



HAL
open science

Développement de nouveaux agents anti-radicalaires de type nitroxyde et nitrone utilisables comme sondes et agents thérapeutiques

Fanny Choteau Choteau-Mary

► **To cite this version:**

Fanny Choteau Choteau-Mary. Développement de nouveaux agents anti-radicalaires de type nitroxyde et nitrone utilisables comme sondes et agents thérapeutiques. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2011. Français. NNT : 2011AVIG0242 . tel-00688960

HAL Id: tel-00688960

<https://theses.hal.science/tel-00688960>

Submitted on 19 Apr 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ACADÉMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THESE

présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
pour obtenir le diplôme de Docteur en Sciences

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE

Développement de nouveaux agents anti-radicalaires de type nitroxyde et nitronne utilisables comme sondes et agents thérapeutiques

Par

Fanny CHOTEAU-MARY

Soutenue le 21 Juin 2011 devant le Jury composé de :

MM.

NEPVEU	Françoise	Professeure Université Paul Sabatier de Toulouse	Rapporteure
GERARDIN	Christine	Professeure Université Henri Poincaré de Nancy	Rapporteure
TUCCIO- LAURICELLA	Béatrice	Maître de conférences Université de Provence (Aix-Marseille I)	Examinatrice
RANCHON- COLE	Isabelle	Maître de conférences Université d'Auvergne (Clermont-Ferrand)	Examinatrice
SALLES	Jean-Pierre	Docteur en Pharmacie Directeur de TS Pharma	Invité
PUCCI	Bernard	Professeur Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Directeur de thèse
DURAND	Grégory	Maître de conférences-HDR Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Directeur de thèse

A mon mari...

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie BioOrganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels anciennement dirigé par le Pr Bernard PUCCI et actuellement par le Pr Ange POLIDORI, à la Faculté des Sciences d'Avignon. Il reçu le soutien financier de l'entreprise TS PHARMA, dirigée par M. Jean-Pierre SALLES et de la Région Provence Alpes Côte d'Azur.

Je tiens à remercier sincèrement Mme Françoise NEPVEU, Professeure à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et Mme Christine GERARDIN, Professeure à l'Université Henri Poincaré de Nancy, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens de même à vivement remercier Mme Béatrice TUCCIO-LAURICELLA, Maître de Conférences à l'Université de Provence, Mme Isabelle RANCHON-COLE, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne et M. Jean-Pierre SALLES, Directeur de TS PHARMA qui me font l'honneur de faire partie de ce jury.

Je remercie respectueusement M. le Professeur Bernard PUCCI pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir permis de mener dans les meilleures conditions qui soient ce travail de thèse. Je lui suis également très reconnaissante du savoir qu'il m'a transmis au cours de mes années universitaires et durant ces trois années de thèse. MERCI de m'avoir toujours apporté votre confiance !!!!

Je remercie très sincèrement M. Grégory DURAND, Maître de Conférences à l'UAPV, pour avoir dirigé ces travaux de thèse et pour avoir toujours suivi avec un grand intérêt mes recherches, même si cela c'est parfois déroulé à distance, par échange de nombreux mails. Merci d'avoir toujours été présent à mes côtés, malgré les nombreuses fois où j'ai réussi à bien t'énerver... Merci pour tous les conseils avisés que tu m'as donné au cours de ces dernières années et même si tu t'es montré dur par moment, cela à payé : nous y sommes arrivés !!!!

J'adresse mes remerciements les plus sincères à M. Jean-Pierre SALLES, directeur de l'entreprise TS PHARMA ainsi qu'à la Région Provence Alpes Côte d'Azur pour leur soutien financier et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail durant ces trois années de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Mme Isabelle RANCHON-COLE, et à M. Robert PROSAK pour l'ensemble des tests biologiques qu'ils ont réalisé ainsi qu'à Mme Béatrice TUCCIO-LAURICELLA et à M. Frederick VILLAMENA pour les nombreuses études de RPE qu'ils ont mené ; leur précieuse collaboration a contribué à donner un plus grand intérêt au travail que j'ai accompli au cours de cette thèse. Dans le même ordre d'idée, je tiens une nouvelle fois à remercier M. Grégory DURAND pour l'ensemble des tests physico-chimiques qu'il a réalisé durant ses deux séjours aux Etats-Unis et qui ont également permis de valoriser mes travaux.

Je tiens maintenant à remercier tous mes collègues de paillasses, passés ou présents, qui ont permis de rendre bien plus agréables mes journées passées dans ce laboratoire, à savoir :

- ✓ M. Simon RAYNAL, qui est présent à mes côtés depuis le premier jour de cette thèse et qui, malgré son caractère « de cochon » de temps à autre, est une personne sur laquelle j'ai toujours pu compter. Merci pour ton aide précieuse de tous les instants !!!!

- ✓ M^{elle} Cindy PATINOTE, qui a toujours su me donner de bons conseils d'un point de vue chimie mais également d'ordre privé. Merci pour toutes nos longues conversations !!!!
- ✓ M. Maher ABLA, qui a toujours répondu avec beaucoup de rigueur à mes nombreuses questions « techniques » et qui a toujours été présent quand s'agissait de discuter, tout simplement... Merci pour ton extrême gentillesse envers moi !!!!
- ✓ M^{elle} Audrey PARAT, qui a toujours su m'apporter son aide durant mes débuts à la paillasse. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble au laboratoire !!!!
- ✓ M. Julien DAUVERGNE, qui a été un très bon « voisin » de paillasse durant mes deux premières années de thèse malgré ces réactions quelques peu « explosives » de temps à autre.... Merci pour ta bonne humeur au quotidien !!!!
- ✓ M. Shivaji SHARMA, qui m'a toujours aidé avec une grande gentillesse et qui, malgré la barrière de la langue, a toujours eu la patience de discuter avec moi... Merci pour tes nombreuses expressions françaises qui m'ont fait beaucoup rire !!!!
- ✓ M. Frédéric LEGRAND, qui a également été un super « voisin » de paillasse même si cela n'a été que durant quelques mois.... Merci pour nos nombreuses conversations !!!!
- ✓ M^{elle} Virginie NETTO, qui a toujours été présente à sa façon quand j'ai eu besoin d'elle. Merci pour ta joie et ta bonne humeur de tous les instants !!!!

Je tiens également à remercier M^{me} Christine CONTINO-PEPIN, Maître de Conférence à l'UAPV, pour son extrême gentillesse durant toutes ces années passées au laboratoire mais également durant toutes mes années universitaires. Merci d'avoir été pour moi une aussi bonne enseignante et Merci de m'avoir fait découvrir et aimer cette « belle » chimie qu'est la chimie thérapeutique !!!!

Je tiens de tout cœur à remercier mes amis moniteurs avec qui j'ai eu la chance et l'honneur de réaliser mon projet CIES : M^{elle} Aurélie CENDRES, M^{elle} Chloé DIBOS, M. Rémy CHIFFLET, M. Alban MOISSONASSE et M. Sébastien VEILLET. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et Merci pour votre amitié qui m'est chère !!!!

Je tiens à ajouter un remerciement tout particulier à M. Sébastien VEILLET, pour ces nombreuses « pauses thé » passées ensemble, qui m'ont très souvent réconforté dans les moments difficiles. Merci pour ta précieuse présence à mes côtés durant ces trois années de thèse, à l'université et à l'extérieur !!!!

Je tiens très sincèrement à remercier M^{elle} Nathalie BRACHET pour son aide précieuse dans la mise en page de ce manuscrit et dans la confection de ce marque-page « personnalisé ». Merci pour toutes ces heures passées à mes côtés devant l'ordinateur, dans la joie et la bonne humeur !!!!

Je tiens également à remercier M. Pierre GUILLET, Maître de Conférences à l'UAPV, pour toutes les retouches de figures « de dernières minutes » qu'il a réalisé et pour avoir accepté de lire certaines parties de ce manuscrit avec une grande rigueur. Merci pour ta présence dans cette dernière ligne droite !!!!

J'exprime mes plus sincères remerciements à ma famille, à ma belle-famille et à mes amis de longue date qui ont toujours su être présents à leurs façons au cours de ces dernières années. Votre présence à mes côtés est indispensable à mon bonheur !!!!

Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur mon mari, M. Frédéric MARY, qui est la personne qui m'a le plus soutenu durant ces années de thèse mais également durant la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ta présence et ton écoute dans les moments les plus durs, pour ta patience et ta compréhension au quotidien et un GRAND MERCI pour tout l'amour que tu me portes depuis plus de huit ans et qui me rend plus heureuse chaque jour !!!!

AVANT-PROPOS

Le travail rapporté dans ce mémoire en vue de l'obtention du titre de docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse a donné lieu à des :

Publications :

- Durand G., Choteau F., Pucci B., Villamena F. A. Reactivity of superoxyde radical anion and hydroperoxyl radical with α -Phenyl-*N*-*tert*-butylnitrone (PBN) derivatives. *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 12498-12509.
- Durand G., Choteau F., Prosak R. A., Rockenbauer A., Villamena F. A., Pucci B. Synthesis, physical-chemical and biological properties of amphiphilic amino acid conjugates of nitroxides. *New J. Chem.*, **2010**, 34, 1909-1920.
- Choteau F., Durand G., Ranchon-Cole I., Cergy C., Pucci B. Cholesterol-based α -Phenyl-*N*-*tert*-butyl nitronne derivatives as antioxydants against light-induced retinal degeneration. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2010**, 20, 7405-7409.
- Choteau F., Tuccio B., Villamena F. A., Pucci B., Durand G., Synthesis of Tris-hydroxymethyl-Based Nitronne Derivatives with highly reactive nitronyl carbon. *J. Org. Chem.*, **2012**.

Communications par affiche :

- Choteau F., Durand G., Ranchon-cole I., Pucci B. New cholesterol-based amphiphilic nitrones as useful tools against retinitis pigmentosa. *16^e Journée Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique*, Paris (**5 Février 2009**) et *Colloque PharmaQam*, UQAM, Montréal, Canada (**15-17 Juin 2009**).
- Ranchon-Cole I., Choteau F., Pucci B., Cergy C., Durand G., Doly M. Neuroprotective effect of amphiphilic cholesterol-based PBN-derivatives. *Annual Meeting of the association for research in vision and ophthalmology*, Fort-Lauderdale, Florida, USA (**3-7 Mai 2009**).
- Durand G., Choteau F., Prosak R. A., Rockenbauer A., Villamena F. A., Pucci B. Synthesis, physical-chemical and biological properties of amphiphilic amino acid conjugates of nitroxides. *17^e Journée Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique*, Paris (**5 Février 2010**).
- Durand G., Choteau F., Prosak R. A., Rockenbauer A., Villamena F. A., Pucci B. Synthesis, physical-chemical and biological properties of amphiphilic amino acid conjugates of nitroxides. *Gordon Research Conference, Oxygen Radicals : Mechanisms That Underpin Redox Biology*, Ventura, California, USA (**7-12 Février 2010**).
- Choteau F., Durand G., Ranchon-Cole I., Cergy C., Pucci B. New cholesterol-based amphiphilic nitrones as useful tools against light-induced retinal degeneration. *Gordon Research Conference, Oxygen Radicals : Mechanisms That Underpin Redox Biology*, Ventura, California, USA (**7-12 Février 2010**).

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

A. IMPLICATION DES RADICAUX LIBRES DANS LE STRESS OXYDANT.....	1
1. PRODUCTION PHYSIOLOGIQUE ET REACTIVITE DES EOR/EAR	1
1.1. <i>Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant</i>	1
1.2.1. Les espèces réactives centrées sur l'oxygène.....	1
1.2.2. Les espèces réactives azotées	2
1.2. <i>Sites de production physiologique</i>	3
1.2.1. Sites de production des espèces oxygénées réactives	3
1.2.2. Sites de production des espèces azotées réactives	5
1.3. <i>Les cibles</i>	5
1.3.1. Les lipides	5
1.3.2. Les acides aminés et les protéines.....	6
1.3.3. L'ADN.....	6
2. LES SYSTEMES DE DEFENSE CELLULAIRE	7
2.1. <i>Système endogène</i>	7
2.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD).....	7
2.1.2. Les catalases	8
2.1.3. Les glutathion peroxydases	8
2.2. <i>Système exogène</i>	9
3. LE STRESS OXYDANT	9
3.1. <i>Définition</i>	9
3.2. <i>La mort cellulaire programmée par apoptose</i>	10
3.3. <i>Pathologies et désordres associés au stress oxydant</i>	10
B. UN PREMIER TYPE D'ANTI-RADICALAIRE ARTIFICIEL : LES NITROXYDES.....	11
1. PRESENTATION GENERALE DES NITROXYDES CYCLIQUES ET DE LEUR UTILITE PREMIERE	11
1.1. <i>Qu'est-ce qu'un nitroxyde cyclique?</i>	11
1.2. <i>Les nitroxydes cycliques en RPE</i>	12
1.2.1. Définition de la RPE	12
1.2.2. Utilisation des nitroxydes en tant que sondes en milieu biologique	12
2. UTILISATION DES NITROXYDES POUR LEURS PROPRIETES ANTIOXYDANTES'.....	13
2.1. <i>Propriétés antiradicalaires et antioxydantes des nitroxydes</i>	13
2.1.1. Mimétiques des enzymes SOD et Cat.....	13
2.1.3. Inhibition de la peroxydation lipidique.....	14
2.1.4. Inhibition des réactions de Fenton ³⁹ et d'Haber Weiss	15
2.1.6. Inhibition des dommages dus à des radiations	15
C. UN SECOND TYPE D'ANTI-RADICALAIRE ARTIFICIEL : LES NITRONES	16
1. UTILISATION DANS LA TECHNIQUE DE PIEGEAGE DE SPIN	16
1.1. <i>Principe du spin trapping</i>	16
1.2. <i>Les nitrones utilisées dans le piégeage de spin : cycliques et linéaires</i>	17
1.2.1. Les spin-traps cycliques	18
1.2.2. Les spin-traps linéaires	20
2. UTILISATION EN TANT QU'AGENTS A PROPRIETES THERAPEUTIQUES : EFFETS PROTECTEURS DE LA PBN	22
2.1. <i>Activité neuroprotectrice</i>	22
2.2. <i>Activité sur la vision et l'ouïe</i>	23
2.3. <i>Autres activités protectrices</i>	23
2.4. <i>Activité sur le vieillissement</i>	24
3. BIODISPONIBILITE ET TOXICITE DE LA PBN	25
3.1. <i>La biodistribution de la PBN comparée à celle de la DMPO</i>	25
3.2. <i>La toxicité de la PBN comparée à celle de la DMPO</i>	25
D. NOUVEAUX AGENTS NITRONES/NITROXYDES A CAPACITE SUPERIEURE DE CIBLAGE	26
1. PRINCIPE GENERAL DE LA « VECTORISATION »	26
2. CIBLAGE DE LA MITOCHONDRIE	27

2.1. Antioxydants peptidiques	27
2.1.1. Les SS-tétrapeptides	28
2.1.1. Les analogues XJB de la Gramicidine S	28
2.2. Fixation d'antioxydants sur des cations lipophiles	29
3. CIBLAGES DES LIPIDES	31
E. LA MODULATION DE LA BALANCE HYDROPHILE-LIOPHILE D'ANTIOXYDANTS SYNTHETIQUES COMME STRATEGIE DE VECTORISATION.....	33
1. LES ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA PBN.....	34
1.1. Phenylnitrones modifiées en position N-terminale.....	34
1.2. Phenylnitrones modifiées en position aromatique	34
1.3. Nitrones cycliques dérivées de la PBN	35
2. MODULATION DE LA BHL D'ANTIOXYDANTS PAR GREFFAGE SUR UNE STRUCTURE AMPHIPHILE	38
2.1. Nitrones à fixation latérale.....	39
2.2. Nitrones à fixation centrale	40
F. OBJECTIFS DE NOS TRAVAUX	41
CHAPITRE 2 : NITROXYDES AMPHIPHILES	
A. INTRODUCTION.....	52
1. CARACTERISTIQUES GENERALES DES TRANSPORTEURS AMPHIPHILES UTILISEES	52
2. TRAVAUX PRELIMINAIRES	53
2.1. Etudes de biodistribution du transporteur lysine radiomarqué.....	53
2.2. Etudes de la vectorisation de différents principes actifs.....	53
3. PRESENTATION DES NOUVEAUX DERIVES AMPHIPHILES	56
3.1. Choix des chaînes hydrophobes	56
3.2. Choix des nitroxydes vectorisés	56
B. SYNTHESE DES DERIVES AMPHIPHILES PORTEURS DE NITROXYDES	58
1. ANALYSE RETROSYNTHETIQUE	58
2. LES DIFFERENTES ETAPES DE LEURS SYNTHESSES.....	59
2.1. Synthèse des deux dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes à chaîne hydrogénée.....	60
2.1.1. Introduction de la chaîne hydrogénée sur les acides aminés.....	60
2.1.2. Introduction de la tête polaire sur les acides aminés hydrophobes.....	60
2.1.3. Introduction des nitroxydes sur les acides aminés amphiphiles	65
2.2. Synthèse des deux dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes à chaîne perfluorocarbonée.....	70
2.4. Nomenclature des nitroxydes amphiphiles synthétisés.....	73
C. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES	73
1. ETUDE DES COEFFICIENTS DE PARTITION ($\log K'_w$)	73
1.1. Principe général.....	73
1.2. Détermination du coefficient de partition par CLHP	74
1.3. Résultats des mesures de $\log K'_w$	75
2. ETUDE D'AUTO-ASSOCIATION EN MILIEU AQUEUX.....	77
2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	77
2.1.1. Principe général.....	77
2.1.2. Résultats	78
2.2. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	80
2.2.1. Phénomènes d'agrégations et spectres RPE.....	80
2.2.2. Résultats	81
3. ETUDE DES POTENTIELS OXYDANT ET REDUCTEURS.....	84
3.1. Etude du potentiel oxydant des nitroxydes par voltampérométrie cyclique	84
3.1.1. Principe de la méthode.....	84
3.1.2. Résultats	85
3.2 Etude de la stabilité des nitroxydes en milieu réducteur	87
D. ETUDES BIOLOGIQUES IN VITRO	88

