	
2			156,7	
3	6,91 dd (8,0 ; 0,9)	H-4 _B ; H-5 _B	116,6	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,19 ddd (8,0 ; 7,5 ; 1,7)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	129,9	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,93 br ddd (7,5 ; 0,9)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,0	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,38 dd (7,6 ; 1,6)	H-4 _B ; H-5 _B	129,0	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			116,3	
2			165,6	
3	6,34 d (2,4)	H-5 _A	103,4	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,5	
5	6,44 dd (8,8 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,94 d (8,9)	H-5 _A	134,7	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
propanone				
1			207,2	
2	4,10 br ddd (9,2 ; 3,6)	H-3 ; 2-CH ₂ OH	55,0	C-1 ; 2-CH ₂ OH ; C-3 ; C-1 _A ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,82 dd (10,6 ; 8,8)	H-2 ; 2-CH ₂ OH	62,6	C-1 ; C-2 ; C-3
	3,44 dd (10,6 ; 3,7)	H-2 ; 2-CH ₂ OH	62,6	C-1 ; C-2 ; C-3
3	5,01 d (9,9)	H-2	78,7	C-1 ; C-2 ; 2-CH ₂ OH ; 3-OCH ₃ ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
3-OCH ₃	3,06* s		56,9	C-3
P4				
Cycle-B				
1			127,5	
2			156,4	
3	6,84 dd (8,1 ; 1,1)	H-4 _B ; H-5 _B	116,1	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,02 dt (7,7 ; 1,6)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,3 ^a	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,75 dt (7,5 ; 1,1)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,6	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,11 dd (7,7 ; 1,5)	H-4 _B ; H-5 _B	128,4 ^a	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			121,4	
2			157,5	
3	6,28 d (2,4)	H-5 _A	104,4	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,6	
5	6,31 dd (8,4 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	107,5	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,03 d (8,4)	H-5 _A	129,1	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			90,8	
3	2,95 dd (12,4 ; 8,1)	H-3 ; H-4	42,0	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,40 dd (12,4 ; 10,6)	H-3 ; H-4	42,0	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	4,01 ddd (10,4 ; 7,8 ; 7,7)	H-3 ; H-5	40,2	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,41 br t (7,4)	H-4 ; H-5	73,8	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,81 dd (10,2 ; 7,7)	H-4 ; H-5	73,8	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,68 d (11,4)	2-CH ₂ OH	69,7	C-2 ; C-3 ; C-1 _A
	3,63 d (11,4)	2-CH ₂ OH	69,7	C-2 ; C-3 ; C-1 _A

* 3H; ^a Valeurs sont interchangeables

Table 9 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P3** et **P4** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

P4 est identifié comme étant un nouveau diaryltetrahydrofurane : 2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-4-(2-hydroxyphényl)-tetrahydrofurane.

I.3.1.e. Produit P5

Le spectre proton ^1H de **P5** (**Tableau 10**) montre la présence de trois protons aromatiques détectés à 6,32 ppm (H-3_A), 6,43 ppm (H-5_A) et 7,77 ppm (H-6_A) attribués au cycle aromatique A et un groupe méthyle à 2,54 ppm (H-8). Les positions de tous ces protons sont déterminées à partir du spectre COSY du couplage proton-proton (**Tableau 10**).

Le spectre carbone ^{13}C *J*mod de **P5** (**Tableau 10**) est constitué de huit signaux, six d'entre eux confirment la présence du cycle aromatique A et les deux autres sont attribués au groupement acétyle. Ce dernier est constitué d'un carbonyle quaternaire (203,7 ppm, C-7) et d'un carbone primaire C-lié correspondant au groupement méthyle (26,3 ppm, C-8). Le cycle aromatique est constitué de trois carbones quaternaires, deux sont O-liés (165,7 ppm, C-2_A and 166,2 ppm, C-4_A) et un C-lié (114,3 ppm, C-1_A) et de trois carbones tertiaires (103,5 ppm, C-3_A; 108,7 ppm, C-5_A et 134,4 ppm, C-6_A).

Les positions de tous les carbones sont déterminées à partir des spectres HMQC et HMBC du couplage ^1H - ^{13}C (**Tableau 10**).

Ainsi le produit **P5** est identifié comme la 2,4-dihydroxyacétophénone (**Figure 34**).

I.3.1.f. Produit P6

Le spectre proton ^1H de **P6** (**Tableau 12**) montre la présence de :

✓ Quatre protons aromatiques détectés à 6,91 ppm (H-3_B) ; 7,12 ppm (H-4_B) ; 6,84 ppm (H-5_B) et 7,21 ppm (H-6_B), ils sont attribués au cycle aromatique B.

✓ Cinq protons aliphatiques correspondant à un groupe méthine (4,03 ppm, H-4) et à deux groupes méthylène, un O-lié (4,65 ppm, 4,28 ppm, H-5) et l'autre C-lié (2,79 ppm, H-3). Ces cinq protons aliphatiques forment une γ -butyrolactone (**Figure 34**). Les positions des protons sont déterminées à partir des spectres ^1H - ^1H COSY NMR (**Tableau 10**).

Le spectre carbone ^{13}C *J*mod de **P6** présente dix carbones, six d'entre eux sont attribués au cycle aromatique B et les quatre autres à la γ -butyrolactone. Les liaisons entre le cycle B et la γ -butyrolactone ont été déterminées par les couplages observés en HMBC (**Tableau 10**). Par conséquent **P6** est identifié comme la 3-(2-hydroxyphényl)- γ -butyrolactone (**Figure 34**).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P5				
Cycle-A				
1			114,3	
2			165,7	
3	6,32 d (2,4)	H-5 _A	103,5	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,2	
5	6,43 dd (8,8 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,7	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,77 d (8,8)	H-5 _A	134,4	C-7 ; C-2 _A ; C-4 _A
acétyl				
7			203,7	
8	2,54* s		26,3	C-1 _A ; C-7
P6				
Cycle-B				
1			127,1	
2			156,0	
3	6,91 dd (8,0 ; 1,1)	H-4 _B ; H-5 _B	116,3	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,12 ddd (7,9 ; 7,6 ; 1,6)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	129,1	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,84 br ddd (7,5 ; 1,1)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,7	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,21 dd (7,6 ; 1,5)	H-4 _B ; H-5 _B	128,6	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
γ-butyrolactone				
1			177,3	
2	2,79 [§] dd (8,8 ; 2,1)	H-3	34,1	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
3	4,03 m	H-2 ; H-4	37,3	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	4,65 br t (8,3)	H-3 ; H-4	73,1	C-1 ; C-2 ; C-3 ; C-1 _B
	4,28 dd (8,5 ; 7,6)	H-3 ; H-4	73,1	C-1 ; C-2 ; C-3 ; C-1 _B

*3H; §2H

Tableau 10 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P5** et **P6** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

I.3.3. Spectres de masse des produits **P1**, **P2**, **P3**, **P4**, **P5** et **P6**

L'ion moléculaire relevé dans le spectre de masse positif (FAB/LSIMS) de **P1** à m/z 311.08 [M + Na]⁺, montre que la formule moléculaire de **P1** est C₁₆H₁₆O₅ confirmant ainsi la structure obtenue par RMN.

L'ion moléculaire mesuré sur les spectres de masse positifs de **P2**, **P3** et **P4** ainsi que leur formules sont :

- m/z 325.10 [M + Na]⁺ (pour **P2**), C₁₇H₁₈O₅.
- m/z 355.09 [M + Na]⁺ (pour **P3**), C₁₈H₂₀O₆.
- m/z 325.10 [M + Na]⁺ (pour **P4**), C₁₇H₁₈O₅.

Ces résultats confirment les structures chimiques obtenues par RMN (**Figure 30**).

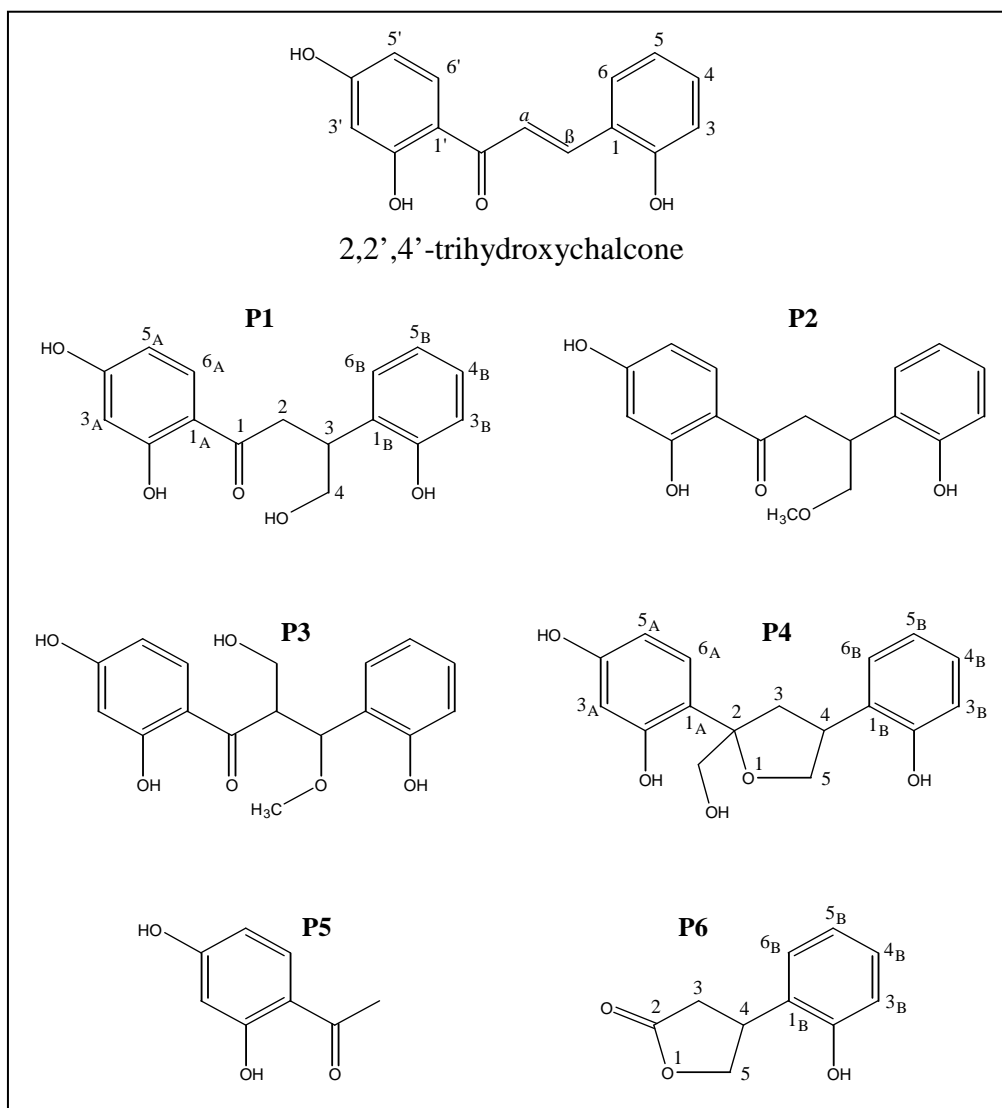


Figure 34 : Structures chimiques des produits issus du pic majoritaire de radiolyse de la 2,2',4'-trihydroxychalcone dans le méthanol.

I.4. PRODUITS MINORITAIRES

En plus des produits de radiolyse issus du pic majoritaire et présentés sur la **Figure 34**, nous avons observé, au cours des différentes étapes de purification, plusieurs produits minoritaires. Leur faible concentration a rendu leur purification quasi-impossible. Toutefois deux de ces produits ont pu être identifiés par rapport à des témoins, déposés dans les mêmes conditions sur des plaques de CCM, et en comparant les coefficients R_f et la fluorescence.

L'injection en CLHP des témoins et la comparaison des temps de rétention et des spectres UV confirment ce résultat. Ces deux produits sont représentés sur la **Figure 35**.



Figure 35 : Structures chimiques des produits issus des pics minoritaires de radiolyse de la 2,2',4'-trihydroxychalcone dans le méthanol.

I.5. RENDEMENT RADIOLYTIQUE ET COURBE DE CONCENTRATION

Les rendements radiolytiques de disparition des chalcones, ont été calculés en utilisant la même méthode pour toutes les chalcones étudiées. Nous présenterons ici la radiolyse de la 2,2',4'-trihydroxychalcone dans le méthanol. Rappelons que plusieurs produits de radiolyse peuvent avoir le même temps de rétention en CLHP, ce qui a rendu impossible le calcul des rendements radiolytiques de formation.

1.5.1. Courbe d'étalonnage

Pour pouvoir calculer la concentration de la chalcone au cours de la radiolyse, nous avons établi dans un premier temps une courbe d'étalonnage, qui donne la variation de la concentration en fonction de la hauteur du pic mesurée en CLHP pour la chalcone étudiée (**Figure 36**). La hauteur du pic correspond à l'absorbance de la molécule à 280nm. A partir de cette courbe d'étalonnage dans le méthanol, nous pouvons calculer la concentration de la chalcone qui reste dans la solution après irradiation à différentes doses.

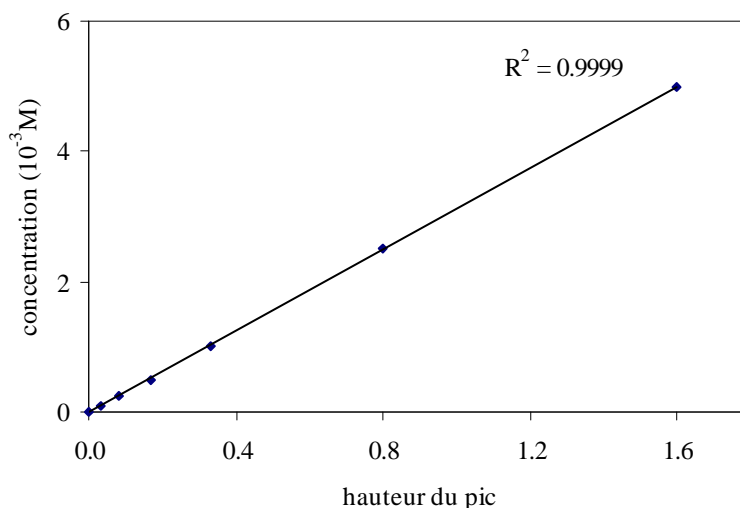


Figure 36 : Courbe d'étalonnage représentant la concentration de la 2,2',4'-trihydroxychalcone en fonction de la hauteur du pic mesurée à 280nm en CLHP en milieu méthanolique.

I.5.2. Evolution de la chalcone en fonction de la dose utilisée

A partir des chromatogrammes CLHP obtenus pour chaque concentration initiale de 2,2',4'-trihydroxychalcone (5×10^{-5} M, 10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M, $2,5 \times 10^{-3}$ M, 5×10^{-3} M et 10^{-2} M) irradiée à différentes doses (de 0,1 kGy à 12 kGy) (**Figure 30**), nous avons suivi l'évolution de la disparition de cette chalcone (**Figure 37**).

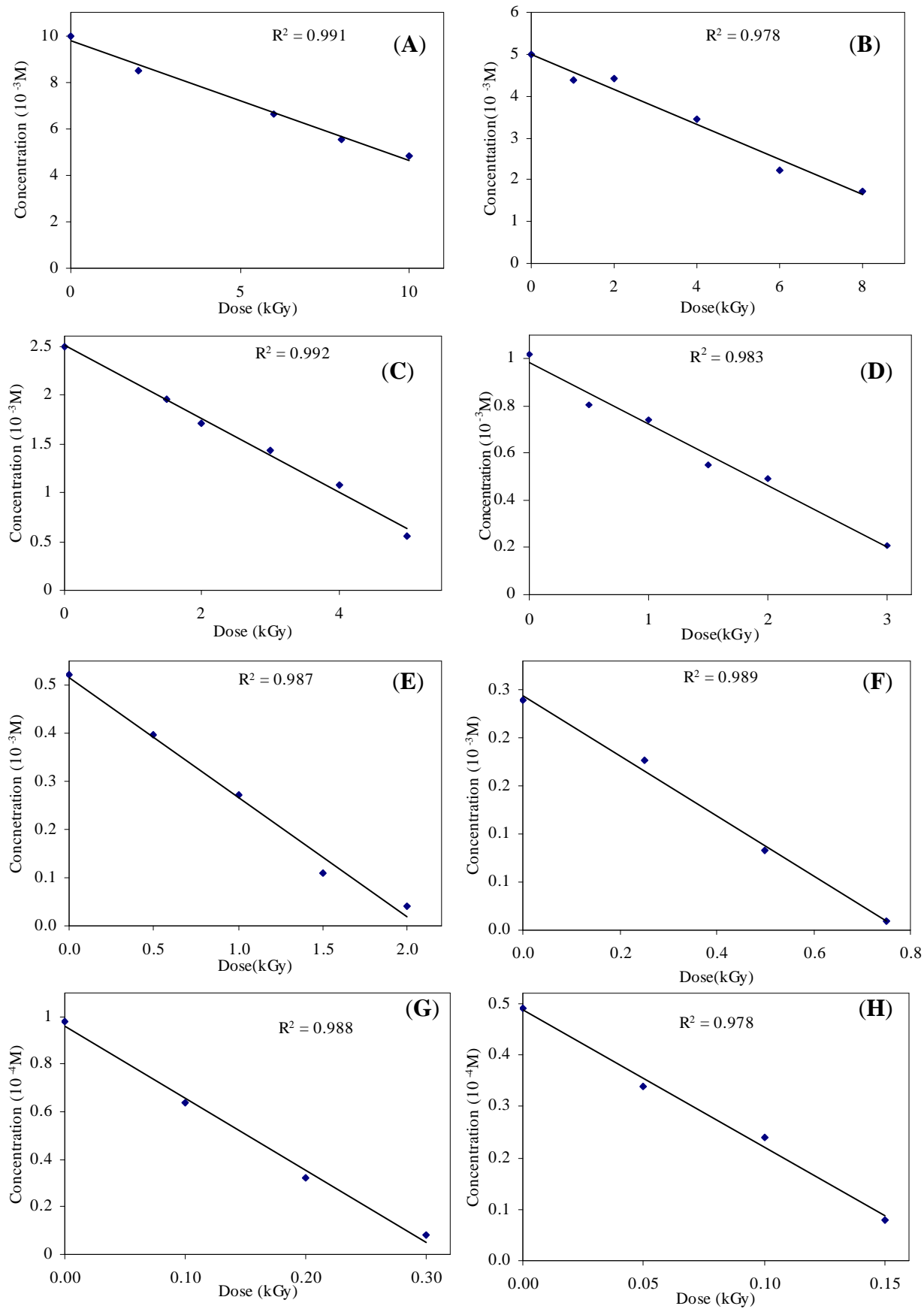


Figure 37 : Evolution de 2,2',4'-trihydroxychalcone en fonction de la dose appliquée à différentes concentrations: 10^{-2} M (A), 5×10^{-3} M (B), $2,5 \times 10^{-3}$ M (C), 10^{-3} M (D), 5×10^{-4} M (E), $2,5 \times 10^{-4}$ M (F), 10^{-4} M (G) et 5×10^{-5} M (H). Dans le méthanol en milieu désaéré.

I.5.3. Rendement radiolytique

Les courbes obtenues (**Figure 37**) sont des droites, à partir des pentes de ces droites on peut calculer les rendements radiolytiques de disparition de la 2,2',4'-trihydroxychalcone, pour chaque concentration initiale en utilisant l'équation donnant le rendement radiolytique et précédemment décrite dans le chapitre. ρ_s est la densité du solvant utilisé, D est la dose absorbée (Gy) et ΔM est la concentration (M), $\frac{\Delta M}{D}$ représente la pente des droites des courbes présentées sur la **Figure 37**.

La **Figure 38** montre l'évolution du rendement de disparition de la 2,2',4'-trihydroxychalcone en fonction de la concentration initiale dans le méthanol, en milieu désaéré.

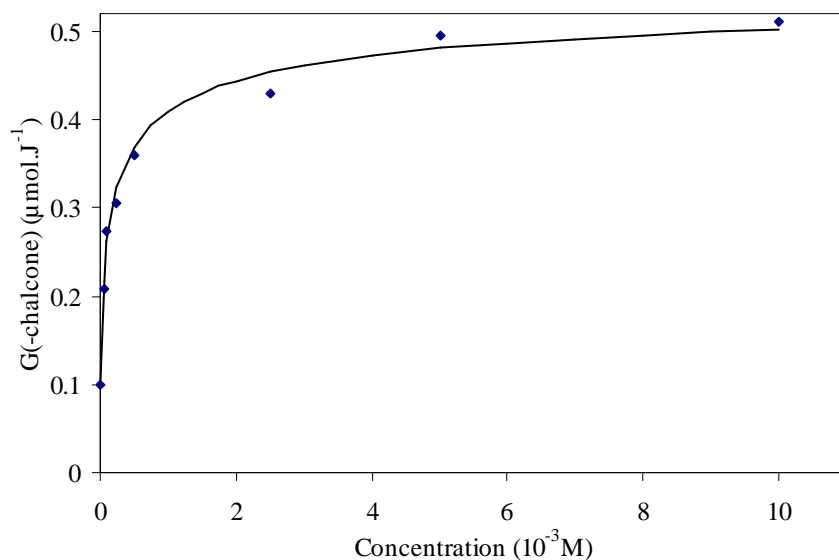


Figure 38 : Rendement radiolytique de disparition de la 2,2',4'-trihydroxychalcone dans le méthanol en milieu désaéré.

La courbe montre que le rendement de disparition de la chalcone, dans le méthanol augmente d'abord avec la concentration initiale puis atteint un palier pour des concentrations supérieures à 10^{-3} M. Ce profil est en accord avec ce que l'on appelle l'effet de dilution que nous avons décrit dans le deuxième chapitre, c'est un processus classique de radiolyse. Au palier de la courbe de dilution, le rendement de disparition de la 2,2',4'-trihydroxychalcone est indépendant de la concentration initiale

II. RADIOLYSE DES CHALCONES DANS LE METHANOL : GENERALISATION

II.1. ETUDE ANALYTIQUE DES CHALCONES

Pour mieux comprendre le processus de radiolyse des chalcones dans le méthanol, nous avons étudié la radiolyse de cinq autres chalcones et d'une dihydrochalcone. Il s'agit de la 2',4'-dihydroxychalcone (Ch2), la 2',4'-dihydroxy-2-méthoxychalcone (Ch3), la 2',4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone (Ch4), la 2'-hydroxychalcone (Ch5), la 2',3',4'-trihydroxychalcone (Ch6) et la 2',4,4',6'-tétrahydroxy-7,8-dihydrochalcone (phlorétine) (Figure 39).

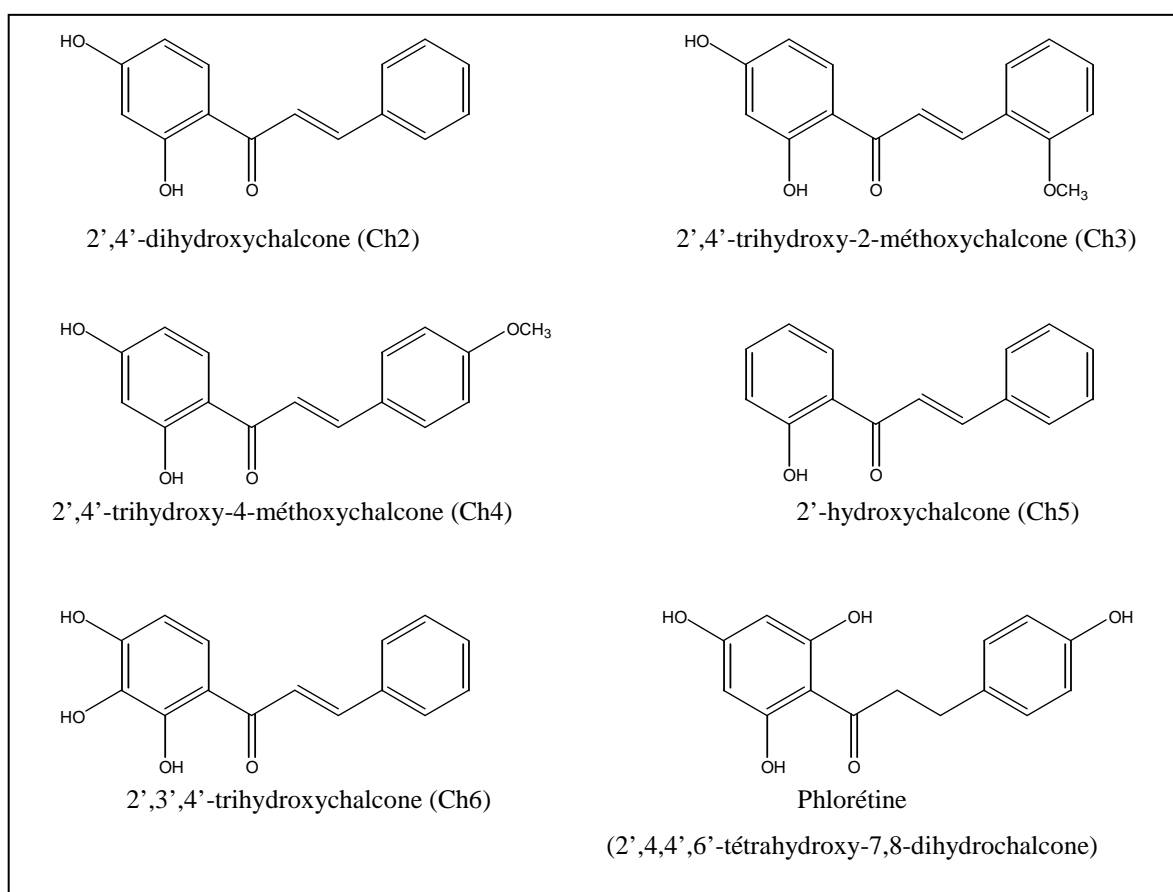


Figure 39 : Structure des différentes chalcones étudiées dans le méthanol.

La radiolyse de ce groupe de chalcones est réalisée dans les mêmes conditions que celle présentée dans le paragraphe précédent. Sur la **Figure 40**, nous avons reporté les chromatogrammes de Ch2 ($t_r = 30$ min), Ch3 ($t_r = 31$ min), Ch4 ($t_r = 31$ min) et Ch5 ($t_r = 34$ min) à 5×10^{-3} M avant irradiation (contrôles) et après irradiation avec une dose de 12 kGy en milieu désaéré. A cette concentration et à cette dose, les pics caractéristiques des chalcones ont pratiquement disparu sauf pour Ch5 qui n'est pas complètement dégradée.

La disparition des chalcones au cours de la radiolyse est accompagnée de l'apparition de nouveaux pics, ce qui traduit la formation de nouveaux produits (**Figure 40**).

Les profils de dégradation observés sur les chromatogrammes des **Figures 30 et 40** sont tout à fait semblables :

- ✓ disparition de la chalcone
- ✓ apparition d'un pic majoritaire élué en moyenne 10 min avant la chalcone
- ✓ « entre les deux », apparition d'un « massif » traduisant la formation de nombreux produits minoritaires.

Le fait que les composés de dégradation aient des temps d'élution inférieurs à ceux des chalcones dans le système chromatographique utilisé ici, montre que les composés formés sont plus polaires.

Deux différences notables sont constatées si l'on compare le comportement des six chalcones. Tout d'abord, Ch5 est moins dégradée que les quatre autres chalcones, il faut une dose de 16 kGy pour avoir la dégradation complète au lieu de 12 kGy pour les autres chalcones. Ensuite, nous constatons que les chromatogrammes de Ch6 (**Figure 40B**) montrent la formation d'un seul pic majoritaire élué autour de 16 min.

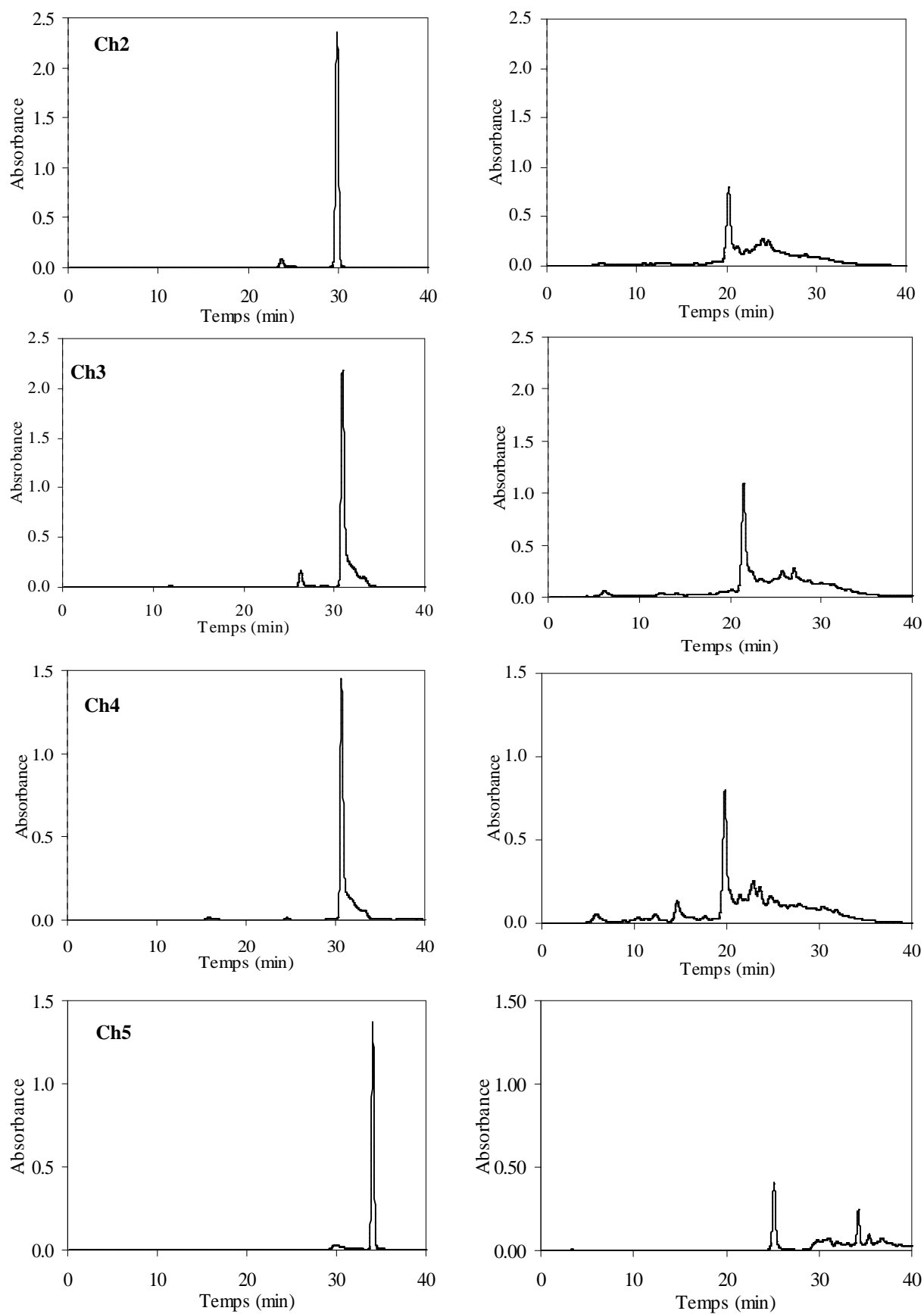


Figure 40(A) : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de Ch2, Ch3, Ch4 et Ch5 avant irradiation (colonne gauche) et après irradiation (colonne droite) avec une dose de 12 kGy en milieu désaéré.

Nous avons mentionné que la radiolyse de la 2,2',4'-trihydroxychalcone (Ch1) est un processus qui dépend à la fois de la concentration et de la dose. Autrement dit, pour les concentrations élevées (5×10^{-3} M), la dégradation totale de Ch1 n'est survenue qu'après l'application d'une dose importante (12 kGy en milieu désaéré). Pour les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), l'irradiation avec des doses inférieures à 0,5 kGy est suffisante pour causer la dégradation complète de Ch1. L'étude analytique de la radiolyse des cinq autres chalcones aboutit aux mêmes conclusions avec un décalage notable pour Ch5. Pour cette dernière, en milieu désaéré, la dégradation totale est effective à une dose de 16 kGy à 5×10^{-3} M (**Figure 40A**), alors que pour les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M) il faut aller jusqu'à 1,5 kGy au lieu de 0,5 kGy pour les autres chalcones.

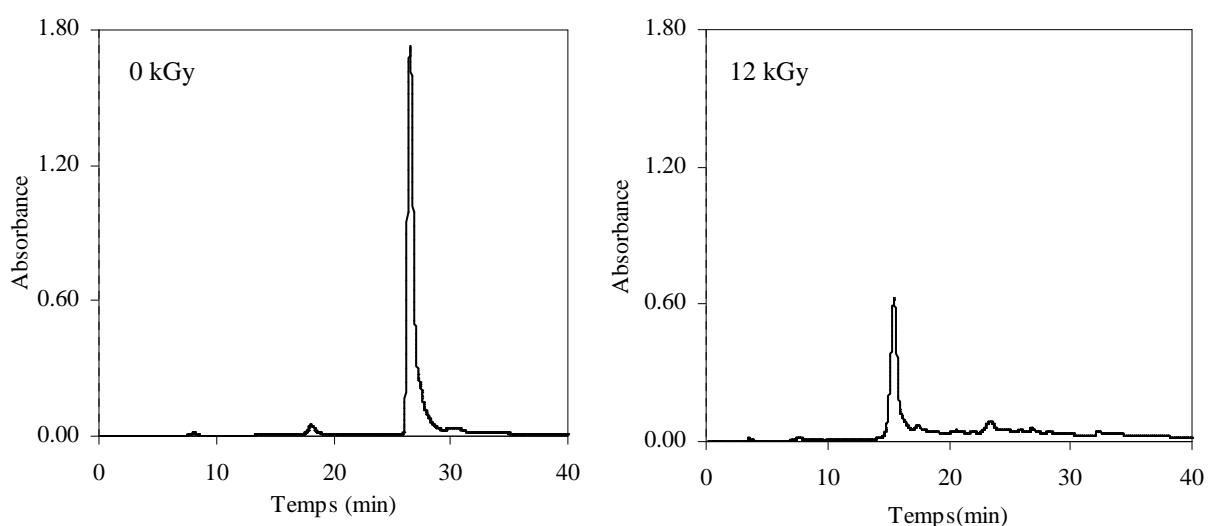


Figure 40(B) : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, pour Ch6 avant et après irradiation avec une dose de 12 kGy en milieu désaéré.

II.2. PURIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DES CHALCONES

100 mg de poudre de chacune des chalcones sont dissous dans du méthanol à une concentration de 5×10^{-3} M, et irradiés avec une dose de 13 kGy. A cette dose on obtient la disparition totale des chalcones, sauf pour Ch5 qui n'est pas complètement transformée à la dose appliquée. 17% de cette chalcone se retrouve dans la masse récupérée après les différentes étapes de purification. Les chromatogrammes obtenus sont identiques à ceux de la **Figure 40** obtenus à 12 kGy dans l'étude analytique. Les irradiations sont faites en milieu désaéré.

II.2.1. La 2',4'-Dihydroxychalcone (Ch2)

La purification des produits majoritaires issus de la radiolyse de Ch2 est réalisée en deux étapes :

✓ La première étape de purification est réalisée par CCM centrifuge, trente cinq fractions ont été récoltées, elles ont été évaporées et pesées. L'analyse CLHP et CCM de ces fractions montre la présence de trois produits purs, ils sont nommés **P7**, **P8** et **P9**. Parmi les fractions récoltées, une pèse 10 mg, et son injection en CLHP montre la présence de plusieurs produits plus polaires que la chalcone. Leur purification semble être difficile à la vue des quantités obtenues et du nombre de pics observés en CLHP. Pour pouvoir purifier ces produits, nous avons procédé à une acétylation de cette fraction.

Acétylation :

Cette étape consiste à changer spécifiquement les groupements hydroxyles par des groupements acétyles, ce qui permet de changer la polarité des produits et par suite de faciliter leur séparation. Cette fraction est dissoute dans 2 ml de pyridine, puis on rajoute 0,5 ml d'anhydride acétique. Des CCM de contrôle sont effectuées toutes les 12 heures, l'acétylation totale est réalisée en 48 heures.

