

Spin trapping : la chasse aux intermédiaires radicalaires

Résumé Le spin trapping couplé à la RPE est une méthode de détection des radicaux à courte durée de vie. Son efficacité dans la caractérisation d'intermédiaires radicalaires est illustrée par trois exemples choisis dans les domaines de la chimie organique et de la polymérisation.

Mots-clés Spin trapping, RPE, intermédiaire radicalaire, adduit de spin, mécanisme réactionnel.

Abstract Spin trapping: running after the radical intermediates

The EPR/spin trapping method allows the detection of short-lived radicals. Three examples of its use are given to illustrate its efficiency in radical intermediate characterization in the fields of organic chemistry and polymerization.

Keywords Spin trapping, EPR, radical intermediate, spin adduct, reaction mechanism.

La RPE est la technique de choix pour l'étude des espèces radicalaires, à condition toutefois que ces composés soient suffisamment stables pour s'accumuler dans le milieu et atteindre une concentration stationnaire permettant leur détection. Mais comment faire lorsqu'un radical a une durée de vie excessivement courte et ne peut pas être détecté par RPE de façon conventionnelle ? Ce cas se rencontre fréquemment dans de très nombreux processus radicalaires en biochimie, chimie organique, polymérisation ou encore en catalyse. Le « spin trapping » (piégeage de spin), décrit il y a cinq décennies [1-3], offre alors un moyen de résoudre le problème. Un rapide examen de la bibliographie montre que l'immense majorité des applications de cette technique se situent dans le domaine de la biologie et de la recherche biomédicale [4]. Ceci résulte de l'observation que la production d'espèces oxygénées ou azotées réactives, notamment radicalaires, est associée au développement de nombreuses pathologies [5]. Mais la méthode du spin trapping peut aussi s'avérer très efficace pour l'étude de processus radicalaires dans de nombreux autres domaines de la chimie, par exemple en vue de l'amélioration de procédés catalytiques, de l'identification de polluants atmosphériques, de l'étude de matériaux inorganiques, de la détermination de mécanismes en chimie organique, ou encore de l'élaboration de nouveaux polymères, pour n'en citer que quelques-uns [6]. Néanmoins, force est de constater qu'en dehors des études biochimiques, peu de chimistes recourent à cette technique analytique pourtant utile dès lors que l'on soupçonne la présence d'intermédiaires radicalaires. Dans l'optique de montrer les potentialités de cette approche en chimie, nous avons choisi de décrire son utilisation dans trois exemples d'études mécanistiques réalisées dans nos équipes, dans les domaines de la synthèse organique et de la polymérisation.

La méthode spin trapping/RPE

Cette technique implique l'addition d'un radical fugace sur un piège (spin trap) diamagnétique pour former un adduit de spin paramagnétique de durée de vie suffisante pour une détection par RPE. L'analyse du spectre de l'adduit permet d'identifier un type de radical, et dans les cas les plus favorables, d'en déterminer la structure précise. La mise en œuvre d'une expérience de spin trapping est très simple mais nécessite que l'on se pose certaines questions à propos de la stabilité du piège dans le milieu considéré, de la durée de vie de

l'adduit, de la vitesse de piégeage, de la possibilité de former des espèces radicalaires stables autres que les adduits de spin, etc. Des informations plus détaillées sur la procédure à suivre pour éviter tous les écueils peuvent être trouvées dans les références [1-3].

Les pièges classiques sont soit des composés nitroso, soit des nitrones. Dans tous les cas, l'addition d'un radical R' sur un piège P conduit à la formation d'un nitroxyde, classiquement noté P-R (voir figure 1). Sur un piège nitroso, R' s'additionne sur l'azote et se retrouve à proximité du centre paramagnétique