1. ETUDE DE LA CYTOTOXICITE DES NITROXYDES.....	88
2. ETUDE DES PROPRIETES CYTOPROTECTIVES.....	90
E. CONCLUSION	92

CHAPITRE 3 : NITRONES DERIVEES DE LA PBN

A. INTRODUCTION..... 96

1. CARACTERISTIQUES GENERALES DES STRUCTURES AMPHIPHILES UTILISEES	96
2. TRAVAUX PRELIMINAIRES	97
2.1. Premières modifications structurales réalisées sur ce modèle de transporteur	97
2.2. Inversion du positionnement des parties polaires et apolaires autour de la PBN	99
2.3. Présentation des résultats in vitro	99
2.4. Présentation des résultats in vivo.....	100
3. PRESENTATION DES NOUVEAUX DERIVES DE LA PBN	101
3.1. Les dérivés amphiphiles de la LPBNAH et de la LPBNH15 à motif cholestérol.....	101
3.2. Dérivés amphiphiles de la PBN à tête polaire Tris	102
3.3. Le dérivé amphiphile de la LPBNH15 à tête polaire glucose.....	103

B. SYNTHÈSE DES NOUVEAUX TRANSPORTEURS DE LA PBN 103

1. SYNTHÈSE DES DERIVES LIPOPHILES DE LA PBN A MOTIF CHOLESTEROL	103
1.1. Synthèse de l'analogue de la LPBNAH à motif cholestérol	103
1.2.2. Synthèse du précurseur hydrophobe à fonction hydroxylamine	104
1.1.2. Synthèse du précurseur de la tête polaire à fonction aldéhyde.....	109
1.2.3 Synthèse de la fonction nitrone.....	110
1.3. Synthèse de l'analogue de la LPBNH15 à motif cholestérol	113
1.3.1. Synthèse du précurseur de la tête polaire à fonction hydroxylamine	113
1.3.2. Synthèse du précurseur hydrophobe à fonction aldéhyde	114
1.3.3. Synthèse de la fonction nitrone.....	115
2. SYNTHÈSE DES DERIVES AMPHIPHILES DE LA PBN A TETE POLAIRE TRIS	118
2.1. Synthèse des précurseurs hydrophobes à fonction aldéhyde	118
2.2. Synthèse des fonctions nitrones	119
2.2.1. Première voie de synthèse de la T-PBN.....	120
2.2.2. Deuxième voie de synthèse de la T-PBN	122
2.2.3. Synthèse des nitrones à longueur de chaîne variable	123
3. SYNTHÈSE DE L'ANALOGUE DE LA LPBNH15 A TETE POLAIRE GLUCOSE	124
3.1. Synthèse du précurseur de la tête polaire glucose	124
3.2. Synthèse de la fonction nitrone	125

C. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES 126

1. ETUDE DE SOLUBILITE EN MILIEU AQUEUX	126
2. ETUDE DES COEFFICIENTS DE PARTITION	127
3. ETUDE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)	129

D. ETUDES *IN VIVO* MENEES SUR LA DEGENERESCENCE RETINIENNE 132

1. QU'EST-CE QUE LA DEGENERESCENCE RETINIENNE ?	132
2. LA DEGENERESCENCE RETINIENNE INDUITE PAR LA LUMIERE OU PHOTODEGENE-RESCENCE RETINIENNE	133
3. PRINCIPE DE L'ETUDE <i>IN VIVO</i>	134
4. RESULTATS DES DIFFERENTES EXPERIENCES.....	135

E. CONCLUSION 138

CHAPITRE 4 : NOUVEAUX TRANSPORTEURS D'ANTIOXYDANTS

A. TRANSPORTEURS MACROMOLECULAIRES DE TYPE DENDRIMERE 142

1. PRESENTATION GENERALE	142
1.1. Présentation de la structure du dendrimère.....	142
1.2. Choix des antioxydants.....	143

2. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS PAMAM PORTEURS D'ANTIOXYDANTS SYNTHÉTIQUES	143
2.1. Préparation des antioxydants sous leur forme ester actif ou acide carboxylique	143
2.1.1. Préparation de l'ester actif dérivé de la PBN.....	143
2.1.2. Préparation de l'ester actif dérivé de l'acide lipoïque	144
2.1.3 Préparation de l'acide dérivé de la DMPO.....	144
2.2. Fixation des antioxydants sur le PAMAM	145
B. NOUVEAU TRANSPORTEUR MONOMOLECULAIRE DE LA PBN.....	147
1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE	147
1.1. Choix de la composante polaire.....	147
1.2. Choix de la composante apolaire.....	147
2. SYNTHÈSE DE LA NITRONE DÉRIVÉE DE LA PBN A MOTIFS PYRIDINIUM ET CYCLOHEXANE	148
2.1. Synthèse du précurseur de la tête polaire à motif pyridinium et à fonction amine.....	148
2.2. Synthèse de la nitrone apolaire à motif cyclohexane et à fonction acide carboxylique	151
C. CONCLUSION	154
CONCLUSION GÉNÉRALE	156
PARTIE EXPÉRIMENTALE :	
1. SYNTHÈSE	161
2. DÉTERMINATION DES COEFFICIENTS DE PARTAGE (LOG K'_w) PAR CLHP-UV.....	200
3. DÉTERMINATION DE LA TAILLE DE PARTICULES PAR DLS	202

PRÉAMBULE

Toute vie qui a pu se développer sur la terre primitive a dû suivre un processus anaérobie, tel fut le cas des premières algues marines qui grâce à la photosynthèse purent faire apparaître le dioxygène provoquant ainsi l'oxydation de composés abondants sur la surface primitive de notre planète. Il n'y a finalement que 2,5 milliards d'années qu'il est produit en excès et qu'il est devenu un composant de l'atmosphère terrestre, pour atteindre la proportion de l'ordre de 20% que nous connaissons aujourd'hui. Durant l'évolution, les espèces vivantes se sont adaptées à sa présence, et il est progressivement devenu indispensable à la vie des animaux, plantes et bactéries en leur permettant de produire de l'énergie. Cette production d'énergie est malheureusement caractérisée par la formation régulière de composés prooxydants souvent délétères, que l'on regroupe à ce jour sous l'appellation d'espèces oxygénées et azotées réactives (EOR/EAR). En conditions physiologiques normales, au niveau cellulaire, ces EOR/EAR produites de manière minoritaire, sont prises en charge par un système de défense limitant leur nocivité. Malheureusement, lorsque ces espèces réactives sont produites en quantité trop importante et que la cellule ne parvient plus à réguler cette formation, le compartiment cellulaire connaît alors un état appelé « stress oxydant ».

Ce phénomène est actuellement impliqué dans de nombreuses maladies ainsi que dans de nombreux désordres métaboliques touchant de nombreux constituants cellulaires vitaux. Par conséquent, les chercheurs tentent de développer depuis de nombreuses années différentes thérapies afin de limiter les effets néfastes de ce phénomène et plus particulièrement l'une d'entre elles qui consiste à renforcer le système de défense cellulaire par l'administration d'antioxydants naturels ou synthétiques. Malheureusement, d'une part les antioxydants naturels ne possèdent en règle générale qu'une très faible biodisponibilité dans l'organisme et d'autre part, les antioxydants synthétiques actuellement utilisés en médecine ont une efficacité limitée contre tous les radicaux libres et ne présentent qu'un effet antioxydant globalement qui peut induire de nombreux effets secondaires défavorables.

C'est donc dans l'optique d'améliorer l'activité thérapeutique d'antioxydants en améliorant leur biodisponibilité et en leur assurant un meilleur ciblage que le laboratoire développe depuis de nombreuses années différents types de structures monomoléculaires amphiphiles capables de transporter un principe actif dans l'organisme par modulation de sa balance hydrophile-lipophile. Ce greffage permet de mieux contrôler son passage transmembranaire et par là sa biodisponibilité.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont consisté à poursuivre cette thématique de recherche en modulant l'activité de deux classes bien particulières d'anti-radicaux artificiels : les nitrones et les nitroxydes. Dans un premier chapitre, consacré à une introduction bibliographique, seront détaillées les différentes propriétés antioxydantes que possèdent ces deux classes d'agents anti-radicalaires utilisables contre le stress oxydant. Puis, dans un second chapitre seront développés les travaux réalisés plus particulièrement sur la vectorisation de nitroxydes, avant de poursuivre dans un troisième chapitre par les études menées sur la vectorisation d'une nitronne bien connue : l' α -Phényl-N-tert-Butyl-Nitronne (PBN). Enfin, quelques perspectives d'avenir seront évoquées dans un quatrième chapitre, consacré au développement de nouveaux transporteurs d'antioxydants potentiels.

Chapitre 1 :

Introduction bibliographique

A. IMPLICATION DES RADICAUX LIBRES DANS LE STRESS OXYDANT	1
1. PRODUCTION PHYSIOLOGIQUE ET REACTIVITE DES EOR/EAR	1
2. LES SYSTEMES DE DEFENSE CELLULAIRE	7
3. LE STRESS OXYDANT	9
B. UN PREMIER TYPE D'ANTI-RADICALAIRE ARTIFICIEL : LES NITROXYDES	11
1. PRESENTATION GENERALE DES NITROXYDES CYCLIQUES ET DE LEUR UTILITE PREMIERE	11
2. UTILISATION DES NITROXYDES POUR LEURS PROPRIETES ANTIOXYDANTES,	13
C. UN SECOND TYPE D'ANTI-RADICALAIRE ARTIFICIEL : LES NITRONES	16
1. UTILISATION DANS LA TECHNIQUE DE PIEGEAGE DE SPIN	16
2. UTILISATION EN TANT QU'AGENTS A PROPRIETES THERAPEUTIQUES : EFFETS PROTECTEURS DE LA PBN	22
3. BIODISPONIBILITE ET TOXICITE DE LA PBN	25
D. NOUVEAUX AGENTS NITRONES/NITROXYDES A CAPACITE SUPERIEURE DE CIBLAGE	26
1. PRINCIPE GENERAL DE LA « VECTORISATION »	26
2. CIBLAGE DE LA MITOCHONDRIE	27
3. CIBLAGES DES LIPIDES	31
E. LA MODULATION DE LA BALANCE HYDROPHILE-LIPOPHELE D'ANTIOXYDANTS SYNTHETIQUES COMME STRATEGIE DE VECTORISATION	33
1. LES ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA PBN	34
2. MODULATION DE LA BHL D'ANTIOXYDANTS PAR GREFFAGE SUR UNE STRUCTURE AMPHIPHILE	38
F OBJECTIFS DE NOS TRAVAUX	41

A. Implication des radicaux libres dans le stress oxydant

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique, de ce fait cette espèce est généralement extrêmement réactive et a tendance à capter un électron pour saturer cette case quantique à deux électrons. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont soit un électron célibataire centré sur un atome d'oxygène, ce qui leur confère la dénomination d'espèces oxygénées réactives (EOR), soit centré sur un atome d'azote, d'où l'appellation d'espèces azotées réactives (EAR).

1. Production physiologique et réactivité des EOR/EAR

1.1. Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant

1.2.1. Les espèces réactives centrées sur l'oxygène

La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O_2) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre à l'état fondamental, en raison de ces deux électrons célibataires (de spin parallèle) situé sur les deux orbitales de plus grande énergie. Cette structure biradicalaire confère donc à la molécule d'oxygène la capacité d'accepter facilement un ou deux électrons célibataires pour donner naissance à des espèces partiellement réduites.

C'est ainsi qu'en acceptant un électron supplémentaire la molécule O_2 se réduit en radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). La production du radical superoxyde ne constitue pas en soit un réel danger, du fait de sa faible réactivité. Toutefois, les réductions en cascades qui suivent et qui le transforment en différentes espèces réactives sont quant à elles responsables de sa grande toxicité indirecte (Figure 1-1).

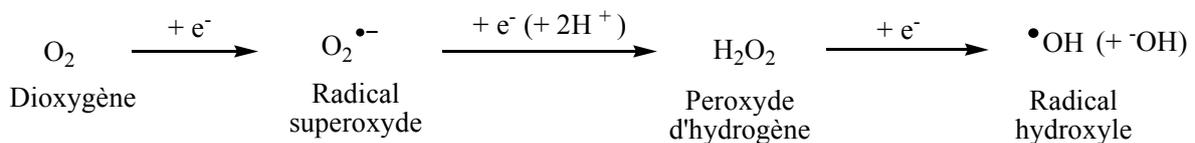


Figure 1-1. Les réactions de réduction monoélectronique issues du dioxygène

En effet, la réduction monoélectronique du superoxyde en présence de deux molécules d'hydrogène mène à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier n'est pas un radical libre mais un oxydant puissant dont la toxicité est bien supérieure à celle du radical superoxyde. Il est effectivement capable, contrairement au superoxyde, de traverser les

membranes des cellules et des organites cellulaires, entraînant de ce fait des dommages sur divers composants cellulaires loin de son site de production.¹ Cependant, sa réactivité reste généralement limitée et c'est son intervention directe dans la production du radical hydroxyle (HO^\bullet) qui le rend tout particulièrement dangereux.

De plus, la réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène entraîne la production du radical hydroxyle qui est quant à lui le radical oxygéné le plus réactif, possédant des vitesses de réaction variant de 10^8 à $10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ associées à un caractère oxydant très fort. Sa formation peut provenir de différents mécanismes mais c'est essentiellement la réaction de Fenton,^{2,3} se produisant en présence de métaux de transition comme Fe^{2+} ou Cu^+ qui est responsable de la production de radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène (Figure 1-2). On peut également mentionner la réaction d'Haber-Weiss, au cours de laquelle l'anion superoxyde peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, avec ou sans catalyse par des métaux de transition (Figure 1-2).



Figure 1-2. Réaction de Fenton (en haut) et réaction d'Haber-Weiss (en bas)

C'est ainsi que, le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle font partie de la famille des espèces oxygénées réactives (EOR), espèces beaucoup plus réactives que le dioxygène dont elles dérivent.

A titre indicatif, il existe également d'autres EOR telles que les radicaux peroxydes RO_2^\bullet , les hydroperoxydes RO_2H ainsi que les radicaux alkoxydes RO^\bullet .⁴

1.2.2. Les espèces réactives azotées

Au cours de la dernière décennie, un radical azoté a pris une place considérable dans le champ de la biologie, il s'agit du monoxyde d'azote ($\text{}^1\text{NO}$).⁴ Le $\text{}^1\text{NO}$ est synthétisé à partir d'un atome d'azote du radical guanidium de l'acide aminé L-arginine et d'une molécule d'oxygène. Comparé à d'autres composés radicalaires, le $\text{}^1\text{NO}$ est caractérisé par une grande diffusibilité à travers les membranes cellulaires et une réactivité limitée liée aux caractéristiques de l'orbitale sur laquelle évolue son électron célibataire. Ce radical possède de

nombreux effets régulateurs et protecteurs qui s'exercent sur la plupart des grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Cependant, son implication dans la survenue de nombreuses pathologies témoigne de son rôle paradoxalement délétère.