✓ La deuxième étape de purification est réalisée par CLHP semi-préparative sur la fraction acétylée. Après acétylation, la fraction est évaporée puis pesée (13 mg), la purification est réalisée par CLHP semi-préparative, deux produits ont pu être récoltés **P10'** et **P11'**. Le **tableau 11** récapitule les masses obtenues pour chaque produit, leurs temps de rétention (t_r), et leurs facteurs de rétention (rapports frontaux R_f).

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t_r) (min)	Rapport frontal (R_f)
P7	6,5	23	0,81
P8	5,2	19	0,56
P9	4,7	20	0,53
P10'	2,6	23	0,80
P11'	1,7	29	0,96

Tableau 11 : Masses obtenues pour chaque produit, temps de rétention obtenu en CLHP et rapports frontaux relevés sur des plaques de silice en utilisant le mélange M1.

II.2.2. La 2',4'-Dihydroxy-2-méthoxychalcone (Ch3)

La purification est réalisée sur une colonne ouverte de Sephadex en deux fois. Après avoir analysé les fractions de la première colonne, nous avons regroupé les fractions où se trouvent les produits majoritaires et nous avons réalisé une deuxième colonne ouverte de Sephadex. Ainsi trois produits ont pu être isolés **P12**, et un couple d'isomères **P13/14**.

Le **tableau 12** récapitule les masses obtenues pour chaque produit, les temps de rétention (t_r), et les facteurs de rétention (rapports frontaux R_f).

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t_r) (min)	Rapport frontal (R_f)
P12	3,8	22	0,38
P13	8,2	22	0,34
P14	8,7	22	0,44

Tableau 12 : Masses obtenues pour chaque produit, temps de rétention obtenu en CLHP et rapports frontaux relevés sur des plaques de silice en utilisant le mélange M1.

II.2.3. La 2',4'-Dihydroxy-4-méthoxychalcone (Ch4)

Deux étapes de séparation sont nécessaires à la purification des produits issus de la radiolyse de Ch4 :

✓ La première étape est effectuée par une colonne ouverte de Sephadex, après analyse des fractions récoltées par CLHP et CCM. Celles qui contiennent les pics majoritaires et qui présentent des profils chromatographiques similaires sont regroupées pour faire une deuxième purification.

✓ La deuxième étape de purification est effectuée par CCM centrifuge. Cette étape nous a permis d'isoler trois produits, **P15** et un couple de diastéréoisomères **P16/17**. Le **tableau 13** récapitule les masses obtenues pour chaque produit, les temps de rétention (t_r), et les facteurs de rétention (rapports frontaux R_f).

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t_r) (min)	Rapport frontal (R_f)
P15	4,3	22	0,58
P16	8,2	20	0,52
P17	5,8	20	0,41

Tableau 13 : Masses obtenues pour chaque produit, temps de rétention obtenu en CLHP et rapports frontaux relevés sur des plaques de silice en utilisant le mélange M1.

II.2.4. La 2'-Hydroxychalcone (Ch5)

La purification du produit majoritaire de radiolyse est réalisée en trois étapes : tout d'abord un fractionnement par colonne ouverte (onze fractions), suivi d'une séparation par CCM centrifuge. Une CLHP semi-préparative est nécessaire pour purifier le produit majoritaire **P18**. Le fait que la chalcone ne soit pas complètement dégradée nous a empêché d'identifier plus de produits de radiolyse, parce que formés en faible quantité. Le **tableau 14** récapitule la masse obtenue, le temps de rétention (t_r), et le facteur de rétention (rapport frontal R_f).

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t_r) (min)	Rapport frontal (R_f)
P18	12,3	24	0,88

Tableau 14 : Masse obtenue pour chaque produit, temps de rétention obtenu en CLHP et rapport frontal relevé sur des plaques de silice en utilisant le mélange M1.

II.2.5. La 2',3',4'-Trihydroxychalcone (Ch6)

La purification est réalisée sur une colonne ouverte de Sephadex en une seule étape, l'analyse des fractions récoltées, nous a permis d'identifier le produit majoritaire de radiolyse **P19**. Le **tableau 15** récapitule la masse obtenue, le temps de rétention (t_r), et le facteur de rétention (rapport frontal R_f).

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t _r) (min)	Rapport frontal (R _f)
P19	14,3	15	0,82

Tableau 15 : Masse obtenue pour **P19**, temps de rétention obtenu en CLHP et rapport frontal relevé sur des plaques de silice en utilisant le mélange M1.

II.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DES CHALCONES

II.3.1. Spectres UV

Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, les chalcones possèdent deux bandes d'absorption en UV, la bande I entre 320 nm et 370 nm, cette bande représente la conjugaison entre les cycles A et B par l'intermédiaire de la double liaison et le groupement carbonyle, et la bande II allant de 220 nm jusqu'à 254 nm attribuée à la conjugaison entre la double liaison et le groupement carbonyle. L'épaule à 312 nm correspond à la conjugaison entre le cycle A et le groupe carbonyle (*Dhar, 1981*). Pour les chalcones, une augmentation du nombre de groupes hydroxyles sur le cycle A induit un déplacement de la bande I vers des valeurs supérieures. Par exemple, les longueurs d'onde d'absorption de Ch5 (un groupe OH sur le cycle A) et de Ch1 (deux groupes OH en position 2' et 4') sont respectivement 343 nm et 366 nm (**Figure 41**).

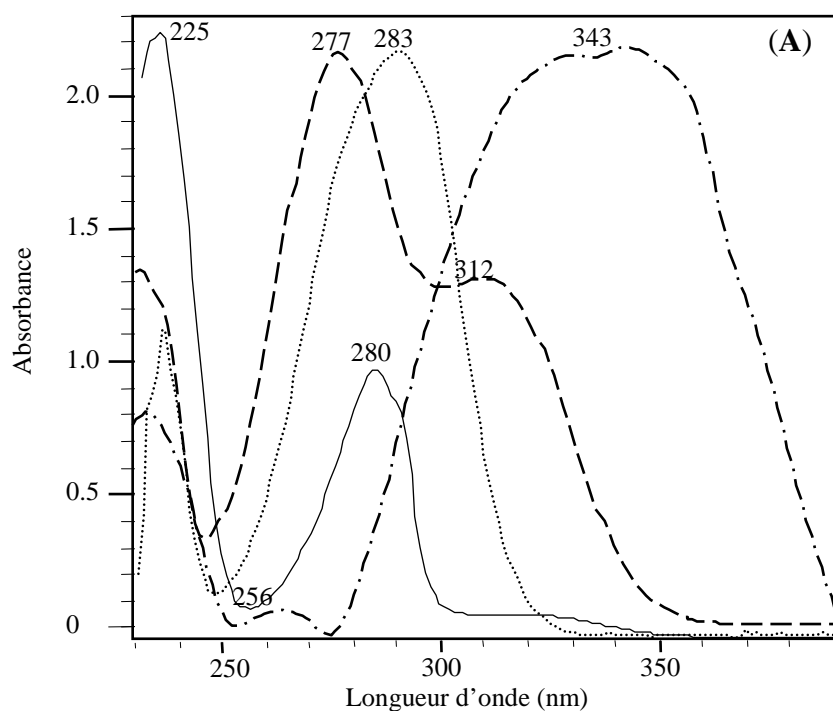


Figure 41(A) : Spectres UV de la 2',4'-dihydroxychalcone (— · — · —) et des produits de radiolyse: (— — —) **P7**, (—) **P8** et **P9**, (· · · · ·) **P10** et **P11**, à une concentration de 5×10^{-4} M.

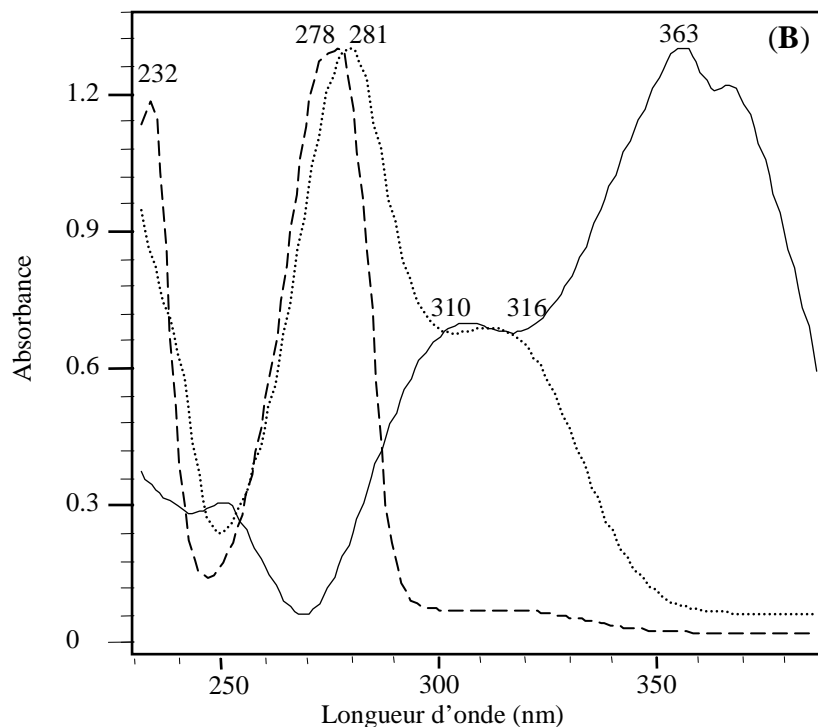


Figure 41(B) : Spectres UV de la 2',4'-dihydroxy-2-méthoxychalcone et de la 2',4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone (—) , des produits de radiolyse: (· · · · ·) **P12** et **P15**, (— — —) **P13/14** et **P16/17**, à une concentration de 5×10^{-4} M.

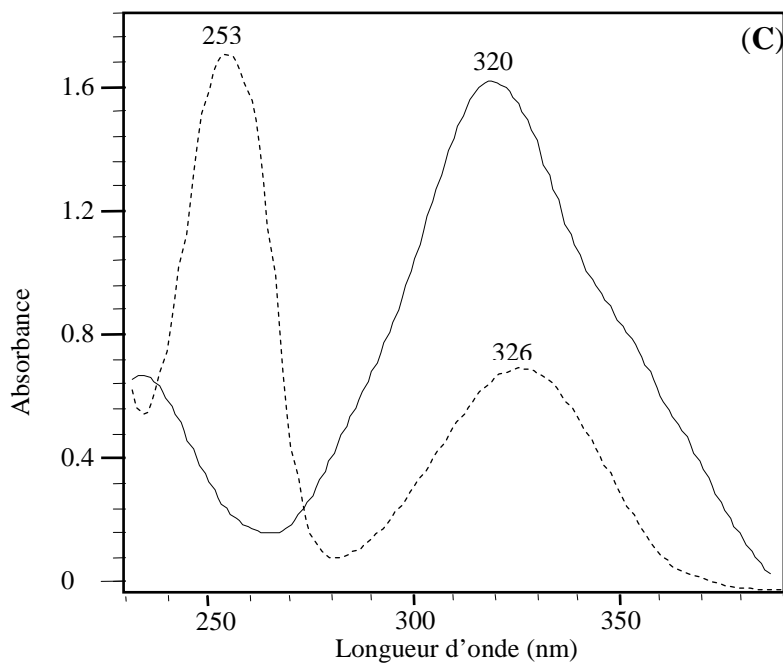


Figure 41(C) : Spectres UV de la 2'-hydroxychalcone (———) et du produit de radiolyse (-----) **P18**, à une concentration de 5×10^{-4} M.

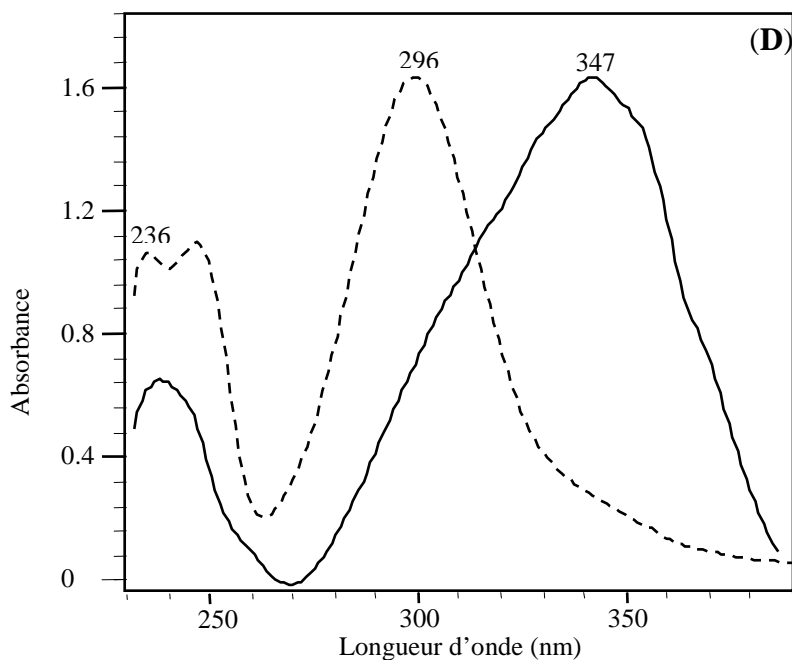


Figure 41(D) : Spectres UV de la 2',3',4'-trihydroxychalcone (———) et du produit de radiolyse (-----) **P19**, à une concentration de 5×10^{-4} M.

Les spectres UV des produits de radiolyse des chalcones montrent la disparition de la bande I et l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption entre 275 nm et 285 nm (**Figure 41**). Ce résultat prouve la disparition de la conjugaison entre les cycles A et B, ce qui semble indiquer que la double liaison a disparu dans les produits de radiolyse. En revanche l'épaule à 312 nm n'a pas disparu dans tous les produits formés, indiquant que le groupement carbonyle existe dans ces produits.

II.3.2. Spectres RMN des produits de radiolyse

Les analyses des spectres RMN des produits de radiolyse des chalcones, montrent la présence de trois types de composés :

✓ Produits **P7, P12, P15, P18 et P19** (**Figure 42A/B**): les spectres protons et carbones de ces produits montrent la présence des deux cycles aromatiques A et B (**tableaux 16, 20, 21 et 23**), les différences constatées à ce niveau sont dues aux chalcones mères. Ainsi on constate la présence de deux groupements hydroxyles sur le cycle A pour **P7, P12 et P15** qui sont issus respectivement de Ch2, Ch3 et Ch4, tandis que pour **P18 et P19** on note la présence d'un groupement hydroxyle et de trois groupes hydroxyles sur le cycle A respectivement, ils sont issus de Ch5 et Ch6 respectivement. Au niveau du cycle A nous constatons la présence d'un groupement méthoxyle en position *ortho* pour **P12, P13 et P14**, et *para* pour **P15, P16 et P17**. **P18 et P19** présentent tous les deux un cycle aromatique A non substitué (**tableaux 16, 20, 21 et 23**).

Les quatre produits **P7, P15, P18 et P19** ont la même partie aliphatique avec fixation d'un groupe hydroxyméthyle en β du carbonyle de la chalcone. Pour **P12** les résultats RMN montrent la présence d'un groupe hydroxyméthyle et d'un groupe méthoxyle en α et β du carbonyle respectivement (**tableaux 16, 20, 21 et 23**).

✓ Produits **P8, P9, P13/14 et P16/17** (**Figure 42A/B**): les spectres RMN de ces produits montrent la présence des mêmes cycles aromatiques que les précédents. Ils présentent une particularité au niveau de la partie aliphatique : la présence d'un cycle tetrahydrofurane. On note aussi l'absence du groupe carbonyle et la présence d'un groupement hydroxyméthyle pour **P9, P13/14 et P16/17**, tandis que les spectres RMN de **P8** montrent la présence d'un groupe hydroxyle (**tableau 16**).

✓ Produits **P10'** et **P11'** : ce sont les deux produits les plus polaires issus de la fraction acétylée de Ch2 (**Figure 42A**). Les résultats RMN (**tableaux 18 et 19**) montrent la présence des mêmes cycles aromatiques A et B avec deux groupements acétyles greffés sur le cycle A. La différence est observée au niveau de la partie aliphatique, pour **P10'** on note la présence du carbonyle et de deux groupements acétyles. Le carbonyle du composé **P11'** a disparu, on dénombre la présence de quatre groupements acétyles.

Les résultats RMN de **P13** (**tableau 21**) et **P16** (**tableau 22**) sont comparables respectivement à ceux de **P14** (**tableau 21**) et **P17** (**tableau 22**). Des petites différences sont observées pour la chaîne aliphatique, la constante de couplage à (12,8 Hz ; 8,5 Hz) et 12,8 Hz attribuée à H-3 pour **P13** a été déplacée à (12,2 Hz ; 6,9 Hz) et 11,9 Hz (H-3) pour **P14**. Ces différences, significatives combinées avec la différence de Rf (0,34 pour **P13** et 0,44 pour **P14** dans le mélange de solvants (M1 : CH₂Cl₂-EtOAc-MeOH 90 : 5 : 5), montrent que **P13/14** sont deux diastéréoisomères: présence de carbones asymétriques en C-2 et C-4. En CLHP, les deux produits sont élués aux mêmes temps de rétention (22 min). Les mêmes différences sont observées pour **P16** et **P17** au niveau des constantes de couplage, le Rf de **P16** (0,52) et (0,41) pour **P17** dans le mélange de solvants M1. Ceci montre que **P16/17** sont deux diastéréoisomères, dû à la présence de carbones asymétriques (C-2 et C-4). En CLHP les deux produits sont élués au même temps de rétention (20 min)

Les positions de tous les carbones sont déterminées à partir des spectres HMQC et HMBC du couplage ¹H-¹³C. Finalement, **P7**, **P8**, **P9**, **P10'**, **P11'**, **P12**, **P13/14**, **P15**, **P16/17**, **P18** et **P19** sont identifiés respectivement comme (**Figure 42A/B**) :

- 1-[2,4-dihydroxyphényl]-3-phényl-4-hydroxybutanone
- 2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxy-4-phényltetrahydrofurane
- 2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-4-phényltetrahydrofurane
- 1-[2,4-diacétoxyphényl]-2-acétoxyméthyl-3-phényl-4-acétoxy-butanone
- 1-acétoxy-2-acétoxy -2-[2,4-diacétoxyphényl]-3-acétoxyméthyl-4-phényl-5-acétoxypentane
- 1-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-3-(2-méthoxyphényl)-3-méthoxypropanone
- 2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-4-(2-méthoxyphényl)tetrahydrofurane
- 1-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-3-(4-méthoxyphényl)-4-hydroxybutanone
- 2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyméthyl-4-(4-méthoxyphényl)tetrahydrofurane
- 1-[2-dihydroxyphényl]-3-phényl-4-hydroxybutanone
- 1-[2,3,4-trihydroxyphényl]-3-phényl-4-hydroxybutanone

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P7				
Cycle-B				
1			143,4	
2	7,25 m	H-3 _B ; H-4 _B	129,1	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,25 m	H-2 _B ; H-4 _B	129,5	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,16 m	H-3 _B /5 _B ; H-2 _B /6 _B	127,7	C-2 _B /6 _B
5	7,25 m	H-4 _B ; H-6 _B	129,5	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,25 m	H-4 _B ; H-5 _B	129,1	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			114,4	
2			166,4 ^a	
3	6,21 d (2,4)	H-5 _A	103,7	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,3 ^a	
5	6,34 dd (8,9 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	109,1	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,75 d (8,9)	H-5 _A	133,8	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
butanone				
1			204,9	
2	3,38 dd (16,0 ; 5,6)	H-2 ; H-3	41,4	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
	3,27 dd (16,0 ; 8,6)	H-2 ; H-3	41,4	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,46 m	H-2 ; H-4	45,9	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	3,74 [§] m	H-3	67,3	C-2 ; C-3 ; C-1 _B
P8				
Cycle B				
1			142,9	
2	7,24 m	H-3 _B ; H-4 _B	128,4	C-4 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,29 m	H-2 _B ; H-4 _B	130,1	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,18 m	H-3 _B /5 _B ; H-2 _B /6 _B	127,5	C-2 _B /6 _B
5	7,29 m	H-4 _B ; H-6 _B	130,1	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,24 m	H-4 _B ; H-5 _B	128,4	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle A				
1			114,9	
2			159,0	
3	6,20 d (2,4)	H-5 _A	104,5	C-1 _A ; C-5 _A
4			160,0	
5	6,12 dd (8,9 ; 2,5)	H-3 _A ; H-6 _A	106,9	C-1 _A ; C-3 _A
6	6,53 d (8,7)	H-5 _A	129,9	C-2 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			109,3	
3	3,03 dd (13,7 ; 8,2)	H-3 ; H-4	35,8	C-2 ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,92 dd (13,7 ; 6,2)	H-3 ; H-4	35,8	C-2 ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,43 m	H-3 ; H-5	51,5	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,50 dd (11,9 ; 4,1)	H-4 ; H-5	73,2	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,90 br d (11,8)	H-4 ; H-5	73,2	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B

[§]2H; ^aValeurs sont interchangeables

Tableau 16 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P7** et **P8** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P9				
Cycle-B				
1			141,9	
2	7,23 m	H-3 _B ; H-4 _B	128,4	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,28 m	H-2 _B ; H-4 _B	129,5	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,19 m	H-3 _B /5 _B ; H-2 _B /6 _B	127,5	C-2 _B /6 _B
5	7,28 m	H-4 _B ; H-6 _B	129,5	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,23 m	H-4 _B ; H-5 _B	128,4	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			121,3	
2			157,3	
3	6,30 d (2,4)	H-5 _A	104,4	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,7	
5	6,33 dd (8,2 ; 2,5)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,06 d (8,3)	H-5 _A	129,0	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			90,9	
3	3,03 dd (12,6 ; 8,4)	H-3 ; H-4	44,2	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,31 dd (12,6 ; 10,1)	H-3 ; H-4	44,2	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,75 m	H-3 ; H-5	46,4	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,39 dd (7,5 ; 6,6)	H-4 ; H-5	75,1	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,78 dd (10,3 ; 7,5)	H-4 ; H-5	75,1	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,65 [§] s		69,5	C-2 ; C-3 ; C-1 _A

[§]2H

Tableau 17 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC du produit **P9** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (*J* Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P10'				
Cycle-B				
1			138,0	
2	7,24 m	H-3 _B ; H-4 _B	129,7	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,24 m	H-2 _B ; H-4 _B	129,7	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,15 m	H-3 _B /5 _B ; H-2 _B /6 _B	128,6	C-2 _B /6 _B
5	7,24 m	H-4 _B ; H-6 _B	129,7	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,24 m	H-4 _B ; H-5 _B	129,7	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			129,1	
2			160,4	
3	6,63 d (2,2)	H-5 _A	119,2	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,3	
5	6,74 dd (8,6 ; 2,2)	H-3 _A ; H-6 _A	119,8	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,05 d (8,5)	H-5 _A	132,8	C-2 ; C-2 _A ; C-4 _A
2 _A -acétoxy			169,3	
	2,18* ^a s		21,8	2 _A -acétoxy
4 _A -acétoxy			170,3 ^c	
	2,18* ^a s		21,0	4 _A -acétoxy
pentane				
1	4,61 [§] s		74,3	C-2 ; C-3 ; C-1 _A ; 1-acétoxy
2			74,1	
3	3,42 br dd (6,0 ; 5,8)	3-CH ₂ -R ; H-4	42,1	C-1 ; C-2 ; 3-CH ₂ -R ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,44 m	H-3 ; H-5	43,9	C-2 ; C-3 ; 3-CH ₂ -R ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B /6 _B
5	3,84 dd (10,6 ; 7,3)	H-4 ; H-5	69,3	C-3 ; C-4 ; C-1 _B ; 5-acétoxy
	4,37 dd (10,4 ; 7,5)	H-4 ; H-5	69,3	C-3 ; C-4 ; C-1 _B ; 5-acétoxy
3-CH ₂ -R	4,24 dd (15,6 ; 5,9)	H-3 ; 3-CH ₂ -R	60,2	C-2 ; C-3 ; C-4 ; 3-R'-acétoxy
	3,90 dd (15,8 ; 5,5)	H-3 ; 3-CH ₂ -R	60,2	C-2 ; C-3 ; C-4 ; 3-R'-acétoxy
1-acétoxy			170,4 ^c	
	2,10* ^b s		20,3	1-acétoxy
2-acétoxy			172,4	
	2,20* s		19,9	2-acétoxy
3-R'-acétoxy			172,0	
	2,10* ^b s		19,6	3'-R'-acétoxy
5-acétoxy			173,0	
	2,12* s		19,3	5-acétoxy

*3H ; [§]2H; ^{a,b,c}Valeurs sont interchangeables

Tableau 18 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC du produit **P10'** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P11'				
Cycle-B				
1			137,2	
2	7,24 m	H-3 _B ; H-4 _B	129,3	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,24 m	H-2 _B ; H-4 _B	129,3	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,17 m	H-3 _B /5 _B ; H-2 _B /6 _B	128,3	C-2 _B /6 _B
5	7,24 m	H-4 _B ; H-6 _B	129,3	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,24 m	H-4 _B ; H-5 _B	129,3	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			130,7	
2			159,4	
3	6,83 d (2,4)	H-5 _A	118,9	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,7	
5	6,94 dd (8,0 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	120,5	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,85 d (8,3)	H-5 _A	132,1	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
2 _A -acétoxy			169,0	
	2,20* ^a s		21,4 ^b	2 _A -acétoxy
4 _A -acétoxy			169,2	
	2,20* ^a s		21,2 ^b	4 _A -acétoxy
butanone				
1			203,0	
2	3,96 br dd (6,8 ; 5,0)	H-3 ; 2-CH ₂ -R	49,1	C-1 ; 2-CH ₂ -R ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,84 m	H-4 ; H-2	41,9	C-1 ; C-2 ; 2-CH ₂ -R ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B /6 _B
4	4,04 dd (12,0 ; 7,8)	H-3 ; H-4	70,3	C-2 ; C-3 ; C-1 _B ; 4-acétoxy
	4,38 dd (11,4 ; 8,2)	H-3 ; H-4	70,3	C-2 ; C-3 ; C-1 _B ; 4-acétoxy
2-CH ₂ -R	4,23 dd (16,0 ; 5,7)	H-2 ; 2-CH ₂ -R	63,2	C-1 ; C-2 ; C-3 ; 2-R'-acétoxy
	3,98 dd (15,9 ; 5,9)	H-2 ; 2-CH ₂ -R	63,2	C-1 ; C-2 ; C-3 ; 2-R'-acétoxy
2-R'-acétoxy			172,0	
	2,12* s		19,9 ^c	2-R'-acétoxy
4-acétoxy			173,0	
	2,15* s		19,8 ^c	4-acétoxy

*3H; ^{a,b,c}Valeurs sont interchangeables

Tableau 19 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC du produit **P11'** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P12				
Cycle-B				
1			121,3	
2			159,0	
3	7,01 br d (8,1)	H-4 _B ; H-5 _B	112,7	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,31 dt (8,0 ; 1,6)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	130,0	C-2 _B ; C-6 _B
5	7,03 dt (8,0 ; 1,5)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,8	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,46 dd (7,8 ; 1,6)	H-4 _B ; H-5 _B	128,5	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
2-OCH ₃	3,87* s		56,0	C-2 _B
Cycle-A				
1			116,4	
2			165,9	
3	6,32 d (2,4)	H-5 _A	103,3	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,1	
5	6,43 dd (8,1 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,7	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,92 d (8,0)	H-5 _A	134,8	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
propanone				
1			207,4	
2	3,83 m	H-3 ; 2-CH ₂ OH	55,7	C-1 ; 2-CH ₂ OH ; C-3 ; C-1 _A ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,81 dd (10,8 ; 9,2)	H-2 ; 2-CH ₂ OH	62,2	C-1 ; C-2 ; C-3
	3,44 dd (10,6 ; 8,8)	H-2 ; 2-CH ₂ OH	62,2	C-1 ; C-2 ; C-3
3	5,00 d (9,8)	H-2	77,2	C-1 ; C-2 ; 2-CH ₂ OH ; 3-OCH ₃ ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
3-OCH ₃	2,98* s		56,8	C-3
P13				
Cycle-B				
1			129,9	
2			159,1	
3	6,89 br d (8,2)	H-4 _B ; H-5 _B	111,7	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,88 dt (7,9 ; 1,6)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,3	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,80 dt (7,9 ; 1,6)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,6	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,06 dd (7,6 ; 1,5)	H-4 _B ; H-5 _B	128,7 ^a	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
2-OCH ₃ *	3,75 s		55,7	C-2 _B
Cycle-A				
1			122,0	
2			158,7	
3	6,27 d (2,4)	H-5 _A	104,3	C-1 _A ; C-5 _A
4			157,1	
5	6,31 dd (8,2 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,09 d (8,2)	H-5 _A	128,8 ^a	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			90,7	
3	2,83 dd (12,8 ; 8,5)	H-3 ; H-4	42,2	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,35 dd (12,8 ; 10,2)	H-3 ; H-4	42,2	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,91 br quint (8,0)	H-3 ; H-5	41,0	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,33 t (7,4)	H-4 ; H-5	73,9	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,75 m	H-4 ; H-5	73,9	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,65 [§] s		69,2	C-2 ; C-3 ; C-1 _A

*3H; §2H; ^aValeurs sont interchangeable

Tableau 20: Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P12** et **P13** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P14				
Cycle-B				
1			130,1	
2			159,1	
3	6,91 br d (8,1)	H-4 _B ; H-5 _B	111,6	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,14 dt (7,9 ; 1,6)	H-3 _R ; H-5 _R ; H-6 _R	128,0	C-2 _R ; C-6 _R
5	6,90 m	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,7	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,30 dd (7,6 ; 1,5)	H-4 _B ; H-5 _B	128,6	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
2-OCH ₃ *	3,76 s		55,8	C-2 _B
Cycle-A				
1			120,4	
2			158,9	
3	6,26 d (2,4)	H-5 _A	104,5	C-1 _A ; C-5 _A
4			157,3	
5	6,27 dd (8,2 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,11 d (8,2)	H-5 _A	129,1	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			90,2	
3	2,65 dd (12,2 ; 6,9)	H-3 ; H-4	38,9	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,50 t (11,9)	H-3 ; H-4	38,9	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,80 m	H-3 ; H-5	39,5	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,34 t (7,4)	H-4 ; H-5	74,2	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,75 m	H-4 ; H-5	74,2	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,83 [§] s		67,9	C-2 ; C-3 ; C-1 _A
P15				
Cycle-B				
1			130,8	
2	7,22 d (8,7)	H-3 _B	129,9	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	6,81 dd (8,7)	H-2 _B	133,8	C-1 _B ; C-5 _B
4			159,4	
5	6,81 d (8,7)	H-6 _B	133,8	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,22 d (8,7)	H-5 _B	129,9	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
4-OCH ₃	3,73* s		55,4	C-4 _B
Cycle-A				
1			114,5	
2			165,6	
3	6,28 d (2,4)	H-5 _A	103,6	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,4	
5	6,42 dd (8,8 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,8	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,88 d (8,9)	H-5 _A	135,4	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
butanone				
1			205,1	
2	3,50 dd (15,3 ; 5,3)	H-2 ; H-3	41,2	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
	3,30 dd (15,3 ; 8,0)	H-2 ; H-3	41,2	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,44 m	H-2 ; H-4	44,8	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	3,75 dd (10,3 ; 7,0)	H-3 ; H-4	67,2	C-2 ; C-3 ; C-1 _B
	3,68 dd (10,3 ; 7,0)	H-3 ; H-4	67,2	C-2 ; C-3 ; C-1 _B

*3H; [§]2H; ^aValeurs sont interchangeable

Tableau 21 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P14** et **P15** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
P16				
Cycle-B				
1			133,5	
2	7,15 d (8,7)	H-3 _B	129,3	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	6,84 d (8,8)	H-2 _B	114,9	C-1 _B ; C-5 _B
4			159,6	
5	6,84 d (8,8)	H-6 _B	114,9	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,15 d (8,7)	H-5 _B	129,3	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
4-OCH ₃	3,74* s		55,5	C-4 _B
Cycle-A				
1			121,3	
2			157,4	
3	6,30 d (2,4)	H-5 _A	104,4	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,7	
5	6,32 dd (8,4 ; 2,1)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,04 d (8,4)	H-5 _A	129,0	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			91,0	
3	2,98 dd (13,0 ; 7,9)	H-3 ; H-4	44,4	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,26 dd (12,6 ; 10,2)	H-3 ; H-4	44,4	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,68 m	H-3 ; H-5	45,6	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,34 t (8,0)	H-4 ; H-5	75,3	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,73 m	H-4 ; H-5	75,3	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,64 s		69,6	C-2 ; C-3 ; C-1 _A
P17				
Cycle-B				
1			133,7	
2	7,24 d (8,6)	H-3 _B	129,2	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	6,88 d (8,8)	H-2 _B	114,9	C-1 _B ; C-5 _B
4			159,5	
5	6,88 d (8,8)	H-6 _B	114,9	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,24 d (8,6)	H-5 _B	129,2	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
4-OCH ₃	3,76* s		55,4	C-4 _B
Cycle-A				
1			119,7	
2			158,0	
3	6,31 d (2,4)	H-5 _A	104,6	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,8	
5	6,33 dd (8,4 ; 2,1)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,08 d (8,4)	H-5 _A	128,9	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
2			91,6	
3	2,71 dd (12,4 ; 7,1)	H-3 ; H-4	41,3	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
	2,57 t (12,0)	H-3 ; H-4	41,3	C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-4 ; C-5 ; C-1 _A ; C-1 _B
4	3,35 m	H-3 ; H-5	44,7	C-2 ; C-3 ; C-5 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
5	4,31 t (8,0)	H-4 ; H-5	75,6	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
	3,87 dd (9,8 ; 8,0)	H-4 ; H-5	75,6	C-2 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _B
2-CH ₂ OH	3,64 [§] s		68,5	C-2 ; C-3 ; C-1 _A

*3H; [§]2H

Tableau 22 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P16** et **P17** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C	HMBC
P18				
Cycle-B				
1			143,4	
2	7,28 m	H-3 _B ; H-4 _B	129,1	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,23 m	H-2 _B ; H-4 _B	129,5	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,17 m	H-3 _B /5 _B ; H-2 _B /6 _B	127,8	C-2 _B /6 _B
5	7,23 m	H-4 _B ; H-6 _B	129,5	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,28 m	H-4 _B ; H-5 _B	129,1	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			121,1	
2			163,4	
3	6,88 br d (8,6)	H-4 _A ; H-5 _A	119,0	C-1 _A ; C-5 _A
4	7,45 ddd (8,6 ; 8,5 ; 1,5)	H-3 _A ; H-5 _A ; H-6 _A	137,3	C-2 _A ; C-6 _A
5	6,91 ddd (7,9 ; 7,2 ; 0,7)	H-3 _A ; H-4 _A ; H-6 _A	120,2	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,93 dd (8,1 ; 1,4)	H-4 _A ; H-5 _A	131,7	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
butanone				
1			207,2	
2	3,54 dd (16,0 ; 5,0)	H-2 ; H-3	42,0	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
	3,41 dd (14,3 ; 6,8)	H-2 ; H-3	42,0	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,48 m	H-2 ; H-4	45,9	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	3,74 [§] m	H-3	67,3	C-2 ; C-3 ; C-1 _B
P19				
Cycle-B				
1			133,1	
2	7,32 dd (7,7 ; 1,4)	H-3 _B ; H-4 _B	129,0	C-3 ; C-4 _B ; C-6 _B
3	7,25 dd (7,7 ; 7,2)	H-2 _B ; H-4 _B	129,1	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,16 tt (7,2 ; 1,4)	H-2/6 _B ; H-3/5 _B	127,1	C-2 _B ; C-6 _B
5	7,25 dd (7,7 ; 7,2)	H-4 _B ; H-6 _B	129,1	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,32 dd (7,7 ; 1,4)	H-4 _B ; H-5 _B	129,0	C-3 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle-A				
1			114,5	
2			152,6	
3			143,6	
4			153,1	
5	6,46 d (8,9)	H-6 _A	108,4	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,49 d (8,9)	H-5 _A	123,5	C-1 ; C-2 _A ; C-4 _A
butanone				
1			205,7	
2	3,55 dd (12,6 ; 5,3)	H-2 ; H-3	41,0	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
	3,51 dd (12,8 ; 5,7)	H-2 ; H-3	41,0	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1 _A ; C-1 _B
3	3,38 quint (7,3)	H-2 ; H-4	45,5	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B
4	3,79 dd (10,4 ; 5,6)	H-3 ; H-4	67,1	C-2 ; C-3 ; C-1 _B
	3,72 dd (10,6 ; 6,9)	H-3 ; H-4	67,1	C-2 ; C-3 ; C-1 _B

[§]2H

Tableau 23 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produit **P18** et **P19** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (*J* Hz).