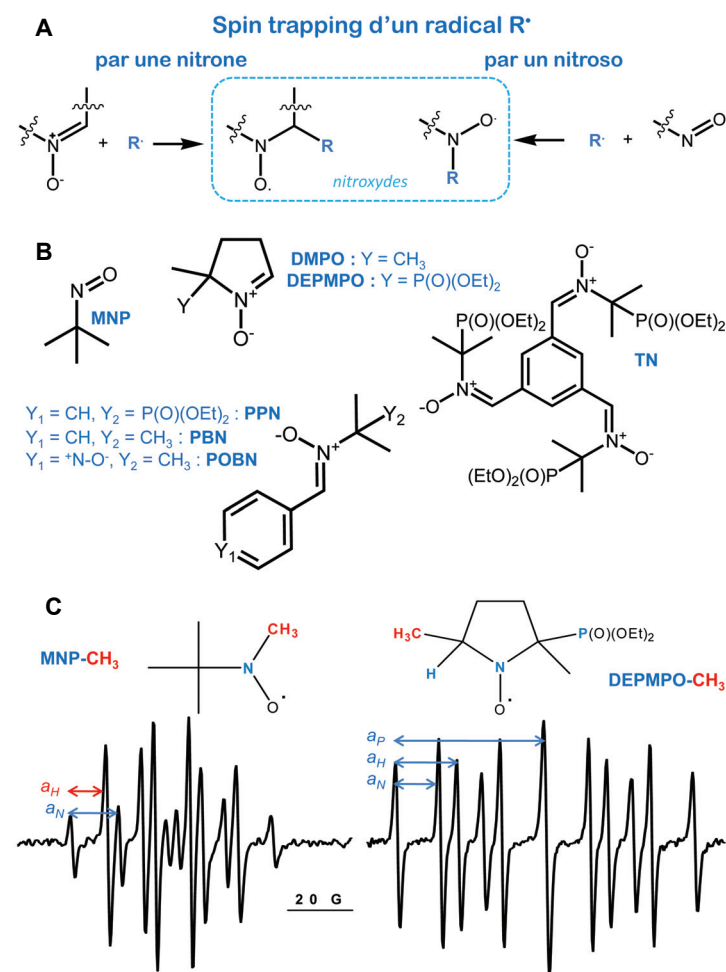


Figure 1 - A) Piégeage d'un radical par un composé nitroso ou une nitron. B) Structure de quelques pièges usuels. C) Spectres de RPE des adduits MNP-CH₃ et DEPMPPO-CH₃; la constante de couplage avec les noyaux H du radical méthyle piégé est matérialisée par une flèche rouge.

dans le nitroxyde formé, donnant des spectres de RPE plus caractéristiques de l'espèce piégée. Mais les composés nitroso ont aussi des inconvénients importants : dimérisation, adduits parfois instables, formation de nitroxydes parasites par décomposition ou suite à une éne-réaction... Les nitrones quant à elles sont souvent stables dans toutes sortes de milieux, parfois même sous irradiation ou à des températures élevées, et piègent une large gamme de radicaux. Leur inconvénient majeur est le peu d'informations contenues dans les spectres des adduits : R' s'additionne sur le carbone du groupe nitronyle et se trouve donc plus éloigné du centre paramagnétique dans l'adduit.

Le spectre RPE d'un adduit présente généralement un grand nombre de raies en raison des couplages hyperfins entre l'électron célibataire et le noyau ^{14}N (spin nucléaire $I = 1$) du groupe nitronyle, les protons ($I = 1/2$) en α ou en β de l'azote et également le noyau ^{31}P ($I = 1/2$) dans le cas des pièges β -phosphorés. L'analyse de la structure du spectre, généralement complétée par des simulations pour déterminer précisément les constantes de couplage hyperfin a_x , conduit à des informations structurales sur R'. À titre d'exemple, la figure 1C montre les spectres enregistrés après piégeage de $^{\bullet}\text{CH}_3$ par MNP et DEPMPO : ce n'est qu'avec le nitroso qu'on observe des couplages provenant du radical méthyle.

Trois exemples d'application

Formation d'un endoperoxyde : élucidation d'un mécanisme mystérieux...

De nombreux antipaludiques naturels ou synthétiques (e.g. artémisinine, BO7, arteflène, trioxaquinones...) présentent dans leur structure un pont endoperoxyde essentiel à leur activité [7]. En effet, en présence de Fe(II), le pont est rompu, donnant lieu à des radicaux centrés sur l'oxygène qui se réarrangent à radicaux carbonés pouvant alkyler des cibles vitales pour le parasite. Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules plus efficaces, nous nous sommes intéressés à

la synthèse d'endoperoxydes naturels extraits des feuilles d'*Eucalyptus grandis*. Ces composés, appelés facteurs G (pour « growth regulators »), jouent le rôle de phytohormones et régulateurs de croissance et sont impliqués dans la défense de la plante [8]. Leur synthèse passe par une fixation spontanée du dioxygène sur un diéno.

Cette réaction biomimétique, qui survient dans la plante au moment d'un stress hydrique, nous a intrigués car elle se fait alors que l'on est confronté à la barrière de spin, entre l'oxygène fondamental (triplet) et le diéno (singulet). Il faut noter que l'oxygénation de diènes conjugués nécessite en général l'emploi d'un photosensibilisateur et peu d'exemples d'addition spontanée du dioxygène (autoxydation) sont décrits, alors que leur mécanisme n'est jamais explicité. Nous avons néanmoins fait de cette autoxydation l'étape clé de notre synthèse, la formation des endoperoxydes à partir de l'acide syncarpique étant directe (voir la figure 2 montrant la formation d'une base de Mannich entre l'acide syncarpique et l'aldéhyde choisi, l'hydrolyse acide puis l'addition spontanée de O_2 sur le diéno). Il était dès lors plus qu'intéressant d'en comprendre le mécanisme.