En effet, de fortes concentrations en $\cdot\text{NO}$ font que ce radical interagit avec le radical anion superoxyde formé au niveau mitochondrial (Figure 1-3). Cette réaction se réalise très rapidement ($k = 4.10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) pour conduire à l'anion peroxy-nitrite, un oxydant puissant des tissus biologiques qui diffuse largement à travers les membranes pour étendre sa toxicité au-delà de son site de production.^{5,6} De plus, l'anion peroxy-nitrite ainsi formé peut ensuite se décomposer à pH physiologique pour conduire à deux radicaux, le radical hydroxyle et le radical nitro (Figure 1-3).⁷ Cependant, bien que cette réaction ait été observée *in vitro*, elle ne semble pas prépondérante. Les réactions entre le peroxy-nitrite et les groupements thiols ou ascorbate seraient en effet privilégiées par rapport à sa décomposition en radical hydroxyle.

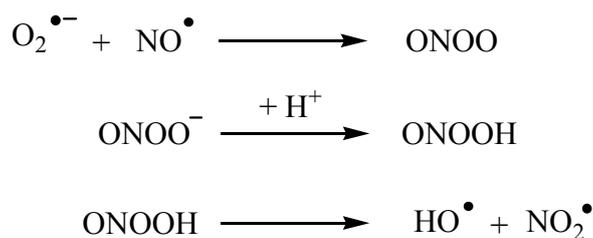


Figure 1-3. Formation et décomposition de l'anion peroxy-nitrique

1.2. Sites de production physiologique

La production d'EOR et EAR dans les cellules mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et découle de plusieurs sources possibles localisées dans différents lieux de l'organisme.

1.2.1. Sites de production des espèces oxygénées réactives

Les radicaux libres centrés sur l'oxygène sont principalement formés au cours du processus de respiration cellulaire, se déroulant dans la membrane mitochondriale interne. Au cours du processus normal de réduction de l'oxygène au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale, celui-ci est quasi intégralement converti par capture de quatre électrons en molécules d'eau. Cette chaîne mitochondriale de transport des électrons permet en effet d'oxyder des coenzymes réduits (NADH , H^+) et des flavoprotéines réduites (FADH_2) afin de libérer de l'énergie servant à la synthèse d'ATP. L'oxydation de ces coenzymes s'accompagne

d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, transitent jusqu'à l'oxygène moléculaire O_2 , accepteur terminal de la chaîne (Figure 1-4).

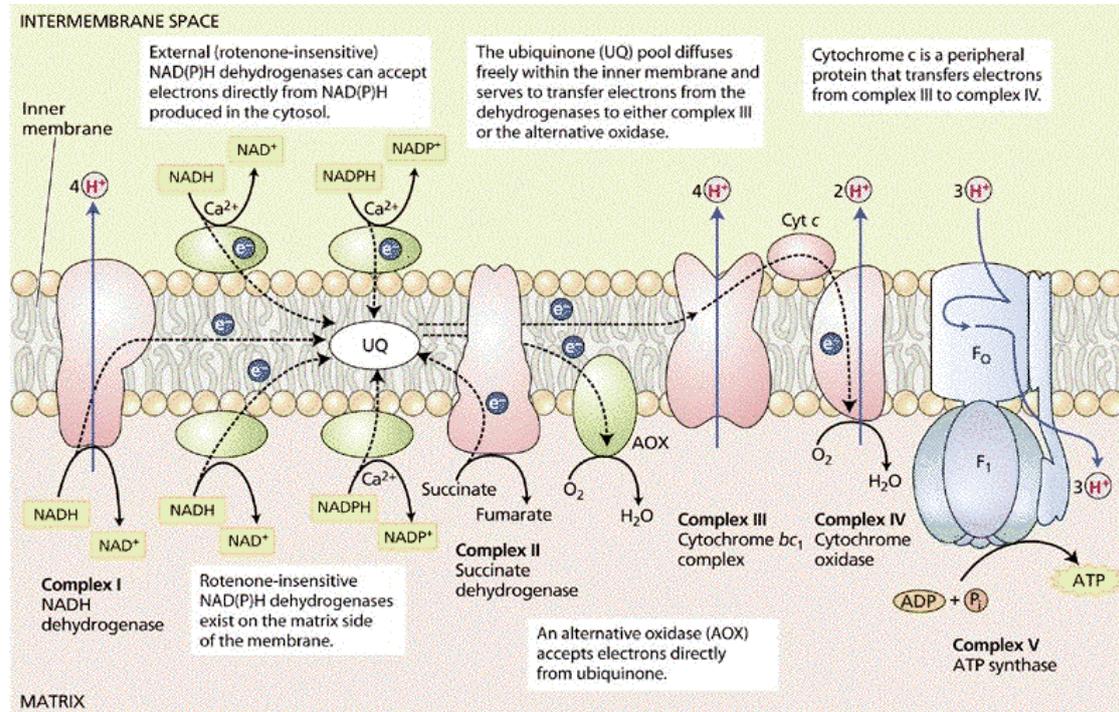


Figure 1-4. Chaîne mitochondriale de transport d'électrons

Cependant, une fuite d'environ 1 à 4 % des électrons transportés le long de cette chaîne se produit au niveau des complexes I et III,^{8,9} entraînant la production du radical superoxyde par réduction monoélectronique de l'oxygène dissout dans la matrice mitochondriale. Comme nous venons de le mentionner, il s'en suit alors une cascade de réductions en chaîne conduisant à la formation d'autres EOR bien plus nocives et réactives que le superoxyde lui-même.

En temps normal, la production mitochondriale d'anion superoxyde a été estimée à environ 150 mmoles par jour chez l'humain,^{1,10} en dehors de toute activité physique intense.¹¹ Cependant, cette production d'anion superoxyde peut s'intensifier avec une augmentation de l'activité de la mitochondrie, lors d'un apport en nutriments, d'un accroissement de l'apport d'oxygène^{12,13} ou encore avec l'âge.¹⁴

Ces espèces oxygénées réactives peuvent également être formées, en quantité moindre, à l'intérieur d'autres organites cellulaires. C'est notamment le cas dans le noyau, où la membrane nucléaire possède des cytochromes oxydases ainsi qu'une chaîne de transport des

électrons, dont la fonction physiologique est inconnue. L'activité de cette dernière est toutefois beaucoup plus faible que celle de son homologue mitochondriale, mais une perte d'électrons peut également intervenir et amener à la formation de l'anion superoxyde. De même, c'est à l'intérieur de lysosomes, de peroxysomes ou encore du réticulum endoplasmique lisse que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou l'acide hypochloreux peuvent être formés et conduire à leur tour à de nombreuses EOR.

1.2.2. Sites de production des espèces azotées réactives

Les radicaux libres centrés sur l'azote ne sont quant à eux pas formés à un endroit précis de l'organisme. En effet les monoxydes d'azote synthases (NOS) responsables de la synthèse du $\cdot\text{NO}$ par transformation enzymatique de la L-arginine, comportent trois isoenzymes qui diffèrent entre elles par leur localisation au sein de l'organisme. Il existe deux NOS constitutives dont l'une est associée à la membrane plasmique et à l'appareil de Golgi, dans de nombreuses cellules parmi lesquelles les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules rénales. La seconde prédomine dans le cytosol des cellules du système nerveux central et périphérique. Enfin, la NOS inductible est présente dans le cytosol des macrophages, des hépatocytes, des polynucléaires neutrophiles, des cellules des îlots pancréatiques et des cellules endothéliales. De plus, le monoxyde d'azote formé dans ces lieux divers diffuse très rapidement au travers des membranes cellulaires, pouvant par conséquent endommager de nombreux constituants cellulaires et surtout réagir avec de nombreux radicaux libres pour former à son tour des EAR, puis des EOR.

1.3. Les cibles

Les cibles privilégiées de ces EOR et EAR sont les biomolécules essentielles au fonctionnement cellulaire comme l'ADN, les protéines et les lipides constitutifs des membranes.

1.3.1. Les lipides¹⁵

Les lipides sont des composés particulièrement sensibles à l'oxydation et aux attaques radicalaires. En effet, les acides gras insaturés peuvent subir une réaction d'oxydation en chaîne initiée par des radicaux libres, nommée peroxydation lipidique. Ce phénomène présente une grande dangerosité vis-à-vis du fonctionnement cellulaire puisqu'il constitue une chaîne de réactions radicalaires qui se propage, s'amplifie et augmente les effets des radicaux en formant des produits encore plus réactifs. C'est notamment le cas de deux aldéhydes formés, le 4-hydroxynonéal (4-HNE), particulièrement toxique vis-à-vis des protéines, ainsi que le malonaldéhyde (MDA), capable d'altérer de nombreuses biomolécules.^{16,17} De plus, au

fur et à mesure que ces réactions radicalaires progressent, les canaux ioniques membranaires sont perturbés et le transport de protéines ou d'enzymes est inactivé, ce qui conduit inévitablement à la dégradation des membranes. Par conséquent, la peroxydation lipidique est un processus qui, en plus de faire perdre l'intégrité et la fonction de barrière sélective de la membrane, conduit à la formation de nombreux sous-produits toxiques très réactifs, qui s'attaquent aux autres biomolécules constitutives de la cellule.

1.3.2. Les acides aminés et les protéines¹⁸

Les protéines, et de ce fait les acides aminés qui les constituent, sont aussi des biomolécules particulièrement sensibles aux radicaux libres. En effet, il a été estimé que les protéines peuvent piéger entre 50 et 70 % des espèces radicalaires générées par une cellule et les dommages sont de plusieurs types :

- l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés, mais également la nitration de certaines d'entre elles,^{19,20}
- l'oxydation de la chaîne polypeptidique suivie d'une fragmentation et/ou de la formation de pontages intra- ou inter-chaînes,
- la production de dérivés carbonylés par réaction avec des aldéhydes, et notamment ceux produits lors de la peroxydation lipidique (MDA et 4-HNE).^{21,22}

C'est ainsi que lorsque les protéines atteintes sont de nature enzymatique, leur fonctionnalité et par conséquent leur activité biologique est perdue, à cause de modifications de leur structure tridimensionnelle engendrée par ces dommages. Les protéines dénaturées sont ensuite éliminées car il n'existe pas, sauf dans de rares cas, de système réparateur de protéines. De plus, une fois oxydées ces protéines deviennent plus sensibles à l'action des protéases, enzymes chargées de l'élimination des protéines.¹⁹

1.3.3. L'ADN²³

L'ADN, support de l'information génétique d'un organisme, est également un substrat particulièrement sensible aux radicaux libres. On peut effectivement dénombrer au moins cinq catégories de dommages causés à l'ADN, qui sont :

- l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques,
- la formation de sites abasiques par attaque de la liaison entre la base et le désoxyribose,
- la formation d'adduits intra-caténaux par réaction entre les bases de l'ADN²⁴ et les produits de la peroxydation lipidique²⁵ (comme le MDA),

- les cassures simple et double-brin par attaque du sucre lui-même,
- les pontages ADN-protéines.

L'oxydation des bases est toutefois le phénomène le plus largement étudié car ces dernières sont très sensibles à l'oxydation et notamment, la guanine, qui se transforme en 8-oxo-guanine, un des marqueurs reconnus du stress oxydant.²⁶ Il est toutefois important de noter que les lésions causées à l'ADN nucléaire peuvent être réparées, tant qu'elles se produisent en quantité raisonnable, alors que l'ADN mitochondrial d'un même tissu connaît quant à lui des taux de dégradation dix fois supérieurs. Cette relative fragilité s'explique par plusieurs facteurs : un système enzymatique réparateur moins développé, la fragilité de l'ADN mitochondrial suite à l'absence d'enroulement sur les histones et bien entendu la proximité de ce matériel génétique avec la chaîne respiratoire productrice d'EOR.

2. Les systèmes de défense cellulaire

Dans le but de répondre à ces fuites d'électrons, inhérentes au fonctionnement de notre organisme, les cellules se sont dotées d'un système de défense permettant de neutraliser les EOR produites en conditions normales lors de la respiration cellulaire. La cellule est en effet capable de se débarrasser de ces espèces toxiques par le biais de deux mécanismes de défense qui fonctionnent en parallèle : des enzymes antioxydantes ou des antioxydants exogènes.

2.1. Système endogène

L'organisme a ainsi développé au sein de chaque cellule un système antioxydant enzymatique, constitué de trois classes d'enzymes spécialisées : les superoxydes dismutases (SOD), les catalases (Cat) et les glutathions peroxydases (GPx) ainsi que d'autres enzymes qui lui sont associés.

2.1.1. Les superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en molécule de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Par ce processus, les SOD s'attaquent directement à la base du processus oxydatif engendré par la respiration cellulaire. Chez les eucaryotes, la SOD est ubiquitaire et elle représente une famille de métalloprotéines où les métaux sont liés à quatre résidus histidine. On distingue au sein de cette famille trois isoenzymes (SOD1, SOD2, SOD3) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire.

2.1.2. Les catalases

Les catalases sont des hémoprotéines (protéines à hème) qui complètent l'action des SOD en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en molécules d'eau et de dioxygène. Chez la plupart des cellules aérobies, la catalase est essentiellement présente dans les érythrocytes, les hépatocytes et les reins alors qu'elle existe en quantité beaucoup plus faible dans le cerveau ou le cœur.

2.1.3. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases sont des séléno-enzymes qui présentent, tout comme les catalases, une action complémentaire des SOD en catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau ou d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en alcools. Leur activité nécessite la présence d'un cofacteur, le glutathion réduit (GSH), un tripeptide constitué d'une cystéine qui au cours de la réaction va être transformé en glutathion oxydé (GSSG). Une seconde enzyme, la glutathion réductase (GR), permet de régénérer par la suite le GSSG en GSH par oxydation d'un autre cofacteur, le NADPH. Le NADP⁺ produit est à son tour régénéré en NADPH par une troisième enzyme, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD). Il est important de noter que la GPx n'est pas spécifique du peroxyde d'hydrogène mais que les hydroperoxydes minéraux ou organiques sont également des substrats possibles, elle reste en revanche spécifique du glutathion.

La figure 1-5 ci-dessous résume très clairement le système antioxydant enzymatique chez les eucaryotes.

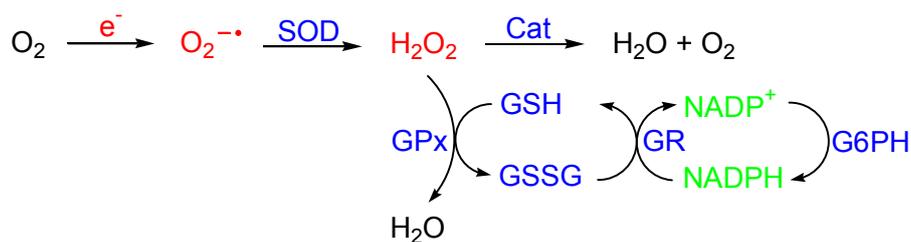


Figure 1-5. Détoxification des EOR par voie enzymatique

Il est alors très intéressant de remarquer qu'au sein de ce système de défense endogène, aucune enzyme antioxydante n'est responsable de la détoxification du radical hydroxyle, pourtant le plus réactif. De fait, il est important de mentionner que des systèmes non enzymatiques sont également présents dans les organismes vivants, afin de fonctionner de

concert avec le système enzymatique dans la lutte vis-à-vis de EOR/EAR. Parmi les principaux antioxydants non enzymatiques endogènes on peut citer le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles (oestrogènes), l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque.

2.2. Système exogène

Cette classe d'antioxydants exogènes (ou capteurs de radicaux libres) regroupe des micros nutriments tels les vitamines (E ou C), les polyphénols, les caroténoïdes mais également certains métaux tels le zinc et le sélénium qui sont apportés par l'alimentation.

Certains de ces antioxydants sont régénérables et se comportent comme des agents catalytiques, et donc de ce fait capables d'éliminer un grand nombre de radicaux. C'est le cas notamment de la vitamine E.

3. Le stress oxydant

En absence de conditions pathologiques, la production physiologique d'EOR est donc maîtrisée par le système de défense naturel et on dit dans ces circonstances que la balance prooxydants/antioxydants est en équilibre. Malheureusement, une rupture de ce précaire équilibre peut conduire les cellules dans un état de stress oxydant. L'intérêt pour le stress oxydant en biologie a vu le jour, il y a une cinquantaine d'années, lorsqu'en 1956 Denham Harman, un chercheur américain, émit l'hypothèse que le vieillissement serait en partie dû à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les radicaux libres.

3.1. Définition

L'état de stress oxydant est donc défini comme une rupture de l'équilibre entre la production dite « normale » d'espèces prooxydantes et la consommation de ces espèces par le système antioxydant. Cette rupture d'équilibre peut avoir des origines multiples. Par exemple une surproduction d'EOR/EAR, pourra être observée lors d'une exposition à des radiations, une intoxication aux métaux lourds, une consommation excessive d'alcool, mais également en association avec le tabagisme. Le déséquilibre de la balance prooxydants/antioxydants peut également résulter d'une défaillance du système de défense lors de carences nutritionnelles ou d'anomalies génétiques responsables du mauvais codage d'une protéine antioxydante. La rupture de cet équilibre va se traduire par une attaque de tous les constituants cellulaires par les radicaux libres, ainsi que par une toxicité secondaire due au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés.