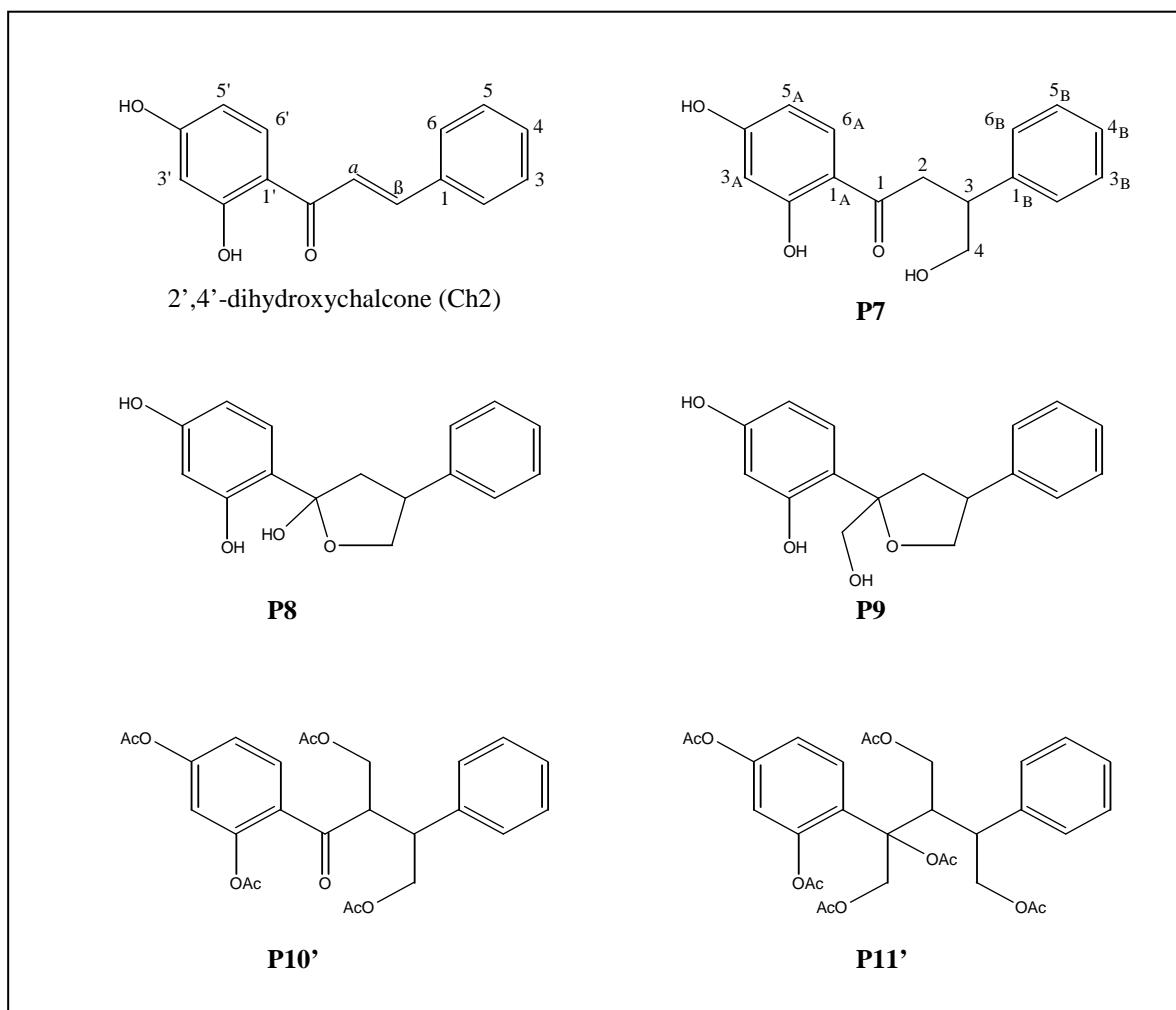


Figure 42(A) : Structures chimiques de Ch2 et de ses produits de radiolyse dans le méthanol.

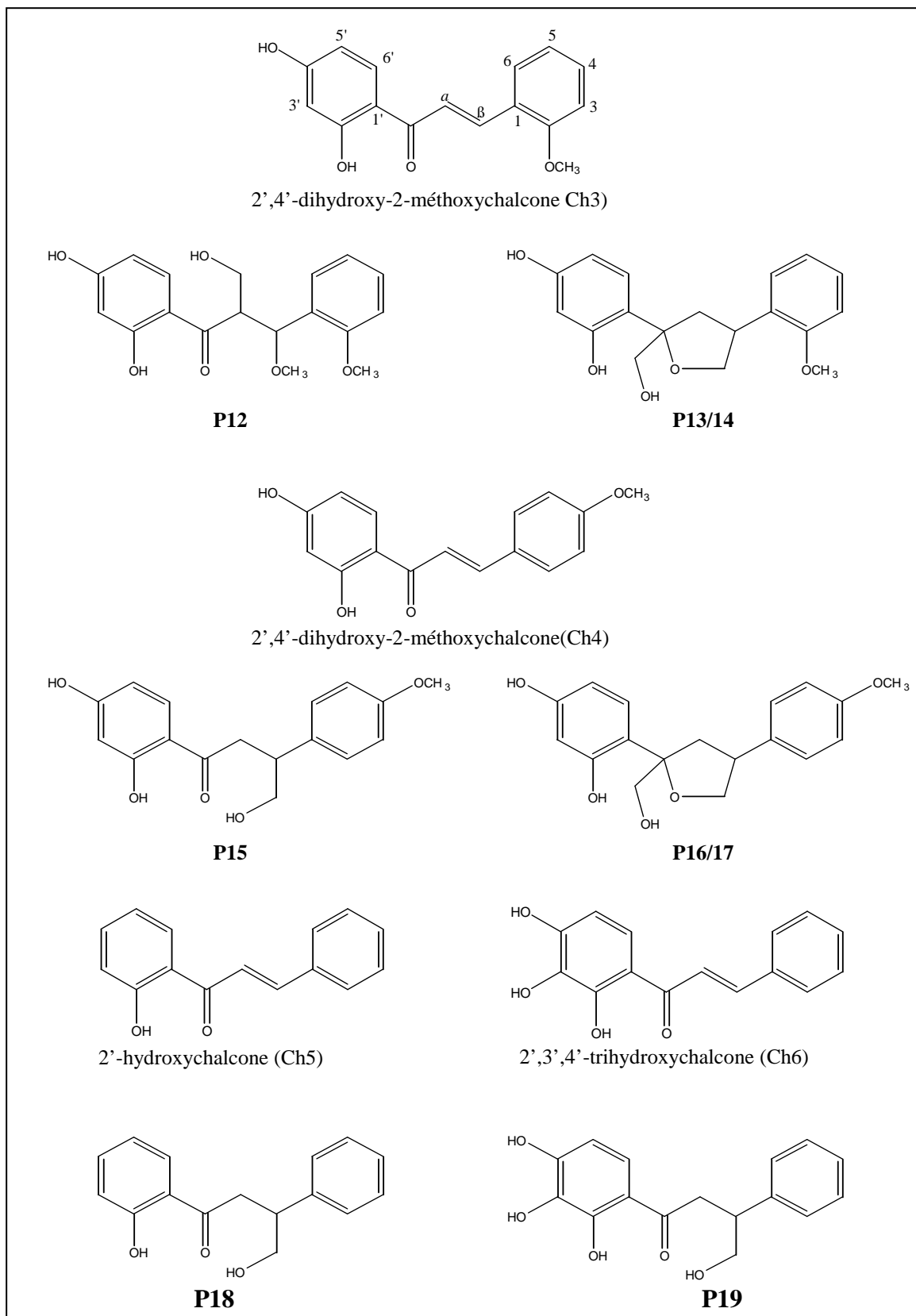


Figure 42(B) : Structures chimiques des chalcones Ch3, Ch4 Ch5 et Ch6 et des produits de radiolyse dans le méthanol.

A partir des produits acétylés issus de la radiolyse de Ch2, nous pouvons déduire la structure des molécules présentes dans la fraction avant l'acétylation (**Figure 43**). Rappelons que l'acétylation a permis de remplacer tous les groupements hydroxyles par des groupements acétyles.

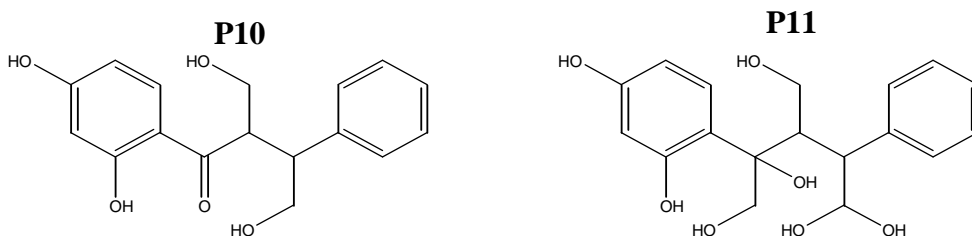


Figure 43 : Structures chimiques des produits présents dans la fraction issue de la radiolyse de Ch2 dans le méthanol.

II.4 RENDEMENT RADIOLYTIQUE ET COURBE DE DILUTION

Tout d'abord, nous présenterons les différentes courbes d'étalonnage obtenues pour chaque chalcone, puis nous développerons l'évolution de la concentration en fonction de la dose utilisée ainsi que les courbes des rendements radiolytiques de disparition.

II.4.1. Courbe d'étalonnage

La **Figure 44** présente les courbes d'étalonnage obtenues pour chacune des cinq chalcones, permettant de calculer la concentration de la chalcone pour différentes doses d'irradiation à partir des chromatogrammes CLHP. La hauteur du pic correspond à l'absorbance de la molécule à 280nm.

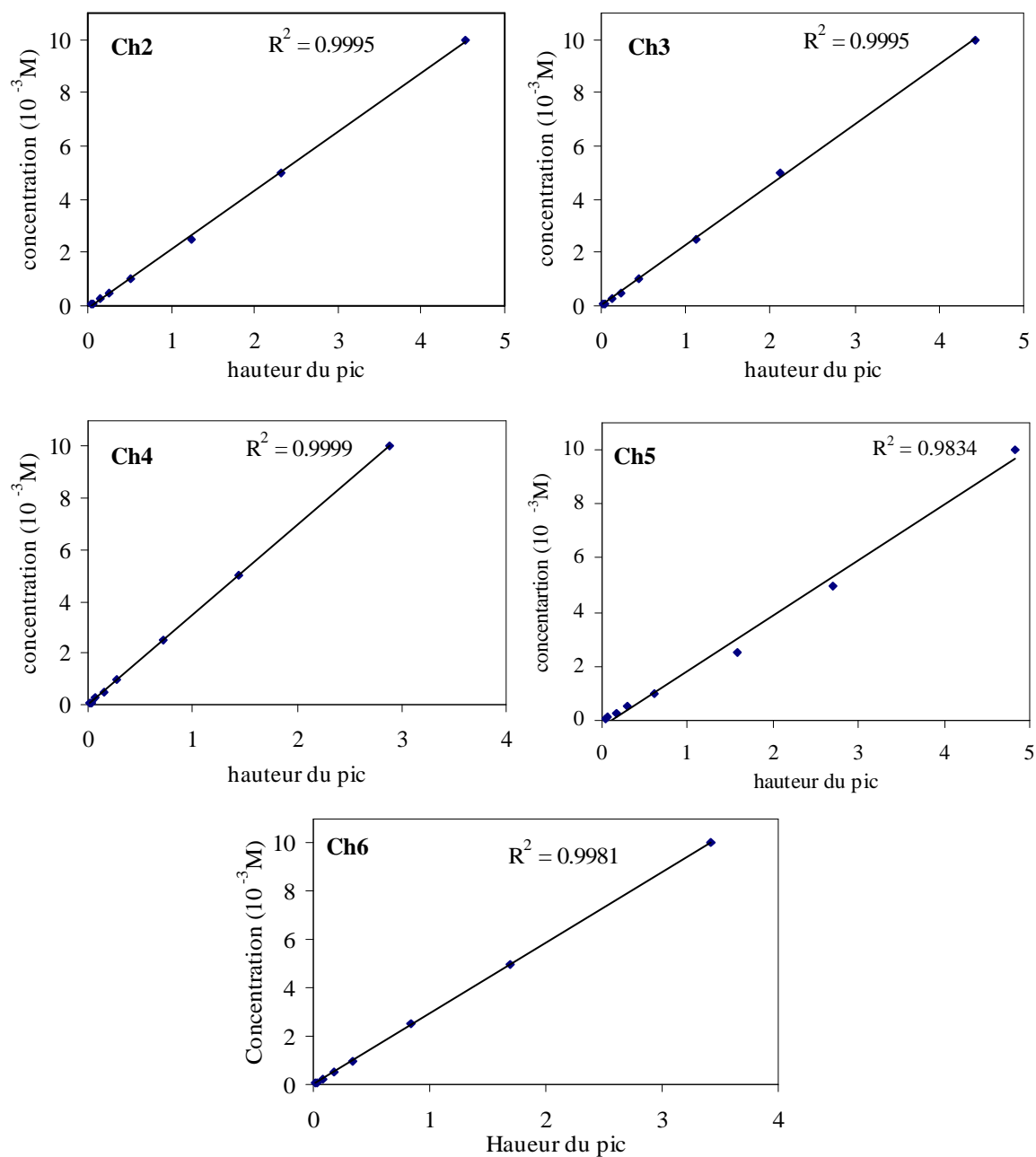


Figure 44 : Courbes d'étalonnage représentant la concentration de Ch2, Ch3, Ch4, Ch5 et Ch6 en fonction de la hauteur du pic mesurée à 280 nm en CLHP en milieu méthanolique.

II.4.2. Evolution de la chalcone en fonction de la dose utilisée

La **figure 45** montre la variation de la concentration des chalcones en fonction de la dose appliquée, elle est calculée à partir de la hauteur des pics obtenus en CLHP pour chaque concentration initiale (5×10^{-5} M, 10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, 10^{-3} M, $2,5 \times 10^{-3}$ M, 5×10^{-3} M et 10^{-2} M) irradiée avec différentes doses (de 0,1 kGy à 12 kGy). A partir de l'étalonnage précédent, nous avons suivi l'évolution de la disparition des chalcones en milieu désaéré, nous présenterons les résultats à 5×10^{-4} M et 5×10^{-3} M.

Nous constatons que la disparition de la chalcone en fonction de la dose appliquée est une droite, il faut une dose de 12 kGy pour causer la dégradation totale des différentes chalcones à 5×10^{-3} M, alors qu'à $2,5 \times 10^{-4}$ M une dose de 2 kGy est suffisante. Il est nécessaire de préciser que les produits issus de radiolyse des chalcones commencent à apparaître à partir des faibles doses appliquées (0,1 kGy). Plus on augmente la dose, plus les produits sont formés en quantité suffisante, permettant leur séparation et leur identification. Pour des doses supérieures nous n'avons constaté aucune variation dans les produits de radiolyse, que ce soit en CLHP ou sur CCM, ceci montre que les produits formés au cours de la radiolyse ne se dégradent pas.

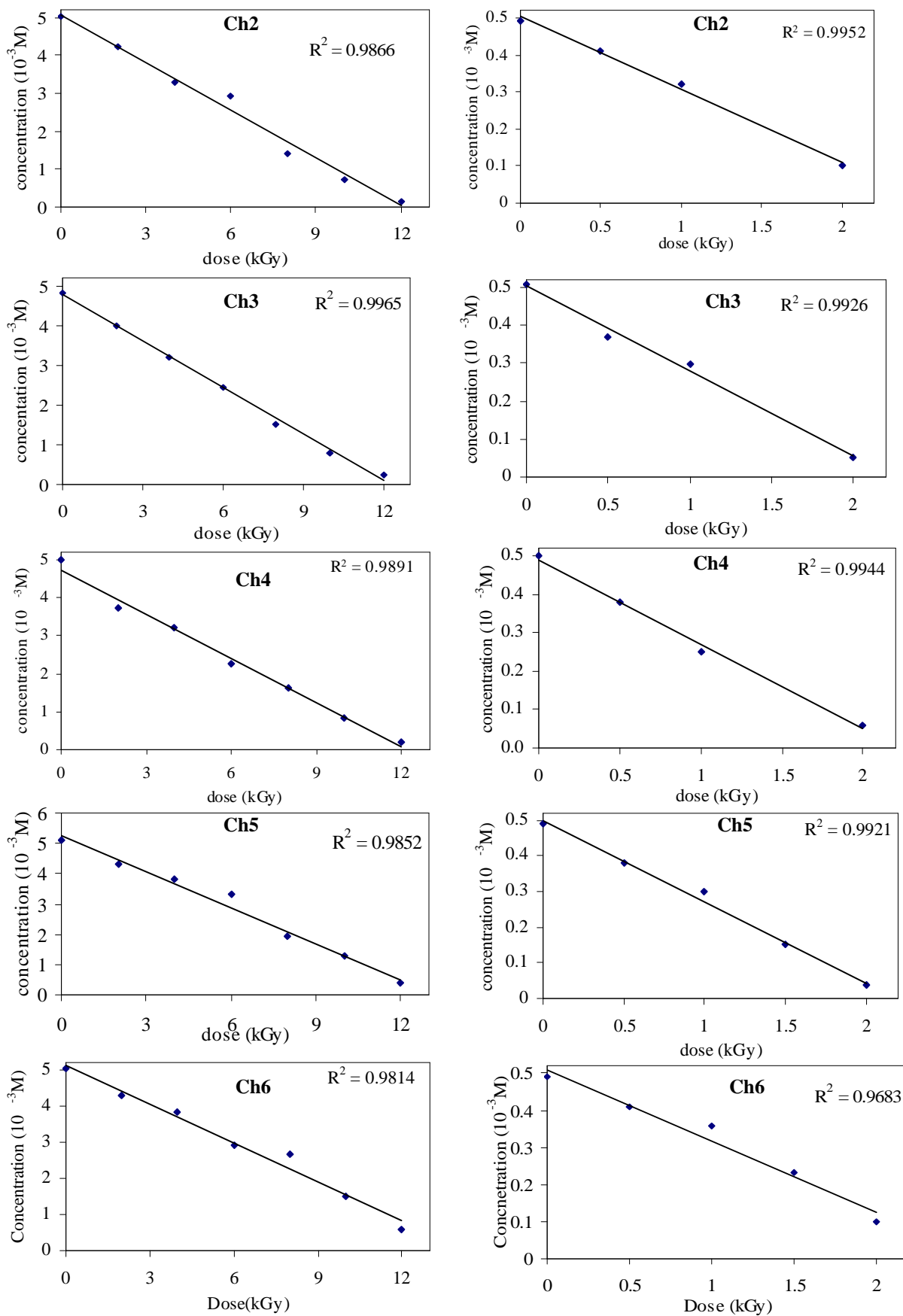


Figure 45 : Evolution de la concentration des chalcones dans le méthanol désaéré en fonction de la dose à deux concentrations différentes: colonne de gauche ($5 \times 10^{-3} \text{ M}$), colonne de droite ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$).

II.4.3. Rendement radiolytique

A partir de la pente des droites obtenues sur la **Figure 45**, nous pouvons calculer les rendements radiolytiques de disparition des chalcones en se basant sur l'équation 1. Nous présentons les courbes de radiolyse obtenues pour les cinq chalcones dans le méthanol. Rappelons que plusieurs produits de radiolyse peuvent avoir le même temps de rétention en CLHP, ce qui a rendu le calcul du rendement radiolytique de leur formation impossible.

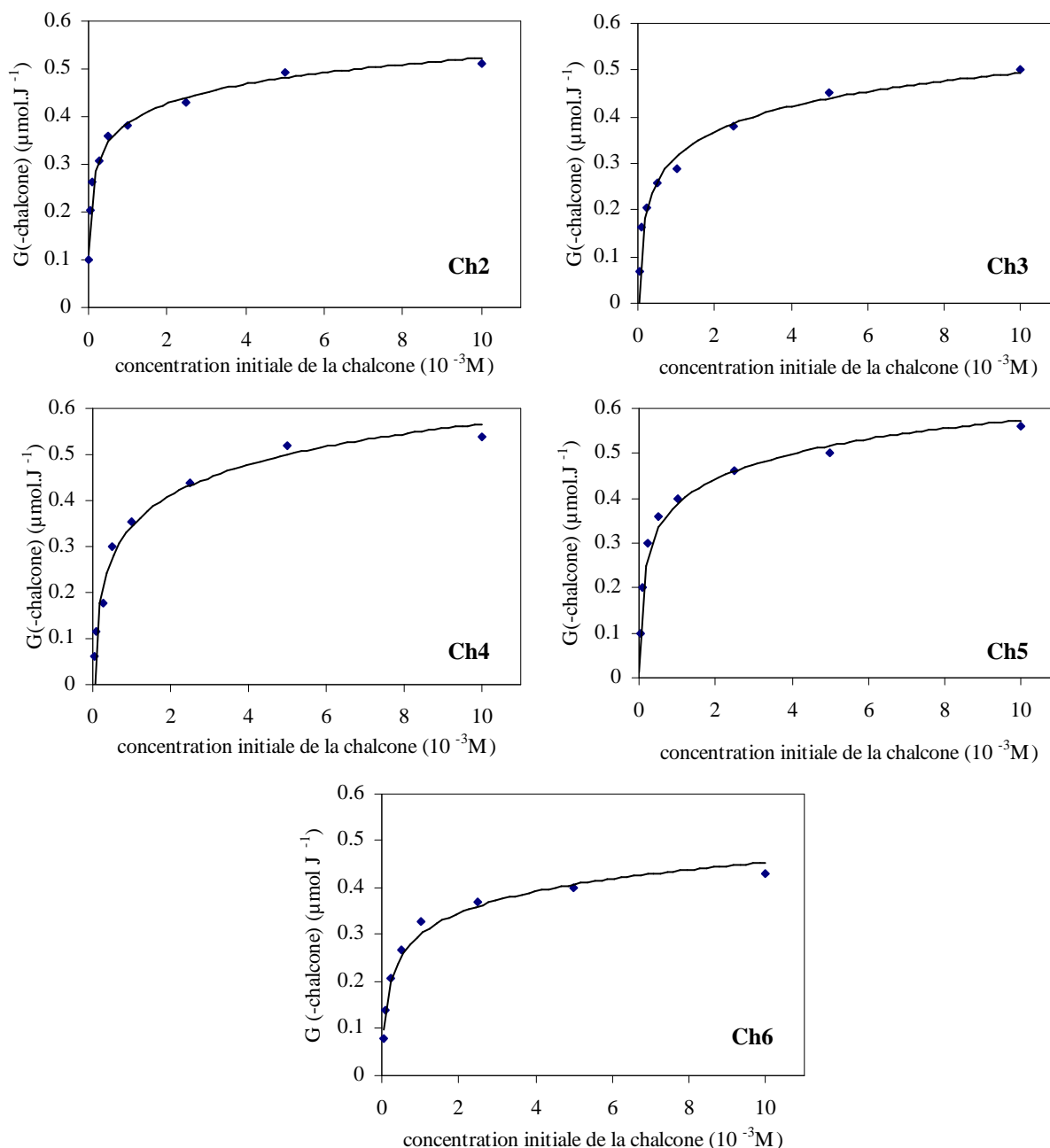


Figure 46 : Rendement radiolytique de disparition de Ch2, Ch3, Ch4, Ch5 et Ch6 dans le méthanol en milieu désaéré.

Nous constatons que les rendements de disparition de Ch2, Ch3, Ch4, Ch5 et Ch6 dans le méthanol, augmentent pour atteindre un palier pour des concentrations supérieures à 10^{-3} M. Ce profil est en accord avec l'effet de dilution décrit au deuxième chapitre.

III. RADIOLYSE DES CHALCONES DANS L'ETHANOL

Dans le but de mieux comprendre le comportement des chalcones en solution face au rayonnement, nous avons également étudié la radiolyse de Ch1 dans l'éthanol. L'identification des produits de radiolyse et la comparaison avec ceux obtenus dans le méthanol, nous donnera des informations précieuses sur leur comportement des chalcones en chimie sous rayonnement. Nous proposerons dans le dernier paragraphe de ce chapitre des mécanismes généraux expliquant la transformation des chalcones en milieu alcoolique.

III.1. ETUDE ANALYTIQUE DE Ch1

Le protocole adopté est identique à celui de la radiolyse de Ch1 en milieu méthanolique :

- ✓ différentes concentrations allant de 5×10^{-5} M à 5×10^{-3} M.
- ✓ différentes doses allant de 0,1 kGy à 24 kGy.

De même que dans le méthanol désaéré (absence d'oxygène), la dégradation de la chalcone est visible à partir de 0,1 kGy (**Figure 47**), et elle est complète à 10 kGy à une concentration de 5×10^{-3} M. Le même processus se produit pour les faibles concentrations ($< 10^{-4}$ M), mais une dose de 0,5 kGy est suffisante pour entraîner la disparition totale des pics CLHP correspondant aux molécules mères. Ceci rejoint les résultats qui ont été observés lors de l'irradiation des chalcones dans le méthanol.

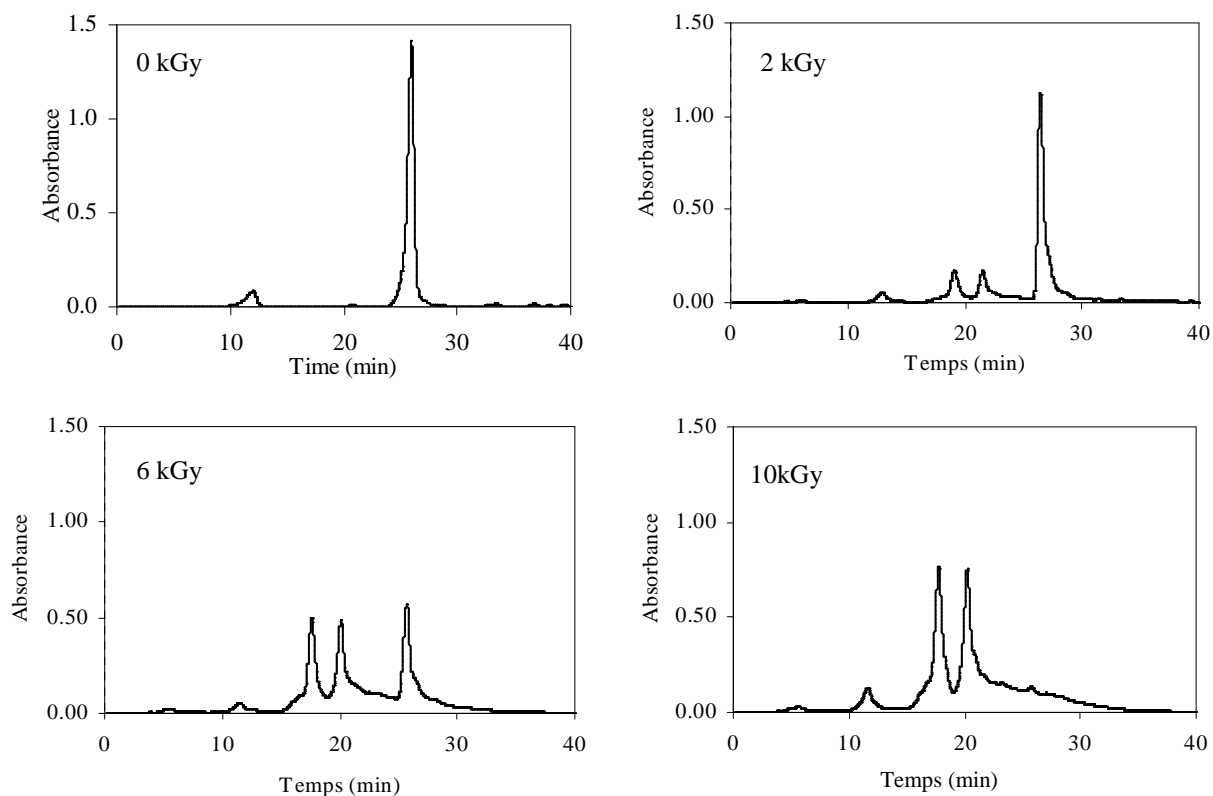


Figure 47 : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de Ch1 avant irradiation et après irradiation à différentes doses, en milieu désaéré à 5×10^{-3} M de concentration.

Pour comparer la radiolyse de Ch1 dans le méthanol et l'éthanol, nous avons représenté sur la **Figure 48** les chromatogrammes obtenus après une irradiation à 8 kGy en milieu désaéré.

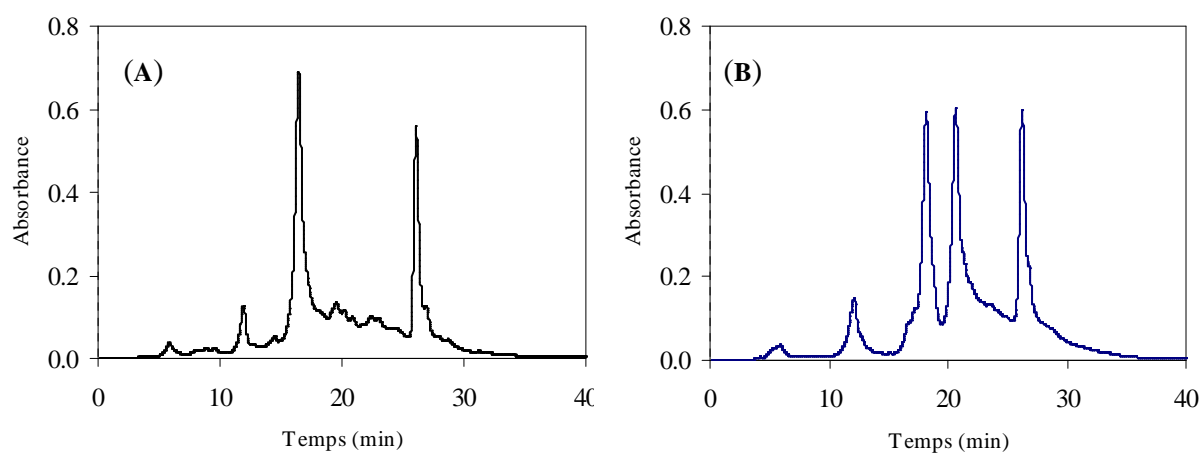


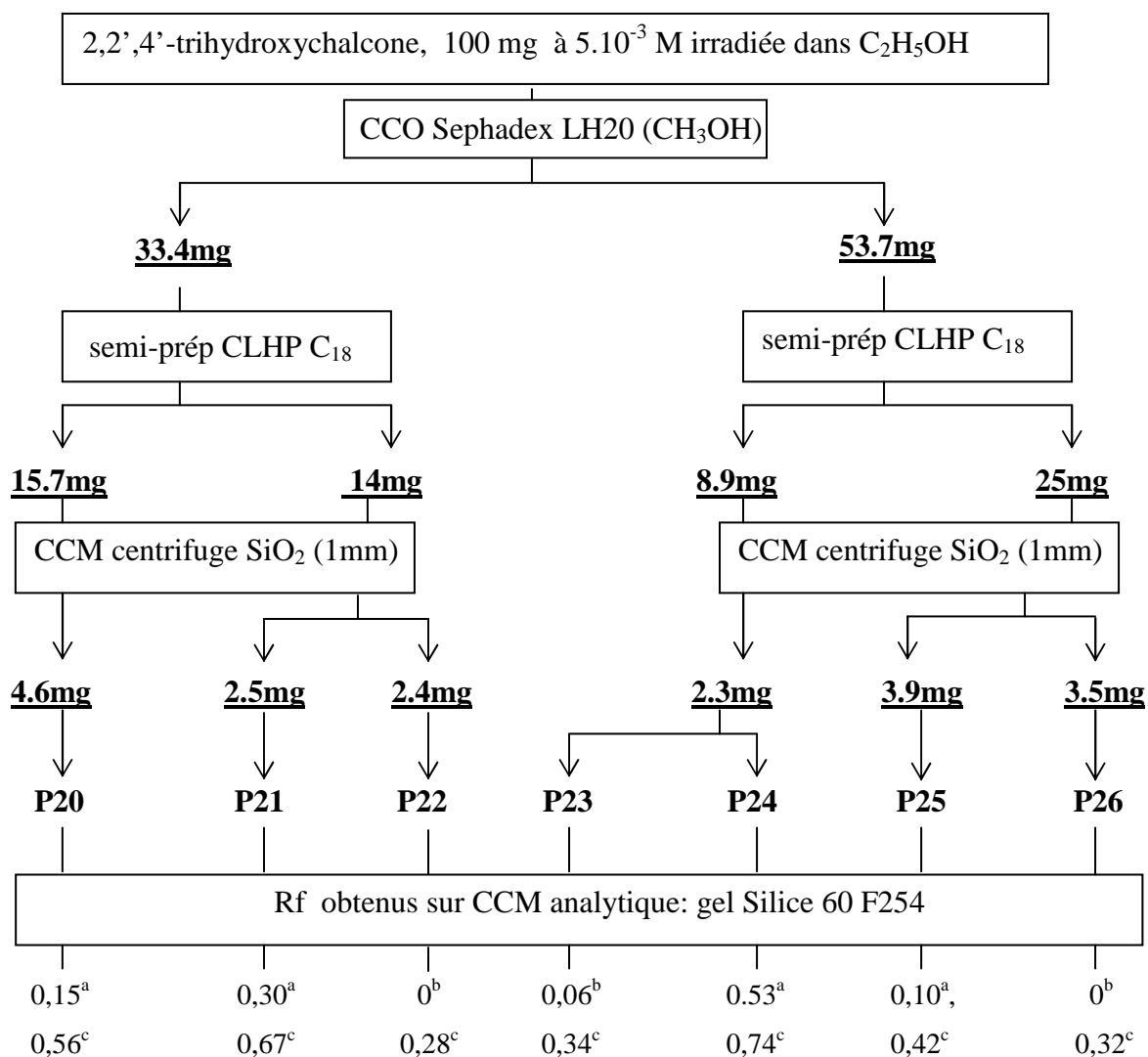
Figure 48 : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de Ch1 irradiée à une dose de 8 kGy, dans le méthanol (A) et dans l'éthanol (B), en milieu désaéré à une concentration de 5×10^{-3} M.

Dans les deux cas, la disparition du pic de Ch1 est accompagnée de l'apparition de nouveaux pics indiquant la formation de nouveaux composés (**Figure 48**). A dose égale, nous constatons une différence au niveau des produits formés : nombre de pics observés en CLHP et temps de rétention. Dans le méthanol, on observe la formation d'un pic majoritaire élué autour de 16 – 17 min et un second minoritaire élué autour de 12 min. Dans l'éthanol, on observe la formation de deux pics autour de 18 min et 21 min, le pic élué autour de 12 min est toujours présent. La différence des temps de rétention peut être due à la nature des groupements additionnés au cours de la radiolyse : HMR et $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ pour le méthanol et HER et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ pour l'éthanol. Plusieurs produits correspondent à chacun de ces pics, et nous nous limiterons à la purification et à la détermination des produits issus des pics élués autour de 18 et 21 min.

III.2. PURIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE Ch1

100 mg de Ch1 sont dissous dans l'éthanol à une concentration de 5×10^{-3} M et irradiés à une dose de 13 kGy, ce qui permet d'avoir une dégradation totale de la chalcone. Le chromatogramme obtenu est identique au chromatogramme obtenu en étude analytique à 12 kGy (**Figure 47**). L'irradiation est réalisée en milieu désaéré.