Des travaux préliminaires nous ont conduit à envisager un processus radicalaire et à réaliser une étude par spin trapping/RPE. Après oxygénation d'une solution de précurseur du facteur G3 ($\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{CH}_3$) contenant une nitrone, un spectre de RPE intense et correspondant à l'adduit d'un radical carboné a été systématiquement détecté, suggérant un mécanisme selon deux voies possibles, notées I et II dans la figure 3 [9].

L'utilisation d'un précurseur marqué au ^{13}C a produit avec la nitrone TN un adduit dont le spectre RPE présente un couplage hyperfin avec le ^{13}C , démontrant que l'intermédiaire I_1 a été piégé et donc que la réaction se fait selon la voie I (figure 4).

La structure précise de l'adduit a pu être confirmée par spectrométrie de masse en tandem et l'étude mécanistique a été confortée par des calculs de chimie quantique [10]. En effet, l'addition d'oxygène fondamental (état triplet) sur le diéno

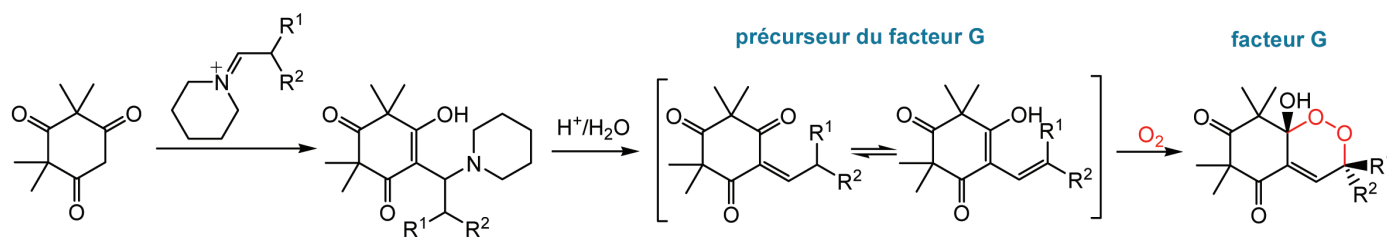


Figure 2 - Synthèse des facteurs G (la synthèse est décrite dans la réf. [7]) ; le pont endoperoxyde formé est représenté en rouge.

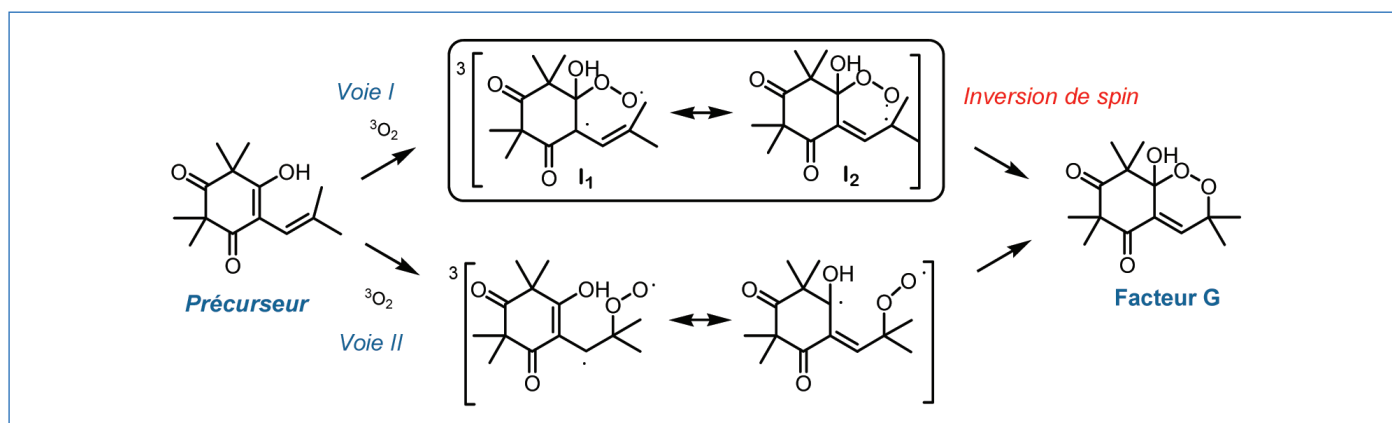


Figure 3 - Biradicaux postulés lors de la réaction d'autoxydation ; deux voies sont envisagées ici, notées I et II.