3.2. La mort cellulaire programmée par apoptose

A ce jour, il est évident que l'état de stress oxydant et donc la surproduction d'EOR/EAR sont directement impliqués dans le déclenchement d'un processus de mort cellulaire programmée plus connu sous le nom d'apoptose.^{27,28,29} Cette mort cellulaire programmée rapide est utilisée en permanence par l'organisme afin de renouveler les cellules qui le composent, sans entraîner ni inflammation ni lésion dans les tissus où ces cellules disparaissent. Ce processus se caractérise ainsi par une destruction organisée de la cellule, à l'inverse de la nécrose qui est définie comme une mort accidentelle.

On dénombre différents facteurs induisant le déclenchement de l'apoptose (substances toxiques, atteintes de l'ADN, transmission d'un signal de mort...), mais la présence d'espèces radicalaires fait partie de l'un des principaux facteurs. En effet, la présence d'espèces oxydantes en quantité anormale stimule le facteur de transcription NF- κ B, qui est en temps normal présent dans le cytoplasme sous sa forme inactive.³⁰

L'apoptose est donc un phénomène que la plupart voire que la totalité des cellules peuvent développer, cependant l'engagement dans cette voie d'autodestruction nécessite une parfaite régulation entre des facteurs activateurs et inhibiteurs pour la bonne survie d'un organisme. Par conséquent, toute stimulation anormale de ce phénomène par un état de stress oxydant conduit à une perte cellulaire excessive néfaste pour l'organisme. C'est notamment le cas dans les syndromes d'ischémie reperfusion et d'immunodéficience, mais également celui de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson.

3.3. Pathologies et désordres associés au stress oxydant

La plupart des maladies liées au *stress oxydant* apparaissent progressivement avec l'âge car les processus de vieillissement cellulaire entraînent une hyperproduction mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'une baisse des défenses anti-oxydantes.³¹ C'est ainsi que les recherches menées au cours des dernières décennies ont montré qu'un grand nombre de pathologies liées à l'âge, parmi lesquelles le cancer, les maladies neurodégénératives, les démences, les cataractes ainsi que le déclin de la fonction immunitaire, seraient favorisées par l'accumulation de radicaux libres.³²

Les cytopathies mitochondriales, qui regroupent une grande variété de maladies dont la source commune est un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale, sont également associées à des phénomènes de stress oxydant. Ces cytopathies recouvrent un très grand nombre de présentations cliniques, en particulier chez l'enfant³³ mais également chez

l'adulte.³⁴ De plus, du fait de la présence ubiquitaire des mitochondries dans l'organisme, les déficits de la chaîne respiratoire peuvent affecter le fonctionnement de n'importe quel organe. L'atteinte peut être isolée ou, au contraire, pluriviscérale ayant alors généralement une dominante neuromusculaire.

Par conséquent, compte tenu de la grande réactivité des radicaux libres et de leur implication dans de nombreux phénomènes pathologiques, les chercheurs ont tenté de développer des molécules aux propriétés antiradicalaires et antioxydantes en tant qu'agents à propriétés thérapeutiques. C'est ainsi que nous sommes venus à nous intéresser à deux classes d'antioxydants artificiels très couramment employées : les nitroxydes et les nitrones.

B. Un premier type d'anti-radicalaire artificiel : les Nitroxydes

1. Présentation générale des nitroxydes cycliques et de leur utilité première

1.1. Qu'est-ce qu'un nitroxyde cyclique?

Les nitroxydes cycliques sont des radicaux libres, c'est-à-dire présentant un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche de valence. Ils sont caractérisés comme des radicaux libres particuliers car ils sont persistants, voir même stables pour certains, avec une durée de vie pouvant dépasser plusieurs années lorsqu'ils sont conservés sous forme solide. Cette propriété de persistance est liée à leur structure électronique particulière caractérisée par la présence d'une liaison π à 3 électrons entre les atomes d'azote et d'oxygène, l'électron non apparié occupant une orbitale anti-liante π^* . De plus, la présence des deux groupements méthyles en α de la fonction aminoxyle permet d'augmenter la stabilité. Les nitroxydes cycliques les plus couramment utilisés sont de type pipéridique (à gauche) ou pipéridinique (à droite), (Figure 1-6).



Figure 1-6. Structures chimiques des nitroxydes les plus classiques

Ces composés peuvent lors de transformations redox monoélectroniques se présenter sous forme d'hydroxylamine et de cation oxoammonium (Figure 1-7).

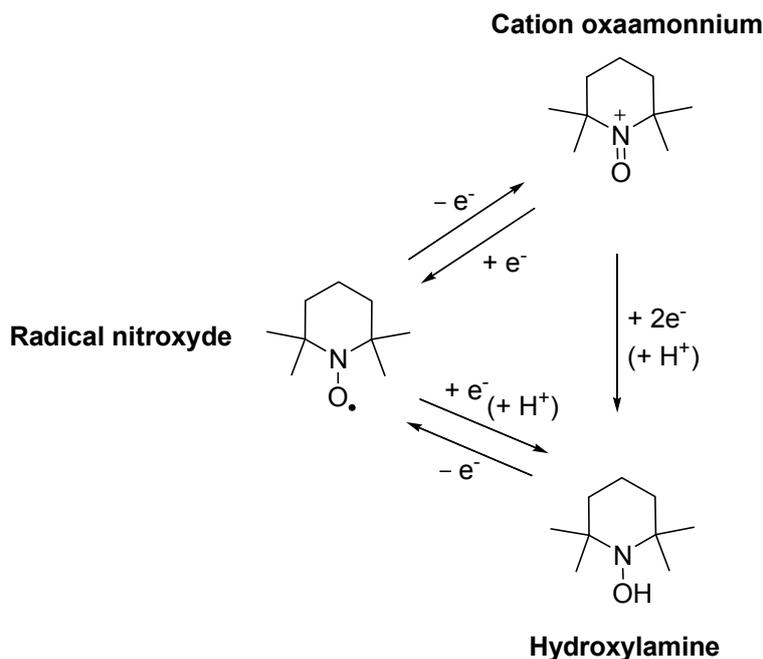


Figure 1-7. Les trois états redox des nitroxydes cycliques

Les nitroxydes cycliques ont longtemps été utilisés comme sondes en résonance paramagnétique électronique (RPE) du fait de leur grande stabilité et de leur nature paramagnétique.

1.2. Les nitroxydes cycliques en RPE

1.2.1. Définition de la RPE

La résonance paramagnétique électronique (RPE), également connue sous le nom de résonance de spin électronique, est une technique spectroscopique qui permet d'étudier et de détecter les espèces comportant un ou plusieurs électrons célibataires. Sa capacité à détecter de faibles concentrations de radicaux (10^{-8} M) et sa sensibilité au mouvement et à l'environnement moléculaire, ont contribué grandement à sa popularité. Un des avantages de cette méthode est que seules les espèces paramagnétiques sont détectables, ce qui la rend très utile pour l'étude des systèmes complexes tels que les milieux biologiques. La RPE peut ainsi être comparée à un filtre qui ne rendrait observable que les substances paramagnétiques, sans affecter ni interagir avec le système étudié.

1.2.2. Utilisation des nitroxydes en tant que sondes en milieu biologique

Comme nous venons de le mentionner, l'environnement redox de nos cellules est très sensible à un excès d'espèces prooxydantes qui peut conduire à un état de stress oxydant. Ce

phénomène étant à l'heure actuelle impliqué (ou soupçonné) dans de nombreux désordres pathologiques, toute technique qui permettrait de quantifier et de visualiser l'environnement redox en milieu biologique serait un outil essentiel dans la détermination du lien existant entre l'état de *stress oxydant* et ces différentes pathologies. De plus, cette technique pourrait également permettre de déterminer l'efficacité thérapeutique d'antioxydants administrés en milieu biologique.

C'est pour ces raisons que des radicaux stables tels que les nitroxydes ont été utilisés en milieu biologique dans les années 80. Dans un premier temps, des études menées en RPE ont servi à mesurer la répartition tissulaire et cellulaire de molécules dotées d'une sonde de type nitroxyde. Par la suite, des études cinétiques en RPE ont permis de mesurer l'état redox de tissus en utilisant la capacité qu'ont les nitroxydes à se réduire en hydroxylamine.³⁵ En effet, les formes hydroxylamines ne fournissant aucun signal en RPE, il est très facile de quantifier et de visualiser au cours du temps la réduction d'un nitroxyde par disparition de son signal RPE.

2. Utilisation des nitroxydes pour leurs propriétés antioxydantes^{36,37}

L'intérêt des nitroxydes en tant qu'agents protecteurs est apparu plus récemment, dès lors qu'on s'est rendu compte que ces composés prévenaient les dommages oxydants sur des modèles cellulaires³⁸ et animaux.³⁶

2.1. Propriétés antiradicalaires et antioxydantes des nitroxydes

2.1.1. Mimétiques des enzymes SOD et Cat

Les nitroxydes sont tout particulièrement capables, au même titre que les SOD, de prévenir la formation de l'anion superoxyde³⁹ selon deux mécanismes qui sont :

- la réduction du nitroxyde en hydroxylamine, celle-ci pouvant être, selon un cycle catalytique, réoxydée en nitroxyde par une seconde molécule de superoxyde,⁴⁰
- l'oxydation du nitroxyde en cation oxammonium, celui-ci pouvant être, selon le même cycle catalytique, réduit en nitroxyde par une molécule de superoxyde.⁴¹

Ces deux processus en chaîne sont représentés sur la figure 1-8. L'équation bilan de chacun révèle bien une dismutation, puisque deux molécules de superoxyde conduisent à une molécule de dioxygène et à une molécule de peroxyde d'hydrogène comme dans le cas du mécanisme d'action des SOD. C'est la raison pour laquelle les nitroxydes sont considérés comme des mimétiques des enzymes SOD.

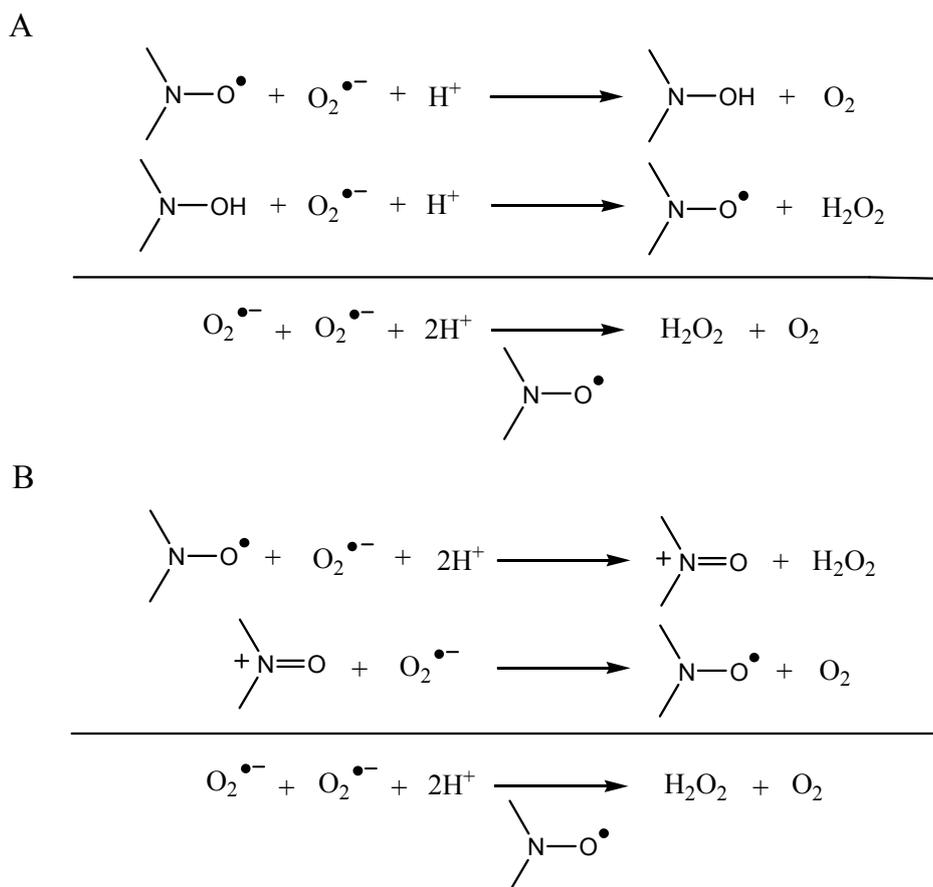


Figure 1-8. Dismutation du superoxyde par les nitroxydes *via* leur réduction en hydroxylamines (A) et *via* leur oxydation en cation oxammonium (B).

Ainsi, en éliminant le radical anion superoxyde, première espèce réactive issue de la réduction incomplète de l'oxygène, les nitroxydes bloquent les réactions en chaînes responsables de la production des autres EOR. De plus, il semblerait que la réduction du nitroxyde en cation oxammonium puis sa réoxydation en nitroxyde par une molécule de superoxyde, soit un processus plus rapide que l'action des SOD elles-mêmes.⁴² Par ailleurs, le mode d'action catalytique des nitroxydes permet d'envisager une activité protectrice même à de très faibles concentrations, ces radicaux étant régénérés à chaque cycle.

Les nitroxydes ont également démontré qu'ils pouvaient induire une activité semblable à celle des catalases, en protégeant des cellules de mammifères exposées au peroxyde d'oxygène et à des peroxydes organiques.⁴³

2.1.3. Inhibition de la peroxydation lipidique⁴⁴

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, la peroxydation lipidique est un processus de dégradation en chaîne des lipides, qui détériore les membranes. Ce processus

d'auto-oxydation est une réaction radicalaire composée de trois étapes principales qui sont successivement : l'initiation, la propagation et la terminaison. Les nitroxydes et les hydroxylamines peuvent stopper la peroxydation lipidique en participant à des réactions redox à différentes étapes du mécanisme. En effet, il a été démontré qu'ils pouvaient inhiber l'étape d'initiation en neutralisant l'amorceur radicalaire ainsi que retarder l'étape de propagation en réagissant avec les radicaux lipidiques oxydés.

2.1.4. Inhibition des réactions de Fenton³⁹ et d'Haber Weiss

Les réactions de Fenton sont dans la plupart des cas à l'origine de la formation du radical hydroxyle HO[•], une espèce radicalaire particulièrement délétère. Les nitroxydes sont capables de limiter la formation du radical hydroxyle, par les réactions de Fenton, en acceptant un électron d'un atome de Fer sous sa forme réduite Fe²⁺ suivant le mécanisme de la figure 1-9.⁴⁵ Par conséquent, ils inhibent la formation des radicaux HO[•] en se substituant aux molécules de peroxyde d'hydrogène, qui réagissent en temps normal avec ces métaux de transition.

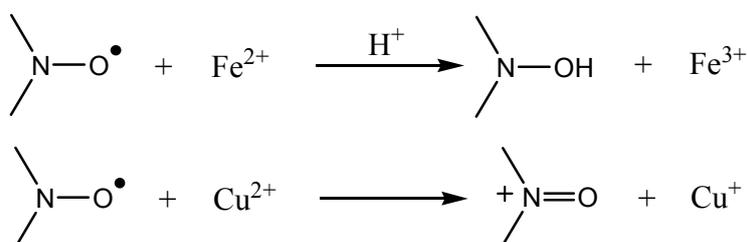


Figure 1-9. Réaction des nitroxydes avec Fe²⁺ et Cu²⁺

Les nitroxydes sont effectivement capables de réagir avec d'autres métaux de transition. Lors de ce processus, les nitroxydes agissent comme des oxydants qui maintiennent les métaux dans leur plus haut état d'oxydation, empêchant la réaction d'Haber-Weiss d'avoir lieu. Mais, les nitroxydes peuvent également agir en absence de réducteur tel le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, lors de ce second processus, les nitroxydes agissent comme des réducteurs capables de réagir avec les ions Cu²⁺, limitant la réaction d'Haber-Weiss (Figure 1-9).⁴⁶

2.1.6. Inhibition des dommages dus à des radiations

Les travaux de Krishna *et al.* ont démontré que les nitroxydes offraient une radioprotection dès plus significative, alors que leurs formes hydroxylamines en étaient quasiment dépourvues.³⁸ Cette activité radioprotectrice semble dépendre en partie de la

facilité que possède les nitroxydes à pénétrer dans les cellules, grâce à leur faible poids moléculaire (~200 Da), mais également à leur affinité pour d'éventuelles molécules cibles.⁴⁷

En conclusion, de par leur dualité d'action, les nitroxydes présentent des propriétés intéressantes dans la lutte contre les phénomènes de stress oxydant en renforçant le système de défense cellulaire lorsque celui-ci est soumis à une surproduction de radicaux libres.