La première étape de purification des produits de radiolyse est réalisée à l'aide d'une colonne ouverte de sephadex (LH20). Vingt et une fractions ont été récoltées évaporées et pesées. Les injections CLHP et les analyses CCM de ces fractions montrent que deux fractions contiennent les produits majoritaires (deux pics à 18 min et 20 min). La deuxième étape est la CLHP semi-préparative, chacune des deux fractions est traitée séparément, cette étape de purification nous a permis de séparer les deux pics élués à 18 min et 20 min respectivement, les masses obtenues sont représentés sur le **Schéma 1**. Les analyses CCM montrent que trois des quatre fractions récoltées en CLHP semi-préparative contiennent deux produits chacune (deux taches ont été observées sur les plaques CCM), ce qui fait que sous un pic CLHP deux produits sont élués. Ceci nous a amené à faire une dernière purification en CCM centrifuge pour chacune des trois fractions. Environ douze fractions sont récoltées pour chaque CCM centrifuge, elles ont été analysées par CCM analytique. Ces analyses montrent que six fractions contiennent des produits purs. Ainsi sept produits ont pu être isolés (**Schéma 1**).



^a : CH_2Cl_2 -EtOAc-MeOH 96 : 3 : 1

^b : CH_2Cl_2 -EtOAc-MeOH 95 : 3 : 2

^c : CH_2Cl_2 -EtOAc-MeOH 90 : 5 : 5

Schéma 1 : Les différentes étapes de purification des produits majoritaires de radiolyse de Ch1, irradiée dans l'éthanol.

III.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE Ch1

III.3.1. Spectres UV

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le spectre UV de Ch1 est caractérisé par deux bandes d'absorption $\lambda_{1\max} = 366$ nm et $\lambda_{2\max} = 253$ nm, ainsi que par un épaulement à 312 nm (**Figure 49**). Nous constatons que les produits de radiolyse ont les mêmes spectres UV que ceux issus de la radiolyse du méthanol, les sept produits possèdent quasiment le même spectre UV avec un léger déplacement des maxima d'absorption pour **P20** et **P23** vers les valeurs positives. Dans tous les cas, les produits de radiolyse ne possèdent plus la double liaison α,β .

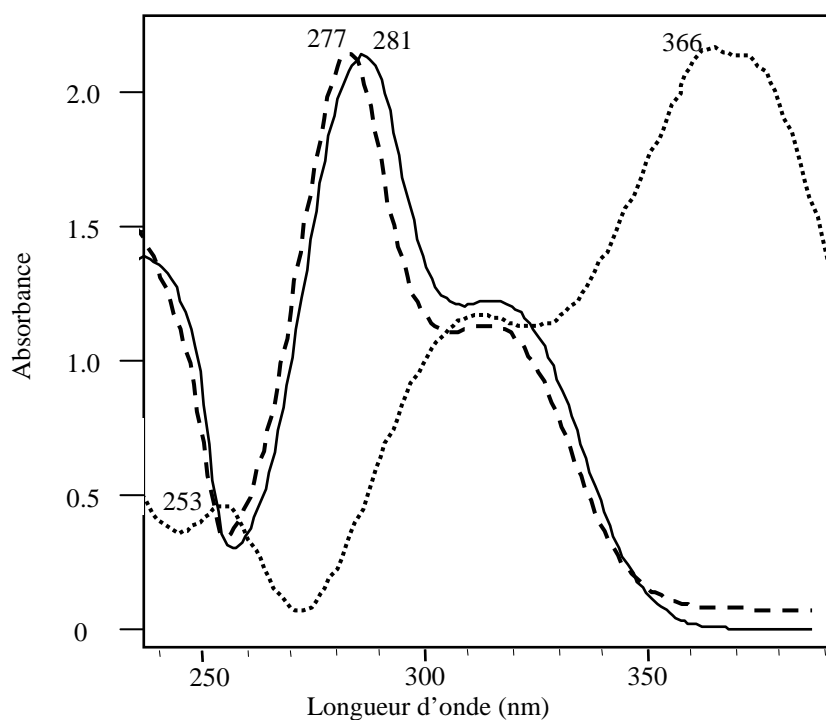


Figure 49 : Spectres UV de Ch1 (.....) et des produits de radiolyse, **P20** et **P23** (———) ; **P21**, **P22**, **P24**, **P25** et **P26** (- - -), à une concentration de 5×10^{-4} M.

III.3.2. Spectres RMN

Les produits **P20**, **P21**, **P22**, **P23**, **P24**, **P25** et **P26** formés au cours de la radiolyse de Ch1 dans l'éthanol sont identifiés par leurs spectres RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC.

III.3.2.a. Produit P20

Le spectre proton ^1H du produit **P20** montre la présence de sept protons aromatiques (**tableau 24**). Quatre d'entre eux sont détectés à 6,88 ppm (H-3_B), 7,18 ppm (H-4_B), 6,91 ppm (H-5_B) et 7,40 ppm (H-6_B), ils sont attribués au cycle aromatique B. Les trois autres sont détectés à 6,34 ppm (H-3_A), 6,44 ppm (H-5_A) et 7,91 ppm (H-6_A), ils sont attribués au cycle aromatique A.

Le spectre proton ^1H montre aussi sept signaux correspondant à la partie aliphatique, deux groupes oxyméthines à 5,25 ppm (H-3) et 3,74 ppm (2-CH-R'), un groupe méthine lié au carbonyle à 3,94 ppm (H-2), un groupe méthylène à 3,32 ppm et 3,23 ppm ainsi que deux groupes méthyles à 1,05 ppm et 0,95 ppm. Les positions de tous les protons ont été confirmées par les spectres RMN ^1H - ^1H COSY (**tableau 24**).

Le spectre ^{13}C *Jmod* indique la présence de dix-neuf signaux, sept sont attribués à la partie aliphatique et douze à la partie aromatique (**tableau 24**). La partie aliphatique est constituée d'un carbone quaternaire (carbonyle, 207,6 ppm, C-1), deux carbones tertiaires O-liés (78,5 ppm, C-3 ; 68,0 ppm, 2-CH), un carbone tertiaire C-lié (56,9 ppm, C-2), un carbone secondaire O-lié (65,2 ppm, 3-OCH₂) et deux carbones primaires (22,3 ppm, 2-R-CH₃ ; 15,2 ppm, 3-OR-CH₃). Les unités aromatiques sont constituées de cinq carbones quaternaires, trois O-liés (156,7 ppm, C-2_B ; 166,1 ppm C-2_A/C-4_A) et deux C-liés (126,8 ppm, C-1_B ; 116,6 ppm, C-1_A) et de sept carbones tertiaires (117,5 ppm, C-3_B ; 129,9 ppm, C-4_B ; 121,0 ppm, C-5_B ; 129,2 ppm, C-6_B ; 103,5 ppm, C-3_A ; 108,9 ppm, C-5_A ; 135,0 ppm, C-6_A). Les positions de tous les carbones sont déterminées par les spectres HMQC et HMBC (**tableau 24**).

III.3.2.b. Produit P21

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C *Jmod* obtenus pour **P21** (**tableau 25**) sont similaires à ceux du produit **P20**, notamment la partie aromatique (**tableau 24**), ils montrent la présence des deux cycles aromatiques A et B. La différence entre **P20** et **P21** concerne la partie aliphatique.

Le spectre RMN ^1H de **P21** présente cinq signaux correspondant à deux groupes méthines (3,57 ppm, H-3 ; 4,34 ppm, H-4), un groupe méthylène lié au carbonyle (3,50 ppm, H-2 ; 3,46 ppm, H-2) et un groupe méthyle (1,09 ppm, H-5). Les positions de tous les protons ont été confirmées par les spectres RMN ^1H - ^1H COSY (**tableau 25**).

Le spectre RMN ^{13}C *Jmod* de **P21** présente cinq signaux correspondant à la partie aliphatique: un carbone quaternaire (carbonyle à 204,7 ppm, C-1), un carbone tertiaire O-lié

(70,2 ppm, C-4), un carbone tertiaire C-lié (46,9 ppm, C-3), un carbone secondaire (39,0 ppm, C-2) et un carbone primaire (21,7 ppm, C-5). Les positions de tous les carbones et les liaisons entre la partie aliphatique et la partie aromatique sont déterminées par les spectres HMQC et HMBC (**tableau 25**).

III.3.2.c. Produit P22

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C *Jmod* de **P22** (**tableau 26**) montrent la présence des mêmes cycles aromatiques A et B que **P20** et **P21**.

Les différences entre **P21** et **P22** sont l'absence du signal correspondant au groupe carbonyle (204,7 ppm, C-1), la présence d'un signal correspondant à un carbone quaternaire O-lié (109,3 ppm, C-2) et la formation d'un cycle pentagonal.

III.3.2.d. Produits P23, P24, et P25

Les résultats RMN de **P23** (**tableau 24**) sont similaires à ceux du produit **P20** (**tableau 24**). Des différences mineures sont observées au niveau de la chaîne aliphatique, notamment les constantes de couplage à 9,7 Hz (H-3) ; 9,8 Hz ; 4,0 Hz (H-2) et 6,5 Hz ; 4,2 Hz (2-CH-R') pour **P20** qui sont déplacées à 9,0 Hz (H-3), 9,1 Hz ; 5,1 Hz (H-2), et 6,4 Hz ; 5,1 Hz (2-CH-R') pour **P23**. Ces différences combinées aux différences de temps de rétention (20 min pour **P20** et 22 min pour **P23**) et de R_f (0,15 pour **P20** et 0,30 pour **P23** dans le mélange de solvants M1 : CH₂Cl₂-EtOAc-MeOH 90 : 5 : 5) indiquent que ces deux produits sont deux diastéréoisomères, notamment à cause de la présence des carbones asymétriques (C-3, C-2 et 2-CH-R').

Des différences de constante de couplage dans le spectre proton sont observées pour **P21/P24** au niveau de H-3 et H-4 (**tableau 25**) et au niveau de H-4 et H-5 **P22/P25** (**tableau 26**). Ces produits présentent des différences de temps de rétention (20 min pour **P21** et 18 min pour **P24**) et des R_f différents (0,42 et 0,28, pour **P21** et **P24** respectivement). On note aussi des différences de temps de rétention entre **P21** et **P24** (20 min et 18 min respectivement) et des R_f différents (0,74 pour **P22** et 0,34 pour **P25** dans le même mélange de solvants précédemment M1). En se basant sur ces résultats, on déduit que **P21** et **P24** ainsi que **P22** et **P25** sont des diastéréoisomères (**Figure 50**).

III.3.2.e. Produits P26

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C *Jmod* de **P26** (**tableau 27**) montrent la présence des mêmes cycles aromatiques A et B et le même cycle tetrahydrofurane que **P22** et **P25**. Les différences entre **P22** et **P26** observées en spectre proton ^1H sont la présence du signal correspondant à un groupe méthine (3,99 ppm, 2-CH-R') et d'un signal correspondant à un groupe méthyle (1,10 ppm, 2-R-CH₃).

En ^{13}C *Jmod*, deux différences sont observées entre **P22** et **P26**, la présence du signal correspondant au groupe méthine (74,4 ppm) et celle d'un signal correspondant au groupe méthyle (19,4 ppm). Les positions de tous les carbones sont déterminées par les spectres HMQC et HMBC (**tableau 27**).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
P20				
Cycle B				
1			126,8	
2			156,7	
3	6,88 dd (8,2 ; 0,9)	H-4 _B ; H-5 _B	117,5	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,18 ddd (8,0 ; 7,5 ; 1,7)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	129,9	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,91 dd br (7,5 ; 0,8)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,0	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,40 dd (7,6 ; 1,6)	H-4 _B ; H-5 _B	129,2	C-2 _B ; C-4 _B ; C-3
Cycle A				
1			116,6	
2			166,1	
3	6,34 d (2,4)	H-5 _A	103,5	C-1 _A ; C-5 _A
4			166,1	
5	6,44 dd (8,9 ; 2,2)	H-3 _A ; H-6 _A	108,9	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,91 d (9,0)	H-5 _A	135,0	C-2 _A ; C-4 _A ; C-1
Chaîne aliphatique				
1			207,6	
2	3,94 dd (9,8 ; 4,0)	2-CH ; H-3	56,9	C-1 _B ; C-1 _A ; C-1 ; C-3 ; 2-CH ; 2-R'-CH ₃
3	5,25 d (9,7)	H-2	78,5	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; 3-OCH ₂ ; C1 ; C2 ; 2-CH
2-CH-R	3,74 dq (6,5 ; 4,2)	H-2 ; 2-R'-CH ₃	68,0	C-1 ; C-2 ; C-3 ; 2-R'-CH ₃
2-R'-CH ₃	1,05 ^a d (6,6)	2-CH	22,3	C-2 ; 2-CH
3-OCH ₂	3,32 dq (9,5 ; 7,1)	H-2 ; 2-CH	65,2	C-3 ; 3-R''-CH ₃
	3,23 dq (9,6 ; 7,0)	H-2 ; 2-CH	65,2	C-3 ; 3-R''-CH ₃
3-R''-CH ₃	0,95 ^a t (7,0)	H-2	15,2	C-2
P23				
Cycle B				
1			127,0	
2			156,4	
3	6,86 dd (8,0 ; 0,9)	H-4 _B ; H-5 _B	116,7	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,14 ddd (8,0 ; 7,4 ; 1,7)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	129,7	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,87 ddd (7,6 ; 7,4 ; 1,0)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,8	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,36 dd (7,5 ; 1,6)	H-4 _B ; H-5 _B	129,3	C-2 _B ; C-4 _B ; C-3
Cycle A				
1			116,8	
2			166,5	
3	6,29 d (2,4)	H-5 _A	103,2	C-1 _A ; C-5 _A
4			165,4	
5	6,36 dd (8,9 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,3	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,86 d (9,0)	H-5 _A	135,2	C-2 _A ; C-4 _A ; C-1
Chaîne aliphatique				
1			206,4	
2	4,18 dd (9,1 ; 5,1)	2-CH ; H-3	57,9	C-1 _B ; C-1 _A ; C-1 ; C-3 ; 2-CH ; 2-R'-CH ₃
3	5,26 d (9,0)	H-2	76,8	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; 3-OCH ₂ ; C1 ; C2 ; 2-CH
2-CH-R	3,88 dq (6,4 ; 5,2)	H-2 ; 2-R'-CH ₃	67,5	C-1 ; C-2 ; C-3 ; 2-R'-CH ₃
2-R'-CH ₃	1,14 ^a d (6,4)	2-CH	20,5	C-2 ; 2-CH
3-OCH ₂	3,32 dq (7,0 ; 3,0)	H-2 ; 2-CH	64,9	C-3 ; 3-R''-CH ₃
	3,31 dq (7,0 ; 3,0)	H-2 ; 2-CH	64,9	C-3 ; 3-R''-CH ₃
3-R''-CH ₃	0,98 ^a t (7,0)	H-2	15,4	C-2

^a integration 3H

Tableau 24 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P20** et **P23** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
P21				
Cycle B				
1			127,5	
2			156,5	
3	6,80 dd (8,0 ; 0,9)	H-4 _B ; H-5 _B	117,9	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,04 ddd (8,0 ; 7,3 ; 1,6)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,8	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,72 ddd (7,5 ; 7,3 ; 1,0)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,1	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,11 dd (7,5 ; 1,4)	H-4 _B ; H-5 _B	132,9	C-2 _B ; C-4 _B ; C-3
Cycle A				
1			114,2	
2			165,6	
3	6,28 d (2,4)	H-5 _A	103,5	C-1 _A ; C-5 _A
4			165,6	
5	6,41 dd (8,9 ; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	108,8	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,83 d (8,9)	H-5 _A	133,7	C-2 _A ; C-4 _A ; C-1
Chaîne aliphatique				
1			204,7	
2	3,50 m	H-2 ; H-3	39,0	C-1 _B ; C-1 _A ; C-1 ; C-3 ; C-4
	3,46 m	H-2 ; H-3	39,0	C-1 _B ; C-1 _A ; C-1 ; C-3 ; C-4
3	3,57 m	H-2 ; H-4	46,9	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-5
4	4,34 dq (6,3 ; 3,5)	H-3 ; H-5	70,2	C-1 _B ; C-2 ; C-3 ; C-5
5	1,09 ^a d (6,3)	H-2	21,7	C-3 ; C-4
P24				
Cycle B				
1			129,7	
2			156,2	
3	6,79 dd (8,0 ; 1,0)	H-4 _B ; H-5 _B	117,0	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,00 ddd (8,0 ; 7,5 ; 1,5)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,3	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,72 ddd (7,5 ; 7,4 ; 0,9)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,4	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,13 dd (7,6 ; 1,5)	H-4 _B ; H-5 _B	130,7	C-2 _B ; C-4 _B ; C-3
Cycle A				
1			114,3	
2			165,4	
3	6,26 d (2,3)	H-5 _A	103,5	C-1 _A ; C-5 _A
4			165,4	
5	6,40 dd (8,8 ; 2,3)	H-3 _A ; H-6 _A	108,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,88 d (8,8)	H-5 _A	133,8	C-2 _A ; C-4 _A ; C-1
Chaîne aliphatique				
1			205,5	
2	3,57 m	H-2 ; H-3	39,3	C-1 _B ; C-1 _A ; C-1 ; C-3 ; C-4
	3,51 m	H-2 ; H-3	39,3	C-1 _B ; C-1 _A ; C-1 ; C-3 ; C-4
3	3,60 m	H-2 ; H-4	46,0	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-5
4	4,21 dq (6,3 ; 6,2)	H-3 ; H-5	71,1	C-1 _B ; C-2 ; C-3 ; C-5
5	1,09 ^a d (6,2)	H-2	21,9	C-3 ; C-4

^a integration 3H

Tableau 25: Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P21** et **P24** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (*J* Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
P22				
Cycle B				
1			125,9	
2			153,5	
3	6,80 d él (8,0)	H-4 _B ; H-5 _B	116,9	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,18 ddd (8,0; 7,5; 1,6)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	129,3 ^b	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,90 ddd (7,4; 7,3; 0,9)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,2	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,11 dd (7,4; 1,4)	H-4 _B ; H-5 _B	129,4 ^b	C-2 _B ; C-4 _B ; C-4
Cycle A				
1			116,5	
2			157,5	
3	6,36 d (2,3)	H-5 _A	104,2	C-1 _A ; C-5 _A
4			160,0	
5	6,39 dd (8,4; 2,4)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,28 d (8,3)	H-5 _A	129,6	C-2 _A ; C-4 _A ; C-2
tetrahydrofurane				
2			109,3	
3	2,64 m	H-3 ; H-4	39,1	C-1 _B ; C-1 _A ; C-2; C-4 ; C-5
	2,61 m	H-3 ; H-4	39,1	C-1 _B ; C-1 _A ; C-2; C-4 ; C-5
4	3,27 m	H-3 ; H-5	43,2	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; C-2 ; C-3 ; C-5 ; 5-CH ₃
5	4,71 dq (6,2; 3,1)	H-4 ; 5-CH ₃	86,2	C-1 _B ; C-3 ; C-4 ; 5-CH ₃
5-CH ₃	1,08 ^a d (6,2)	H-5	17,6	C-4 ; C-5
P25				
Cycle B				
1			129,6	
2			153,4	
3	6,78 d él (7,8)	H-4 _B ; H-5 _B	116,9	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,15 dd él (7,8 ; 7,7)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	127,4	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,88 ddd (8,1 ; 7,5 ; 0,7)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	121,5	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,14 d él (7,8)	H-4 _B ; H-5 _B	129,0	C-2 _B ; C-4 _B ; C-4
Cycle A				
1			116,3	
2			157,3	
3	6,36 d (2,3)	H-5 _A	104,2	C-1 _A ; C-5 _A
4			160,0	
5	6,39 dd (8,3 ; 2,3)	H-3 _A ; H-6 _A	107,6	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,30 d (8,3)	H-5 _A	129,7	C-2 _A ; C-4 _A ; C-2
tetrahydrofurane				
2			109,3	
3	2,54 brd (11,8)	H-3 ; H-4	35,5	C-1 _B ; C-1 _A ; C-2; C-4 ; C-5
	2,66 dd (12,1 ; 4,2)	H-3 ; H-4	35,5	C-1 _B ; C-1 _A ; C-2; C-4 ; C-5
4	3,21 br d (4,0)	H-3 ; H-5	43,6	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; C-2 ; C-3 ; C-5 ; 5-CH ₃
5	4,70 q (6,5)	H-4 ; 5-CH ₃	89,1	C-1 _B ; C-3 ; C-4 ; 5-CH ₃
5-CH ₃	1,33 ^a d (6,5)	H-5	20,8	C-4 ; C-5

^a integration 3H ; ^b Les assignements sont interchangeable.

Tableau 26 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **P22** et **P25** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (J Hz).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
P26				
Cycle B				
1			127,3	
2			156,5	
3	6,84 dd (7,7 ; 1,1)	H-4 _B ; H-5 _B	116,3	C-1 _B ; C-5 _B
4	7,01 dt (7,4 ; 1,3)	H-3 _B ; H-5 _B ; H-6 _B	128,7	C-2 _B ; C-6 _B
5	6,75 dt (7,5 ; 1,2)	H-3 _B ; H-4 _B ; H-6 _B	120,8	C-1 _B ; C-3 _B
6	7,28 dd (7,6 ; 1,4)	H-4 _B ; H-5 _B	128,2	C-4 ; C-2 _B ; C-4 _B
Cycle A				
1			122,2	
2			157,9	
3	6,27 d (2,3)	H-5 _A	104,9	C-1 _A ; C-5 _A
4			158,6	
5	6,33 dd (8,6 ; 2,5)	H-3 _A ; H-6 _A	107,5	C-1 _A ; C-3 _A
6	7,82 d (8,6)	H-5 _A	129,2	C-2 ; C-2 _A ; C-4 _A
tetrahydrofurane				
1				
2			91,6	
3	3,05 dd (12,5 ; 8,5)	H-3 ; H-4	45,5	C-1 _B ; C-1 _A ; C-2 ; C-4 ; C-5 ; 2-CH-R'
	2,43 dd (12,4 ; 11,1)	H-3 ; H-4	45,5	C-1 _B ; C-1 _A ; C-2 ; C-4 ; C-5 ; 2-CH-R'
4	3,54 dt (11,7 ; 8,7)	H-3 ; H-5	47,0	C-1 _B ; C-2 _B ; C-6 _B ; C-2 ; C-3 ; C-5 ; 5-CH ₃
5	4,23 q (6,0)	H-4 ; 5-CH ₃	83,3	C-1 _B ; C-3 ; C-4 ; 5-CH ₃
5-CH ₃	1,27 ^a d (6,0)	H-5	18,4	C-4 ; C-5
2-CH-R'	3,99 q (6,2)	2-R-CH ₃	74,4	C-1 _A ; C-2 ; C-3 ; 2-R-CH ₃
2-R-CH ₃	1,10 d (6,4)	2-CH-R'	19,4	C-2 ; 2-CH-R'

^a integration 3H

Tableau 27 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC du produit **P26** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS; δ ppm (*J* Hz).

III.3.3. Spectres de masse des produits P20/23 P21/24, P22/25

L'ion moléculaire mesuré sur les spectres de masse positifs de **P20/23**, **P21/P24** et **P22/P25** ainsi que leurs formules sont :

- *m/z* 369.13 [M + Na]⁺ (pour P19 et P22), C₁₉H₂₂O₆.
- *m/z* 325.10 [M + Na]⁺ (pour P20 et P23), C₁₇H₁₈O₅.
- *m/z* 325.10 [M + Na]⁺ (pour P21 et P24), C₁₇H₁₈O₅.

Ces résultats confirment les structures chimiques obtenues par RMN (**Figure 50**), ils confirment aussi la présence de trois couples de diastéréoisomères.

Finalement, **P20/23**, **P21/P24**, **P22/P25** et **P26** sont identifiés respectivement comme **(Figure 50)** :

1-[2,4-dihydroxyphényl]-2-(hydroxyéthyl)-3-éthoxyl-3-(2-hydroxyphényl)-propanone.

1-[2,4-dihydroxyphényl]-3-(2-hydroxyphényl)-4-hydroxy-pentanone.

2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxy-4-(2-hydroxyphényl)-5-méthyltetrahydrofurane.

2-[2,4-dihydroxyphényl]-2-hydroxyéthyl-4-(2-hydroxyphényl)-5-méthyltetrahydrofurane.

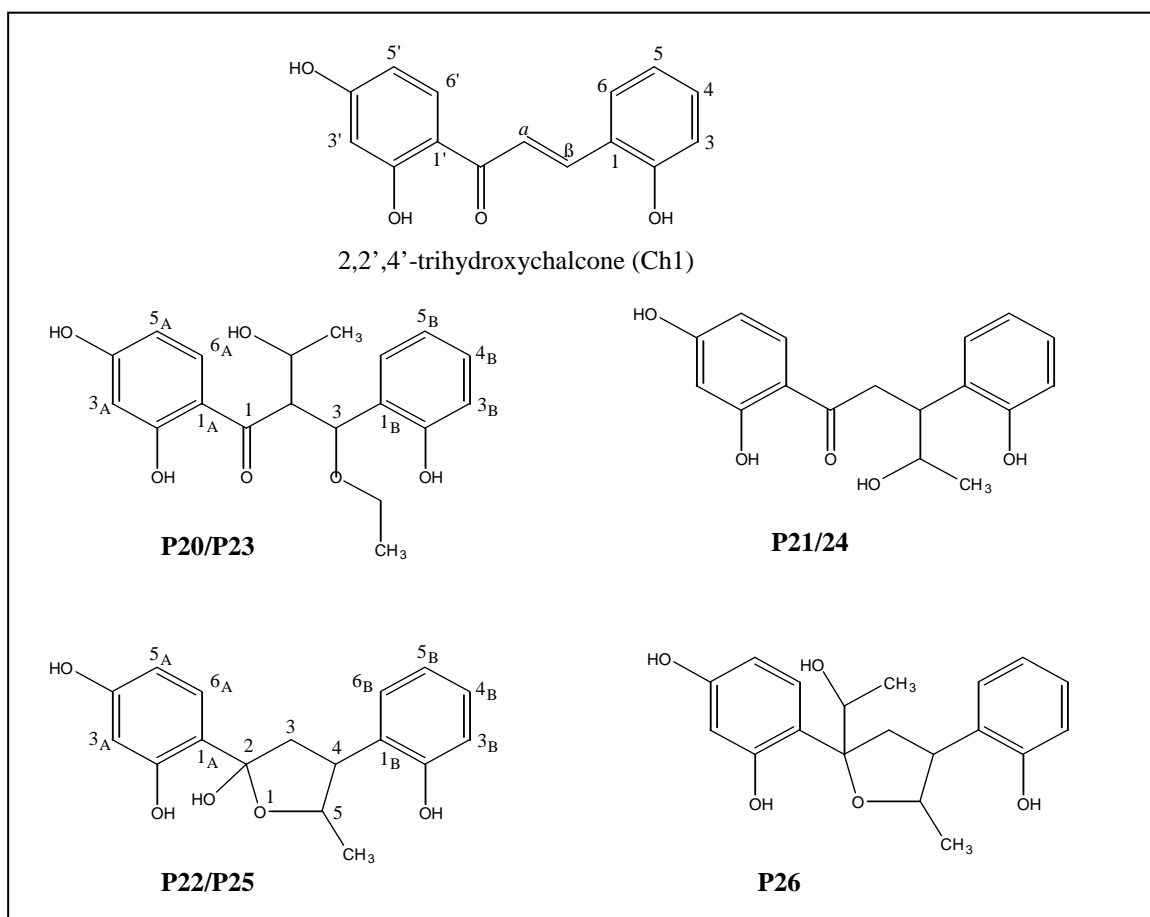


Figure 50 : Structures chimiques des produits majoritaires de radiolyse de Ch1 dans l'éthanol.

IV. ROLE DE L'OXYGENE DANS LA RADIOLYSE DES CHALCONES

Pour étudier le rôle de l'oxygène nous avons irradié des solutions de Ch1 dans trois conditions expérimentales différentes :

- ✓ en milieu désaéré en faisant barboter de l'hélium gazeux dans la solution à irradier.
- ✓ en milieu non désaéré dans des tubes ouverts.
- ✓ en milieu non désaéré dans des tubes fermés.

IV.1. RADIOLYSE DE Ch1 DANS LE METHANOL EN MILIEU NON DESAERE

La **Figure 51** représente les chromatogrammes CLHP de Ch1 (5×10^{-3} M) en milieu non désaéré (tube fermé), non irradiée (le contrôle) et irradiée avec les doses suivantes : 10 kGy, 12 kGy, 20 kGy et 24 kGy, qui sont plus élevées que les doses utilisées en milieu désaéré. Nous observons que la hauteur du pic de Ch1 (temps de rétention: $t_r = 26$ min) ne change pas pour des doses inférieures ou égales à 10 kGy, la dégradation de la chalcone commence effectivement à 12kGy et continue lorsque la dose augmente, la dégradation complète est observée à 24 kGy.

Le même décalage vers des plus fortes doses est observé si l'on compare les irradiations en milieu non désaéré (tube fermé) et en milieu désaéré. Il faut, par exemple, 14 kGy pour dégrader la chalcone complètement à 5×10^{-4} M, au lieu de 1 kGy en milieu désaéré. Nous constatons donc, là encore, que la concentration et la dose absorbée sont deux facteurs dont dépend le processus de radiolyse.

Nous pouvons, d'ores et déjà, noter l'influence du milieu de radiolyse sur la dégradation de la chalcone. Il semble que l'oxygène de l'air ait un rôle protecteur pour la chalcone vis à vis des réactions de radiolyse. En effet, de 0 à 10 kGy (**Figure 51**) aucune dégradation n'est observée en milieu non désaéré (tube fermé). En revanche il est important de noter que la dégradation qui débute au delà de cette dose semble identique (chromatogrammes CLHP

identiques à ceux obtenus en milieu désaéré) à celle qui se produit en milieu désaéré. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la dégradation ne peut avoir lieu que lorsque l'oxygène de l'air présent dans le tube fermé a été consommé par les réactions de radiolyse. Ceci est confirmé, en irradiant la chalcone en milieu non désaéré, tube ouvert. Nous constatons en effet que la chalcone n'est pas dégradée, l'oxygène moléculaire n'étant, dans ce cas, jamais complètement consommé et donc toujours présent au cours des réactions de la radiolyse.

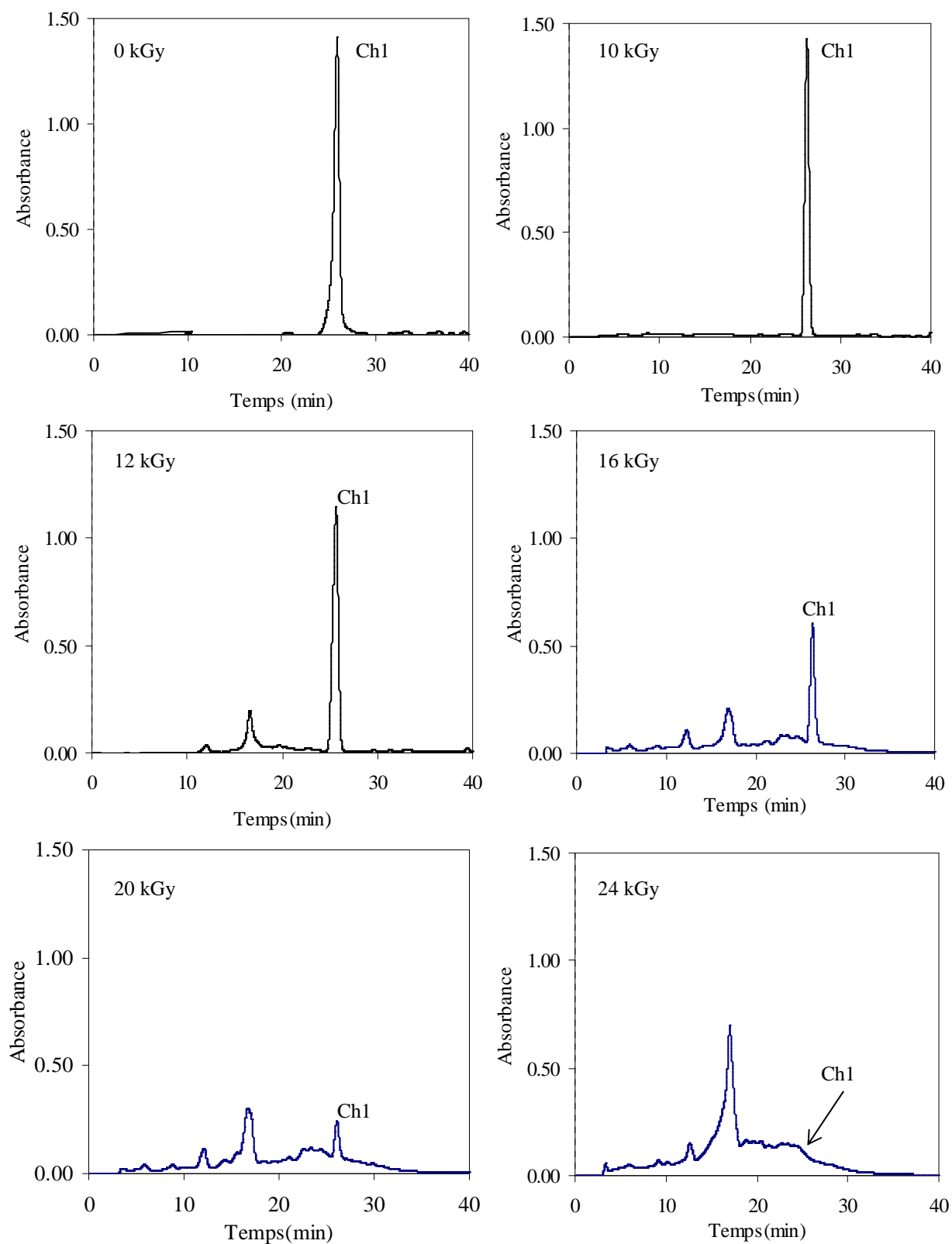


Figure 51 : Chromatogrammes obtenus par CLHP, enregistrés à 280 nm, d'une solution de Ch1 (5×10^{-3} M) avant et après irradiation avec des doses de 10 kGy, 12 kGy, 16 kGy, 20 kGy et 24 kGy, dans le méthanol en milieu non désaéré.

IV.2. RADIOLYSE DE Ch1 DANS L'ETHANOL EN MILIEU NON DESAERE

Nous avons également étudié la radiolyse de Ch1 en milieu éthanolique non désaéré. La **Figure 52** compare les chromatogrammes CLHP obtenus en milieu désaéré et non désaéré (tube fermé). De même que pour le méthanol, en présence d'oxygène la dégradation n'est effective qu'après consommation de l'oxygène présent dans le milieu, ce qui correspond à une dose de 10 kGy. Dans ce cas (milieu non désaéré tube fermé) la dégradation est totale à 22 kGy.