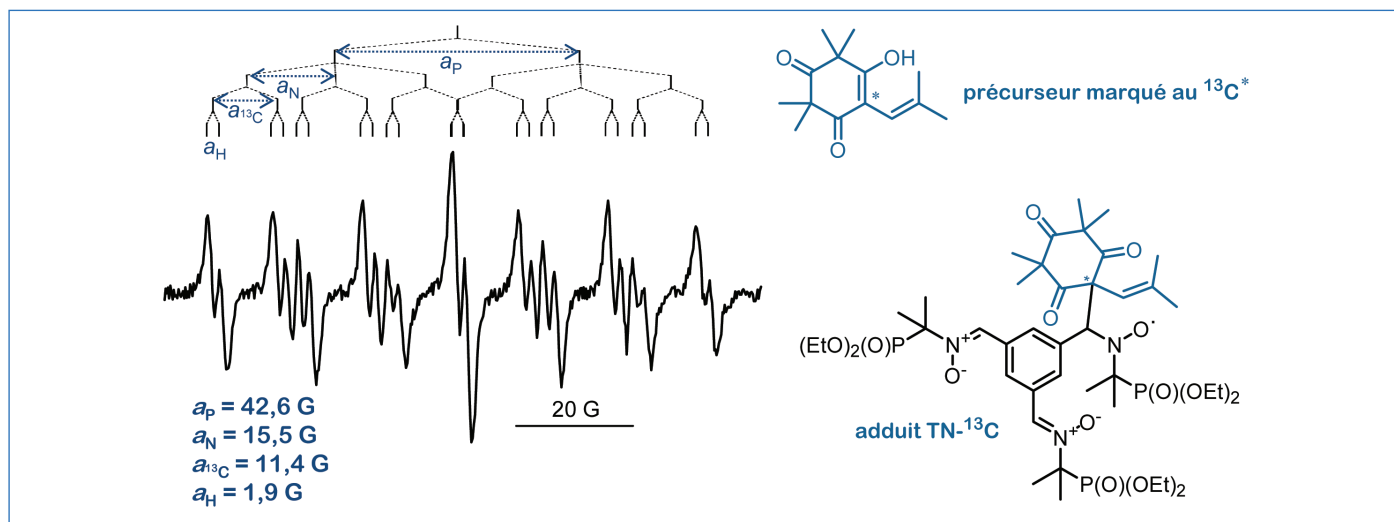


Figure 4 - Mise en évidence par spin trapping/RPE de l'intermédiaire radicalaire I_1 représenté dans la figure 3.

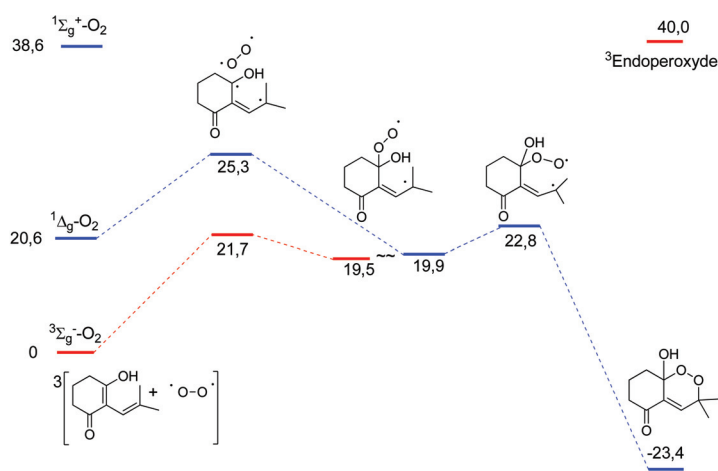


Figure 5 - Chemin réactionnel de l'autoxydation calculé par méthode DFT et enthalpies relatives en kcal/mol.

conduit à des biradicaux (triplet) qui doivent évoluer pour finalement conduire à l'endoperoxyde (singlet) après cyclisation. Le chemin réactionnel ainsi décrit (figure 5) est en bonne adéquation avec les intermédiaires mis en évidence par RPE et spectrométrie de masse. L'intervention d'oxygène singlet (chemin en bleu, figure 5) est effectivement beaucoup plus coûteuse en énergie. Sur le chemin de l'état triplet (en rouge, figure 5), une inversion de spin se produit sur l'intermédiaire biradicalaire situé à 19,5 kcal/mol, où les deux états sont dégénérés.

Fluoroalkylation radicalaire : une nouvelle méthodologie de synthèse de molécules organofluorées

L'introduction d'atomes de fluor dans une molécule organique modifie profondément ses propriétés et a permis des avancées majeures en sciences des matériaux, en agrochimie et en sciences du vivant. Ainsi, environ le tiers des molécules utilisées en pharmacologie et la moitié des composés à action phytosanitaire comportent dans leur structure un ou plusieurs atomes de fluor (des exemples sont décrits dans la réf. [11]), alors même qu'il n'existe dans la nature aucun composé organofluoré. On comprend donc aisément tout l'intérêt de développer de nouvelles voies d'accès à ces composés. Par ailleurs, la génération de radicaux par catalyse photoredox a récemment connu un renouveau assez remarquable. Cette méthodologie permet de produire des espèces radicalaires dans

des conditions particulièrement douces à l'aide d'un catalyseur ou d'un colorant photosensible activé par une source de lumière non invasive (LED ou lampe à économie d'énergie, voire lumière solaire). Cette approche a eu un impact particulièrement marqué en chimie des groupes perfluoroalkylés [12]. En effet, les réactifs de Umemoto, Togni et Shibata, utilisés comme source électrophile du groupe CF_3 , peuvent être réduits et ainsi délivrer le radical trifluorométhyle.