C. Un second type d'anti-radicalaire artificiel : Les Nitrones

1. Utilisation dans la technique de piégeage de spin

Les radicaux libres, de courte durée de vie, relèvent de systèmes réactionnels où leur concentration instantanée est très faible du fait de leur haute réactivité. Ainsi, ce problème majeur est rencontré lors de la détection et la mise en évidence d'espèces radicalaires dans les milieux vivants. En effet, très peu d'intermédiaires radicalaires impliqués dans les processus biologiques ont une durée de vie suffisante dans les conditions physiologiques pour maintenir une concentration stationnaire supérieure ou égale au seuil de détection RPE. L'observation RPE devient donc difficile et on fait ainsi généralement appel à une méthodologie de piégeage des radicaux, encore appelée spin trapping, qui permet la formation d'adduits radicalaires plus stables et donc plus faciles à mettre en évidence.

1.1. Principe du spin trapping

Dès son apparition à la fin des années 60,^{48,49} la technique de piégeage de spin (ou « spin trapping ») est rapidement appliquée à la détection et à l'identification de radicaux libres de très courte durée de vie. Le principe consiste à additionner au système étudié une molécule diamagnétique, qui va servir à piéger de façon très rapide un radical libre afin de former un nouveau radical (adduit de spin) beaucoup plus stable (Figure 1-10).

C'est ainsi que les espèces radicalaires qui ne sont au départ pas détectables dans le système sont converties en radicaux plus persistants, qui vont quant à eux pouvoir s'accumuler dans le milieu afin d'être étudiés plus facilement. Par conséquent, cette technique offre l'opportunité de simultanément distinguer et quantifier les divers radicaux libres générés dans un milieu biologique. L'étude du spectre RPE de l'adduit de spin formé va permettre de mesurer les constantes de couplage afin de caractériser cet adduit. On distingue alors deux types de constantes : la constante hyperfines a_N , et la constante de l'hydrogène a_H . La valeur de a_H dépend de l'angle dièdre existant entre l'orbitale p de l'atome d'azote, contenant l'électron célibataire, et la liaison C-H avec l'atome d'hydrogène en β . Cette valeur dépend

donc de l'encombrement du radical piégé. La valeur de a_N varie quant à elle selon la polarisation de la liaison N-O et dépend ainsi de l'électronégativité du radical piégé. Les solvants jouent également un rôle important sur la valeur de ces constantes de couplage, suivant leurs polarités.

Une telle technique a ainsi permis d'améliorer la compréhension de processus pathologiques liés au stress oxydant et a vu l'émergence de nouvelles molécules capables de piéger les radicaux libres d'origine biologique : les nitrones.⁵⁰

1.2. Les nitrones utilisées dans le piégeage de spin : cycliques et linéaires

A l'heure actuelle, les nitrones sont une classe de molécules diamagnétiques très couramment utilisée dans la technique de spin trapping. On distingue deux familles de nitronne qui sont les plus couramment employées : les nitrones linéaires de type PBN et les nitrones cycliques de type DMPO. Un exemple de piégeage d'un radical (R^\bullet) par la PBN est représenté sur la figure 1-10.

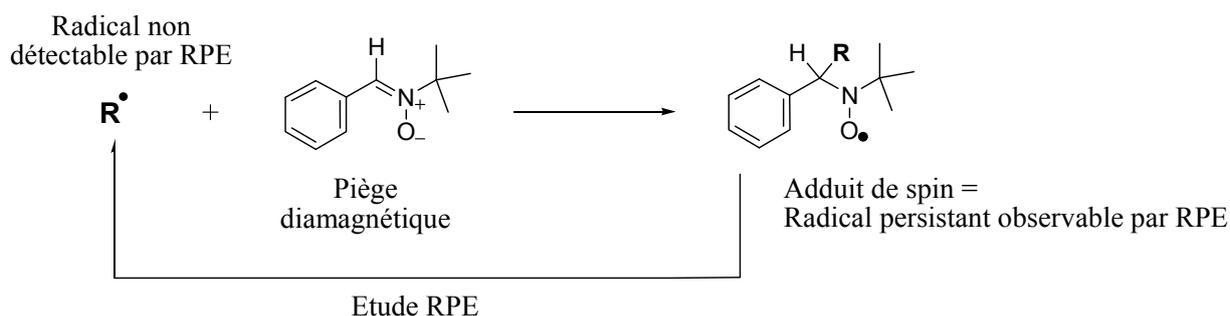


Figure 1-10. Principe de la technique de piégeage de spin par la PBN

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

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

1.2.1. Les spin-traps cycliques

La DMPO est encore actuellement l'un des pièges les plus utilisés,⁵¹ car elle présente d'excellentes propriétés de piégeage des radicaux oxygénés de type hydroxyle, superoxyde et perhydroxyle.^{52,53} En effet, la DMPO réagit avec le radical hydroxyle avec une constante de vitesse de $6,1$ à $8,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,⁵⁴ et avec l'anion superoxyde avec une constante de l'ordre de $1,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁵⁵ De plus, cette nitrone est également capable de piéger des radicaux carbonés de type alkyle,^{56,57} hydroxyalkyle⁵⁸ et alkoxy.⁵⁹ Cependant, malgré la grande capacité que possède cette nitrone cyclique à piéger de nombreux radicaux libres, elle présente quelques limitations comme :

- sa faible solubilité dans l'eau,
- sa sensibilité aux attaques nucléophile en milieu aqueux ainsi qu'à d'autres réactions de dégradation,
- la très faible stabilité de l'adduit de spin formé par piégeage du radical superoxyde, DMPO-O₂H, qui a la particularité de se décomposer très rapidement en adduit hydroxyle, DMPO-OH, et dont le temps de demi-vie est de 45 secondes en milieux aqueux.^{51,60,61}

C'est ainsi que de nouveaux spin-traps, dérivés de la DMPO, ont été synthétisés afin d'améliorer ses capacités de détection et d'identification de radicaux libre en milieu biologique. L'équipe de Pr. Tordo a ainsi synthétisé un analogue β -phosphorylé de la DMPO, la DEPMPO (2-diéthylphosphono-2-méthyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxyde),^{62,63} qui présente une meilleure aptitude à la capture de radicaux oxygénés que la DMPO tout en formant des adduits de spin plus persistants (Figure 1-11). En effet, l'adduit formé par capture d'un radical superoxyde, DEPMPO-O₂H, ne se réduit pas en adduit hydroxyle comme cela se produit avec la DMPO. De plus, son temps de demi-vie est de 14,8 minutes en milieu aqueux, environ 20 fois plus persistant que celui formé par la DMPO. Enfin, la DEPMPO comme la DMPO, sont susceptibles de piéger des radicaux carbonés dérivant d'un réarrangement de radicaux peroxyde ou d'hydroperoxydes lipidiques.⁶⁴

Par la suite, de nombreux autres spin-traps cycliques ont été synthétisés, toujours dans le but d'augmenter le temps de demi-vie des adduits de spin formés. La figure 1-11 présente quelques analogues, avec notamment :

- la DIPPMPO,⁶⁵
- la Boc-MPO, qui offre notamment de nombreux avantages dans la détection et la caractérisation des radicaux superoxydes mais également des radicaux glutathiyls (GS) en milieu biologique,^{66,67,68,60}
- la EMPO, qui tout comme la DEPMPO forme un adduit EMPO-O₂H plus stable que la DMPO et qui ne se décompose pas en adduits hydroxyles, mais dont le temps de demi-vie de 8,6 minutes en milieu aqueux est tout de même moindre que celui de la DEPMPO,^{68,69,70,71}
- la AMPO, qui forme un adduit AMPO-O₂H dont le temps de demi-vie de 8 minutes est semblable à celui de la EMPO, mais qui possède l'avantage de pouvoir être utilisée dans la détection de nombreux radicaux en milieu aqueux.^{72,73}

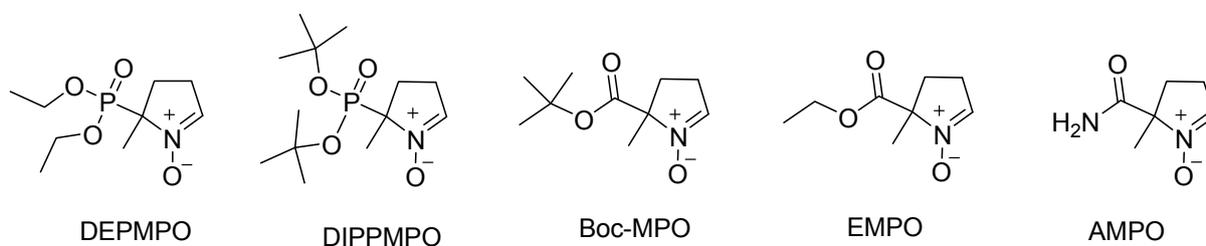


Figure 1-11. Structures chimiques de quelques spin-traps cycliques

Ce travail de synthèse d'analogues de la DMPO a conduit les chercheurs à la conclusion que les nitrones cycliques ayant la possibilité de former des liaisons hydrogènes intra-moléculaires entre la fonction nitroxyde et le substituant positionné en α , sont celles qui donneront les adduits de spin les plus persistants et par conséquent les plus stables.^{72,74}

C'est ainsi que plus récemment deux nitrones cycliques hydrophiles de type DMPO ont été synthétisées, la (5S)-CDMPO et son isomère la (5R)-CDMPO (Figure 1-12).⁷⁵ Dans le but d'augmenter le nombre de liaisons hydrogènes intra-moléculaires pouvant être générées à proximité de la fonction nitrone, la DMPO a été greffée à un groupement β -cyclodextrine, qui est un polyglucoside cyclique (sept glucoses pour la forme β).

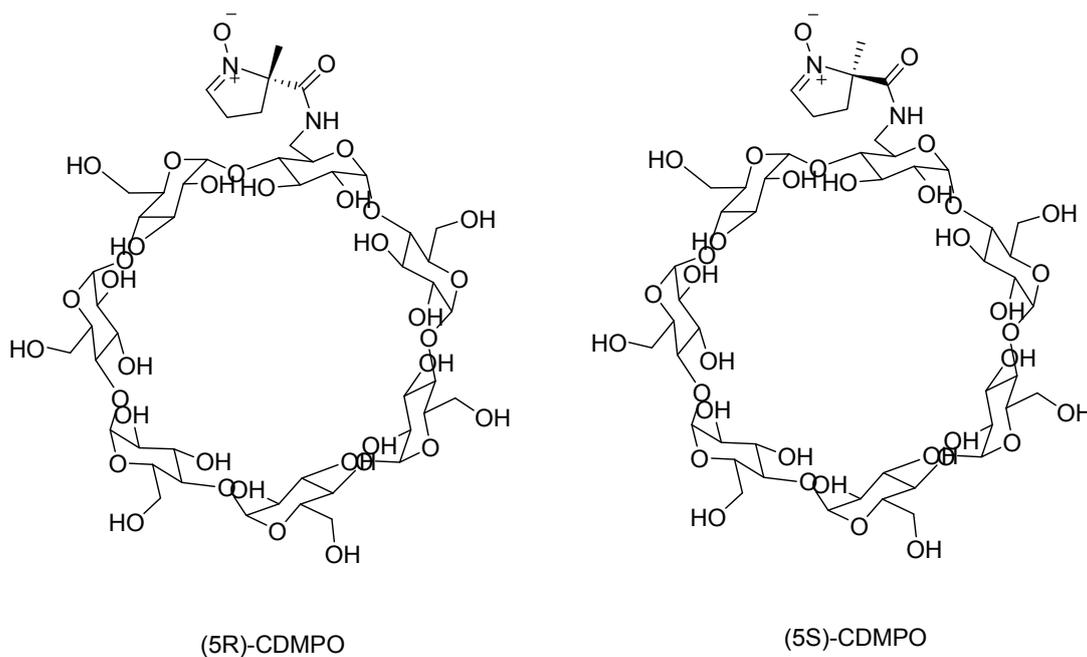


Figure 1-12. Structures chimiques des nitrones (5S)-CDMPO et (5R)-CDMPO

Cette association s'est montrée efficace, puisque la constante de vitesse de piégeage du superoxyde se trouve nettement augmentée, passant de $1,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la DMPO à $58 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour ces deux nitrones β -CDMPO. De plus, le temps de demi-vie de l'adduit (5R)-CDMPO- O_2H , quasiment deux fois supérieur à celui DEPMPO- O_2H , atteint 28 min en milieu aqueux. Cependant, il est important de mentionner que le temps de demi-vie correspondant à son isomère, le (5S)-CDMPO, n'est que de 5 min, ce qui suggère que les liaisons hydrogènes ainsi que les interactions de Van der Waals formées pour l'isomère R seraient plus fortes que pour l'isomère S.

Ainsi, la présence de nombreuses liaisons hydrogènes intra-moléculaires entre la fonction nitroxy et les fonctions hydroxyles présent sur la cyclodextrine permettraient de stabiliser l'adduit de spin formé avec l'isomère R. De plus, il semblerait que l'utilisation d'une jonction amide pour le greffage de la DMPO sur la cyclodextrine soit un avantage considérable qui reste également à exploiter dans le but d'augmenter encore davantage la vitesse de piégeage de futurs spins traps cycliques.⁵⁵

1.2.2. Les spin-traps linéaires

La PBN est également utilisée dans des études de piégeage de spin malgré des propriétés de piégeage plus faibles que son analogue cyclique, conduisant à des adduits de spin moins persistants.⁷⁶ En effet, l'adduit de spin formé par piégeage du radical superoxyde, PBN- O_2H , a un temps de demi-vie de seulement 10 secondes. Cependant, son hydrophobie

plus élevée rend la PBN plus adaptée que la DMPO pour piéger des radicaux carbonés en milieu organique⁷⁷ comme en milieu aqueux.⁷⁸ De plus, cette hydrophobie supérieure lui confère une meilleure distribution tissulaire et une meilleure pénétration transmembranaire lors d'expériences en milieu biologique.

L'équipe du Pr. Tordo a également mis au point un analogue β -phosphorylé de la PBN (Figure 1-13), la PPN (N-benzylidène-1-diéthoxyphosphoryl-1-méthyléthylamine-N-oxyde)^{79,80,81} dont les capacités de piégeage vis-à-vis du radical superoxyde sont augmentées par rapport à la PBN.

De nombreux autres spin-traps linéaires ont ensuite été synthétisés dont la EPPN (N-2-(2-ethoxycarbonyl-propyl)- α -phenylnitrone)⁸² qui possède un groupement ester diéthylique à la place d'un groupement méthyle (Figure 1-13). Cet analogue β -estérifié de la PBN possède également de bien meilleures capacités de piégeage du radical superoxyde, avec notamment un temps de demi-vie de 5 minutes pour l'adduit EPPN-O₂H. De plus, son caractère lipophile ainsi que sa bonne solubilité en milieu aqueux en fait un spin-trap efficace dans de nombreux milieux (organique, aqueux et biologique) et pour le piégeage de multiples radicaux (oxygénés et carbonés).⁸³

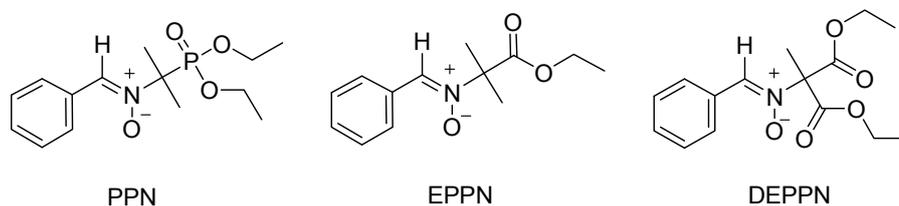


Figure 1-13. Structures chimiques de quelques spin-traps linéaires

Par la suite, il a été prouvé que la présence de deux groupements ester diéthylique sur son analogue β -diestérifié, la DEEPN, permettait d'améliorer encore d'avantage la stabilité de l'adduit formé par piégeage du superoxyde.^{84,85}

Enfin, de même que pour la DMPO, la PBN a également été greffé sur une β -cyclodextrine protégée (Me₃CD-PBN) pour conduire à des adduits de spin bien plus persistant que le PBN-O₂H. L'adduit Me₃CD-PBN-O₂H possède en effet un temps de demi-vie d'environ 10 min contre moins d'une minute pour l'adduit PBN-O₂H.