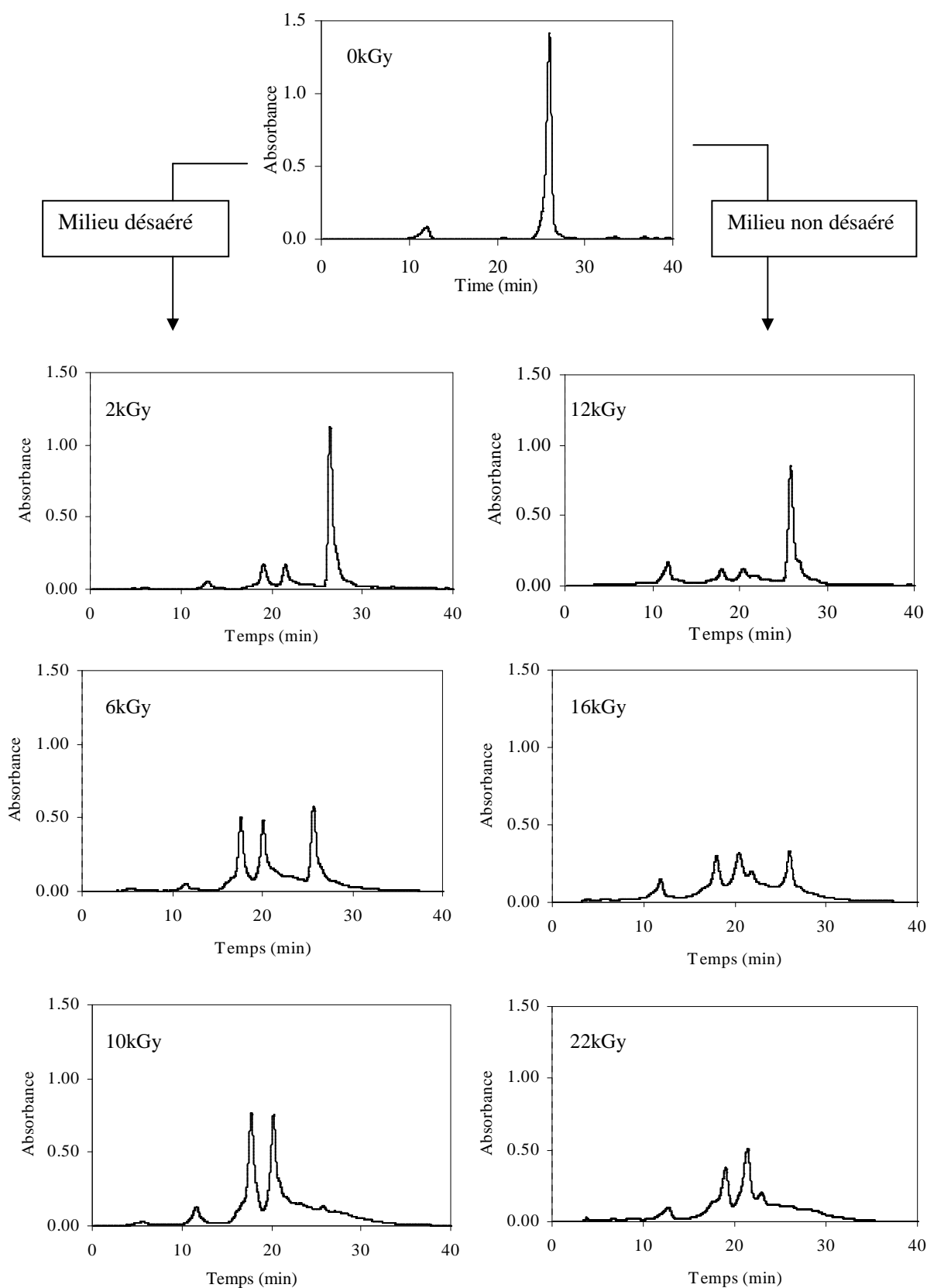


Figure 52 : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de Ch1 avant irradiation et après irradiation à différentes doses, dans l'éthanol en milieu non désaéré et désaéré à 5×10^{-3} M.

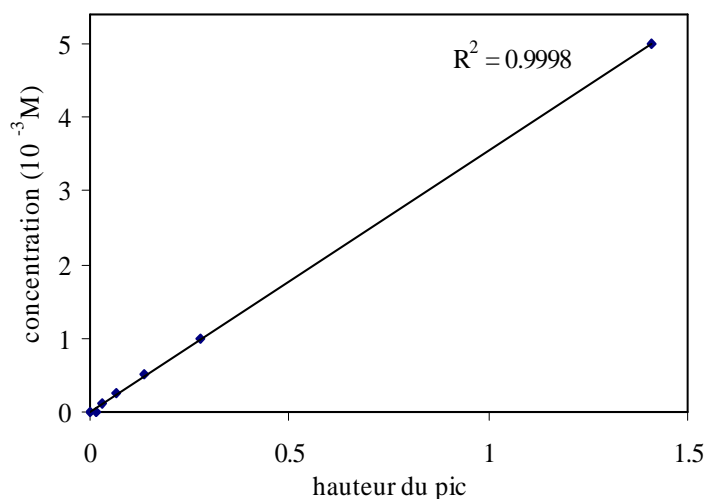


Figure 53 : courbe d'étalonnage représentant la concentration de Ch1 en fonction de la hauteur de pic mesuré à 280 nm en CLHP en milieu éthanolique.

Une courbe d'étalonnage (**Figure 53**) nous permet de suivre, à l'aide des chromatogrammes CLHP, la disparition de Ch1 en fonction de la dose. L'évolution de la concentration de Ch1 obtenue dans les différents cas (milieu désaéré, milieu non désaéré tube fermé et milieu non désaéré tube ouvert) est présentée sur la **Figure 54**.

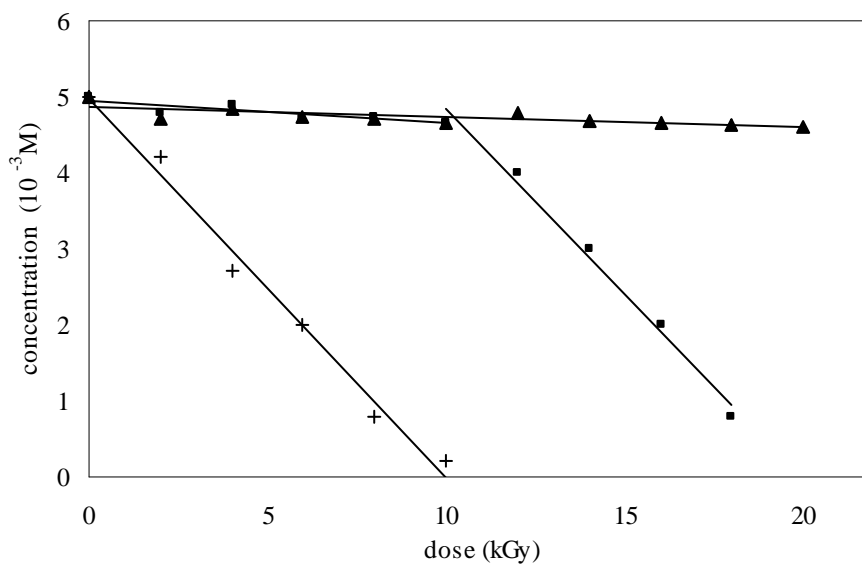


Figure 54 : Evolution de la concentration de Ch1 en fonction de la dose d'irradiation, en solution éthanolique à $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, en milieu aéré à tube ouvert (▲), en milieu aéré à tube fermé (■) et en milieu désaéré (+).

Dans les trois cas de radiolyse, nous observons un comportement différent de transformation de Ch1 :

- (i) en milieu désaéré (absence de l'oxygène) on constate une décroissance rapide de la concentration de la chalcone dès les premières doses appliquées. La chalcone est complètement dégradée à 10 kGy, ceci prouve que l'oxygène n'a pas un rôle primordial dans le processus de transformation de la chalcone.
- (ii) en milieu non désaéré dans un tube fermé (présence d'une quantité limitée d'oxygène), la dégradation de la chalcone a lieu à partir de 10 kGy, ce qui signifie que tant que l'oxygène moléculaire est présent dans le milieu de radiolyse, la chalcone est protégée et ne peut pas réagir avec les radicaux libres du solvant. Ensuite à partir de 10 kGy tout l'oxygène est consommé et la dégradation peut débiter avec la même dose dépendance qu'en absence d'oxygène (même pente $\Delta M = f(D)$ et même rendement radiolytique) (**Figure 54**).
- (iii) en milieu non désaéré dans un tube ouvert (présence illimitée d'oxygène dans le milieu de radiolyse), on n'observe aucune dégradation de la chalcone même à des fortes doses, ce qui confirme que l'oxygène moléculaire inhibe la réaction entre la chalcone et les espèces réactives produites dans la radiolyse du solvant.

En conclusion on peut dire que l'oxygène moléculaire réagit probablement avec les radicaux libres du solvant pour former des radicaux peroxydes (voir chapitre 2), rendant la réaction avec la chalcone chimiquement défavorable. Ce résultat est inattendu, car d'une manière générale, l'oxygène moléculaire a plutôt tendance à favoriser les dégradations engendrées par l'irradiation. Par exemple, pour la radiolyse des flavonols, l'oxygène joue un rôle important dans leur transformation en depsides (voir chapitre 4). Il faut noter aussi que les radicaux peroxydes formés dans le milieu de radiolyse ne réagissent pas avec la chalcone.

V. MECANISMES DE TRANSFORMATION DES CHALCONES EN MILIEU ALCOOLIQUE

Vingt huit composés sur trente identifiés conservent les deux cycles aromatiques initiaux (présents dans les molécules mères). Ils diffèrent par le nombre de groupements hydroxyles présents sur les cycles aromatiques A et B initialement présents dans les molécules mères.. Ils diffèrent également par la nature des groupements greffés sur la chaîne aliphatique et par la position de ces groupements. Nous constatons que tous ces composés sont caractérisés par l'absence de la double liaison de la chaîne aliphatique.

En comparant les produits de radiolyse des chalcones obtenus dans les deux solvants, Nous constatons que les deux cycles aromatiques ne sont pas affectés par l'irradiation, mais que la double liaison et le groupement carbonyle sont les deux fonctions touchées. Les radicaux les plus impliqués dans la dégradation des chalcones sont HMR dans le méthanol et HER dans l'éthanol, et dans une moindre mesure $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$. A partir de ces constatations expérimentales, nous allons proposer plusieurs mécanismes de transformation des chalcones, en milieu alcoolique.

V.1. ROLE DE LA DOUBLE LIAISON

D'après la structure des produits identifiés, nous pouvons proposer que la première étape de transformation de la chalcone est l'attaque de la double liaison, pour confirmer cette hypothèse, nous avons irradié en milieu désaéré la phlorétine (une dihydrochalcone, sans double liaison α,β , **Figure 39**), dans les mêmes conditions expérimentales de dose et de concentration que pour les autres chalcones.

Le chromatogramme CLHP de la phlorétine (**Figure 55**) (2',4,4',6'-tetrahydroxy-7,8-dihydrochalcone) ne montre pas de modification bien que cette molécule soit irradiée avec des doses supérieures à 20 kGy. Ce résultat nous permet de confirmer le rôle principal de la double liaison α,β dans la dégradation des chalcones.

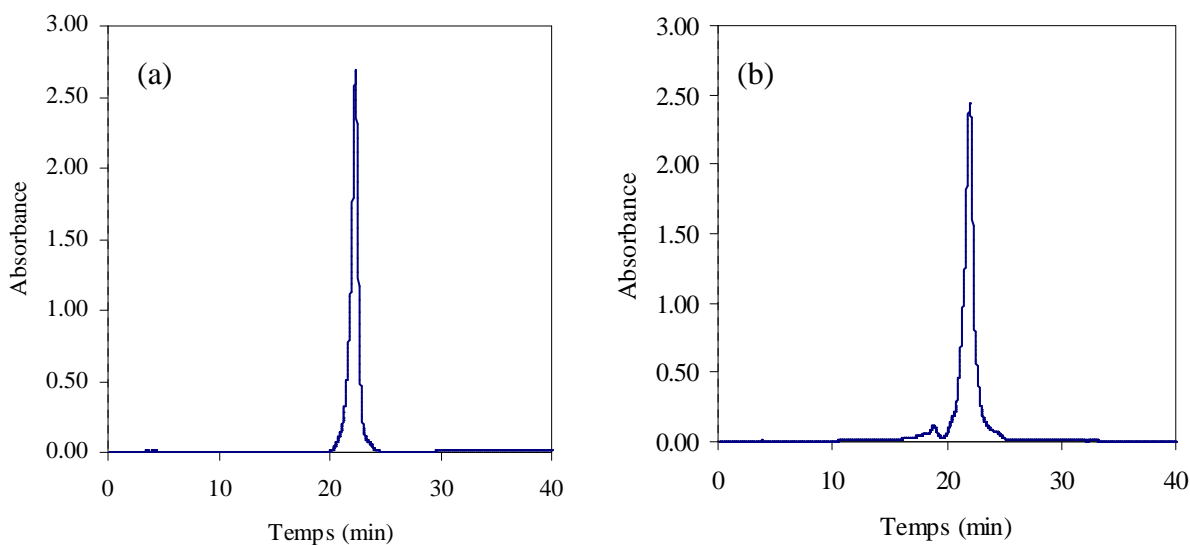


Figure 55 : Chromatogrammes, enregistrés à 280 nm, de la phlorétine (2',4,4',6'-tetrahydroxy-7,8-dihydrochalcone) avant irradiation (a) et après irradiation (b) avec une dose de 20 kGy en milieu désaéré à 5×10^{-3} M.

V.2. MECANISMES DE DEGRADATION DES CHALCONES EN SOLUTION ALCOOLIQUE

En comparant les structures chimiques de tous les produits identifiés, dans le méthanol et dans l'éthanol, nous pouvons classer les produits de radiolyse en deux groupes principaux:

- ✓ le premier dans lequel les produits sont caractérisés par l'addition des radicaux issus de la radiolyse des solvants sur la chaîne aliphatique, mono ou disubstitués par HMR, HER, $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$ ou H^\bullet .

- ✓ le deuxième groupe où les produits sont caractérisés par l'addition des radicaux mais également par une cyclisation.

Dans un premier temps, nous présenterons le mécanisme de formation du premier groupe de produits (**Figures 56, 57 et 58**), ensuite nous proposerons un schéma réactionnel expliquant la formation des produits cyclisés (**Figures 59, 60 et 61**).

Les structures chimiques des produits obtenus montrent que le processus de transformation est déclenché par l'attaque de HMR ou HER (selon le milieu de radiolyse: méthanol ou éthanol) sur la double liaison. Par conséquent, un radical intermédiaire est formé, le premier centré sur C- β (**1a**) et le deuxième sur C- α (**2a**) permettant l'addition d'autres espèces réactives

présentes dans le milieu de radiolyse tels que $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ ou $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$, H^\bullet , HMR ou HER et l'électron solvaté (e_s^-). La **Figure 56** récapitule ce schéma réactionnel, qui mène à la formation de **P3**, **P12** et **P20/23** (attaque de HMR/HER en $\text{C}\alpha$ -**1a-1b**) et de **P1**, **P7**, **P10**, **P15**, **P18**, **P19** et **P21/24** (attaque de HMR/HER en $\text{C}\beta$ -**2a-2b**). La **Figure 56** montre également trois voies réactionnelles expliquant la formation du composé intermédiaire **2d**. Ce composé n'a pas été identifié, en revanche, comme nous l'expliquerons plus loin, il pourrait participer à la formation de **P4**, **P9**, **P13/14**, **P16/17** et **P26**. Trois chemins sont proposés pour expliquer la formation de **2d** :

✓ Le premier chemin (**2b-2c-2d**) est basé sur une attaque de HMR ou HER sur le groupe carbonyle de **2b**, suivi d'une addition de H^\bullet .

✓ Le deuxième chemin (**2b'-2c'-2d**) est basé sur une forme mésomère de **2a** (**2b'**) suivi de l'addition d'un radical H^\bullet donnant la formation de (**2c'**), ce dernier peut subir une attaque de HMR ou HER sur la double liaison pour former un radical en $\text{C}\alpha$ sur lequel vient s'additionner H^\bullet menant à la formation de **2d**. Une telle attaque de la double liaison par les radicaux HMR ou HER est possible puisqu'elle a déjà été observée (*Wang, 1999*) et est confirmée dans notre étude (première étape de la dégradation de chalcone).

✓ Le troisième chemin (**2b-2c''-2d**) est une alternative au chemin **2b-2c-2d**. Dans ce cas, l'électron solvaté peut réduire le groupe carbonyle de **2b** ($\text{R} = \text{H}$) pour former un anion radicalaire (**2c''**), cette étape est suivie par la capture d'un proton H^+ et la recombinaison du radical formé avec HMR/HER donnant la formation de **2d**.

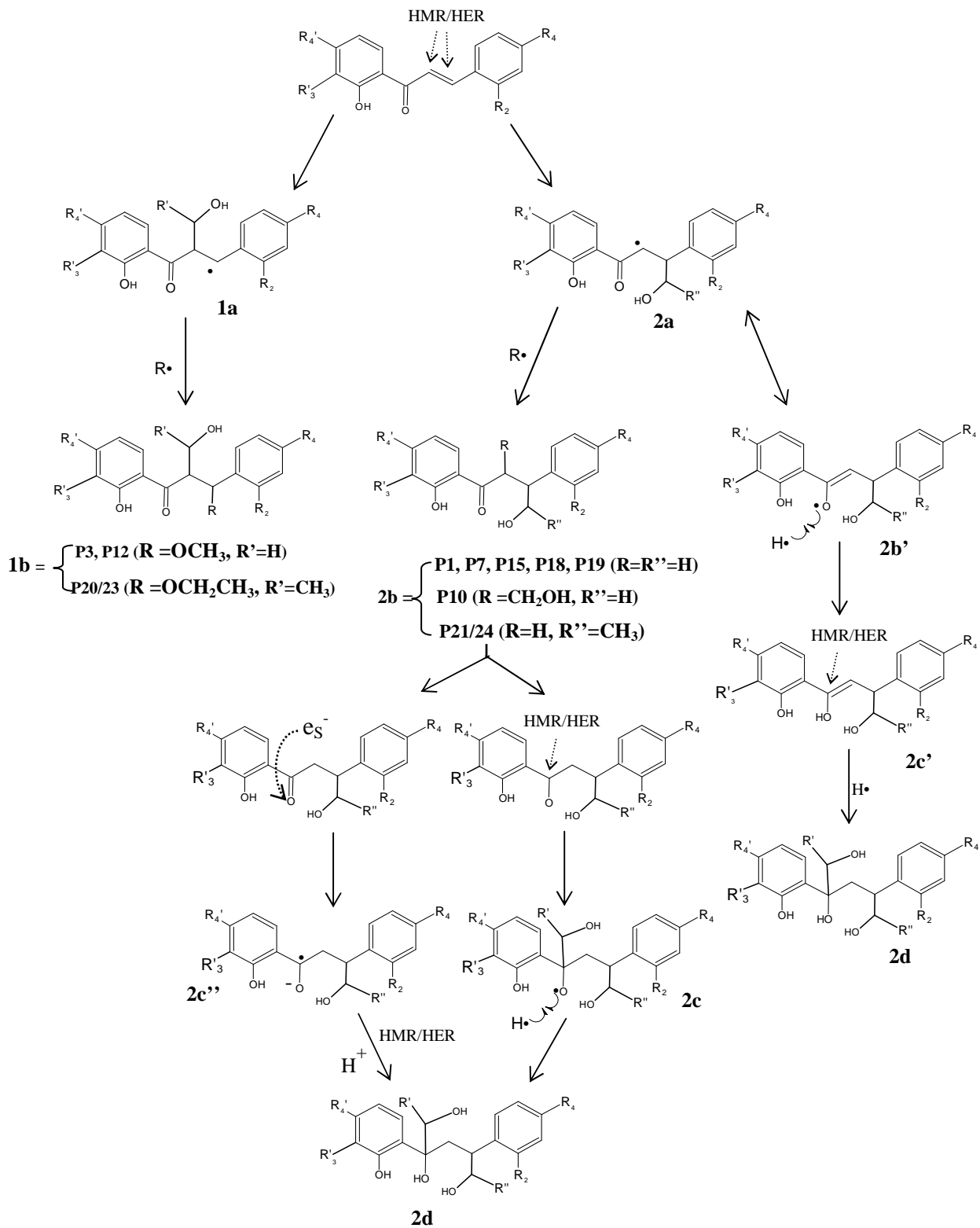


Figure 56 : Mécanismes de transformations des chalcones en produits de radiolyse non cyclisés mono et di substitués, irradiée en milieu alcoolique.

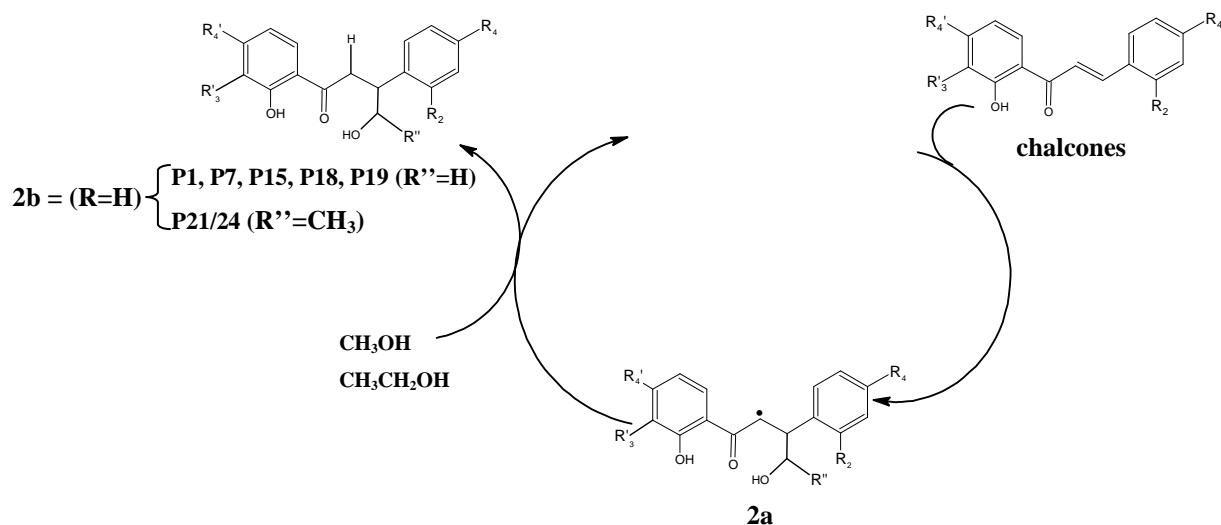


Figure 57 : Mécanismes de transformations des chalcones, irradiées en milieu alcoolique, en produits de radiolyse non cyclisés monosubstitués en position C β .

Pour expliquer la formation de **P1**, **P7**, **P15**, **P18**, **P19** et **P21/P24**, un autre mécanisme radicalaire est proposé (**Figure 57**). Après l'attaque de la chalcone par HMR ou HER, le radical **2a** pourrait capter un atome H \bullet de l'alcool (CH₃OH ou CH₃CH₂OH) pour former **P1**, **P7**, **P15**, **P18**, **P19** et **P21/P24** et libérer un radical HMR ou HER dans le milieu de radiolyse. Toutefois ce mécanisme ne peut pas expliquer la formation de **P3**, **P10**, **P12** et **P20/P23**.

Sur la **Figure 58** nous avons pris **2b** (R = CH₂OH et R'' = H) comme nouveau point de départ à partir duquel deux voies possibles sont alors envisageables:

- ✓ (première colonne) addition d'un radical H \bullet sur l'oxygène du groupe carbonyle pour former un radical centré sur l'atome de carbone voisin (**Ib'**), suivi de l'addition d'un radical HMR donnant **P11**.

- ✓ (deuxième colonne) une tautomérie céto-énolique pourrait exister menant à la formation d'une nouvelle double liaison qui pourrait être attaquée par HMR aboutissant à la formation du radical intermédiaire **Ic''**. Sur ce dernier peut se greffer un radical H \bullet pour former **P11**.

Les deux mécanismes sont chimiquement possibles mais l'équilibre de tautomérie céto-énolique est habituellement en faveur de la forme cétonique. La formation de la forme énol doit en général être catalysée par une base ou un acide fort, ce qui n'est pas notre cas dans le milieu de radiolyse. Le premier mécanisme (première colonne) est probablement

favorisé en raison de la spécificité du milieu de radiolyse (présence de nombreux radicaux libres H^\bullet). Ce type de produit n'a pas été identifié dans l'éthanol, il est probablement formé en faible quantité et sa polarité rend la séparation difficile.

Les **Figures 59, 60 et 61** présentent les mécanismes de formation des produits de radiolyse cyclisés. Pour expliquer la formation de **P8** et **P22/25**, prenons comme point de départ le produit **2b** ($R = R'' = H$) (**Figure 59**). Deux voies sont alors envisageables, la première est une réaction ionique très classique tandis que la seconde est radicalaire, passant par la formation d'un héli-acétal. La formation de l'héli-acétal cyclique est bien connue et bien décrite par l'intermédiaire de la voie ionique (*Vollhardt, 1999*), néanmoins un tel mécanisme est habituellement catalysé par des solutions acides. Le deuxième mécanisme quant à lui est favorisé en milieu de radiolyse, notamment par la présence des radicaux H^\bullet . Notons que la séparation de **P7** et **P8** était très difficile, ceci est probablement dû à la présence concomitante des deux composés en équilibre chimique dans la solution. En effet le type de réaction que l'on vient de décrire n'est en général pas « à sens unique », et la même remarque peut être appliquée à **P21/24** et **P22/25**.

La **Figure 60** explique la formation des produits **P4, P9, P13/14, P16/17** et **P26**. Deux voies sont possibles, la première est ionique et la seconde radicalaire. Le premier mécanisme mène à la formation d'un groupe alcyloxonium qui pourrait facilement libérer une molécule d'eau et former un carbocation (**IIIc'**). Le carbocation ternaire subit une cyclisation, suivie d'une libération d'un ion H^+ aboutissant à la formation de **IIIc''** qui correspond aux produits **P4, P9, P13/14, P16/17** et **P26**. Cependant le mécanisme ionique doit être catalysé et exige probablement des conditions fortement acides, le mécanisme radicalaire est, encore une fois, probablement favorisé dans le milieu de radiolyse. Malgré cela l'attaque de H^\bullet sur **IIIa''** est probablement moins efficace que l'attaque classique de HMR ou HER. Ces remarques plutôt négatives, quant aux mécanismes proposés, nous amènent à envisager une autre voie réactionnelle (**Figure 61**).

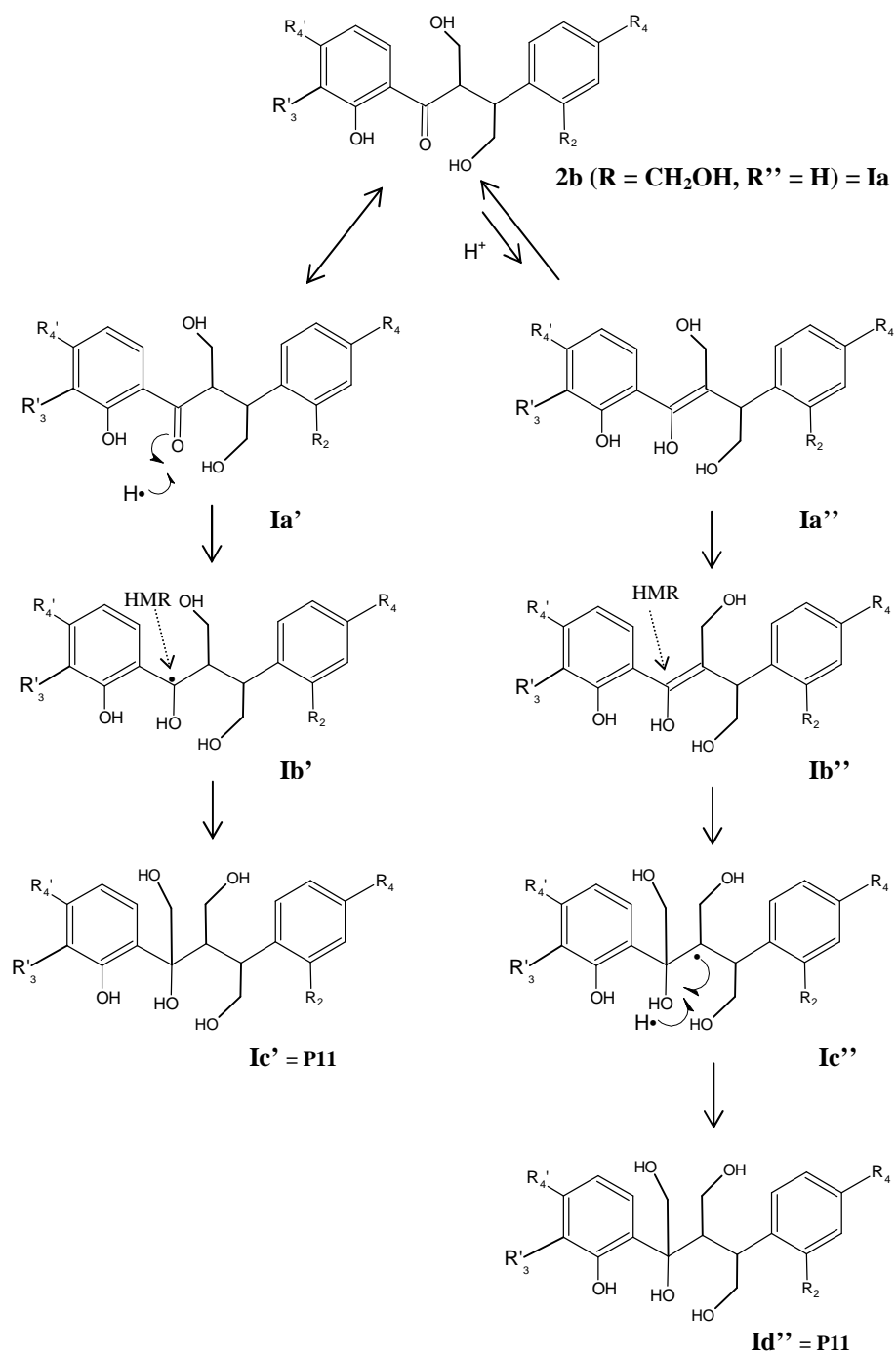


Figure 58 : Mécanismes de formations du produit **P11** issu de la dégradation de Ch1 en milieu méthanolique.

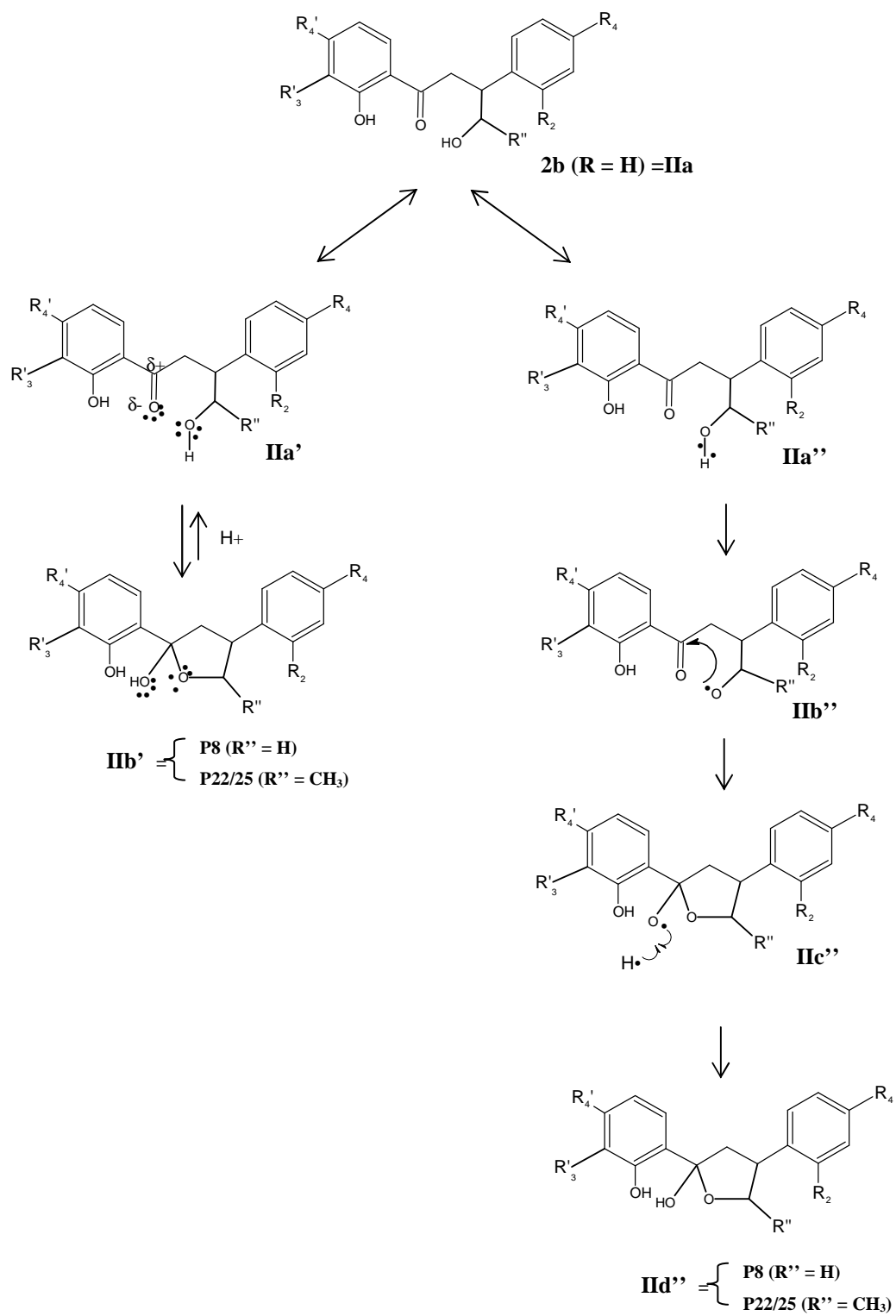


Figure 59 : Mécanismes de transformations des chalcones, irradiée en milieu alcoolique (méthanol/éthanol), en produits de radiolyse cyclisés.

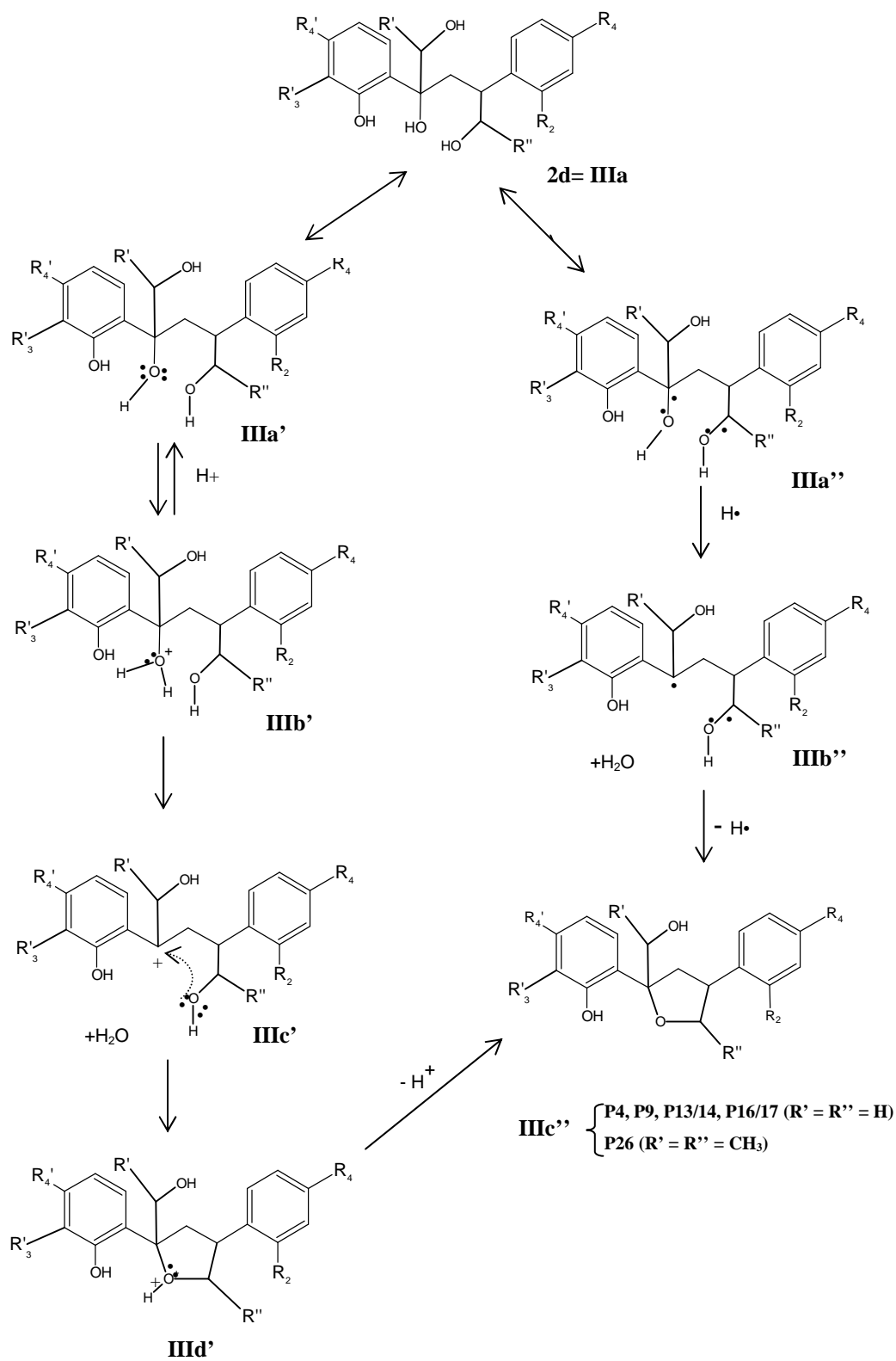


Figure 60 : Mécanismes de transformations (ionique et radicalaire) des chalcones en produits de radiolyse cyclisés, irradiée en milieu alcoolique (méthanol/éthanol).