Nous avons tout d'abord montré l'intérêt de cette stratégie dans des réactions multicomposants, puis décrit de nouveaux réactifs de fluoroalkylation (sulfoximines et sulfilimino-iminiums) [13]. L'intérêt de ces composés est notamment l'opportunité de faire varier la nature de la chaîne perfluorée ($\text{R}_F = \text{C}_4\text{F}_9, \text{CF}_3, \text{CF}_2\text{Br}, \text{CF}_2\text{H}, \text{CFCl}_2$, figure 6). Lors de nos transformations, un catalyseur passe dans un état excité (par irradiation avec des LED bleues) et est alors suffisamment réducteur pour générer le radical trifluorométhyle à partir des précurseurs de la figure 6. Cette espèce peut ensuite s'additionner sur une double liaison, conduisant ainsi à un autre radical. Son oxydation permet de régénérer l'espèce catalytique et un cation alors piégé par un nucléophile présent dans le milieu.

Afin d'étayer le mécanisme proposé, des études de spin trapping ont été menées sur plusieurs systèmes producteurs de radicaux avec divers spin traps de type nitroso ou nitron [13]. Selon le réactif utilisé, nous avons pu piéger toute une série de radicaux R_F , comme $^{\bullet}\text{CF}_3, ^{\bullet}\text{CF}_2\text{Br}, ^{\bullet}\text{CFCl}_2$ ou encore $^{\bullet}\text{C}_4\text{F}_9$. Les résultats les plus marquants ont été obtenus avec le spin trap MNP, qui a systématiquement conduit à l'identification du radical piégé. Les spectres de RPE des adduits obtenus après addition des divers radicaux donnent des signatures très caractéristiques, comme le montre la figure 7. Pour chacune des réactions étudiées, le radical carboné secondaire formé après addition de R_F sur l'oléfine a aussi été détecté. La méthode spin trapping/RPE a permis ici de démontrer de manière directe le caractère radicalaire de ces réactions, ainsi que d'identifier deux intermédiaires radicalaires impliqués dans le mécanisme.

Les systèmes RFRP : un procédé alternatif de polymérisation radicalaire

Les systèmes de polymérisation de type redox (RFRP, « redox free radical polymerization ») sont actuellement très utilisés dans de très nombreuses et très diverses applications (pour