2. Utilisation en tant qu'agents à propriétés thérapeutiques : effets protecteurs de la PBN

Les nitrones ont également été utilisées dans le cadre d'expériences biologiques afin d'évaluer si leurs propriétés de pièges à radicaux libres pouvaient avoir un effet protecteur sur des cellules ou des organismes exposés à un stress oxydant. Les premières recherches ont débuté dès 1985, lorsque Novelli *et al* ont découvert que la PBN possédait une activité protectrice dans les cas d'ischémies cérébrales,⁸⁶ étude qui a été confirmée par McKennie *et al.* en 1986⁸⁷ ainsi que par Hamburger *et al.* en 1989.⁸⁸

2.1. Activité neuroprotectrice

La PBN est capable de franchir la barrière hémato-méningée, notamment dans le cas d'ischémies cérébrales, en raison de son hydrophobie suffisante. Elle est par conséquent capable de lutter contre le phénomène désignant l'arrêt de l'apport sanguin artériel dans le cerveau : l'ischémie cérébrale. Les lésions cérébrales dépendent évidemment de la gravité de l'ischémie, les conséquences pouvant être réversibles ou non mais ce phénomène s'accompagne d'une surproduction d'EOR pouvant conduire à une mort cellulaire importante. L'activité protectrice de la PBN sur des modèles d'ischémie cérébrale globale a pu être mise en évidence par Olivier *et al.*⁸⁹ ainsi que par Clough-Helfman *et al.*⁹⁰ Ces résultats ont été ensuite confirmés par Mori *et al.*,⁹¹ attribuant à la PBN ses effets protecteurs par capture du radical superoxyde, empêchant ainsi la formation d'EOR plus toxiques. De plus, l'activité protectrice de la PBN lors d'ischémies focales chez le rat a également été soulignée par Cao *et al.*⁹² puis par Zhao *et al.*,⁹³ démontrant une restauration du métabolisme mitochondrial cérébral clairement mise en évidence par l'augmentation du taux d'ATP et la réduction du taux de lactate mitochondrial. Ces résultats ont par la suite été confirmés par Folbergova *et al.*⁹⁴ Enfin, Li *et al.*⁹⁵ ont montré qu'après une ischémie cérébrale de 20 minutes, les sujets traités avec de la PBN présentaient une réduction des dommages causés au cerveau de l'ordre de 30 à 50%. De plus, la PBN semble réduire significativement l'activité des caspases, enzymes impliquées dans les phénomènes d'apoptose.

L'activité neuroprotectrice de la PBN a pu être démontrée sur de nombreux autres modèles biologiques *in vitro* et *in vivo*. Par exemple le quinolinate est une toxine susceptible de reproduire les aspects neurochimiques et anatomiques observés dans le maladie de Huntington. Cette maladie neurodégénérative se traduit par une mort cellulaire massive des neurones dans le striatum, une partie du cerveau impliquée dans la locomotion et le tonus. La

PBN s'est révélée très efficace dans la réduction des lésions induites par administration de quinolinate permettant de restaurer les aptitudes locomotrices de rats.⁹⁶

La PBN intervient donc comme agent neuroprotecteur en réduisant les phénomènes d'apoptose et en agissant sur les différents mécanismes biochimiques que nous venons d'évoquer mais elle possède également des potentialités pharmacologiques dans des modèles tissulaires autres que ceux du système nerveux central.

2.2. Activité sur la vision et l'ouïe

De nombreuses recherches ont montré que le stress oxydant joue un rôle primordial dans l'induction de maladies touchant l'oreille interne et dans la perte de l'audition lors d'exposition à des nuisances sonores excessives.^{97,98,99} En effet, Fechter *et al.* ont démontré que de nombreux composés comme, le monoxyde de carbone, le cyanure d'hydrogène et l'acrylonitrile peuvent, en association avec des nuisances sonores, engendrer une perte de l'audition par une surproduction d'EOR et d'EAR dans l'oreille interne.¹⁰⁰ C'est ainsi que la PBN a été testée sur des rats soumis à une exposition sonore intense et en présence de monoxyde de carbone ou d'acrylonitrile et il a été démontré que l'administration de PBN avant et pendant la période d'exposition à la toxine et l'intensité sonore permettait de diminuer fortement la perte auditive chez les rats soumis à l'expérience.^{101,102} En revanche, la PBN s'est avérée inefficace lorsque les rats ont été soumis uniquement à une exposition sonore intense.

La PBN s'est également montrée à plusieurs reprises capable de réduire les effets néfastes des radicaux libres sur un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne, qui consiste à exposer des rats à une lumière intense.^{103,104,105} Cette partie sera développée en détail dans le Chapitre 3, où nous comparerons l'activité protectrice de nouvelles nitrones synthétisées dans le cadre de cette thèse sur un modèle de dégénérescence induite chez le rat par exposition à une lumière fluorescente.

2.3. Autres activités protectrices

Les diabètes insulino-dépendants sont notamment caractérisés par une réaction inflammatoire localisée au niveau du pancréas et une destruction des cellules β produisant l'insuline. La streptozotocine (STZ) est une molécule capable de reproduire les diabètes insulino-dépendants en induisant la formation de radicaux libres et une hyperglycémie. Ainsi, il a été démontré que la PBN est capable d'inhiber cette hyperglycémie induite par la STZ tout en réduisant très fortement la production de radicaux.¹⁰⁶

La PBN réduit également les dommages induits par des agents anticancéreux anthracycliques ou des agents anti-angiogéniques. En effet, la PBN est capable de diminuer la cardiotoxicité de la doxorubicine¹⁰⁷ en maintenant son activité cytotoxique.¹⁰⁸ De plus, la PBN est également capable de réduire l'action tératogène du thalidomide par pré-traitement, indiquant que la toxicité de ce xéniobiotique pourrait être liée à la formation d'espèces radicalaires.¹⁰⁹

2.4. Activité sur le vieillissement

De nombreuses études ont mis en évidence le fait que l'administration de PBN chez des sujets âgés s'accompagnait d'un allongement de la durée de vie. En effet, dès 1991 Carney *et al.*¹¹⁰ démontrèrent pour la première fois les effets bénéfiques d'une administration chronique de PBN sur la restauration des fonctions cognitives de rats âgés. Sack *et al.*¹¹¹ ont par la suite démontré que l'administration de PBN à des rats âgés (24 mois) pendant plus de 9 mois permettait d'augmenter de façon étonnante leur durée de vie (4 fois plus de sujets en vie à la fin de l'étude), entraînant de surcroît l'augmentation des performances cognitives des rats traités. Enfin, Saito *et al.*¹¹² sont arrivés à prolonger de deux mois la durée de vie de rats âgés (30 ou 32 mois) en leur faisant absorber de manière journalière de la PBN contenue dans l'eau qu'ils buvaient. La PBN possède donc une activité anti-âge marquée qui serait en partie due, d'après Saito, à sa capacité à former des radicaux nitroxydes *in vivo*, qui produits en conditions normales, auraient diverses propriétés pharmacologiques positives. Ames *et al.*¹¹³ ont également suggéré que la N-tert-butylhydroxylamine, le produit d'hydrolyse de la PBN, protégerait la mitochondrie des dommages causés par la sénescence à des concentrations 100 fois inférieures à celles de la PBN nécessaires pour aboutir à la même protection.

En conclusion de toutes les études menées sur la PBN, il semble peu probable que la diversité des activités biologiques constatées puisse se réduire à sa simple capacité de piégeage de radicaux. En effet, à de nombreuses reprises la PBN conduit à des effets protecteurs pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours après son administration, et ce malgré un temps de demi-vie en milieu biologique de seulement 132 minutes.¹¹⁴ Par conséquent, il semble peu envisageable que le piégeage stœchiométrique de radicaux libres par la PBN soit à l'origine de ces effets protecteurs intenses. De plus, les expériences biologiques nécessitent des quantités de PBN sensiblement 1000 fois inférieures à celles utilisées dans les expériences de spin-trapping.

Ainsi, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action et donc l'efficacité de la PBN, des études sur sa biodisponibilité ainsi que sur sa toxicité ont été réalisées.

3. Biodisponibilité et toxicité de la PBN

En plus d'avoir des effets protecteurs variés sur l'organisme, la PBN possède un caractère partiellement amphiphile qui serait à l'origine de sa bonne biodisponibilité *in vivo*. En effet, si par opposition à la DMPO, la PBN s'est révélée plus efficace en tant qu'agent à propriétés thérapeutiques, c'est par la grande facilité qu'elle possède à se solubiliser dans les fluides biologiques ainsi qu'à passer les membranes cellulaires.

3.1. La biodistribution de la PBN comparée à celle de la DMPO

Chen *et al.* ont tout d'abord étudié la biodistribution de la PBN radiomarquée au carbone 14 après injection intrapéritonéale à des rats.¹¹⁴ La PBN s'accumule majoritairement dans le foie, mais elle se répartit aussi de manière non négligeable dans de nombreux autres organes y compris le cerveau (~3%), et 15 minutes après l'injection la concentration tissulaire en PBN atteint son maximum. La PBN est ensuite progressivement éliminée par voie urinaire.

Cheng *et al.* ont ensuite étudié la répartition de la PBN dans le sang et dans le cerveau par la technique de microdialyse couplée à la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) après injection intrapéritonéale.¹¹⁵ Les résultats indiquent une rapide entrée dans le cerveau et dans le sang, avec un maximum atteint après 20 minutes environ confirmant les travaux de Chen *et al.*

Plus récemment, Liu *et al.* ont étudié par CLHP la pharmacocinétique de divers spin traps cycliques et non cycliques, dont celle de la DMPO et de la PBN.¹¹⁶ Cette étude confirme à nouveau les résultats précédemment établis, à savoir que le maximum de concentration en spin traps dans les tissus est atteint après 30 minutes environ et reste relativement élevé pendant au moins une heure.

3.2. La toxicité de la PBN comparée à celle de la DMPO

L'un des principaux avantages des spin-traps de type PBN et DMPO est leur très faible toxicité, qui sont dans la plupart des cas assimilés comme étant non toxique.

En effet, Janzen *et al.* ont étudié les doses maximales en spin-traps utilisables dans les études de piégeage *in vivo*.¹¹⁷ Au cours de cette étude toxicologique menée sur des rats, la PBN utilisée à la dose de 1 g/kg apparaît comme létale. Cependant, à 500 mg/kg elle présente des effets toxiques mais non létaux et les rats intoxiqués retrouvent leur intégrité physique après quelques jours. Cette dose de 500 mg/kg semble donc être la dose maximale tolérée en

PBN. La DMPO présente quant à elle une toxicité encore plus faible, puisqu'au double de la concentration létale en PBN, c'est-à-dire à 200 mg/kg, aucune mortalité n'est détectée.

De plus, ces mêmes auteurs ont entrepris d'étudier les effets sanguins que pouvaient avoir ces spin-traps à haute concentration.¹¹⁸ Cette étude a alors confirmé les résultats précédents, puisque la DMPO ne présente aucune toxicité à 232 mg/kg et la PBN à 100 mg/kg. L'examen sanguin est normal dans les deux cas et ne révèle aucune différence significative avec le groupe témoin. Les quelques signes de toxicité visibles dans le cas de l'administration de la PBN disparaissent progressivement après une heure, ce qui est tout à fait en accord avec les études pharmacocinétiques.

Enfin, les très faibles toxicités de ces deux nitrones observées à de hautes doses *in vivo* ont également pu être mises en évidence *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales.¹¹⁹

Les nitrones sont par conséquent des molécules très intéressantes pour l'étude des mécanismes biochimiques, naturels ou accidentels, impliquant la formation d'espèces radicalaires. Parmi l'ensemble de ces nitrones, la PBN présente tout de même des effets protecteurs remarquables dans divers modèles expérimentaux, en raison très certainement de son caractère partiellement amphiphile qui lui permet d'être à la fois soluble en milieu aqueux et dans les milieux lipidiques.

D. Nouveaux agents Nitrones/Nitroxydes à capacité supérieure de ciblage

L'efficacité thérapeutique des antioxydants artificiels de type nitrone et nitroxyde est, comme nous venons de le voir en détail, reconnue depuis de nombreuses années. Par conséquent, de nombreuses équipes de recherche ont tenté d'améliorer l'activité de ces antioxydants synthétiques en favorisant leur ciblage vers des sites endommagés par la production d'espèces oxydantes.

1. Principe général de la « vectorisation »

Depuis plusieurs années de nombreuses recherches ont porté sur le développement de nouveaux systèmes susceptibles de limiter les effets secondaires des principes actifs, d'améliorer leur sélectivité ou de leur faciliter l'accès aux tissus gravides. Cette nouvelle approche, consistant à améliorer l'efficacité d'un principe actif, est née sous le terme de « vectorisation ». Cette approche ne consiste pas en l'élaboration d'un composé nouveau, mais plutôt en la fixation d'un principe actif déjà reconnu pour ses propriétés thérapeutiques

sur une structure moléculaire qui lui assurera un meilleur transport entre la zone d'adsorption et le site d'application, dans des conditions d'isolement total vis-à-vis du milieu biologique. Ainsi aucune dégradation ni aucun effets secondaires de l'actif ne devraient se manifester dans l'organisme hôte. De plus, le principe actif que l'on pourra délivrer spécifiquement au niveau de sa cible sera plus efficace à des doses plus faibles ce qui permettra de s'affranchir d'éventuels problèmes de toxicité. C'est ainsi que ce mode de prise en charge d'un actif peut être appliqué aux antioxydants, leur conférant ainsi un ciblage privilégié du site de production des EOR, la mitochondrie ou des constituants cellulaires particulièrement sensibles aux espèces radicalaires comme les membranes phospholipidiques.

2. Ciblage de la mitochondrie¹²⁰

Afin de bien comprendre l'importance apportée au ciblage de la mitochondrie, il est primordial de rappeler que cet organite cellulaire (le « poumon » de la cellule) est le siège de la phosphorylation oxydative, processus par lequel notre corps fabrique l'énergie dont il a besoin pour fonctionner. La mitochondrie est essentielle à la vie et son exposition permanente aux EOR/EAR qu'elle produit la rend directement vulnérable. Les attaques répétées des radicaux libres induisent des dommages sur son ADN et ses protéines, entraînant directement une dégradation de la phosphorylation oxydative qui s'accompagne alors d'une augmentation de la fuite électronique et donc d'une surproduction d'EOR/EAR. Par conséquent, de nombreuses stratégies visant à cibler le compartiment mitochondrial sont actuellement développées dans la lutte des dommages oxydants.

2.1. Antioxydants peptidiques

Comme nous l'avons évoqué en début de chapitre, la chaîne de transport d'électrons est composée en grande majorité de polypeptides, essentiels à son fonctionnement. Cependant, ces derniers sont synthétisés dans le cytoplasme ce qui signifie qu'ils ont ensuite besoin d'être importés dans la mitochondrie afin d'y être assemblés. Ce processus requiert l'utilisation de protéines de transport présentes dans la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne et la matrice. C'est ainsi que dans le cas d'une protéine qui doit atteindre la matrice mitochondriale, on observe sur sa partie *N*-terminale la présence d'un peptide signal de 20 à 30 acides aminés. Ce dernier se lie alors spécifiquement à des récepteurs présents sur la membrane externe, déclenchant ainsi l'action d'une translocase qui permet à la protéine de traverser la membrane externe par le biais d'un pore hydrophile. Une fois dans l'espace intermembranaire, celle-ci pénètre la membrane interne par un second processus, dépendant cette fois-ci du potentiel de membrane, qui permet

l'ouverture d'un nouveau pore. Arrivée dans la matrice, ce peptide signal est finalement clivé sous l'action des peptidases et le polypeptide restant peut alors être assemblé à la protéine finale.

Partant de l'observation que les translocases sont peu spécifiques et ne font pas la différence entre des molécules de taille et de polarité similaires, certains auteurs ont utilisé cette stratégie de vectorisation pour acheminer des antioxydants vers la mitochondrie.

2.1.1. Les SS-térapeptides¹²¹

Les SS-térapeptides sont des peptides cationiques, dont la structure générale est basée sur une alternance de motifs aromatiques et basiques (Figure 1-14). L'un de ces motifs aromatiques appartient en l'occurrence à un acide aminé particulier : la diméthyltyrosine (Dmt), dérivé du 3,5-diméthylphénol, qui confère au peptide son activité antioxydante.¹²² Ce motif aromatique est responsable de la réduction des EOR ainsi que des liaisons peroxydes, ceci ayant été démontré par la faible activité antioxydante du SS-20 dépourvu de Dmt. Les motifs basiques présents sur ces SS-térapeptides sont quant à eux chargés d'assurer la pénétration cellulaire, qui se fait donc aisément sous forme de pénétration passive et ne nécessite aucune consommation d'énergie.¹²³

2.1.1. Les analogues XJB de la Gramicidine S¹²⁴

Les XJB peptides sont constitués d'une courte séquence peptidique de l'antibiotique cyclodecapeptide Gramicidine S (GS), sur laquelle est greffé un nitroxyde bien connu pour ces propriétés antioxydantes : le 4-AT. La figure 1-14 montre un exemple d'analogue XJB, pour lequel le fragment Leu-^DPhe-Pro-Val-Orn de la GS a été sélectionné.