Dans ce cas (**Figure 61**) le produit de départ n'est pas un composé intermédiaire non identifié, au contraire, ce produit de départ **II_d''** n'est autre que **P8** ($R'' = H$) ou **P22/25** ($R'' = CH_3$). Le produit **II_d''** subit une réduction par l'électron solvaté pour former le produit intermédiaire **II_e''**, l'addition d'un radical HMR ou HER est alors possible pour former les produits **P4**, **P9**, **P13/14**, **P16/17** et **P26**.

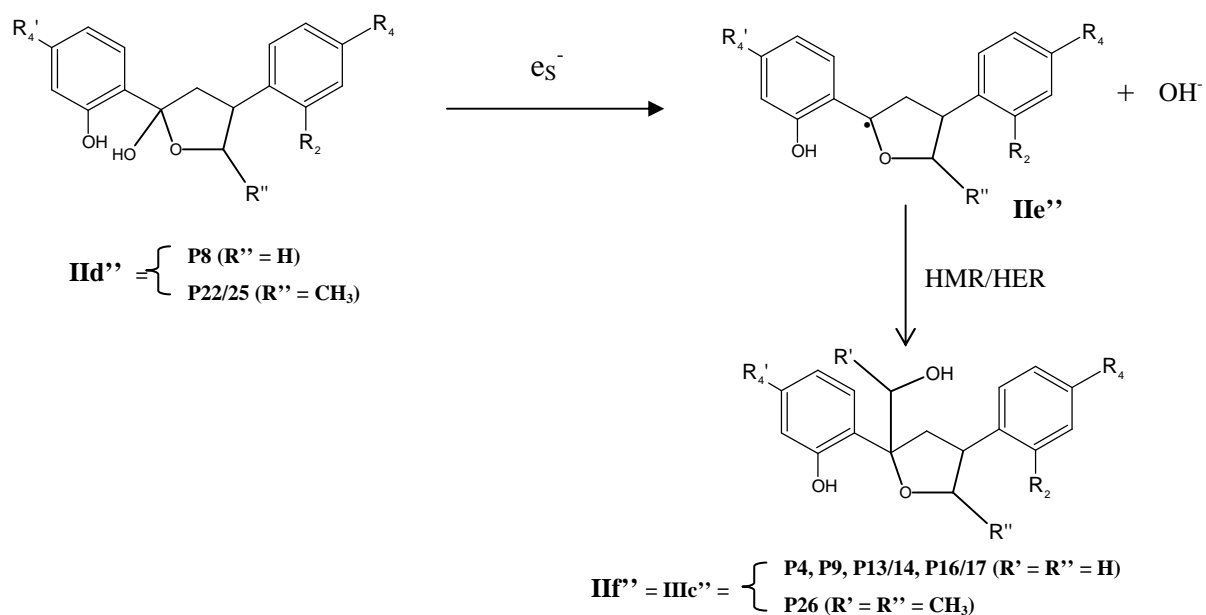
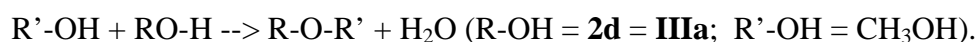


Figure 61 : Mécanisme de dégradation des chalcones impliquant l'attaque de l'électron solvaté aboutissant à la formation des produits cyclisés.

En ce qui concerne **P2**, la formation de ce composé inattendu peut être expliquée par une addition d'un radical $\bullet\text{CH}_3$ après coupure de la liaison RO-H ou par l'addition de $\text{CH}_3\text{O}\bullet$ après coupure de la liaison R-OH du composé **P1**. Ces deux mécanismes sont possibles, mais la coupure de la liaison RO-H est probablement plus facile, même si la coupure de la liaison R-OH peut également exister en solution alcoolique irradiée (*Freeman, 1987*).

Un autre mécanisme est possible, il s'agit de la formation d'un éther à partir de deux alcools, selon la réaction suivante:



Cependant ce mécanisme est, encore une fois, habituellement catalysé en milieu très acide.

Nous avons également observé de petits fragments tels que **P5** et **P6**. La **Figure 62** présente un schéma réactionnel pouvant expliquer la formation de ces produits de radiolyse issus de la rupture de la double liaison. Le produit **P6** peut être formé à partir du radical intermédiaire **IIb''**, par cyclisation et coupure du cycle aromatique A (**Figure 62**)

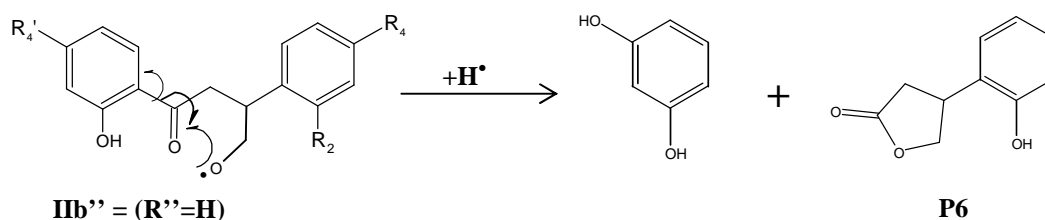


Figure 62 : Schéma réactionnel proposé pour la formation de la butyrolactone, en milieu de radiolyse en solution méthanolique.

La réactivité des chalcones avec les radicaux libres de la radiolyse des alcools (méthanol et éthanol) est présentée ici sur la base des produits de radiolyse obtenus avec une série de six chalcones. Il a été démontré que les deux cycles aromatiques ne participent pas directement au processus de transformation alors que la double liaison est responsable de la dégradation. La première réaction est une attaque redox de HMR ou HER sur la double liaison de la chaîne aliphatique, cette attaque est suivie d'une cascade de réactions telles que des additions radicalaires, la perte de la double liaison et des cyclisations qui mènent à de nombreux composés nouveaux. Les processus de dégradation se produisent seulement en l'absence d'oxygène moléculaire, s'il est présent, ce dernier joue un rôle protecteur.

Le mécanisme général met en évidence beaucoup de réactions de substitution chimique possibles après l'attaque de la double liaison. La radiolyse de la série de six chalcones a démontré que la substitution des deux cycles aromatiques A et B n'a pas influencé et n'a pas participé à la dégradation. Changer la substitution en C-2 (H, OH ou OCH₃) a mené au même type de produits de dégradation gardant les deux cycles aromatiques intacts.

VI. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES CHALCONES ET DE LEURS PRODUITS DE RADIOLYSE

Nous avons vu que l'irradiation a pour effet de transformer les chalcones en produits de radiolyse. Il est important de savoir si ces derniers sont plus ou moins antioxydants que les chalcones. Si nos résultats sont extrapolables à l'ionisation des fruits et légumes, la question que nous devons nous poser est : « la formation de produits de radiolyse permet-elle de conserver les qualités nutritionnelles relatives à la présence de ces molécules ? ». Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la capacité des chalcones et celle de leurs produits de dégradation (**Figure 63**) à piéger les radicaux DPPH.

Les résultats obtenus pour les six chalcones étudiées et leurs produits de radiolyse sont présentés sur la **Figure 63**. Nous constatons que ces chalcones n'ont pas une grande activité antioxydante, sauf Ch6 qui possède une activité importante et pour lequel nous avons pu mesurer une CI50 de $4,9 \times 10^{-5}$ M. Le pourcentage d'inhibition des cinq autres chalcones mesuré à 10^{-2} M ne dépasse pas 15%. La seule différence entre les cinq premières chalcones et Ch6 est la présence du groupement hydroxyle sur le cycle A en position 3'. La présence de ce groupement combinée à celle des groupes 2'-OH et 4'-OH doit participer à l'activité antioxydante, probablement par des effets stabilisateurs des radicaux formés après transfert redox (arrachement d'un atome d'hydrogène depuis les groupements 3'- et 4'-OH).

D'une manière générale, nous pouvons constater (**Figure 63**) que les produits de radiolyse sont plus actifs que les chalcones mères. En comparant l'activité des différents produits de radiolyse issus de la même chalcone, nous remarquons que les produits cyclisés ont une activité anti-DPPH plus élevée que les composés mono et disubstitués.

Le cycle A joue un rôle important dans l'activité antioxydante, notamment par la présence de groupements hydroxyles. En comparant l'activité des différents produits cyclisés (**P4**, **P22/25** notamment) issus des différentes chalcones, nous constatons que plus le cycle B est substitué par des groupements hydroxyles plus l'activité anti-DPPH est importante. En examinant l'activité des produits de radiolyse, nous constatons que l'absence des groupements hydroxyles sur le cycle A diminue largement l'aptitude à piéger le radical DPPH. Nous devons cependant remarquer que ces prémices de relation structure-activité ne sont fait ici que sur la base de faibles variations des pouvoirs redox (faibles activités). Seules les activités antioxydantes de Ch6 (IC50 = $4,9 \times 10^{-5}$ M) et de son produit de radiolyse **P19** (IC50 = $4,1 \times 10^{-5}$ M) peuvent être considérées comme intéressantes d'un point de vue biologique ; et dans

ce cas, il est intéressant de remarquer que la perte de la double liaison dans le produit de radiolyse n'a pas diminué l'activité antioxydante. Cette activité a même été légèrement augmentée, probablement grâce aux propriétés redox du groupe CH₂OH greffé au cours du processus de radiolyse.

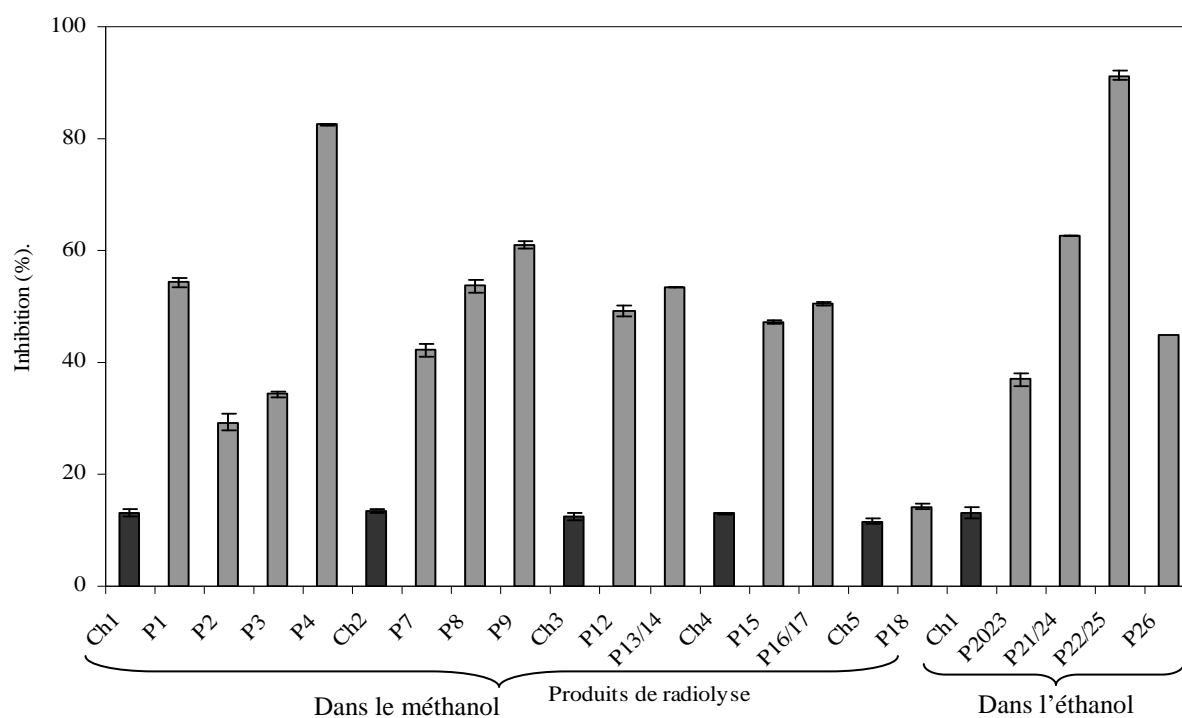


Figure 63 : Activité anti-DPPH des chalcones Ch1, Ch2, Ch3, Ch4 et Ch5, et de leurs produits de radiolyse, mesurée à 10^{-2} M. Les barres sur les histogrammes représentent l'écart type (SD/2)

CHAPITRE VI

RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE APPLICATION AU
TRAITEMENT DES ALIMENTS PAR IRRADIATION

RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE

APPLICATION AU TRAITEMENT DES ALIMENTS

PAR IRRADIATION

INTRODUCTION

L'ionisation γ est une technique de plus en plus utilisée dans le domaine agro-alimentaire. Elle permet, comme nous l'avons déjà mentionné, d'assainir les produits alimentaires et de prolonger leur durée de conservation en ralentissant le développement des bactéries et des levures, micro-organismes responsables de l'altération des aliments, notamment des fruits et légumes. Les fruits et légumes représentent une source importante de composés naturels tels que les vitamines, les acides phénoliques et les flavonoïdes reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. L'avenir de cette technologie s'avère particulièrement intéressant pour les produits crus.

Quelques problèmes sont rencontrés lors du traitement par irradiation :

- ✓ un consommateur reste méfiant vis-à-vis des radiations. Pourtant, les énergies utilisées en ionisation alimentaire ne peuvent engendrer aucune radioactivité du produit irradié.

- ✓ les aliments peuvent en partie perdre leur qualité nutritionnelle : changements dans la concentration des composés constituant l'aliment, ou bien encore modifications des structures chimiques. Par exemple, *Graham et Stevensen* ont montré que la concentration en vitamine C dans les fraises et les pommes de terre diminue après irradiation (*Graham, 1997*). En ce qui concerne les vitamines, les changements de concentration sont en général considérés comme mineurs, ou tout au moins pas plus importants que ceux engendrés par les autres techniques de conservation. L'irradiation est ainsi déjà largement utilisée pour obtenir des produits exempts de pathogènes sans modifier l'équilibre nutritionnel du produit (teneur

en acides aminés, acides gras et vitamines). Les effets de l'irradiation sur les composés phénoliques sont beaucoup moins étudiés. *Oufedjikh* et ses collaborateurs ont montré que les concentrations en polyphénols diminuent dans la clémentine irradiée.

La compréhension des réactions chimiques produites durant le processus d'irradiation des aliments est difficile à appréhender puisque de nombreux paramètres physico-chimiques entrent en jeu. Nous avons montré que, selon les conditions d'irradiation, certains flavonoïdes pouvaient être dégradés par radiolyse gamma. Cette transformation dépend de la concentration et de la dose d'irradiation, mais nous avons mis en évidence qu'à faible concentration, une dose relativement faible suffisait à transformer la molécule d'origine. La teneur naturelle de ces composés, dans les jus de fruits et le vin, par exemple, varie entre 100 et 300 mg par litre, ce qui fait des concentrations voisines de 10^{-5} M et 10^{-6} M. Dans ces conditions, nous avons montré que l'application de doses faibles, inférieures à 0,5 kGy pouvait causer la dégradation des flavonoïdes lors d'un traitement ionisant. Ces études ont été menées essentiellement en milieu alcoolique, mais nous avons également observé des dégradations avec les mélanges eau-alcool. Cependant ces études ne sont que des premières étapes dans la compréhension du comportement des flavonoïdes en chimie sous rayonnement. Nous ne pouvons pas extrapoler directement ces résultats aux comportements des flavonoïdes dans les fruits irradiés. L'étude de l'ionisation du jus d'orange et le suivi des composés phénoliques au cours de l'irradiation est une deuxième étape dans cette compréhension.

I. IRRADIATION DU JUS D'ORANGE

I.1 LA COMPOSITION DU JUS D'ORANGE

Avec plus de 85% d'eau, l'orange est un fruit particulièrement juteux et désaltérant. C'est dans cette eau de constitution que se trouvent sous forme dissoute les principaux éléments nutritifs:

✓ **Les glucides** : la teneur en sucres peut varier selon la variété mais elle est de 8,5 à 12 % dans le fruit à maturité. Représentés par le saccharose (40%), le fructose et le glucose, ce sont des sucres facilement assimilables qui fournissent rapidement de l'énergie à l'organisme.

✓ **Les fibres** sont bien représentées dans le fruit avec une teneur de 2,4%, en moyenne. Elles ont l'originalité d'être riches en pectines (environ 50%) particulièrement bien tolérées et qui jouent un rôle régulateur sur le transit intestinal.

✓ **Les minéraux** sont très diversifiés : le calcium occupe une place privilégiée par son abondance (40 mg pour 100 g au lieu de 5 à 15 mg pour 100 g pour la plupart des autres fruits). Magnésium, potassium et phosphore font partie des autres minéraux dont l'orange est assez bien pourvue.

✓ **Les vitamines** : le profil vitaminique de l'orange est dominé par une teneur élevée en vitamine C (40 à 80 mg pour 100 g). Ces substances potentialisent l'effet antiscorbutique de la vitamine C et ont par ailleurs une action protectrice sur les capillaires sanguins. La vitamine C est protégée par l'acidité naturelle du milieu (acides organiques) et par la peau épaisse du fruit qui constitue une barrière efficace vis-à-vis de l'oxygène de l'air. Les autres vitamines hydrosolubles sont également bien représentées : toutes les vitamines du groupe B, en particulier la vitamine B1 ou thiamine et la vitamine B9 ou acide folique. La provitamine A peut atteindre 0,05 à 0,2 mg pour 100 g selon les variétés, les plus colorées étant les plus riches. On trouve enfin de petites quantités de vitamine E (0,24 mg pour 100 g).

✓ **Les oligo-éléments** sont nombreux : fer (0,3 mg), cuivre, zinc, manganèse, nickel, iode, traces de bore et de sélénium.

✓ **Les substances aromatiques** participent au goût et au parfum de l'orange : ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (cithares, aldéhydes, esters ...). Des essences odorantes sont concentrées dans les cellules de la peau et sont employées en alimentation, parfumerie et pharmacie.

✓ **Les pigments** donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée : jaune à orange pour les flavonoïdes et les caroténoïdes, rouge ou rouge violacé pour les anthocyanes. Certains de ces pigments (flavonoïdes, anthocyanes, caroténoïdes) possèdent en outre des propriétés vitaminiques.

Le jus d'orange renferme la quasi-totalité des éléments nutritifs du fruit. Seules les fibres insolubles sont éliminées. Il fournit notamment des sucres, des minéraux, des vitamines et des composés phénoliques. Très fraîchement extrait du fruit, le jus de l'orange est aussi riche en vitamine C que l'orange elle-même. Mais la teneur vitaminique diminue rapidement, en raison de l'action oxydante de l'air.

Les citroflavonoïdes sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes que l'on trouve spécifiquement dans l'écorce des agrumes (orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère) (**Figure 64**). La peau de l'orange contient de minuscules vésicules baignant dans un tissu de soutien, appelé flavedo, qui doit sa couleur jaune orangée aux flavanones. En

dessous de cette fine couche colorée se trouve une seconde couche blanche appelée albedo qui ne contient aucun flavanone soluble. C'est la couche externe des écorces d'orange, le flavedo, qui a prêté son nom aux flavonoïdes.

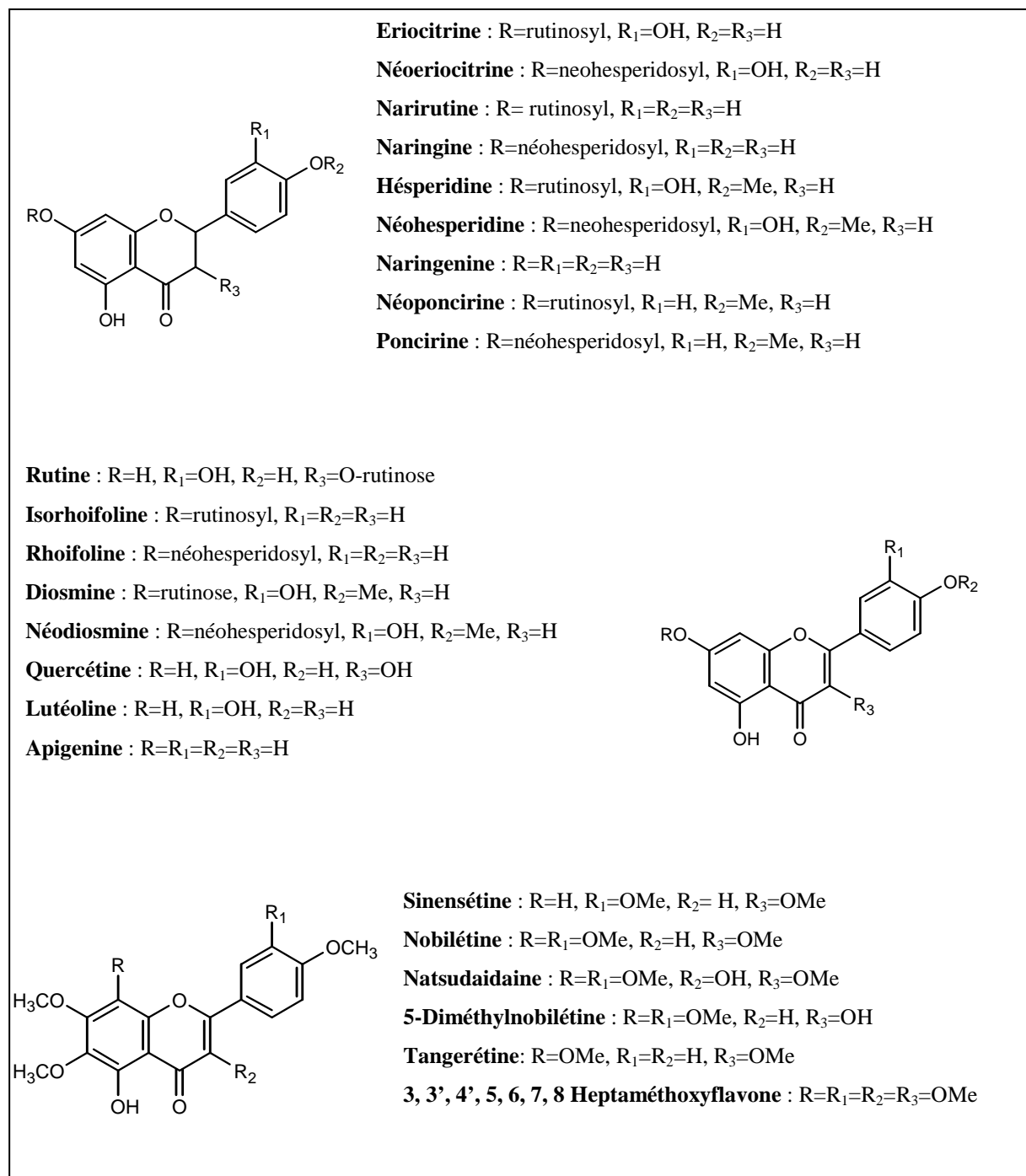


Figure 64 : Structure des flavonoïdes de l'orange (*Satoru, 2000*).

I.2 TRAITEMENT DU JUS D'ORANGE

I.2.1. Préparation des jus

Nous travaillons sur des oranges achetées en commerce, de variété *Valencia* (origine Espagne). Chaque orange est lavée puis pressée en prenant soin de récupérer le moins de pulpe possible. Le jus récolté est centrifugé à 2500 tours/minute pendant 15 minutes afin de bien séparer la pulpe et le jus. Le surnageant (liquide limpide) est alors utilisé pour les extractions.

Une première moitié est alors utilisée comme témoin non irradiée et l'autre est irradiée à une dose de 10 kGy. Elle nous permettra de visualiser au mieux les effets de l'irradiation sur la composition du jus d'orange.

I.2.2. Extractions

La technique d'extraction utilisée est le partage liquide/liquide, en utilisant des solvants de polarité croissante, permettant de fractionner un mélange complexe et riche en produits afin d'obtenir des extraits plus simples. De plus, c'est une des techniques les plus faciles et les plus pratiques pour séparer des composés chimiques de polarités différentes. Dans notre cas, nous utilisons une ampoule à décanter et des solvants non miscibles avec l'eau.

Il y a deux étapes principales dans cette technique d'extraction :

✓ La dispersion par agitation de l'ampoule : le mélange de la solution aqueuse et du solvant est agité « vigoureusement ». On ouvre le robinet après chaque agitation pour équilibrer la pression interne et la pression atmosphérique.

✓ La décantation, temps durant lequel les solvants non miscibles se séparent en deux phases. Elles peuvent être ensuite séparées avec précision grâce à la forme particulière de la partie terminale de l'ampoule.

Les solvants utilisés dans notre étude sont des solvants non miscibles avec l'eau, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. Ces solvants seront utilisés par polarité croissante c'est-à-dire dichlorométhane puis acétate d'éthyle. Le même protocole d'extraction est pratiqué pour le jus irradié et non irradié. Le schéma d'extraction choisi est le suivant donné sur le **Schéma 2**.

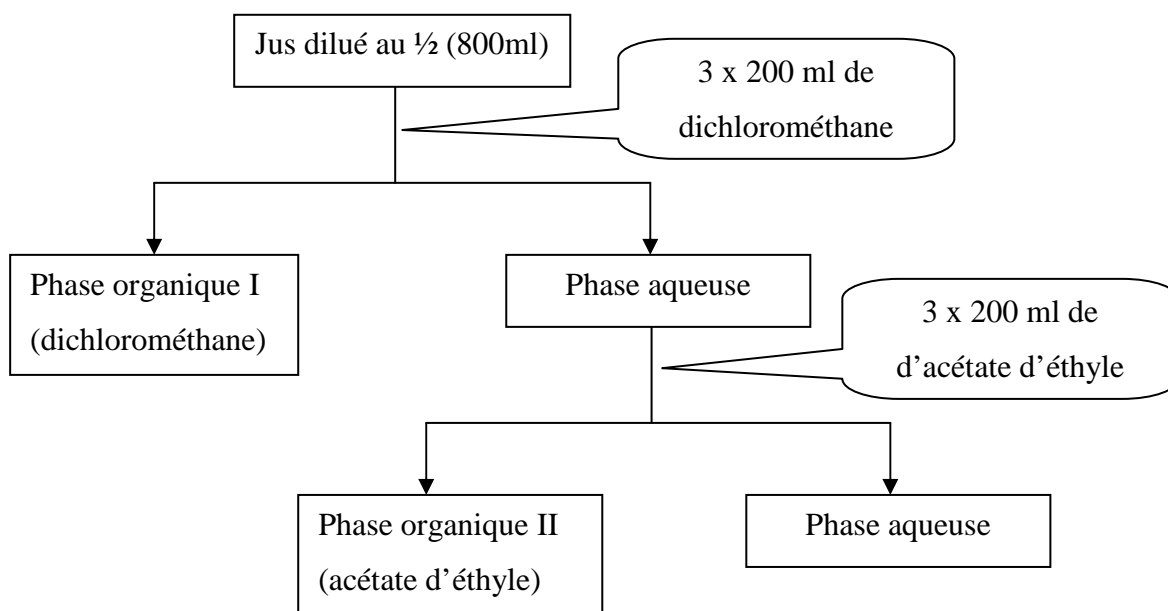


Schéma 2 : Les différentes étapes d'extraction du jus d'orange.

Les fractions issues des deux phases organiques I et II sont ensuite filtrées avec des filtres de 0,45 μm de diamètre de pores, puis évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif et enfin pesées. Les masses obtenues sont celles données dans le **tableau 28**.

Extraits	Non irradié (mg)	Irradié (mg)
Dichlorométhane	17,5	18,6
Acétate d'éthyle	117,0	61,8

Tableau 28 : Masses des produits obtenues lors de l'extraction du jus d'orange.

Nous constatons que les masses récoltées dans la phase acétate d'éthyle sont beaucoup plus importantes que celle de la phase dichlorométhane.

Après irradiation, nous observons une nette diminution de la phase acétate d'éthyle. En revanche, la masse de la phase dichlorométhane n'a quasiment pas changé.

Cette partie du travail a pour objectif d'obtenir des résultats sur le comportement des flavonoïdes non glycosylés lors de l'irradiation du jus d'orange. Les flavonoïdes non glycosylés peuvent se trouver dans la phase acétate d'éthyle pour les plus polaires (présence

de groupements hydroxyles) et dans la phase dichlorométhane pour les moins polaires (présence de groupements méthoxyles). La phase aqueuse, qui contiendrait notamment les flavonoïdes glycosylés n'a pas été étudiée.

I.2.3. Analyse des extraits

Les extraits sont analysés en CLHP et par CCM. Nous injectons 50 µl de chaque extrait qui est à une concentration massique $C = 10$ mg/ml. Le temps d'analyse est de 80 minutes et le débit est de 1 ml/min. Rappelons que les extraits du jus d'orange sont complexes et riches en produits, c'est pour cette raison que l'on doit rallonger le temps d'acquisition à 80 minutes. Les chromatogrammes obtenus en CLHP des extraits I et II sont représentés sur les **Figures 65** et **66**, respectivement.

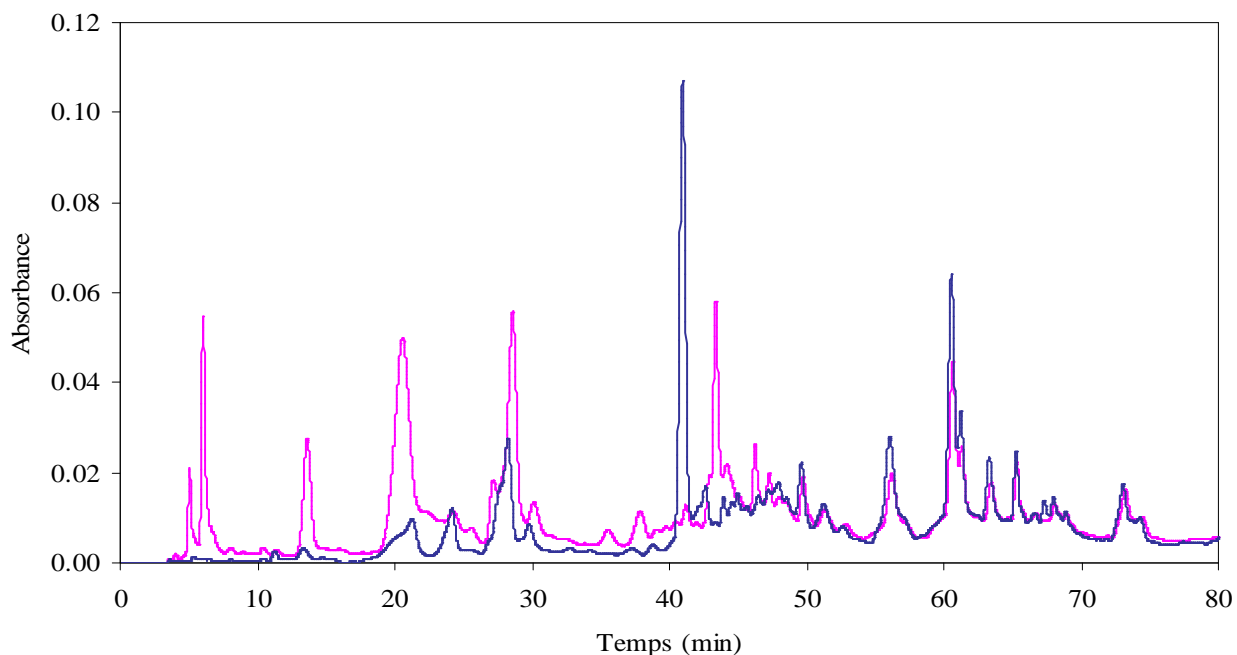


Figure 65 : Chromatogrammes obtenus en CLHP de l'extrait dichlorométhane du jus non irradié (en bleu) et du jus irradié à 10 kGy (en rose) superposés. Détectés à 280 nm.

Les chromatogrammes CLHP de ces deux extraits (**Figures 65 et 66**) sont riches en produits. Les profils des deux extraits non irradiés (en bleu) sont très différents, les chromatogrammes montrent que l'extrait I (dichlorométhane) est moins complexe que l'extrait II (acétate d'éthyle).

Après irradiation (en rose), nous constatons, tout d'abord sur la **Figure 65**, qu'aux temps d'éluion inférieurs à 15 minutes, l'irradiation provoque des changements avec

l'apparition de nouveaux composés. Ensuite, pour des temps d'élution compris entre 15 et 50 minutes, l'irradiation a provoqué une augmentation de l'absorbance de pratiquement tous les composés sauf le pic élué à 41 min qui a presque disparu. Un pic à 43 min s'est également nettement formé dans l'extrait irradié.

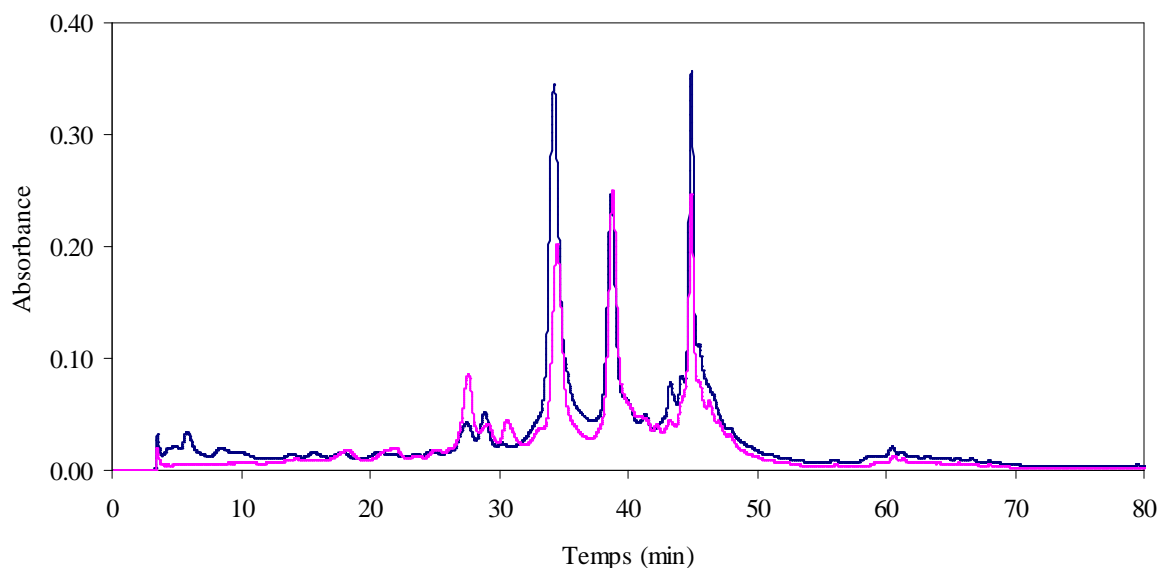


Figure 66 : Chromatogrammes obtenus en CLHP ($\lambda=280\text{nm}$) de l'extrait acétate d'éthyle du jus non irradié (en bleu) et du jus irradié à 10 kGy (en rose) superposés.

Contrairement à l'extrait dichlorométhane, nous ne constatons pas d'apparition de nouveaux produits après irradiation dans l'extrait acétate d'éthyle (**Figure 66**). Nous n'observons des modifications que pour deux des pics majoritaires qui perdent un peu de leur hauteur, démontrant que les produits correspondant ont été dégradés en partie par l'ionisation. Par ailleurs, nous pouvons noter que le pic élué à 29 minutes a pratiquement disparu après irradiation (**Figure 66**).

Dans les deux extraits irradiés, nous constatons une diminution de la plupart des pics. Ces modifications des profils montrent ainsi qu'il y a dégradation ou modification de certains composés phénoliques par l'irradiation.