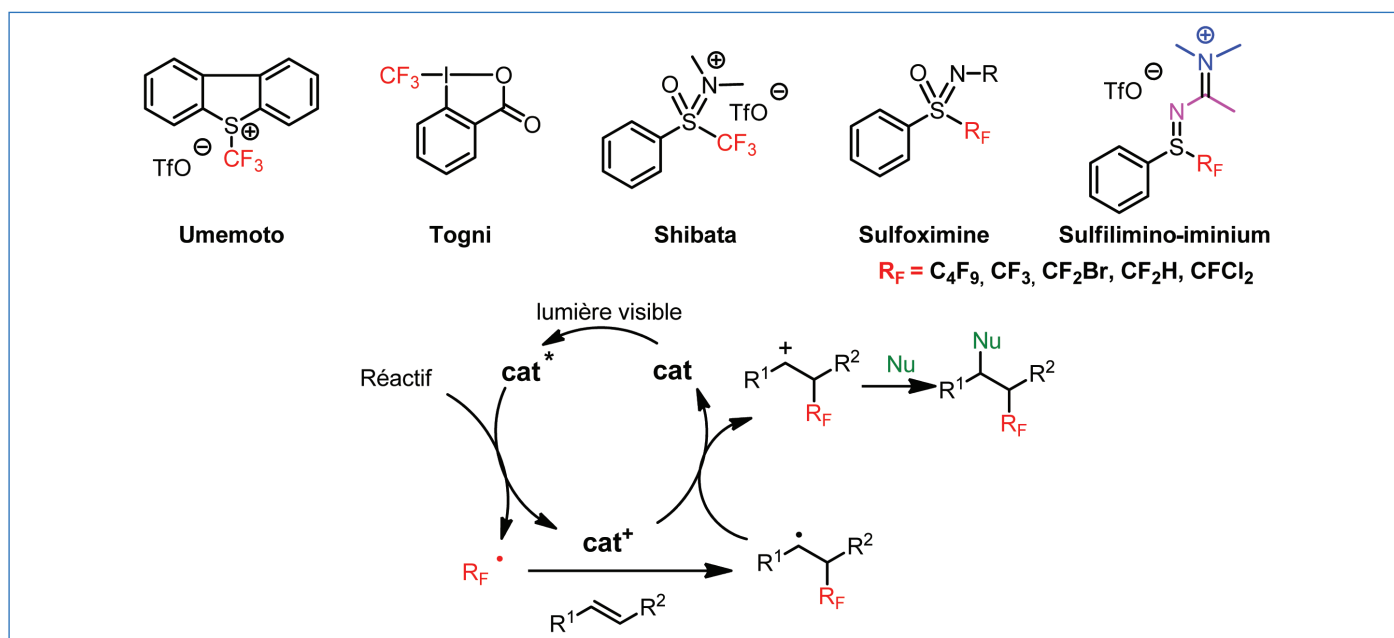


Figure 6 - Réactifs de trifluorométhylation ou perfluoroalkylation électrophiles et utilisation en catalyse photoredox.

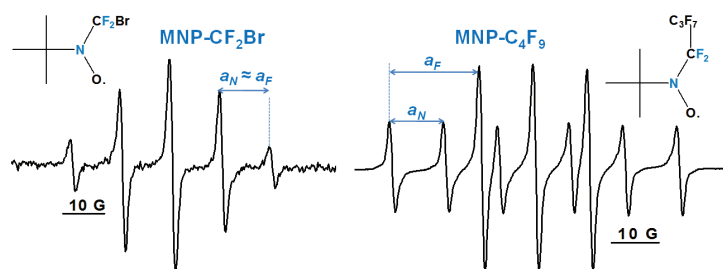


Figure 7 - Spectres des adduits MNP-CF₂Br ($a_N = 12,5$ G et $a_F = 12$ G, 2F) et MNP-C₄F₉ ($a_N = 11,6$ G et $a_F = 19,3$ G, 2F) démontrant la nature radicalaire du mécanisme et permettant l'identification précise du radical piégé.

n'en citer que quelques-unes : chevilles chimiques dans le domaine du bâtiment, colle en électronique, ciment dentaire en dentisterie, etc.). Les systèmes d'amorçage redox les plus employés sont basés sur une réaction amine/péroxyde souvent très efficace. Cependant, trouver des alternatives aux amines (classées toxiques) ainsi qu'aux peroxydes (souvent classés dangereux à cause de leur réactivité) est devenu un enjeu de recherche important [14].

Dans le cadre de nos travaux sur le développement de nouveaux systèmes redox impliquant un complexe organométallique, la technique spin trapping/RPE s'est révélée un outil de choix pour caractériser les mécanismes réactionnels mis en jeu (figure 8), une meilleure compréhension de ces mécanismes pouvant donner lieu à des améliorations de procédés. Un exemple récent est basé sur l'échange de ligand entre le complexe de manganèse(III) acétylacétonate, Mn(acac)₃, et un agent de réducteur tel que la 2-acétylbutyrolactone Dket1 (figure 8, réaction A) [15].

L'analyse par RPE d'une solution de Mn(acac)₃ en présence de Dket1 et de la α -phényl-*N-tert*-butylnitronne (PBN) combinée à des calculs par méthode DFT a permis d'identifier l'adduit PBN-Dket1 (figure 8B), dont la signature est différente de celle de PBN-acac. Utilisée en combinaison avec d'autres méthodes analytiques (comme la spectrométrie de masse), l'identification par spin trapping/RPE de la nature des radicaux formés a permis de mieux comprendre le rôle du métal et d'avancer un mécanisme (figure 8A) qui aboutirait à la formation d'un radical Dket1[•]. Le complexe Mn(acac)₃ arracherait un

atome d'hydrogène de Dket1 pour conduire au radical Dket1[•] et à de l'acétylacétone (acacH). L'intermédiaire réactionnel serait la forme énolate de Dket1 coordonnée à Mn(III) qui a perdu un ligand sous la forme acacH. Ce complexe de Mn(III)-énolate se réduit en Mn(II) en libérant le radical Dket1[•] qui est proposé comme étant l'espèce amorçante de la réaction de polymérisation de type RFRP (figure 8A).

Une méthode au potentiel sous-employé

Depuis plusieurs décennies, le spin trapping couplé à une détection RPE est très largement employé *in vitro* comme *in* ou *ex vivo* par de nombreuses équipes pour étudier par exemple des processus physiopathologiques liés au stress oxydant ou au métabolisme de xénobiotiques. Au travers des trois exemples présentés ici, nous espérons avoir convaincu que la méthode peut aussi conduire à des résultats majeurs dans l'étude de mécanismes réactionnels, bien qu'elle soit largement sous-employée dans ce domaine. Dans le premier cas, elle a permis d'expliquer une fixation spontanée d'oxygène, contribuant ainsi à une meilleure compréhension des phénomènes d'autoxydation. Dans le deuxième cas, la nature radicalaire d'une nouvelle méthodologie de synthèse de molécules organofluorées a été démontrée. Dans le troisième exemple enfin, l'approche par spin trapping, couplée à d'autres méthodes, intervient dans l'élaboration de nouvelles voies de polymérisation radicalaire. D'autres exemples d'application en chimie peuvent être trouvés dans les articles de la référence [6].