Des études de pénétration réalisées par suivi RPE sur des cellules d'embryon de souris ont démontré que le XJB-5-131 est rapidement détecté à l'intérieur de la mitochondrie, alors que le 4-AT incubé seul n'a montré aucun signal RPE au sein même de l'organite. De plus, les études réalisées sur ces mêmes cellules ont également montré que le XJB-5-31 inhibe totalement la production de l'anion superoxyde en cas de stress oxydant cellulaire, et qui plus est à des concentrations 1000 fois inférieures au nitroxyde 4-AT seul. Ce peptide XJB-5-31 semble donc être un nouveau et un excellent piègeur d'EOR et d'électrons au sein même du compartiment mitochondrial. Toutefois, bien que ces antioxydants peptidiques semblent tout à fait prometteurs, des études complémentaires de leur toxicité, temps de demi-vie, et pharmacocinétiques doivent encore être conduites.

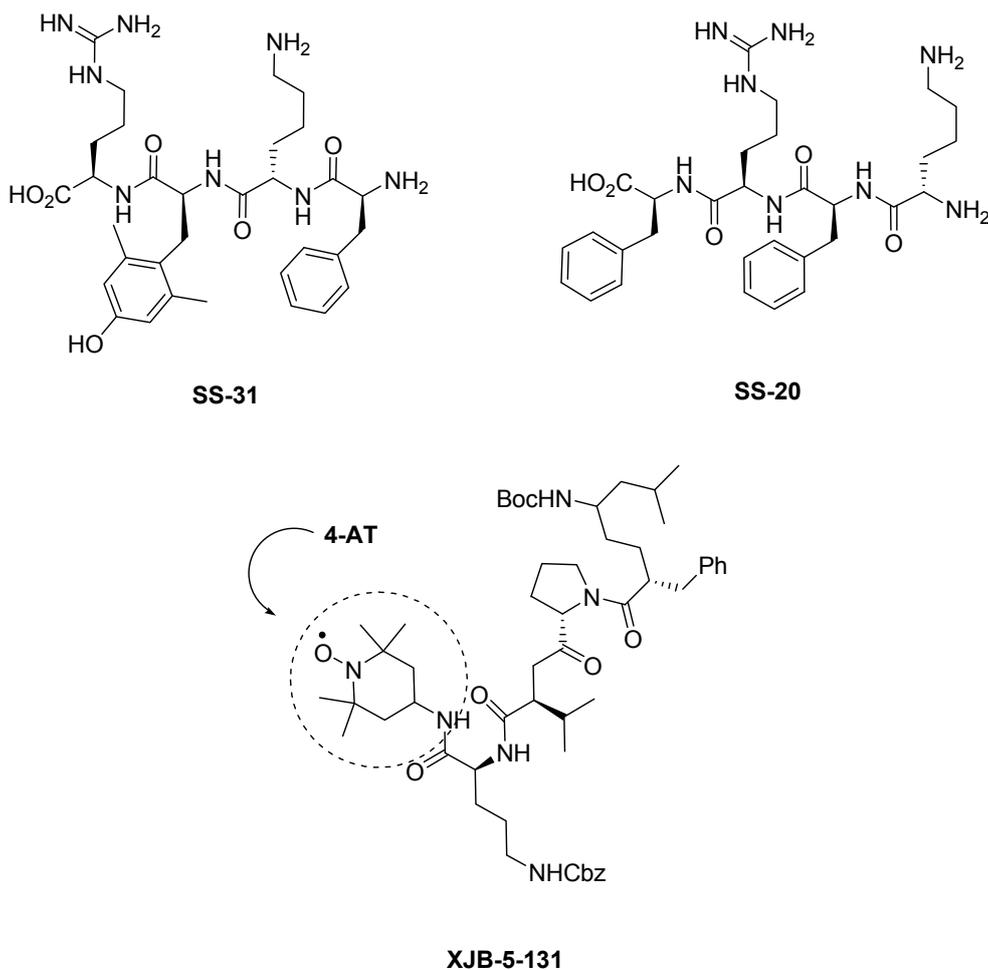


Figure 1-14. Structures des SS-31 et SS-20, ainsi que de la XJB-5-131

2.2. Fixation d'antioxydants sur des cations lipophiles^{125,126}

Comme nous l'avons déjà évoqué, dans la mitochondrie des électrons transitent le long d'une chaîne de protéines par le biais de différents complexes redox. Ce transport permet la translocation de protons au travers de la membrane interne, créant un gradient de pH qui conduit à la formation d'ATP par l'ATP synthétase. Ce phénomène établit un potentiel de membrane interne négatif d'environ 150-180 mV (le plus élevé de tous potentiels membranaires), qui permet d'attirer les cations vers l'intérieur de la mitochondrie. C'est en 1969 que Shulachev *et al.*¹²⁷ ont mis en évidence ce phénomène et proposèrent ainsi d'utiliser des cations lipophiles comme moyen de ciblage mitochondrial. Ces derniers sont dans la plupart des cas des cations triphénylphosphoniums (TPP⁺) que la mitochondrie peut accumuler dans la matrice à des concentrations 100 à 500 fois supérieures à celle du cytoplasme.

C'est en suivant cette stratégie que Murphy *et al.*^{128,129} ont utilisé les cations lipophiles comme transporteurs d'antioxydants, dans le but de les acheminer vers le compartiment mitochondrial et de pouvoir ainsi les délivrer sélectivement au cœur de la mitochondrie. En effet, une libération des antioxydants dans la matrice mitochondriale devrait permettre de la protéger des dommages causés par les EOR.

Par conséquent, au vu des capacités de piègeurs de radicaux libres que possède les nitrones et les nitroxydes, plusieurs travaux ont été menés sur la fixation de ces composés sur des cations triphénylphosphoniums (TPP⁺). C'est ainsi que la MitoPBN,¹³⁰ la MitoBMPO,¹³¹ la MitoDEPMPO,^{132,133} la MitoCP⁴⁰ et la MitoTEMPOL¹³⁴ ont été élaborées dans le but d'introduire ces différents « scavengers » au cœur même de la mitochondrie (Figure 1-15).

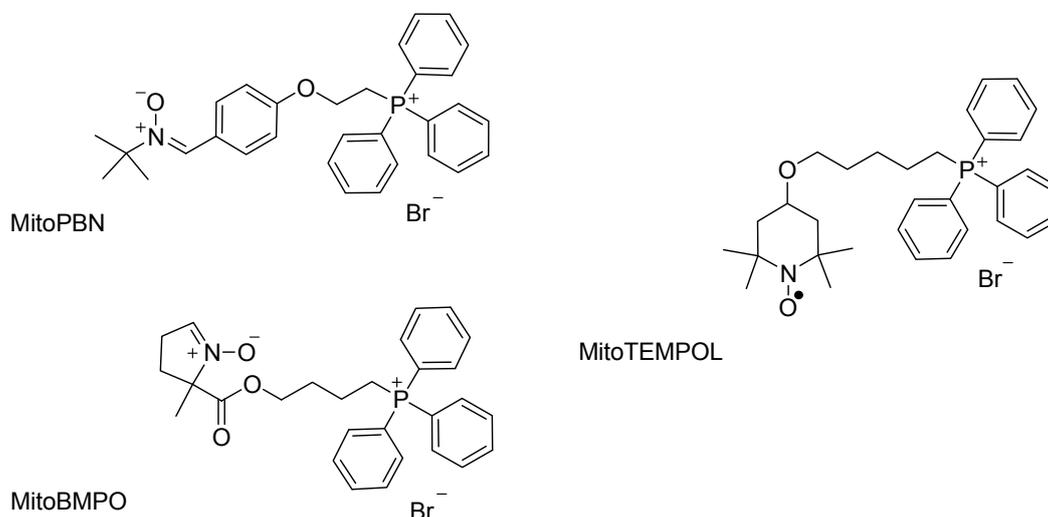


Figure 1-15. Exemples de cations lipophiles TPP⁺ porteurs de nitrones ou de nitroxydes

Les travaux menés sur ces composés ont démontré que ces derniers pénètrent facilement le compartiment mitochondrial, et notamment Dhanasekaran *et al.*⁴⁰ ont réalisé des études de RPE qui ont parfaitement confirmé la sélectivité d'accumulation du MitoCP au sein de la mitochondrie, comparé au CP seul.

De plus, une fois à l'intérieur de la mitochondrie, ces cinq antioxydants lipophiles agissent de manière efficace en piégeant les espèces oxygénées réactives produites en excès, et notamment par mimétisme de l'action des SOD.^{135,136,40}

Par conséquent ces cations lipophiles de type TPP⁺ possèdent de fortes potentialités en ce qui concerne d'une part, un ciblage spécifique de la mitochondrie et d'autre part, une

pénétration rapide au sein de la matrice mitochondriale. De plus, leur clairance est rapide (24 heures) et leur temps de demi-vie relativement long (un jour de demi).¹³⁷

3. Ciblage des lipides

Les membranes cellulaires font l'objet d'attaques diverses de la part des radicaux libres, ces espèces pouvant être d'origine endogène ou exogène. Les lipides constitutifs de ces membranes subissent alors des phénomènes de peroxydation lipidique qui ont pour conséquence une déstabilisation de la membrane et la perte de sa fonction fondamentale de barrière biologique sélective. C'est donc dans le but de protéger les membranes cellulaires vis-à-vis de ces dommages oxydants qu'il est nécessaire de disposer d'antioxydants suffisamment hydrophobes, capables de s'insérer et de demeurer au sein de celles-ci, afin de piéger les radicaux libres susceptibles de les détériorer. C'est notamment le cas d'un antioxydant naturel connu, l' α -tocophérol ou vitamine E, dont le caractère hydrophobe lui permet de se glisser dans les membranes lipidiques et de capter les radicaux peroxydes formés avant qu'ils ne puissent réagir avec d'autres lipides adjacents.¹³⁸

Par conséquent, de nombreuses recherches ont été ou sont actuellement développées afin de concevoir et d'élaborer des antioxydants lipophiles, capables de s'intégrer dans les membranes cellulaires et de suppléer le système antioxydant naturel, notamment lors d'attaques massives d'EOR. Dans cette optique, la stratégie la plus communément employée consiste à greffer à l'antioxydant synthétique une partie à caractère hautement hydrophobe.

De nombreux travaux ont ainsi contribué à l'élaboration de nitrones lipophiles afin d'acheminer ces « spin traps » à proximité des membranes cellulaires. La figure 1-16 montre un exemple des différentes nitrones lipophiles qui ont été synthétisées, soit par greffage de la EPMPO à un motif cholestérol, soit par greffage de la PBN sur des structures amphiphiles comportant deux longues chaînes hydrophobes.

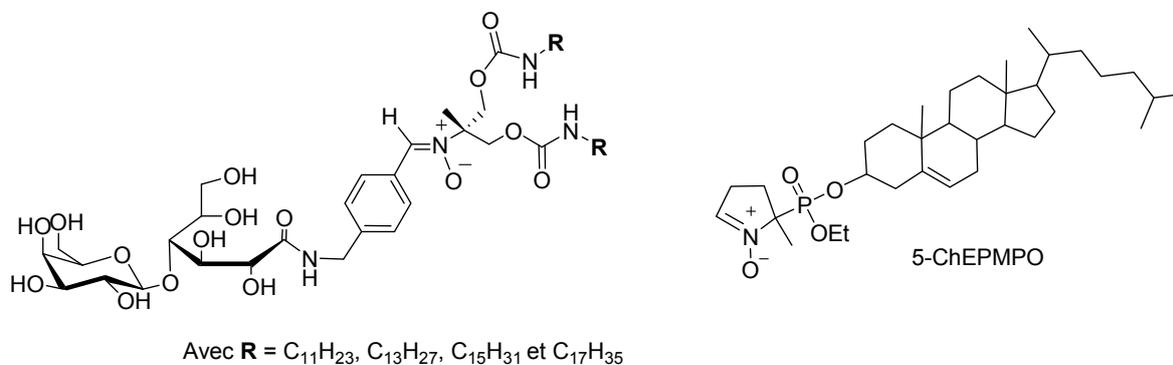


Figure 1-16. Exemples de nitrones lipophiles

En effet, afin d'augmenter le caractère hydrophobe de la PBN, une série de nitrones bicaténaires dérivées de la PBN a été développée au laboratoire (Figure 1-16 Gauche). Ces nitrones de nature amphiphile disposent de part et d'autre du motif PBN, d'une tête polaire de type lactobionolactone ainsi que de deux chaînes hydrocarbonées comportant chacune de 11 à 17 atomes de carbone. Ces deux longues chaînes hydrophobes devraient s'insérer avec une certaine facilité au sein des lipides constituant les membranes cellulaires, la tête polaire devant quant à elle favoriser l'orientation de la nitrone adjacente à la surface de la membrane permettant alors à la PBN d'agir à proximité. Les premières études physico-chimiques, concernant uniquement les deux nitrones dotées de chaînes hydrophobes en C11 et C17, se sont révélées prometteuses puisque ces composés ont présenté une parfaite miscibilité avec des phospholipides polyinsaturés dans un système membranaire biomimétique, les monocouches de Langmuir.¹³⁹ De plus, ce système soumis cette fois-ci à une irradiation sous UV a servi à démontrer que ces deux nitrones dotées protègent les phospholipides de la dégradation. Enfin, des études plus récentes menées cette fois-ci sur l'ensemble de ces nitrones bicaténaires ont montrées que leur insertion dans des phospholipides de liposomes entraîne une diminution très significative des phénomènes de peroxydation.¹⁴⁰

De plus, dans le but d'améliorer l'activité la DEPMPO en la rendant d'avantage lipophile, l'équipe du Pr. Tordo a mis au point la synthèse de la nitrone 5-ChEPMPO (Figure 1-16 Droite),¹⁴¹ Afin d'expliquer ces motivations, il est important de rappeler que la DEPMPO est à l'heure actuelle la nitrone cyclique dont l'adduit superoxyde en milieu biologique est le plus persistant. Cependant, sa principale limitation réside dans son faible coefficient de partition ($\log P = 0,16$) qui rend cette nitrone cyclique préférentiellement soluble en milieu aqueux. Ainsi, l'équipe du Pr Tordo a choisi de greffer cette DEPMPO à un groupement cholestérol à la fois pour sa forte affinité envers les membranes cellulaires, mais également pour son implication dans de nombreux processus biologique.¹⁴² Les études de spin trapping menée par RPE ont alors démontré dans un premier temps que la 5-ChEPMPO demeure aussi efficace que la DEPMPO en ce qui concerne le piégeage de radicaux de type peroxy, alkoxy ou encore thiyl. Néanmoins, contrairement à la DMPO, la 5-ChEPMPO s'est montré capable de piéger un radical peroxyde, provenant de la peroxydation de l'acide linoléique, et ainsi former un l'adduit 5-ChEPMPO-OOL dont la structure a pu être parfaitement caractérisée par couplage ESI-MS/MS.

Enfin plus récemment, deux nitrones bifonctionnalisées de type DMPO ont été synthétisées et étudiées dans le laboratoire du Dr. Frederick Villamena au sein du Département de Pharmacologie à Columbus (Ohio, USA). De même que pour la β -CDMPO,

ces deux nouvelles nitrones cycliques ont été greffées à un groupement de type cyclodextrine. Cependant, ces dernières comportent en supplément une chaîne alkyl à 12 atomes de carbones (Figure 1-17).¹⁴³

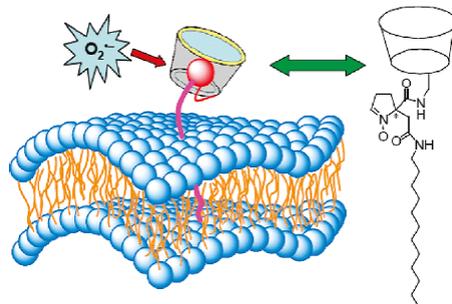


Figure 1-17. Insertion d'une nitrone cyclique bifonctionnée dans une membrane cellulaire

L'ajout de cette partie hydrophobe a bien entendu comme objectif le ciblage des membranes cellulaires, car comme nous pouvons le rappeler, une des limitations dans l'utilisation de la β -CDMPO est sa partie cyclodextrine fortement hydrophile due à la présence des nombreux groupements hydroxyles à l'extérieur de la structure. Les études concernant ces deux analogues bifonctionnalisés de la DMPO se sont révélées très positives, puisque ces deux nitrones lipophiles ont présenté des vitesses de piégeage du superoxyde environ 130 fois supérieures à celle obtenue avec la DMPO en milieu organique. De plus, cette vitesse estimée à $221 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ se trouve environ deux fois supérieure à celles de la EMPO, et plus de 300 fois supérieure à celle de la DEPMPO. Enfin, la présence de la chaîne dodécyle a permis d'atteindre un temps de demi-vie de 9 min pour l'adduit superoxyde en milieu organique.