I.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DU JUS D'ORANGE

Pour identifier les produits présents dans le jus d'orange avant et après ionisation, une trentaine de produits témoins a été injectée en HPLC et sur des plaques CCM. Après cela, nous avons comparé les temps de rétention, les spectres UV ainsi que les coefficients R_f des

produits pouvant correspondre aux produits présents dans le jus d'orange. Ainsi, nous avons pu identifier huit molécules, représentées dans le **tableau 29** et sur la **Figure 67** :

Extrait	Nom du produit	tr (min)	Rf	Max UV (nm)
Dichlorométhane	Sinensétine	56	0,72*	240 ; 266 ; 332
	Limonine	60	0,61*	207 ; 285
	Nobilétine	61	0,69*	236 ; 262 ; 326
	Heptaméthoxyflavone	65	0,65*	238 ; 271 ; 339
Acétate d'éthyle	Acide férulique	29	0,38 [□]	235 ; 322
	Acide p-coumarique	27	0,60 [□]	228 ; 309
	Narirutine	32	0,12 [□]	235 ; 282 ; 330
	Hespéridine	39	0,18 [□]	236 ; 283 ; 328

Tableau 29 : Produits identifiés dans les deux extraits du jus d'orange, leur temps de rétention, les Rf et les maxima d'absorption en UV.

* Système chromatographique utilisé sur des plaques de gel de silice UV₂₅₄: hexane/dichlorométhane/isopropanol/méthanol (70/20/5/5).

[□] Système chromatographique sur des plaques de gel de polyamide UV₂₅₄: eau/acide acétique (95/5).

Les molécules de la **Figure 67** ont été identifiées à la fois dans les extraits irradiés et non irradiés, exception faite de l'acide férulique qui correspond au pic qui a disparu complètement après irradiation. Pour mieux comprendre le comportement de cet acide phénolique en milieu de radiolyse, pouvoir identifier les produits de dégradation et proposer les mécanismes de transformation, nous avons étudié la radiolyse de l'acide férulique en milieu alcoolique.

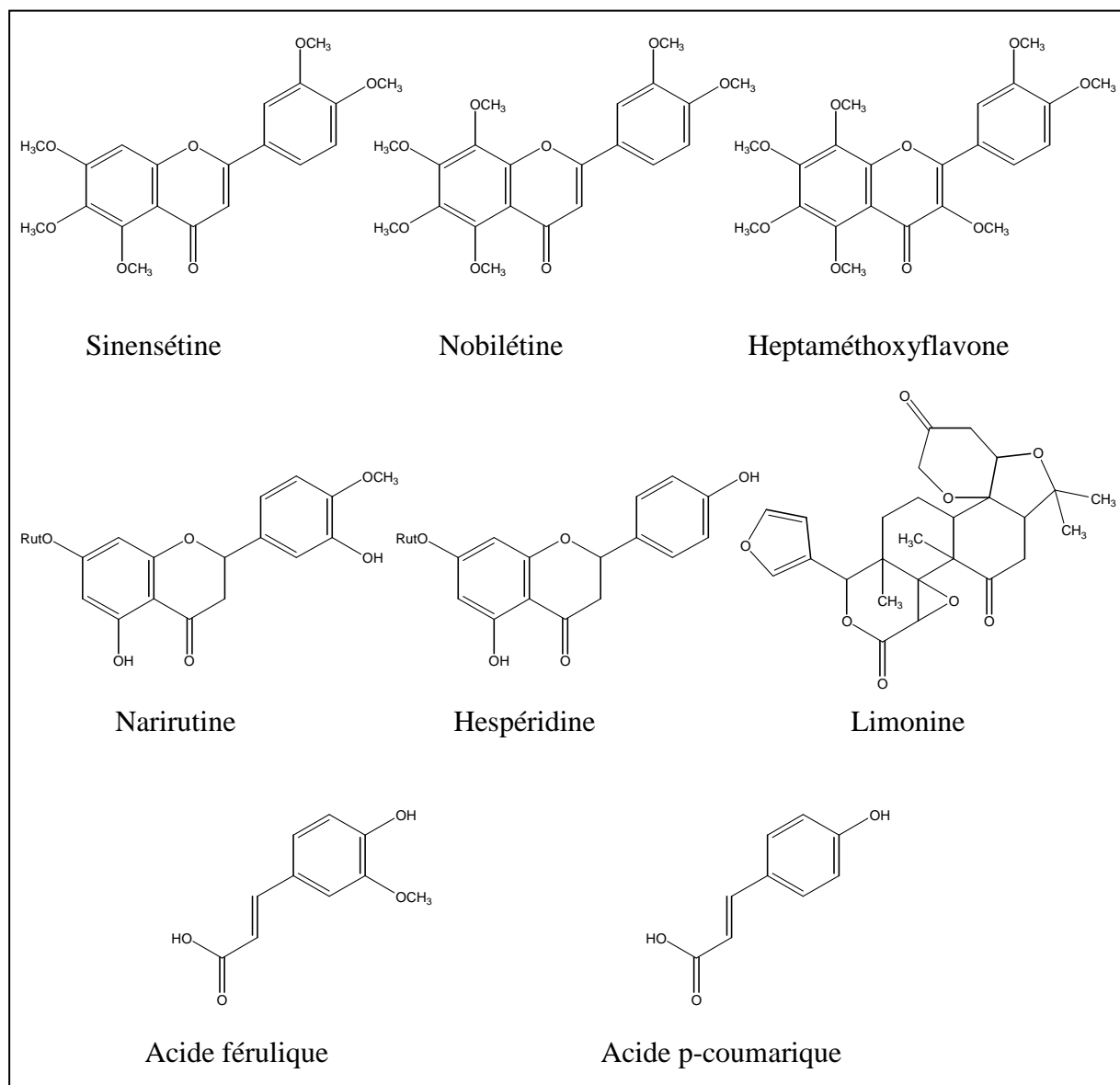


Figure 67 : Structures chimiques des produits identifiés dans le jus d'orange.

II. RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE

L'acide férulique apparaît comme une molécule dégradée de manière importante lors de l'irradiation. De plus, son analogie structurale (présence de la double liaison, de la fonction carbonyle et d'un cycle aromatique) avec les chalcones étudiées dans ce travail nous conduit à étudier la radiolyse de l'acide férulique, en regardant les similitudes qui pourraient apparaître dans les mécanismes de dégradation. Cette molécule étant insoluble dans l'eau, le comportement radiolytique de l'acide férulique sera étudié en milieu alcoolique, comme cela a été fait pour les chalcones, permettant ainsi de comparer les mécanismes de dégradation.

II.1. IRRADIATION DE L'ACIDE FERULIQUE

500 mg d'acide férulique en poudre ont été dissous dans le méthanol à une concentration de 5×10^{-3} M, irradiés en milieu désaéré à une dose de 12 kGy. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 3, le méthanol a été choisi en tant solvant non aqueux le moins éloigné de l'eau et pouvant ainsi se rapprocher des conditions physiologiques existantes dans les fruits et légumes, et particulièrement le jus d'orange.

La **Figure 68** représente les chromatogrammes CLHP de l'acide férulique avant et après irradiation. Une dose de 12 kGy a causé la dégradation complète de la molécule, ce qui se traduit par la disparition totale de son pic ($t_r = 23$ min) et l'apparition de plusieurs nouveaux pics, correspondant à la formation de produits de radiolyse.

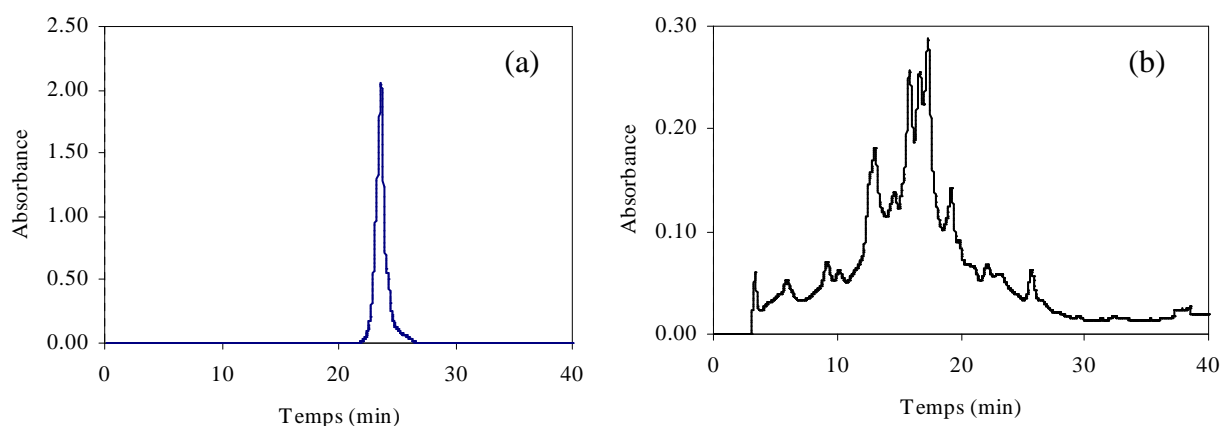


Figure 68 : Chromatogrammes de l'acide férulique à 5×10^{-3} M dans le méthanol, (a) avant irradiation, (b) irradiés à 12 kGy.

Ces chromatogrammes sont obtenus en utilisant le gradient linéaire suivant :

Temps (min)	Débit (ml/min)	A (%)	B (%)
0	1	0	100
40	1	100	0

Solvant (A) : méthanol

Solvant (B) : eau / méthanol / acide acétique : 79% / 20% / 1%.

Ce gradient est différent de celui utilisé pour les chalcones. L'acide férulique et ses produits de dégradation sont plus polaires que les chalcones, et il s'est avéré nécessaire d'utiliser un gradient permettant de « retarder » l'élution de ces produits.

Les analyses CCM confirment le nombre de pics observés en CLHP, et montrent que la solution est riche en produits de radiolyse de polarités différentes.

II.2. PURIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE

En se basant sur les résultats des CCM analytiques sur différents supports, une colonne MPLC de polyamide a été utilisée avec le mélange de solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$: 25/50/25. Dix neuf fractions ont été récoltées, analysées par CCM, séchées et pesées. Après avoir solubilisé la première fraction (245 mg) dans le méthanol, puis laissé 2h à 4°C, nous avons constaté la précipitation d'un produit blanc, ce dernier est pur et a été séparé lavé deux fois. Ce produit (**AF1**) sous forme de poudre blanche (52 mg) s'avère soluble uniquement dans le DMSO ou dans l'eau en milieu basique.

Une fois ce produit blanc retiré de la première fraction, nous avons effectué une deuxième séparation de cette fraction sur une colonne ouverte de Sephadex en utilisant le mélange eau/méthanol à 50/50 comme solvant d'élution ; dix sept fractions ont été récoltées. Les analyses CCM montrent la présence d'au moins trois produits dans la fraction majoritaire (51 mg), d'où la nécessité d'une autre purification. Elle est effectuée par CCM centrifuge en éluant avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$: de 70/20/10 à 20/50/30. Vingt cinq fractions ont été récoltées, analysées, évaporées et pesées. Trois produits supplémentaires ont pu ainsi être purifiés (**AF2**, **AF3** et **AF4**). Les masses, les temps de rétentions et les rapports frontaux des quatre produits de radiolyse de l'acide férulique sont représentés dans le **tableau 30**.

N° de produit	Masse obtenue (mg)	Temps de rétention (t _r) (min)	Rapport frontal (R _f)
AF1	52	17	0,42*
AF2	13	15	0,90 [□]
AF3	10,1	12	0,64 [□]
AF4	9,5	13	0,58 [□]

Tableau 30 : Masses obtenues pour chaque produit de radiolyse de l'acide férulique, temps de rétention et rapports frontaux.

* AcOEt/CH₃COOH/HCOOH/H₂O: 100/10/5/5

[□] CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH: 70/20/10

II.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE DE L'ACIDE FERULIQUE

II.3. 1. Spectres UV

Le spectre UV de l'acide férulique (**Figure 69**) présente deux bandes d'absorption, la première à 322 nm et la deuxième à 235 nm (*Rakotozafy, 2003*). La première bande est due à la conjugaison étendue sur toute la molécule. Nous constatons que pour les produits de radiolyse la première bande à 322 nm a disparu, ceci indique que la conjugaison totale de la molécule n'existe plus, traduisant vraisemblablement la perte de la double liaison au cours de la radiolyse. Nous constatons également l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 280 nm qui pourrait être attribuée au cycle aromatique resté intact (**Figure 69**).

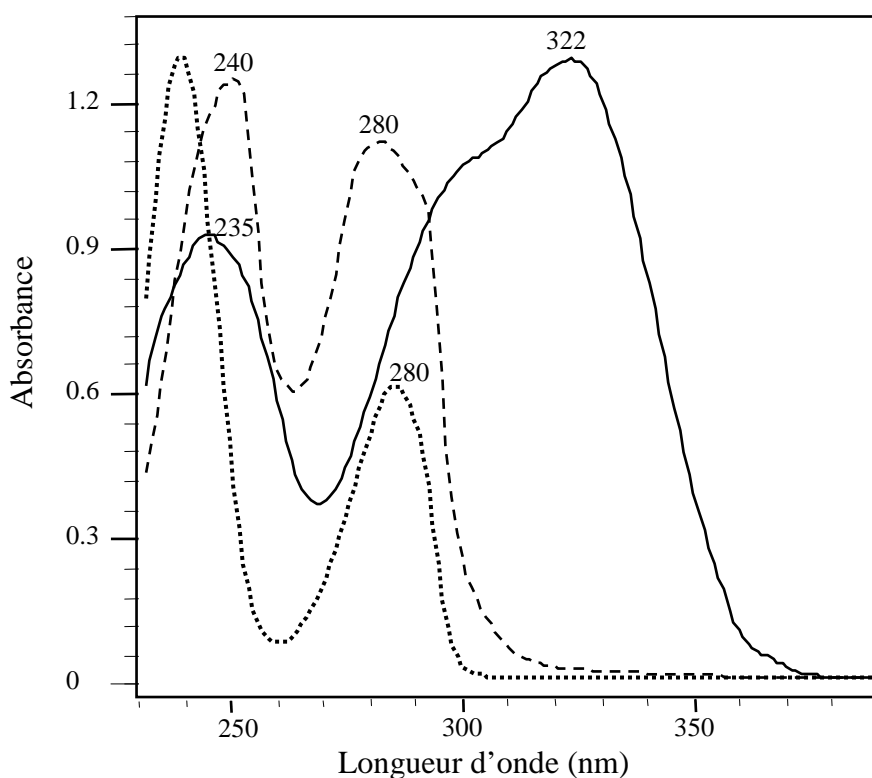


Figure 69 : Spectres UV de l'acide férulique (———), des produits de radiolyse **AF2**, **AF3** et **AF4** (·····) et du produit **AF1** (-----) à une concentration de 5×10^{-3} M.

II.3. 2. Spectres RMN

Les composés de radiolyse sont identifiés par leurs spectres RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC.

II.3.2.a. Produit AF1

Le spectre proton ^1H de **AF1** (**tableau 31**) présente :

- ✓ Trois protons aromatiques détectés à 6,65 ppm (H-2'), à 6,48 ppm (H-5') et à 6,61 ppm (H-6') indiquant la présence d'un cycle asymétrique.
- ✓ Trois signaux correspondant à la partie aliphatique, un groupe oxyméthylène à (4,19 ppm, 3,43 ppm, 2- CH_2OH), un groupe méthylène à (3,72 ppm, 3,20 ppm, H-3) et un groupe méthine lié au groupe carbonyle (2,56 ppm, H-2).
- ✓ Un groupe méthoxyle à 3,68 ppm greffé sur le cycle aromatique.

Les positions de tous ces protons sont déterminées à partir du spectre COSY du couplage proton-proton (**tableau 31**).

Le spectre carbone ^{13}C *J*mod (**tableau 31**) est constitué de onze signaux, cinq sont attribués à la partie aliphatique et les six autres à la partie aromatique :

✓ La partie aliphatique est constituée d'un carbonyle quaternaire (181,6 ppm, C-1), d'un carbone tertiaire C-lié (48,2 ppm, C-2), d'un carbone secondaire C-lié (54,0 ppm, C-3), d'un carbone secondaire O-lié (63,3 ppm, 2-CH₂OH) et d'un carbone primaire O-lié (3,68 ppm, 3'-OCH₃).

✓ La partie aromatique est constituée de trois carbones quaternaires, dont deux sont O-liés (150,1 ppm, C-3' et 154,9 ppm, C-4'), un C-lié (127,6 ppm, C-1') et trois carbones tertiaires (115,3 ppm, C-2'; 116,8 ppm, C-5' et 122,0 ppm).

Les positions de tous les carbones sont déterminées à partir des spectres HMQC et HMBC du couplage ^1H - ^{13}C (**tableau 31**).

Finalement **AF1** est identifié comme un nouveau produit: l'acide 2-hydroxyméthyl-3-[3-méthoxy-4-hydroxyphényl]propanoïque (**Figure 70**).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
AF1				
Partie aromatique				
1'			127.6	
2'	6.65 d (1.5)		115.3	C-4'; C-6'; C-3
3'			150.1	
4'			154.9	
5'	6.48 d (9.2)	H-6'	116.8	C-1' ; C-3'
6'	6.61 dd (8.2 ; 2.5)	H-5' ; H-2'	122.0	C-2' ; C-4' ; C-3
3'-OCH ₃	3.68 s		56.8	
Partie aliphatique				
1			181.6	
2	2.56 dd (17.1 ; 8.6)	H-3 ; 2-CH ₂	48.2	C-1 ; C-3 ; C-1'
3	3.72 m	H-2 ; 2-CH ₂	54.0	C-1 ; C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-1' ; C-2' ; C-6'
	3.20 m	H-2 ; 2-CH ₂	54.0	C-1 ; C-2 ; 2-CH ₂ OH ; C-1' ; C-2' ; C-6'
2-CH ₂ OH	3.43 t (8.3)	H-2 ; 2-CH ₂	63.3	C-1 ; C-2 ; C-3
	4.19 t (8.6)	H-2 ; 2-CH ₂	63.3	C-1 ; C-2 ; C-3
AF2				
Partie aromatique				
1'			132.2	
2'	7.02 br s	H-6'	111.5	C-3 ; C-4' ; C-6'
3'			146.8	C-1' ; C-5'
4'			148.7	C-2' ; C-6'
5'	6.80 br s	H-6'	116.0	C-1' ; C-3'
6'	6.80 br s	H-5' ; H-2'	120.5	C-3 ; C-2' ; C-4'
3'-OCH ₃	3.86 s		56.4	
bubylolactone				
1			176.9	
2	2.82 dd (17.1 ; 8.6)	H-2 ; H-3	36.3	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1'
	2.68 dd (17.1 ; 9.8)	H-2 ; H-3	36.3	C-1 ; C-3 ; C-4 ; C-1'
3	3.79 br quin (8.4)	H-2 ; H-4	41.9	C-1 ; C-2 ; C-4 ; C-1' ; C-2' ; C-6'
4	4.60 t (8.3 ; 8.2)	H-3 ; H-4	74.7	C-2 ; C-3 ; C-1'
	4.19 t (8.6)	H-3 ; H-4	74.7	C-2 ; C-3 ; C-1'

Tableau 31 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **AF1** et **AF2** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS (δ ppm; *J* Hz). (δ ppm, *J* Hz)

II.3.2.b. Produit AF2

Les spectres ¹H et ¹³C de **AF2** montrent la présence du même cycle aromatique que **AF1** (**tableau 31**). La principale différence entre **AF1** et **AF2** est la formation d'un cycle pentagonal pour **AF2** comprenant la présence d'un signal correspondant à un carbone quaternaire carbonyle (176,9 ppm, C-2), de deux groupes méthylène le premier C-lié (2,82 ppm 2,68 ppm, H-2) et le deuxième O-lié (4,60 ppm, 4,19 ppm, H-4). On note aussi la formation d'un cycle tétrahydrofurane (**Figure 70**). La structure de **AF2** est confirmée par les

résultats RMN-2D incluant les corrélations observées en ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C et en HMBC (**tableau 31**).

Ainsi **AF2** est identifié comme un nouveau produit : la 3-(3-méthoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -butyrolactone (**Figure 70**).

II.3.2.c. Produits AF3 et AF4

Les résultats RMN ^1H et ^{13}C J_{mod} de **AF3** et **AF4** (**tableau 32**) montrent la présence du cycle aromatique et du cycle tétrahydrofurane comme pour le composé **AF2**, la seule différence est la présence d'un groupe hydroxyméthyle fixé sur le cycle tétrahydrofurane pour **AF3** et **AF4** (**Tableau 32**).

Toutefois des différences ont été observées entre **AF3** et **AF4** au niveau des constantes de couplage des protons H-2 et H-3 ; pour **AF3** nous mesurons [(11,0 ; 4,0 pour H-2) et (11,8 ; 6,8 pour H-3)], ces valeurs sont déplacées à [(7,9 ; 3,3 pour H-2) et (10,5 ; 8,4 pour H-3)], ces différences couplées avec les différences de temps de rétention (12 min pour **AF3** et 13 min pour **AF4**) et les différences de R_f (0,64 et 0,58 pour **AF3** et **AF4** respectivement) montrent que ces deux produits sont des diastéréoisomères. Les liaisons entre les différents éléments de la partie aliphatique et la partie aromatique ont été déduites des analyses HMBC. Ainsi **AF3** et **AF4** sont identifiés comme deux diastéréoisomères de la 2-hydroxy-3-(3-méthoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -butyrolactone, ce sont des nouveaux produits (**Figure 70**).

Position	¹ H	COSY	¹³ C Jmod/HMQC	HMBC
AF3				
Partie aromatique				
1'			130.2	
2'	6.94 d (2.0)	H-6'	112.9	C-3 ; C-4' ; C-6'
3'			148.4	C-1' ; C-5'
4'			146.8	C-2' ; C-6'
5'	6.80 d (8.2)	H-6'	116.0	C-1' ; C-3'
6'	6.74 dd (8.2 ; 2.0)	H-2' ; H-5'	121.4	C-3 ; C-2' ; C-4'
3'-OCH ₃	3.82 s		56.3	
butyrolactone				
1			177.9	
2	3.03 ddd (11.0 ; 7.0 ; 4.0)	H-7 ; 2-CH ₂ OH	48.1	C-4 ; C-1'
3	3.89 ddd (11.8 ; 6.8 ; 5.1)	H-8 ; H-10	44.6	C-1 ; 2-CH ₂ OH ; C-2' ; C-6'
4	4.59 dd (8.8 ; 6.8)	H-7	73.4	C-2 ; C-1'
	4.52 dd (8.8 ; 3.6)	H-7	73.4	C-2 ; C-1'
2-CH ₂ OH	3.62 dd (10.8 ; 4.0)	H-7	59.7	C-1 ; C-3
	3.43 dd (10.6 ; 7.0)	H-7	59.7	C-1 ; C-3
AF4				
Partie aromatique				
1'			131.2	
2'	7.09 d (1.9)	H-6'	112.0	C-3 ; C-4' ; C-6'
3'			148.8	C-1' ; C-5'
4'			147.0	C-2' ; C-6'
5'	6.81 d (8.1)	H-6'	116.1	C-1' ; C-3'
6'	6.85 dd (8.1 ; 1.9)	H-5' ; H-2'	121.4	C-3 ; C-2' ; C-4'
3'-OCH ₃	3.86 s		56.4	
butyrolactone				
1			177.5	
2	2.87 dt (7.9 ; 3.3)	H-7 ; 8-CH ₂ OH	50.4	C-4 ; C-1'
3	2.80 dd (10.5 ; 8.4)	H-8 ; H-10	43.4	C-1 ; 2-CH ₂ OH ; C-2' ; C-6'
4	4.53 dd (8.8 ; 3.6)	H-7	72.7	C-2 ; C-1'
	4.16 dd (10.3 ; 8.7)	H-7	72.7	C-2 ; C-1'
2-CH ₂ OH	3.95 dd (11.1 ; 3.0)	H-7	58.8	C-1 ; C-3
	3.66 dd (10.8 ; 3.5)	H-7	58.8	C-1 ; C-3

Tableau 32 : Spectres RMN ¹H (400 MHz) et ¹³C (100 MHz), et corrélations observées sur les spectres COSY, HMQC et HMBC des produits **AF3** et **AF4** mesurés dans (CD₃)₂CO/TMS (δ ppm; *J* Hz). (δ ppm, *J* Hz)

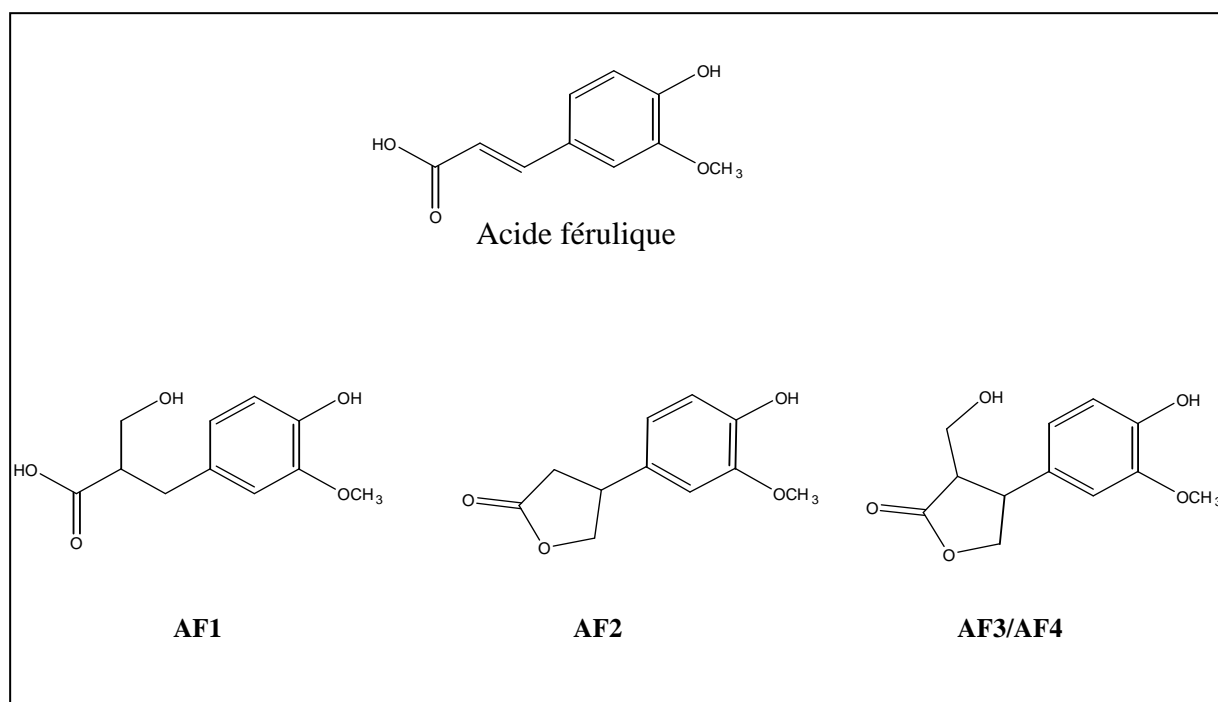


Figure 70 : Structures chimiques de l'acide férulique et des produits de radiolyse dans le méthanol **AF1**, **AF2** et du couple **AF3/AF4**.

III. MECANISMES DE TRANSFORMATION DE L'ACIDE FERULIQUE

La radiolyse de l'acide férulique en milieu méthanolique, nous a permis d'identifier quatre produits de radiolyse, dont un couple de diastéréoisomères. Nous pouvons classer ces quatre composés à deux groupes :

- (i) Molécule avec addition sur la double liaison sans cyclisation (**AF1**).
- (ii) Molécules avec addition sur la double liaison et cyclisation (**AF2**, **AF3** et **AF4**).

Nous avons constaté que le cycle aromatique n'a pas été touché par l'irradiation, comme pour les chalcones. La **Figure 71** présente un schéma réactionnel proposé expliquant la formation des produits de radiolyse de l'acide férulique.

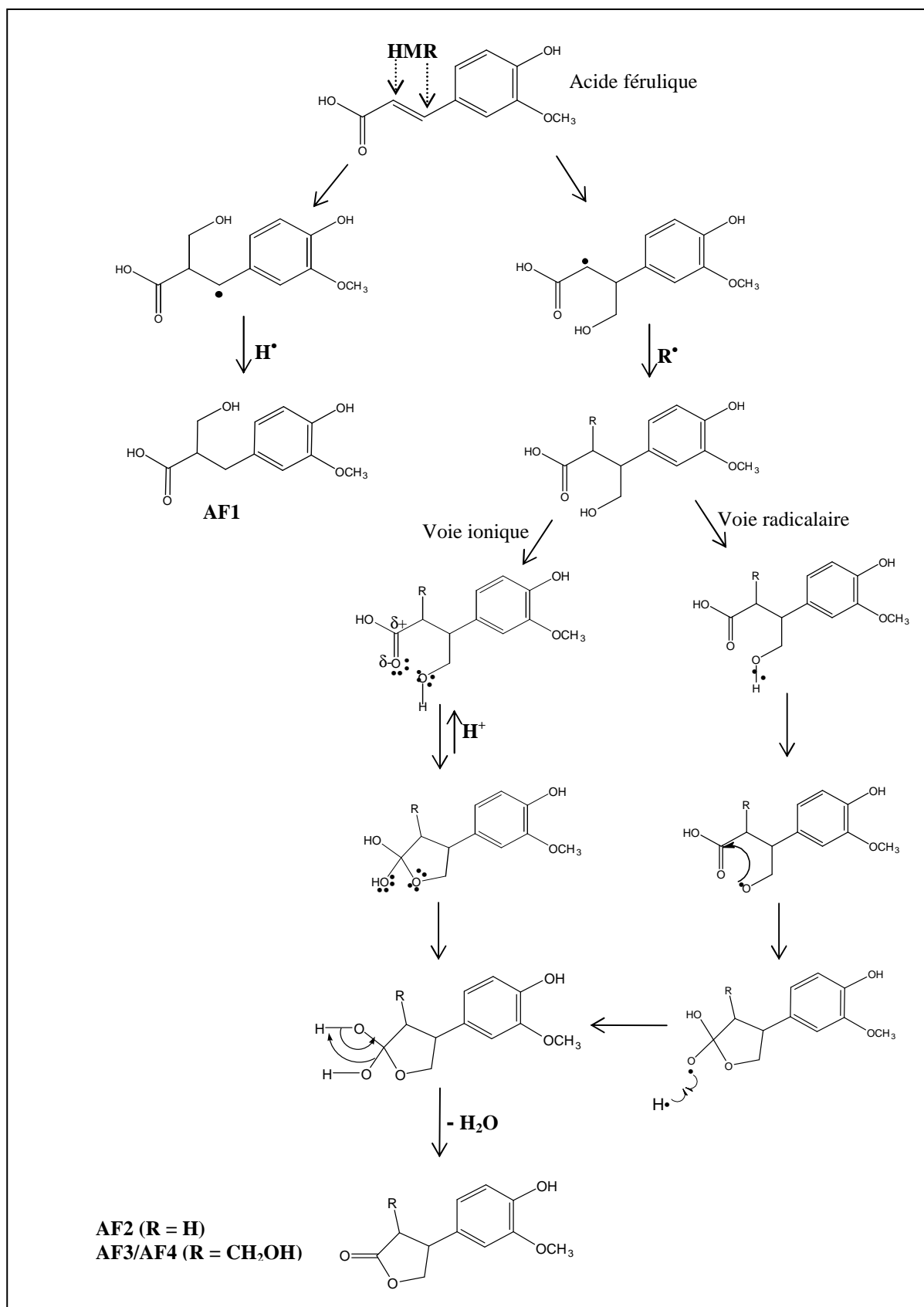


Figure 71 : Mécanismes de transformation de l'acide férulique dans le méthanol en AF1, AF2 et AF3/AF4.

La première étape de transformation de l'acide férulique est l'attaque de HMR sur la double liaison, un radical intermédiaire est formé à l'issue de cette attaque. L'addition d'un radical H^\bullet sur le radical centré sur la position β donne le premier produit de radiolyse, **AF1**.

Pour expliquer la formation des produits de radiolyse cyclisés, nous pouvons considérer comme point de départ le radical centré sur la position α . Une addition d'un radical R^\bullet (HMR ou H^\bullet) est alors possible. A partir de ces produits intermédiaires, deux voies sont possibles :

(i) Voie radicalaire: coupure hétérolytique de la liaison O-H du groupe hydroxyle, suivi d'une cyclisation du radical formé et addition de H^\bullet pour former un alcool secondaire. Finalement le produit formé subit une déshydratation donnant la formation des mêmes produits **AF2** et **AF3/AF4**.

(ii) Voie ionique: ce mécanisme est le même que celui décrit dans le mécanisme de formation des produits cyclisés issus de la radiolyse des chalcones. La formation de l'hémi-acétal serait catalysée par un milieu acide pour former un alcool secondaire, ce dernier peu stable serait déshydraté pour former **AF2** et **AF3/AF4**. Ce deuxième mécanisme nécessite des conditions d'acidité forte que l'on ne retrouve pas forcément dans le milieu de radiolyse.

La dégradation de l'acide férulique a déjà été observée dans des échantillons d'amidon-lignine irradiés en milieu aqueux (*Lepifre, 2004*). L'analyse d'un mélange amidon-lignine montre une diminution de la proportion d'acide férulique accompagnée d'une augmentation de la proportion de vanilline (*Lepifre, 2004*) et d'oligomères phénoliques. Ces observations sont révélatrices de réactions d'oxydation impliquant l'acide férulique initialement présent dans l'échantillon de lignines et pouvant être à l'origine de couplages radicalaires. De telles réactions sont susceptibles de générer des liaisons covalentes entre les constituants des lignines et de l'amidon. Cette réactivité se traduit par des réactions d'oxydation et de condensation associées à une oligomérisation des composés phénoliques de faibles masses. Par l'intermédiaire de leurs doubles liaisons conjuguées au noyau aromatique, certains de ces composés phénoliques semblent jouer un rôle primordial vis à vis des mécanismes réactionnels mis en jeu.

IV. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'ACIDE FERULIQUE ET DE SES PRODUITS DE RADIOLYSE

Nous avons mesuré l'activité antioxydante de l'acide férulique et de ses produits de radiolyse en mesurant leur capacité à piéger le radical DPPH. Les résultats obtenus pour les quatre produits de radiolyse sont présentés sur la **Figure 72**. Le pourcentage d'inhibition des quatre produits de radiolyse a été mesuré à 10^{-3} M et est inférieur à 65%, celui de l'acide férulique est de 90% (son CI50 est de $1,7 \times 10^{-4}$ M). Ceci montre que les produits de radiolyse sont moins actifs que l'acide férulique, mais cette perte d'activité devra être étudiée plus en détails à l'aide des méthodes de chimie théorique puisqu'elle ne corrobore pas les résultats obtenus pour les chalcones.

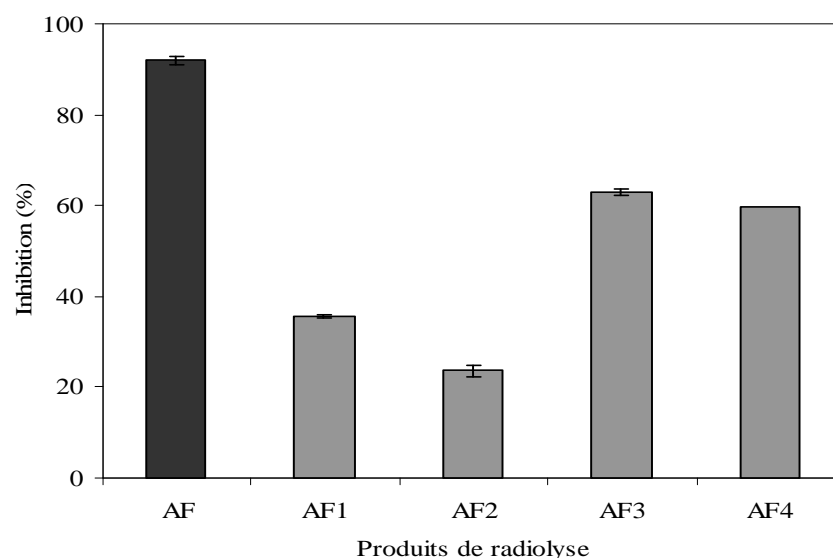


Figure 72 : Activité anti-DPPH des produits issus de la radiolyse l'acide férulique en milieu méthanolique, mesurée à 10^{-3} M. Les barres sur les histogrammes représentent l'écart type (SD/2)

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le but de mieux comprendre le comportement des flavonoïdes en présence de radicaux libres centrés sur le carbone, nous avons étudié leur radiolyse gamma en milieu alcoolique. Rappelons que la radiolyse gamma du méthanol et de l'éthanol conduit à la formation d'espèces réactives, parmi lesquelles se trouvent les radicaux HMR et HER et leurs isomères centrés sur l'oxygène ($\text{CH}_3\text{O}^\bullet$ et $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^\bullet$). Des travaux antérieurs et ceux menés pendant ce travail de thèse ont permis de rassembler des données sur l'irradiation de différentes classes de flavonoïdes (flavonols, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavanones, flavones, flavonoïdes glycosylés, chalcones et dihydrochalcones) et d'un acide phénolique en milieu alcoolique (méthanol et éthanol), à différentes doses et concentrations.