Il existe une grande variété de pièges disponibles et on en trouvera le plus souvent un adapté à l'expérience à mener. Il convient néanmoins de bien connaître les limites de la méthode afin d'éviter tout artéfact ou erreur d'interprétation [1-2]. Bien qu'elle autorise parfois l'identification de l'espèce piégée, elle ne permet souvent que de déterminer quel type de radical a été piégé (alkyle, peroxy, alkoxy, etc.). Une caractérisation structurale pourra alors nécessiter un marquage isotopique du piège ou du substrat, l'utilisation conjointe d'une autre technique analytique (e.g. spectrométrie de masse), ou encore des calculs de chimie quantique.

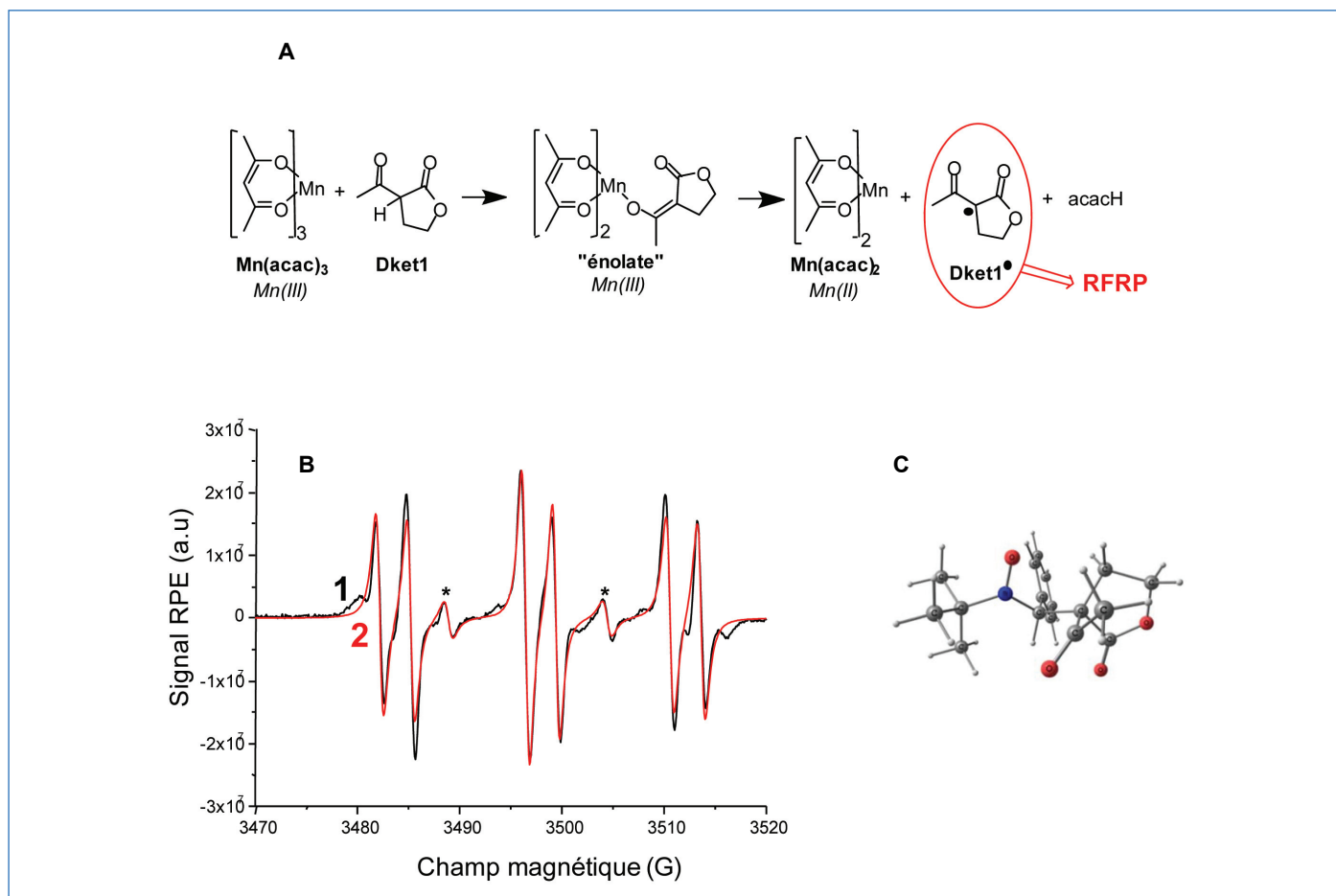


Figure 8 - (A) Mécanisme redox proposé pour la formation de radicaux amorceurs. (B) Spectres RPE expérimental (en noir) et calculé (en rouge) obtenus par capture du radical Dket1[•] par PBN. (C) Structure calculée par modélisation moléculaire de l'adduit PBN-Dket1.