En milieu de radiolyse les flavonols sont dégradés en différents depsides que l'on peut classer en trois groupes :

- depsides méthoxylés en C-8 (formés au cours de la radiolyse dans le méthanol de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine).
- depsides éthoxylés en C-8 (formés au cours de la radiolyse dans l'éthanol de la quercétine, de la morine, du kaempférol et de la galangine).
- depsides hydroxylés en C-8 (formés au cours de la radiolyse dans le méthanol, dans l'éthanol et dans les mélanges eau/alcool).

Aucune modification n'a été observée au niveau des deux cycles aromatiques A et B. Les dihydroflavonols, les flavan-3-ols, les flavanones, les flavones et les flavonoïdes glycosylés ne sont pas dégradés.

Au cours de ce travail, nous avons démontré que les flavonols n'étaient dégradés qu'en milieu non désaéré, montrant ainsi la participation de l'oxygène moléculaire dans le processus de dégradation des flavonols. Nous avons également étudié l'influence de l'eau dans ces processus et par conséquent l'influence des radicaux $\bullet\text{OH}$. Ces radicaux semblent favoriser la formation des depsides du troisième groupe. Par le truchement de ces nouvelles expérimentations et de calculs théoriques effectués en parallèle dans le laboratoire, nous avons pu confirmer le mécanisme de dégradation des flavonols en depsides : attaque du groupement 3-OH par les radicaux HMR ou HER, création d'un radical phénoxyyle, addition

d'une molécule d'oxygène en C-2 de ce radical intermédiaire, suivie d'une cascade d'évènements radicalaires conduisant à l'ouverture du cycle C et à la formation de depsides.

L'essentiel de ce travail de thèse porte sur la radiolyse des chalcones qui ont la particularité d'avoir un hétérocycle central C ouvert, par rapport aux autres flavonoïdes. Toutes les chalcones sont dégradées en chimie sous rayonnement et de nombreux produits de radiolyse ont été identifiés. Tous ont perdu la double liaison C α -C β et peuvent être classés en trois groupes :

- produits mono ou disubstitués en C α ou C β .
- produits possédant un nouveau cycle pentagonal et dont la fonction carbonyle a disparu.
- fragments plus petits issus d'une rupture C-C dans la chaîne tricarbonée.

De même que pour les flavonols, aucune modification des cycles aromatiques A et B n'a été observée, indiquant que les différents substituants présents sur ces cycles n'interviennent pas dans le processus de dégradation des chalcones. En revanche le rôle de la double liaison est primordial dans le processus de dégradation puisque les dihydrochalcones ne sont pas dégradées.

Nous avons étudié l'influence de l'oxygène moléculaire sur le processus de dégradation des chalcones. Le résultat obtenu était inattendu puisque l'oxygène joue un rôle protecteur des chalcones vis à vis des radicaux libres présents dans le milieu de radiolyse. Les espèces réactives formés dans le milieu de radiolyse réagissent probablement avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes ; il est important de signaler ici que les radicaux peroxydes ne réagissent pas avec les chalcones.

Les mécanismes de dégradation des chalcones sont nouveaux et nous nous proposons d'en rappeler les points principaux. La première attaque se fait au niveau de la double liaison, par le radical HMR ou HER (selon le solvant utilisé). La phlorétine (dihydrochalcone) ne présente aucune dégradation bien que cette molécule soit irradiée à des doses élevées, confirmant le rôle essentiel de la double liaison dans la dégradation des chalcones. Les radicaux HMR et HER, leurs isomères centrés sur l'oxygène et les radicaux H \bullet participent à la formation des produits de radiolyse, par des additions radicalaires. L'implication des électrons

solvatés a également été discutée pour finalement proposer l'ensemble des mécanismes réactionnels conduisant à la formation de nombreux produits de dégradation, dont vingt trois ont été identifiés. Des voies radicalaires et ioniques sont envisagées, mais la piste radicalaire est normalement privilégiée dans la « soupe radicalaire » que constitue le milieu de radiolyse, d'autant plus que les voies ioniques nécessitent des conditions d'acidité que l'on ne retrouve pas dans les solutions alcooliques irradiées.

Deux résultats notables et nouveaux se dégagent de ce travail d'identification des produits de la radiolyse des chalcones. D'une part, il est, en général, admis que le comportement redox des chalcones est essentiellement dû à la présence des groupements OH. Nous démontrons ici que la double liaison peut également participer à ce comportement, puisqu'elle est attaquée par les radicaux HER et HMR. D'autre part, l'identification des produits de radiolyse prouve non seulement que des groupements HER et HMR sont additionnés, mais également des groupements OCH₃ et OCH₂CH₃. Ce résultat est intéressant puisqu'il montre que les radicaux correspondants, centrés sur l'oxygène, peuvent également participer aux phénomènes redox ; c'est-à-dire que, dans le milieu de radiolyse, les radicaux isomères (centrés sur le carbone ou sur l'oxygène) sont présents et peuvent réagir de manière concomitante.

Au cours de notre travail, nous avons également mesuré l'activité antioxydante des différentes chalcones et de leurs produits de radiolyse. Les produits de radiolyse ont une activité plus importante que celle des chalcones vis-à-vis du radical DPPH, les produits cyclisés étant les plus actifs. Il faut noter que si les six chalcones étudiées ont une activité assez faible, le fait que les cycles A et B ne soient pas modifiés par l'irradiation, nous conduit à la conclusion générale : les chalcones donnent des produits de radiolyse plus antioxydants. On peut espérer alors que l'irradiation de chalcones plus actives, telles que la naringénine chalcone et la pentahydroxychalcone, nous permettra de trouver de nouveaux antioxydants, plus petits et peut-être plus facilement bio-disponibles.

Un autre volet de ce travail a été consacré à l'étude de l'ionisation d'un jus d'orange. L'irradiation de fruits, notamment de clémentines, a montré que les concentrations de flavonoïdes diminuent en fonction de la dose appliquée (*Oufdejeikh, 2000*). Ceci est probablement dû au fait que les flavonoïdes subissent des dégradations au cours de l'irradiation. Par contre, aucun mécanisme réactionnel n'a été proposé. Pour mieux

comprendre le comportement de ces molécules dans leurs milieux naturels, nous avons procédé à l'irradiation d'un jus d'orange, puis nous avons comparé sa composition en composés phénoliques avec le jus non irradié. Les analyses montrent que l'irradiation provoque la dégradation partielle de certains composés, dégradation complète pour d'autres produits, notamment l'acide férulique, et la formation de nouveaux produits. Ceci nous a amené à étudier la radiolyse de l'acide férulique en milieu alcoolique car il est insoluble *in vitro* en milieu aqueux. Quatre produits ont été identifiés. L'analogie structurale entre l'acide férulique et les chalcones et la structure des produits identifiés nous ont conduit à présenter un mécanisme de transformation analogue à celui des chalcones. Le processus de dégradation de l'acide férulique concorde en effet avec celui des chalcones, et prouve une autre fois que la dégradation est initiée au niveau de la double liaison par les radicaux centrés sur le carbone, suivi d'une cascade de réactions (additions et cyclisations) menant à la formation de nombreux produits de dégradation. Plusieurs voies réactionnelles ont été proposées et l'utilisation des méthodes de chimie théorique pourrait nous permettre de confirmer les voies privilégiées. Les méthodes DFT ont déjà démontré leur efficacité dans l'évaluation des propriétés redox des composés phénoliques. Pour cette étude, l'ensemble des chemins réactionnels doit être étudié, et la prise en compte des effets de solvant peut s'avérer nécessaire.

Si l'étude de la radiolyse des flavonoïdes en milieu alcoolique est une première étape pour appréhender les mécanismes de transformation de composés phénoliques lors de l'ionisation de fruits et légumes, il est nécessaire d'arriver à effectuer la radiolyse dans un milieu se rapprochant d'un milieu physiologique. En ce qui concerne les chalcones, il faudrait étudier la radiolyse dans des mélanges eau-alcool et déduire l'influence de l'eau. Nous avons déjà débuté cette étude pour l'acide férulique afin de pouvoir comparer avec son comportement dans le jus d'orange. Il conviendrait également de faire varier le pH du milieu pour se rapprocher des conditions existantes dans les fruits et légumes.

REFERENCES

REFERENCES

- Abramczyk, H.; Barut, M.; Kroh, J. The equilibrium absorption spectrum of an excess electron in methanol. The effect of deuteration on the band shape. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Chemistry*. **1994**, 42: 131-40.
- Adolfo, H. M.; Paulo, C. V.; Das G. F. Da Silva M. F.; Joao B. F. Dihydrochalcones, coumarins and alkaloids from *metrodoreanigra*. *Phytochemistry*. **1995**, 40: 1797-1800.
- Alcantara, A. R.; Marinas, J. M.; Sinisterra, J. V. Synthesis of 2'-hydroxychalcones and related compounds in interfacial solid-liquid conditions. *Tetrahedron Letters*. **1987**, 28: 1515-1518.
- Arabbi, P. R.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52: 1124-1131.
- Babber, S.; Chander, S.; Aggrwal, A. K.; Synthesis of a topical chalcone and a flavanone of weythia globra. *Indian Journal of Chemistry*. **1987**, 26B: 797-798.
- Baldacchino, G.; Hickel, B. De l'ionisation à la molécule stable : grandeur et décadences des radicaux libres. Dans *Introduction à l'ionisation des aliments* (B. Tilquin, éd.), Frison Roche, Paris, **2003**.
- Bao-Ning, S.; Eun Jung, P.; Jose Schunke, V.; James, G. G.; Fernando, C.; Harry, H. S.; Fong, J.; Pezzuto, M.; Kinghorn A. D. Activity-guided isolation of the chemical constituents of *Muntingia calabura* using a quinone reductase induction assay. *Phytochemistry*. **2003**, 63: 335-341.
- Barua, R. N.; Sharma, R. P.; Thyagarajan, G.; Hertz, W. Flavonoids of *Chromolaena odorata*. *Phytochemistry*. **1978**, 17: 1807-1809.
- Baxendale, J. H. Rate of reaction of solvated electrons with hydrogen ions in methanol. *International Journal of Radiation Physical Chemistry*. **1972**, 4: 113-115.
- Baxendale, J. H.; Wardman, P. Radiolysis of methanol. Product yields, rate constants, and spectroscopic parameters of intermediates. *National Standard Reference Data Series (U. S., National Bureau of Standards)*. **1975**, 54: 26.
- Beiler, J. M.; Graff, M.; Martin, G. J. Inhibition of liver xanthine oxidase activity in rats. *American journal of digestive diseases*. **1952**, 19: 333.
- Belloni, J. Interaction rayonnement - matière. Dans *Actions Biologique et Chimique des rayonnements ionisants* (B. Tilquin, éd.), Frison Roche, Paris, **2001**.

- Belofsky, G.; Percivill, D.; Lewis, K.; Tegos, G. P.; Ekart, J. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *Journal of Natural Products*. **2004**, 67: 481-484.
- Bernas, A.; Grand, D. The so-called ionization potential of water and associated liquids. *Journal of Physical Chemistry*. **1994**, 98: 3440-3443.
- Boeck, P.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V.; Lopez, S.; Sortino, M.; Escalante, A.; Furlan, R. L. E.; Zacchino, S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. *Archiv der Pharmazie*. **2005**, 338: 87-95.
- Brik, M. E.; Pechine, J. M.; Courtieu, J.; Remita, H.; Delcourt, M. O. Spin trap and ESR characterization of unstable intermediate radicals generated by γ -irradiation of methanol. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*. **1993**, 3: 113-24.
- Broddrick H. T.; Vanderlminde H. S. The role of refrigeration in the technological of some radurised food items. 16^e Congrès international du froid. Paris, **1983**.
- Bronner, W. E.; Beecher, G. R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grape fruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*. **1995**, 705: 247-56.
- Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. Antioxidant effects of flavonoïds. *Biofactors*. **1997**, 6: 343-355.
- Brunelet, L.; Vidal, P. Etude technique sur l'inhibition de la germination des pommes de terre par radio exposition gamma. *Revue générale du froid*, Mars, **1960**.
- Bruneton, J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* (3^{ème} éd.), Tec & Doc Lavoisier, Paris, **1999**.
- Bugaenko, L. T.; Kuzmin, M. G.; Polak, L. S. *High Energy Chemistry*. (Ellis Horwood Series in Physical Chemistry), Ellis Horwood, New York. **1993**.
- Burgers, P. C.; Ruttink, P. J. A. The acid catalyzed rearrangement $\text{CH}_3\text{O}^\bullet \longrightarrow \bullet\text{CH}_2\text{OH}$ and its involvement in the dissociation of the methanol dimer radical cation. A Quid Pro reaction. *International Journal of Mass Spectroscopy*. **2005**, 242: 49-56.
- Burton, M. Dans *Actions chimiques et biologiques des radiations* (M. Haïssinsky, éd.), Masson, Paris, **1958**.

- Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology & Medicine*. **1997**, 22: 749-760.
- Chase, W. J.; Hunt, J. W. Solvation time of the electron in polar liquids. Water and alcohols. *Journal of Physical Chemistry*. **1975**, 79: 2835-2645.
- Chinnici, F.; Bendini, A.; Gaiani, A.; Riponi, C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52(15): 4684-4689.
- Chosson, E.; Chabond, A.; Chulia, A. J.; Raynaud, J. Dihydroflavonol glycosides from *Rhododendron Ferrugineum*. *Phytochemistry*. **1998**, 49: 1431-1433.
- Comité Mixte d'experts OMS/FAO/AIEA, Salubrité des aliments irradiés, *Série de rapports techniques*. **1981**, n° 659, OMS Genève.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V. Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers *Jouranal of Natural Products*. **1998**, 61: 71-76.
- Cotellet, N.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Pommery, J.; Wallet, J. C.; Gaydou, E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**, 20: 35-43.
- Crozier, A.; Einar Jensen, M. E. J. L.; Morag S. M. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1997**, 761: 315-321.
- Cuendet, M.; Potterat, O.; Salvi, A.; Testa, B.; Hostettmann, K. A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*. *Phytochemistry*. **2000**, 54: 871-874.
- Curtiss, L. A.; Lucas, D. J.; Polpe, J. A.; Energies of C₂H₅O⁺ isomers. *Journal of Chemical Physics*. **1995**, 102: 3292-3300.
- Curtiss, L. A.; Kock, L. D.; Pople J. A. Energies of CH₂OH, CH₃O, and related compounds. *Journal of Chemical Physics*. **1991**, 95: 4040-4043.
- Cuvelier, M. E.; Richard, H.; Berset, C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **1992**, 56: 324-325.

- De la Rocha, N.; Maria, A. O. M.; Gianello, J. C.; Pelzer, L. Cytoprotective effects of chalcones from *Zuccagnia punctata* and melatonin on the gastroduodenal tract in rats. *Pharmacological Research*. **2003**, 48: 97-99.
- Dhar, D. N.; Lal, J. B. The chalcones (a review). *Journal and Proceedings of the Institute of Chemistry*. **1959**, 31: 297-312.
- Dhar, D. N. *The chemistry of chalcones and related compounds*. Wiley-Intersciences, New York, **1981**.
- Dominguez, J. N.; Leon, C.; Rodrigues, J.; Gamboa de Dominguez, N.; Gut, J.; Rosenthal, P. J. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *Farmaco*. **2005**, 60: 307-311.
- Dugas, A. J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G. C.; Price, K. L.; Fischer, N. H. Winston, G. W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*. **2000**, 63: 327-31.
- Dunford, R.; Land J. E.; Rozanowska, M.; Sarna, T.; Truscott, G. Interaction of melanin with carbon- and oxygen-centered radicals from methanol and ethanol. *Free Radical Biology & Medicine*. **1995**, 19: 735-740.
- Eckermann, C.; Schroder, G.; Eckermann, S.; Strack, D.; Schmidt, J.; Schneider, B.; Schroder, J. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. *Phytochemistry*. **2003**, 62: 271-286.
- Ellison, D. H.; Salmon, G. A.; Wilhinson, F. Nanosecond pulse radiolysis of methanolic and aqueous solutions of readily oxidizable solutes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*. **1972**, 328: 23-36.
- Ferradini, C.; Pucheault, J. *Biologie de l'action des rayonnements ionisants*. Masson, Paris, **1983**.
- Ferradini, C.; Jay-Gerin, J. P. Hypothesis of a possible chemical fate for the incompletely relaxed electron in water and alcohols. *Chemical Physics Letters*. **1990**, 167: 371-373.
- Ferradini, C.; Jay-Gerin, J.-P. Some present aspects of radiolysis of liquid methanol: a review. *Radiation Physics and Chemistry*. **1996**, 48: 473-480.
- Ferradini, C.; Jay-Gerin, J. P. Radiolysis of liquids with high static dielectric constant: an estimate of the total ionization yield, electron thermalization distance, and contribution of heterogeneous reactions. *Journal of Chemical Physics*. **1988**, 89: 6719-6723.

- Fletcher, J.W. Richards, P.J.; Production of electrons by reaction of sodium with methanol and ethanol: kinetics of their formation and subsequent reactions. *Can. J. Chem.* **1971**, 49: 2275-2281.
- Fowles, P.; Pulse radiolytic induced transient electrical conductance in liquid solutions. 4. Radiolysis of methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol. *Transactions of the Faraday Society.* **1971**, 67: 428-39.
- Freeman, G. R. *The radiolysis of alcohols, kinetics of non homogeneous processes: A practical introduction for chemists, biologists, physicists, and materials scientists.* Wiley-Interscience, New York, **1987**.
- Fricke, H.; Hart, E.J. Chemical dosimetry. Dans *Radiation dosimetry: Instrumentation* (éd. F.H. Attix). Vol. II, Academic Press, New-York and London, **1966**.
- Gao, Z. Huang, K. Yang, X; Xu, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1999**, 1472: 643-650.
- Geisman T. A. *The Chemistry of Flavonoïdes Compounds*, Pergamon Press, Oxford-London, **1962**.
- Getoff, N.; Ritter, A.; Schwoerer, F.; Bayer, P. Pulse radiolysis and product analysis of triethylsilane in methanol. *Radiation Physics and Chemistry.* **1992**, 39: 177-182.
- Getoff, N.; Ritter, A.; Schwoerer, F.; Bayer, P. Primary yields of methoxy and hydroxymethyl radicals resulting in the radiolysis of high purity methanol. *Radiation Physics and Chemistry.* **1993**, 41: 797-801.
- Graham, W. D.; Stevensen, M. H. Effect of irradiation on vitamin C content of strawberries and potatoes in combination with storage and with further cooking in potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **1997**, 75: 371-377.
- Guinard, J. L. *Biochimie végétale.* Dunod, Paris, **2000**.
- Gutteridge, J.M. Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radical Research Communications.* **1993**, 19: 141-158.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews.* **1994**, 52: 253-265.
- Harborne, J. B. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman and Hall, London, **1994**.

- Harborne J. B.; Mabry T. J.; Mabry, H. *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London **1975**.
- Harris, T. D.; Do, H. L., Meaghan, Q. B.; Christopher, R. A. Electron-induced reactions in methanol ultrathin films studied by temperature-programmed desorption: a useful method to study radiation chemistry. *Journal of Physical and Chemistry*. **1995**, 99: 9530-9535.
- Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, P. C.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. **1993**, 342:1007-1011.
- Hirata, Y.; Noboru, M. Solvation dynamics of electrons ejected by picosecond dye laser pulse excitation of p-phenylenediamine in several alcoholic solutions. *Journal of Physical and Chemistry*. **1990**, 94: 8503-8505.
- Hollman, P. C. H.; Hertog, M. G. L.; Katan, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. **1996**, 57: 43-46.
- Hosni, G.; Saad, S. F. Synthesis of some new pyrazolines from 4-dimethylaminochalcone and 2-p-dimethylaminocinnamoyl-1-naphthol. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*. **1975**, 86: 263-7.
- Hryntsevich, I. B.; Shadyro, O. I. Reactions of α -hydroxyethyl radicals with flavonoids of various structures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**, 15: 4252-4255.
- Inamori, Y.; Baba, K.; Tsujibo, H.; Taniguchi, M.; Nakata, K.; Kozawa, M. Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1991**, 39: 1604-1605.
- Iwata, S.; Nishino, T.; Inoue, H.; Nagat, N.; Satomi, Y.; Nishino, H. and Shibata, S. Antitumorogenic activities of chalcones (II). Photo-isomerisation of chalcones and the correlation with their biological activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **1997**, 20: 1266-1270.
- Jin, H.; Wu, J.; Pan, X. and Zhang, X. Selecting ethanol as a model organic solvent in radiation chemistry-I. Radiolysis of acetone – ethanol system. *Radiation Physics and Chemistry*. **1996**, 47: 555-558.

- Johnson, D. W.; Salmon, G. A. The effect of dose and base on the lifetime of e_s^- in pulse irradiated methanol: the reaction of e_s^- with hydroxymethyl radicals. *Radiation Physics and Chemistry*. **1977a**, 10: 294-296.
- Johnson, D. W.; Salmon, G. A. Pulse radiolysis of methanol solutions of tetranitromethane. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transaction*. **1977b**, 73, 256-262.
- Jore, D.; Champion, B.; Kaouadji, N.; Jay-Gerin, J. P.; Ferradini, C. Radiolysis of ethanol and ethanol-water solutions: a tool for studying bioradical reactions. *Radiation Physics and Chemistry*. **1988**, 32: 443-448.
- Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tomic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. **1994**, 116: 4846-4851.
- Kenney-Wallace, G. A.; Jonah, C. D. Picosecond spectroscopy and solvation clusters. The dynamics of localizing electrons in polar fluids. *Journal of Physical and Chemistry*. **1982**, 86: 2572-2586.
- Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Hellovaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiological*. **1997**, 146: 223-230.
- Koorbanally, N. A.; Randrianarivelosoa, M.; Mulholland, D. A.; Quarles van Ufford, L.; van den Berg, A. J. J. Chalcones from the seed of *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochemistry*. **2003**, 62: 1225 –1229.
- Koshihara, Y.; Neichi, T.; Murota, S.; Lao, A.; Fujimoto, Y.; Tatsuno, T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica and Biophysica Acta*. **1984**, 792: 92-97.
- Kutner, S. K.; Breur, W. V.; Ginsburg, H. and Cabantchik, Z. I. On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in in vitro cultures of plasmodium falciparum. *Biochemical Pharmacology*. **1987a**, 36: 123-129.
- Le Gall, G.; DuPont, M. S.; Mellon, F. A.; Davis, A. L.; Collins, Geoff, J.; Verhoeyen M. E.; Colquhoun, I. J. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51: 2438-2446.
- Lepifre, S.; Froment, M.; Cazaux, F.; Houot, S.; Lourdin, D.; Coqueret, X.; Lapierre, C.; Baumberger, S. Lignin incorporation combined with electron-beam irradiation

- improves the surface water resistance of starch films. *Biomacromolecules*. **2004**, 5:1678-1686.
- Lespagnol, A.; Lespagnol, C.; Lesieur, D.; Bonte, J. P.; Blain, Y.; Labiau, O. Preparation of chalcones having salicylic structure. *Chimica Therapeutica*. **1971**, 6: 192-195.
 - Lind, J.; Jowko, A.; Eriksen, T. E. Methoxy radical production in methanol radiolysis. *Radiation Physics and Chemistry*. **1979**, 13: 159-163.
 - Liming, N.; Meng, Charles Q.; Sikorski, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **2004**, 14: 1669-1691.
 - Liu, M.; Wilairat, P.; Croft, S. L.; Tan, A.; Lay-Choo, T.; Mei-Lin, G. Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2004**, 12: 1569.
 - Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg-New York, **1970**.
 - Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Calliste, C.A.; Cook-Moreau, J.; Duroux, J. L. Transformation mechanism of the antioxydant kaempferol into depside. γ -Radiolysis study in methanol and in ethanol. *Radiation Research*. **2003**, 160: 355-365.
 - Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D. P.; Calliste, C. A.; Cook-Moreau, J.; Duroux, J. L. Reactivity of flavonoids with 1-hydroxyethyl radical: a γ -radiolysis study. *Biochimica Biophysica Acta*. **2004**, 1670(1): 28-39.
 - Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D. P.; Calliste, C. A.; Duroux, J. L. Redox reactions obtained by gamma irradiation of quercetin methanol solution are similaire to *in vivo* metabolism. *Radiation Research*. **2003**, 159: 218-227.
 - Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D. P.; Champavier, Y.; Calliste, C. A.; Duroux, J. L. Radiolysis of quercetin in methanol solution : observation of depside formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50: 4827-4833.
 - Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Champavier, Y.; Calliste, C.A.; Duroux, J. L. Radiolysis of kaempferol in water/methanol mixtures. Evaluation of antioxidant activity of kaempferol and products formed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003b**, 51: 1270-1277.
 - Markhan, K. R.; Flavones, Flavonols and their glycosides. Dans *Methods in Plant Biochemistry*. vol. I, *Plant phenolics* (éd. J.B. Harborne), Academic Press, New York, **1989**.

- Masaki, H.; Okamoto, N.; Sakaki, S.; Sakurai, H. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxydes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **1997**, 20: 304-308.
- Moore, B. S.; Hertweck, C.; Hopke, J. N.; Izumikawa, M.; Kalaitzis, J. A.; Nilsen, G.; O'Hare, T.; Piel, J.; Shipley, P. R.; Xiang, L.; Austin, M. B.; Noel, J. P. Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: from benzoic acid to chalcone. *Journal of Natural Products*. **2002**, 65: 1956-1962.
- Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; Scaccini, C. Benzoic and cinnamic acid derivates as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47: 1453-1459.
- Ogata, M.; Hoshi, M.; Urano, S.; Endo, T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2000**, 48: 1467-1469.
- OMS: <http://www.who.int/whr/en/>
- Oufedjikh, H.; Lacroix, M.; Mahrouz, M.; Amiot, M.J. Effect of γ irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48: 559-565.
- Pappano, N. B.; Puig de Centorbi, O.; Debattista, N. B.; Calleri de Milan, C.; Borkowski, E. J.; Ferretti, F. H. Kinetics of the bacteriostatic effects of synthetic and natural chalcones on a *Staphylococcus aureus* strain. *Revista Argentina de Microbiologia*. **1985**, 17: 27-32.
- Parenteau, L.; Jay-Gerin, J. P.; Sanche, L. Electron-Stimulated Desorption of H- Ions via Dissociative Electron Attachment in Condensed Methanol. *Journal of Physical Chemistry*. **1994**, 98: 10277-10281.
- Pepin, C.; Goulet, T.; Houde, D.; Jay-Gerin, J.P. Femtosecond kinetic measurements of excess electrons in methanol: substantiation for a hybrid solvation mechanism *Journal of Physical Chemistry*. **1994**, 98: 7009-7013.
- Pepin, C.; Goulet, T.; Houde, D.; Jay-Gerin, J. P. Spectral characteristics of the weakly bound electron species in methanol as determined from a hybrid solvation model. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*. **1996**, 93: 182-187.

- Pietta, P. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. **2000**, 63: 1035-1042.
- Raffi, J. Les avantages de l'ionisation des aliments. Dans *Actions Biologique et Chimique des rayonnements ionisants*. (B. Tilquin, éd.), Frison Roche, Paris, **2001**.
- Rahman, M. M.; Nazmul, Q.; Mohammad, A. R. A new C-benzylated chalcone from *Desmos chinensis*. *Fitoterapia*. **2003**, 74: 511-514.
- Rakotozafy, L.; Falguieres, A.; Doussot, J.; Guy, A.; Nicolas, J. Kinetic study of the oxidation of ferulic acid isomers and its dehydrodimers by purified peroxidases. Dans *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing. Proceedings of the European Symposium on Enzymes in Grain Processing, 3rd, Leuven, Belgium*, 121-126, **2002**.
- Rani, I.; Structural confirmation of eriodictyol 7-methyl ether, a new flavanone occurring in *weythia globra*. Nutt. *Indian Journal of Chemistry. Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*. **1986**, 25B: 1251.
- Rezk, B. M.; Haenen Guido, R. M. M.; van der Vijgh Wim, J. F.; Bast, A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2002**, 295: 9-13.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. **1995**, 22: 375-383.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**, 20: 933-956.
- Ruddock, G. W.; Raleigh, J. A.; Greenstock, C. L. Reactivity of chemically generated superoxide radical anion with peroxides as determined by competition kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1981**, 102: 1416-1417.
- Santhyanaryana, S.; Krishnamutry, H. G. corroborative study on the highly efficient preparation of 2'-hydroxychalcone using partially dehydrated barium hydroxide catalyst. *Current Sciences*. **1988**, 57: 1114-1116.
- Santiard, D.; Ribière, C.; Nordmann, R.; Houee-Levin, C. Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a γ radiolysis study. *Free Radical Biology & Medicine*. **1995**, 19: 121-127.

- Satoru, K.; Yasuhiko, T.; Eriko, K.; Kazunori, O.; Masamichi, Y.; Meisaku, K.; Chihiro, I.; Hiroshi, F. Quantitative Study of Flavonoïds in Leaves of Citrus Plant, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48: 3865-3871.
- Scandella, D.; Foures, M. Effet de l'ionisation sur le maintien de la qualité des légumes de quatrième gamme. *Industrie Agro-Alimentaire*. **1987**, 911-916.
- Shiotani, M.; Murabayashi S.; Sohma, J. Spin trapping of the short-lived free radicals formed in γ -irradiated alcohols. *International Journal for Radiation Physics and Chemistry*. **1976**, 8: 483-495.
- Shiotani, M.; Murabayashi S.; Sohma, J. Reply to the comment on "Spin trapping of the short-lived free radicals formed in gamma irradiated alcohols". *Radiation Physics and Chemistry*. **1978**, 11: 203-208.
- Silfen, J.; Yanai, P.; Cabantchik, Z. I. Bioflavonoid effect on in vitro cultures of plasmodium falciparum. Inhibition of permeation pathways in the host cell membrane by the intraerythrocytic parasite. *Biochemical Pharmacology*. **1988**, 37: 4269-4276.
- Spinks, J. W.; Woods, R. J. *An introduction to radiation Chemistry*, 3^{ème} édition. Wiley, New York, **1990**.
- Sun, G.; Wu, J.; Qin, X.; Fang, X.; Wang, W. Selecting ethanol as a model organic solvent in radiation chemistry-5. Pulse radiolysis study on methyl acrylate anion formation and its behavior in N₂-saturated ethanol solution. *Radiation Physics and Chemistry*. **1999**, 55: 409-416.
- Svetaz, L.; Tapia, A.; Lopez, S. N.; Furlan, R. L. E.; Petenatti, E.; Pioli, R.; Schmeda-Hirschmann, G.; Zacchino, S. A. Antifungal Chalcones and New Caffeic Acid Esters from *Zuccagnia punctata* Acting against Soybean Infecting Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52: 3297-3300.
- Tanaka, T.; Kojima, T.; Kawamori, T.; Yoshimi, N.; Mori, H. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Research*. **1993**, 53: 2775-2779.
- Taub, I. A.; Dorfman, L. M. Pulse radiolysis studies II: Transient spectra and rate processes in irradiated ethanol and aqueous ethanol solution. *Journal of the American Chemical Society*. **1962**, 84: 4053-4059.
- Taub, I. A., Sauer M. C., J.; Dorfman, L. M. Pulse radiolysis studies of the reactivity of the solvated electron in ethanol and methanol. *Discussions of the Faraday Society*. **1963**, 36: 206-213.

- Terao, J.; Karasawa, H.; Arai, H.; Nagao, A.; Suzuki, T.; Takama, K. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolics compounds in solution. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **1993**, 57: 1204-1205.
- Tomas-Barbera, F. A.; Michael, N. C. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80: 1073-1080.
- Tofazza, Md. I.; Satoshi, T. Dihydroflavonols from *Lannea coromandelica*. *Phytochemistry*. **2000**, 54: 901-907.
- Tomazela, D. M.; Pupo, M. T.; Passador, E. A.; da Silva, M. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Fo, E. R.; Oliva, G.; Pirani, J. R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*. **2000**, 55: 643-51.
- Tsuchiya, H.; Sato, M.; Akagiri, M.; Takagi, N.; Tanaka, T.; Iinuma, M. Anti-Candida activity of synthetic hydroxychalcones. *Pharmazie*. **1994**, 49: 756-8.
- Trouillas, P.; Calliste, C. A.; Allais, D. P.; Simon, A.; Marfak, A.; Delage, C.; Duroux, J.L. Antioxydant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbel tea. *Food chemistry*. **2003**, 80: 399-407.
- Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry*. **2005**, in press.
- Urbain, W.M. *Food irradiation. Food Science Technology*. Academic Press, Orlando, **1986**.
- Van Acker, S. A. B. E.; van den Berg, D. J.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; van Bennekom, W. P.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**, 20: 331-342.
- Vasseur, J.P. *Ionisation des produits alimentaires*. Tec & Doc Lavoisier, Paris, **1991**.
- Versari, A.; Biesenbruch, S.; Barbanti, D.; Farnell, P. J. Adulteration of fruit juices: dihydrochalcones as quality markers for apple juice identification. *Food Science & Technology*. **1997**, 30: 585-589.
- Viana, G. S. B.; Bandeira, M. A. M.; Matos, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine*. **2003**, 10: 189-195.

- Vollhardt, K.P.C.; Schore, N.E. *Traité de chimie organique*. « Traduction de la troisième édition américaine par Paul Depovere » *Aldéhydes et cétones*. De Boeck & Larcier, Paris, Bruxelles, **1999**.
- Vrhovsek, U.; Rigo, A.; Tonon, D.; Mattivi, F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52: 6532-6538.
- Wang, G.; Wu, J. Selecting ethanol as a model organic solvent in radiation chemistry-4: radiation chemistry of diallyl sulphide in ethanol solution. *Radiation Physics and Chemistry*. **1999**, 55: 25-34.
- Wang, Y.; Crawford, M. K.; McAuliffe, M. J.; Eisenthal, K. B. Picosecond laser studies of electron solvation in alcohols. *Chemical Physics Letters* **1980**, 74: 160-165.
- Wargon, J. A.; Williams, E. Electron spin resonance studies of radical trapping in the radiolysis of organic liquids. I. Evidence for the primary formation of the methoxy radical in methanol. *Journal of the American Chemical Society*. **1972**, 94: 7917-7918.
- Woods, R. J.; Pikaev, A. K. *Applied radiation chemistry: radiation processing*. Wiley-Intersciences, New-York, **1994**.
- Yoshimasa, N.; Shigeo, W.; Nobuyuki, M.; Hiroyuki, K.; Toshihiko, O. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51: 3309-3312.
- Yong, P., K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50: 2502-2506.
- Zhang, G.; Thomas, J. K. Pyrene radical formation in pulse radiolysis of liquid methanol. *Journal of Physical Chemistry*. **1994**, 98: 11714-11718.
- Zheng-xiang, L.; Li, A. Synthesis of a new series of chalcone derivatives and their antifungal activities. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. **2004**, 13: 245-248.
- Zhongli, C.; Xujia, Z.; Jilan, W. Reactions and kinetics of baicalin with reducing species, H, e^-_{solv} and α -hydroxyethyl radical in deaerated ethanol solution under γ -irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. **1995**, 45: 217-222.
- Zhongli, C.; Yongke, H.; Jilan, W. Study of baicalin scavenging hydroxyethyl peroxy radicals by radiolysis of aerated ethanol-baicalin system. *Radiation Physics and Chemistry*. **1995**, 47: 869-871.