[1] Janzen E.G., Spin trapping, *Account. Chem. Res.*, **1971**, 4, p. 31 ; Perkins M.J., Spin trapping, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1980**, 17, p. 1.

[2] Lauricella R., Tuccio B., Détection et caractérisation de radicaux libres après piégeage de spins, in *La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique : applications*, P. Bertrand (dir.), EDP Sciences, **2014**, p. 49-78.

[3] Buettner G., Spin trapping: ESR parameters of spin adducts, *Free Rad. Biol. Med.*, **1987**, 3, p. 259.

[4] Davies M., Detection and characterization of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods, *Methods*, **2016**, 109, p. 21.

[5] Halliwell B., Free radicals and antioxidants: quo vadis?, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2011**, 32, p. 125 ; Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C., Valko M., Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2017**, 38, p. 592.

[6] Conte M., Chechik V., Spin trapping of radical intermediates in gas phase catalysis: cyclohexane oxidation over metal oxide, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, p. 3991 ; Tong H. et al., Reactive oxygen species formed in aqueous mixtures of secondary organic aerosols and mineral dust influencing cloud chemistry and public health in the Anthropocene, *Faraday Disc.*, **2017**, 200, p. 318 ; Das B., Chirila A., Tromp M., Reek J., de Bruin B., Co^{III}-carbene radical approach to substituted 1H-indenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, p. 8968.

[7] Ruiz J., Azéma J., Payrastra C., Baltas M., Tuccio B., Vial H., André-Barrès C., Antimalarial bicyclic peroxides belonging to the G-factor family: mechanistic aspects of their formation and iron (II) induced reduction, *Cur. Topics Med. Chem.*, **2014**, 14, p. 1668.

[8] Ghisalberti E., Bioactive acylphloroglucinol derivatives from Eucalyptus species, *Phytochem.*, **1996**, 41, p. 7.

[9] Triquigneaux M., Charles L., André-Barrès C., Tuccio B., A combined spin trapping/EPR/mass spectrometry approach to study the formation of a cyclic peroxide by dienolic precursor autoxidation, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, p. 1361.

[10] André-Barrès C., Carissan Y., Tuccio B., Theoretical studies of autoxidation of 2-alkylidene-1,3-cyclohexadione leading to bicyclic-hemiketalendoperoxides, *ACS Omega*, **2017**, 2, p. 5357.

[11] Billard T., Magnier E., Fluor et santé, *L'Act. Chim.*, **2017**, 421, p. 31 ; Schmitt E., Commare B., Panossian A., Vors J., Pazenok S., Leroux F., Synthesis of mono- and bis(fluoroalkyl)-pyrimidines from FARs, fluorinated acetoacetates, and malononitrile provides easy access to novel high value pyrimidine scaffolds, *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24, p. 1311.

[12] Dagousset G., Carboni A., Masson G., Magnier E., Visible light-induced (per)fluoroalkylation by photoredox catalysis, in *Modern Synthesis Processes and Reactivity of Fluorinated Compounds*, H. Groult, F. Leroux, A. Tressaud (eds), Elsevier, **2016**, p. 389-426.

[13] Daniel M., Dagousset G., Diter P., Klein P.-A., Tuccio B., Goncalves A.-M., Masson G., Magnier E., Fluorinated sulfoniminoiminiums: efficient and versatile sources of perfluoroalkyl radicals under photoredox catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, p. 3997.

[14] Snider B.B., Manganese(III)-based oxidative free-radical cyclizations, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, p. 339.

[15] Garra P., Dumur F., Nechab M., Morlet-Savary F., Dietlin C., Graff B., Doronina E.P., Sidorkin V.F., Gignes D., Fouassier J.-P., Lalevée J., Peroxide-free and amine-free redox free radical polymerization: metal acetylacetonates/stable carbonyl compounds for highly efficient synthesis of composites, *Macromol.*, **2018**, 51, p. 6395.

Christiane ANDRÉ-BARRÈS, chargée de recherche au CNRS au laboratoire Synthèse et Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologique de Toulouse (UMR 5068), Université de Toulouse, **Jacques LALEVÉE**, professeur à l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (UMR 7361), Université de Haute-Alsace, **Elsa ANSEMI**, maître de conférences, **Guillaume DAGOUSSET**, chargé de recherche au CNRS, et **Emmanuel MAGNIER**, directeur de recherche au CNRS, à l'Institut Lavoisier, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (UMR 8180), **Didier GIGMES**, directeur de recherche au CNRS, et **Béatrice TUCCIO***, maître de conférences, à l'Institut de Chimie Radicalaire d'Aix-Marseille Université (UMR 7273).

* beatrice.tuccio-lauricella@univ-amu.fr