E. La modulation de la balance hydrophile-lipophile d'antioxydants synthétiques comme stratégie de vectorisation

Au sein de l'organisme ou en présence de cultures cellulaires, les antioxydants synthétiques doivent être à même de franchir les barrières phospholipidiques ou d'être transportés en milieu aqueux, de ce fait leur balance hydrophile lipophile joue un rôle majeur.

Par conséquent, différentes équipes se sont attelées soit à moduler le caractère hydrophile ou hydrophobe de la PBN soit à en préparer des analogues structuraux spécifiques, tandis qu'au laboratoire il nous a paru opportun de doter cet antioxydant d'un caractère

amphiphile susceptible d'améliorer son transfert transmembranaire et donc son efficacité thérapeutique.

1. Les analogues structuraux de la PBN

Comme nous l'avons précédemment évoqué, la PBN présente depuis de nombreuses années des effets protecteurs remarquables dans divers modèles expérimentaux. C'est pour cette raison que de nombreux auteurs ont tenté au fil des années d'améliorer les propriétés protectrices et la biodisponibilité de ce « spin trap » en réalisant des analogues de synthèse.

Dans un premier temps, ces travaux se sont résumés à des modifications chimiques assez simples portant sur les parties N-terminale et aromatique de la PBN, puis dans un second temps, les études se sont orientées vers la synthèse de nitrones aromatique dérivées de la PBN.

1.1. Phenylnitrones modifiées en position N-terminale

Les modifications concernant la partie *tert*-butyle, ont été effectuées afin de réaliser des nitrones plus hydrophiles que la PBN, avec comme objectif principal d'augmenter son hydrosolubilité (Figure 1-18).^{144,145} Cependant, ces modifications se sont généralement accompagnées d'une diminution des capacités de piégeage de spin de ces nitrones hydrophiles en milieu aqueux. Les travaux menés par la suite se sont donc orientés vers des modifications concernant la partie aromatique de la PBN.

1.2. Phenylnitrones modifiées en position aromatique

Les modifications concernant la partie aromatique, ont été effectuées dans le but d'augmenter soit l'hydrophobie de la PBN, soit au contraire son hydrophilie.^{146,147}

En ce qui concerne les dérivés hydrophobes de la PBN synthétisés, ces derniers possèdent en para de la fonction nitrone une longue chaîne hydrogénée à 12 atomes de carbone, qui par sa nature apolaire va apporter une forte hydrophobie aux nitrones finales (Figure 1-18). Toutefois, ces modifications ont une fois encore démontré que ces nitrones hydrophobes possédaient une capacité de piégeage de spin inférieure à celle la PBN.

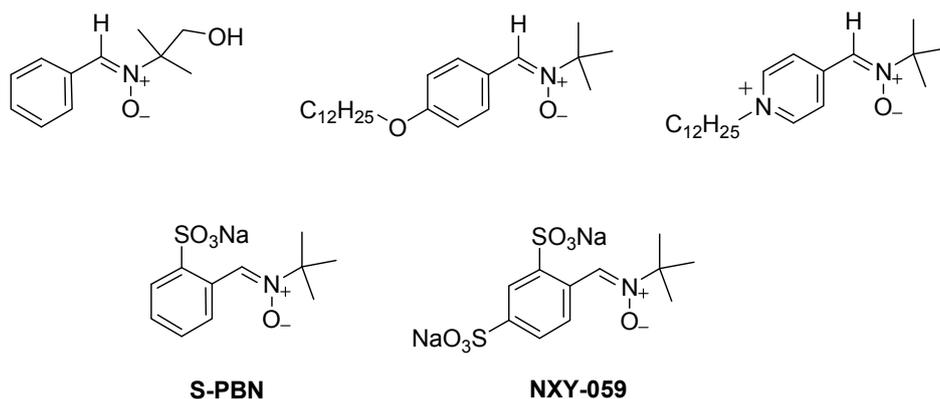


Figure 1-18. Exemples d'analogues de la PBN modifiés soit sur la partie N-terminale, soit sur la partie aromatique

Des dérivés sulfonate hydrophiles de la PBN ont également été synthétisés (Figure 1-18). Malgré une grande hydrophilie de ces composés et leur très faible aptitude à passer au travers de la barrière hémato-méningée ces composés ont présenté des propriétés biologiques très intéressantes. En effet, les effets neuroprotecteurs de la S-PBN se sont révélés proches de ceux observés avec la PBN lors d'ischémies focales, permettant de réduire la taille de l'infarctus et d'augmenter la restauration partielle des fonctions motrices des rats traités,¹⁴⁸ malgré une concentration neuronale très faible.¹⁴⁹ De plus, le dérivé disulfonate NXY-059 a démontré une activité protectrice bien supérieure à celle de la PBN chez des rats atteints d'une ischémie focale de courte ou de longue durée malgré là aussi une faible aptitude au passage de la barrière hémato-méningée.¹⁵⁰ Les dommages causés au cerveau ainsi que la taille de l'infarctus sont nettement diminués et le taux de survie des rats est élevé.¹⁵¹ Enfin, l'ensemble de ces effets bénéfiques a pu être observé quelque soit le moment auquel la NXY-059 est administrée, que ce soit au début de la reperfusion ou plusieurs heures après.^{152,153}

A l'heure actuelle, la NXY-059 est la nitrone dérivée de la PBN qui a démontré la meilleure activité neuroprotectrice dans les expériences d'ischémie/reperfusion. Cette molécule est arrivée jusqu'en phase III d'essais cliniques, malheureusement son développement s'est arrêté à ce stade.

1.3. Nitrones cycliques dérivées de la PBN

Ces modifications chimiques ont essentiellement eu pour objectif d'améliorer les capacités de piégeage de la PBN en augmentant la stabilité des adduits formés et en rigidifiant la fonction nitrone par cyclisation.

Dans cette optique, Thomas *et al.*¹⁵⁴ ont synthétisé une série de nitrones cycliques de type isoquinoline (Figure 1-19), dont les structures sont plus rigides. Ils ont ainsi montré que de tels dérivés inhibaient de manière spectaculaire la peroxydation lipidique et permettaient de réduire notablement la mortalité de souris soumises à un stress oxydant puissant. Parmi cette série, la MDL 101,002 s'est avérée la plus efficace dans le cas d'ischémies focales de courte et longue durée, où elle arrive à limiter très fortement les dommages causés par le radical hydroxyle et le radical anion superoxyde sur les lipides membranaires et les protéines.¹⁵⁵ Thomas a alors émis l'hypothèse que l'amphiphile de cet analogue de la PBN serait à l'origine de sa meilleure distribution dans les compartiments cytosolique et membranaire, lui assurant ainsi des propriétés pharmacologiques puissantes.¹⁵⁶

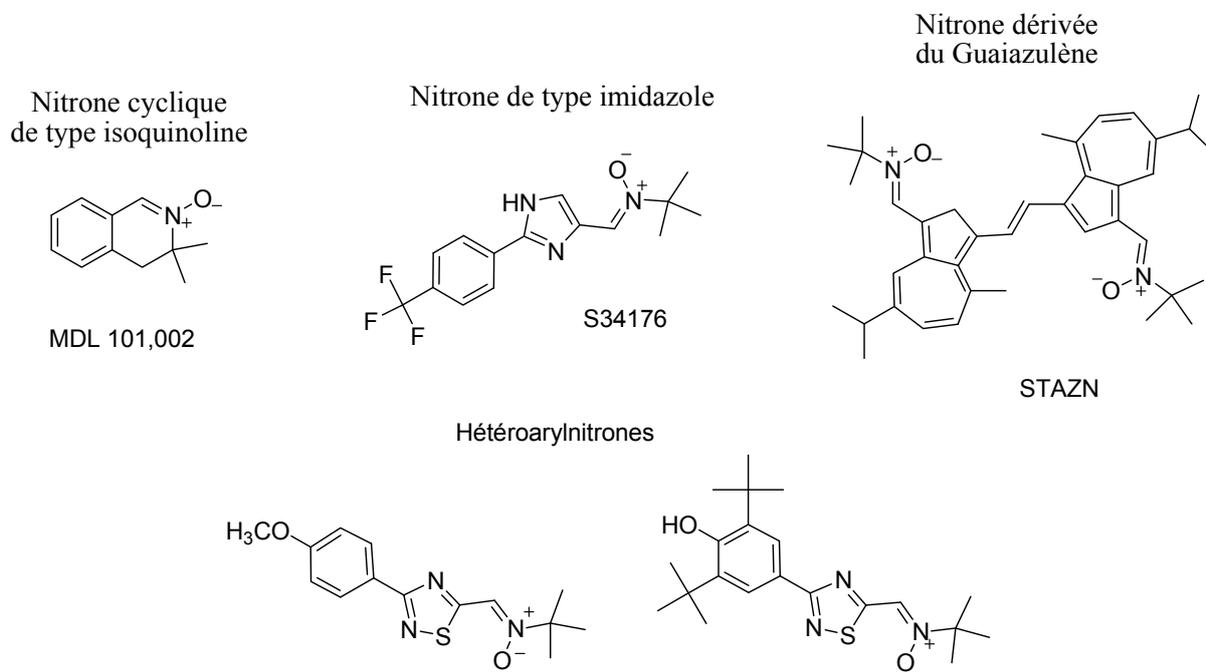


Figure 1-19. Exemples d'analogues cycliques de la PBN

Dhainault *et al.*¹⁵⁷ ont mis au point la synthèse de dérivés comportant cette fois-ci un motif imidazole dans le but de rendre les adduits de spin plus stables et moins réactifs vis-à-vis des constituants cellulaires. Ils ont alors démontré que ces dérivés de la PBN présentaient à nouveau une meilleure aptitude que la PBN à réduire la peroxydation lipidique des membranes. L'une de ces molécules, la S34176 (Figure 1-19) a de même que la MDL 101,002 présenté une aptitude importante à piéger les radicaux hydroxyles et anions superoxydes lors de son administration à des rats soumis à une ischémie de courte durée. En

effet, lorsque celle-ci est injectée 30 min avant l'ischémie, elle réduit la perte neuronale de 50% par rapport au contrôle alors que l'injection 5 minutes après l'ischémie conduit à des résultats identiques. Malheureusement, son administration 3 heures après l'ischémie ne donna aucun effet protecteur traduisant ainsi la faible fenêtre d'action de cette nitrone et donc son utilisation limitée dans le cadre d'un traitement applicable à l'homme.

Becker *et al.*¹⁵⁸ ont réalisé la synthèse de composés dérivés du Guaiazulène dont le cycle aromatique confère aux structures une rigidité supérieure et une stabilisation élevée des adduits de spin formés par réaction de la fonction nitronyle avec les EOR. L'une d'entre elles, la STAZN (Figure 1-19) a notamment présenté d'excellentes propriétés antioxydantes, nettement supérieures à celle de la PBN, dans le cas d'un stress oxydant induit par des neurotoxines responsables d'une augmentation des produits issus de la peroxydation lipidique.^{159,160, 161}

Plus récemment, Porcal *et al.*¹⁶² ont mis au point la synthèse de nouvelles hétéroarylnitrones qui combinent dans leur structure différents fragments, dont l'intérêt commun est de permettre une meilleure stabilisation de l'adduit de spin formé par capture de radicaux de nature diverse. Ils ont alors démontré, par des études de piégeage de spin, la très grande capacité que possédaient ces hétéroarylnitrones à piéger des radicaux. De plus, deux d'entre elles, de structure 1,2,4-thiadiazolylnitrones (Figure 1-19), ont présenté les meilleures activités neuroprotectrices *in vitro* dans le cas d'un stress oxydant induit par du H₂O₂. De plus, ces deux hétéroarylnitrones se sont également révélées les moins toxiques lors des tests réalisés sur un modèle de macrophages de souris. Porcal et son équipe en ont alors déduit que la présence et la nature du pharmacophore lié à la fonction nitronyle joue un rôle déterminant dans l'amélioration de l'activité neuroprotectrice. En effet, ces deux pharmacophores permettent d'augmenter l'hydrophobie de la PBN et par conséquent favorise le passage de la fonction nitronyle au travers de la barrière hémato-méningée, où elle pourra aisément jouer son rôle antioxydant.

Au travers de ces différents exemples, nous avons donc pu constater que la plupart des travaux concernant l'amélioration de l'activité thérapeutique de la PBN par modification de sa structure ont donné des résultats relativement satisfaisants. Par conséquent, la modulation de la BHL d'antioxydants tel que la PBN semble parfaitement convenir à une stratégie de vectorisation qui permettrait une amélioration notable de leur biodisponibilité tissulaire et cellulaire.

2. Modulation de la BHL d'antioxydants par greffage sur une structure amphiphile

Depuis plusieurs années, le laboratoire développe différents types de structures monomoléculaires amphiphiles capables de transporter un principe actif dans l'organisme par modulation de sa balance hydrophile-lipophile. Ce greffage permet ainsi de mieux contrôler sa biodisponibilité dans l'organisme, tout en lui permettant d'atteindre son site d'action, sans être dégradé au cours du transport.

Le principe repose sur l'utilisation d'un transporteur monomoléculaire muni : (a) d'une chaîne hydrophobe pouvant être hydro- ou perfluorocarbonée, (b) d'une tête polaire et, (c) d'un bras de liaison reliant la tête polaire et la partie apolaire (Figure 1-20). La structure amphiphile du transporteur lui confère à la fois une bonne solubilité en milieu aqueux tout en lui préservant une lipophilie suffisante permettant un passage au travers des bicouches membranaires ou une insertion en leur sein, propriété étroitement liée à la nature hydrocarbonée ou fluorocarbonée de la partie hydrophobe greffée. Par ailleurs le choix de la tête hydrophile (saccharidique ou peptidique) autorise le ciblage de tissus spécifiques. L'intérêt d'un tel système réside dans le fait qu'il peut être utilisé pour différents types d'actifs tel que des antioxydants, des anticancéreux ou autres.

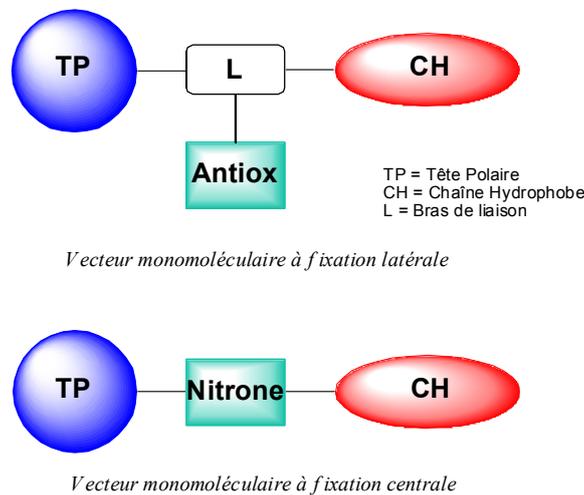


Figure 1-20. Structure générale des transporteurs amphiphiles monomoléculaires

Suivant le schéma général de ces transporteurs monomoléculaires sur lesquels un motif antioxydant de type nitrone a été greffé deux variantes ont pu être proposées (Figure 1-20) : (a) transporteur amphiphile monomoléculaire à fixation centrale et (b) transporteur amphiphile monomoléculaire à fixation latérale. Dans la première série, c'est le motif nitrone qui est

inséré au cœur de la molécule alors que dans la seconde série le motif nitrone est fixé à la molécule au niveau d'un bras de liaison. Notons que dans la seconde série, il est facilement envisageable d'étendre cette stratégie à d'autres motifs antioxydants.

2.1. Nitrones à fixation latérale

La première nitrone amphiphile synthétisée, la TA1PBN, appartient au modèle à fixation latérale (Figure 1-21).^{163,164} L'emploi d'une chaîne hydrophobe perfluorocarbonée s'appuie sur plusieurs critères : (a) les propriétés tensioactives mais non détergentes des tensioactifs perfluorocarbonés qui leur confère une cytotoxicité nettement inférieure, (b) une hydrophobie supérieure à celle des chaînes hydrocarbonées de même longueur, et (c) une faible miscibilité avec les phospholipides membranaires, ce qui laisse envisager un meilleur passage au travers des membranes biologiques.

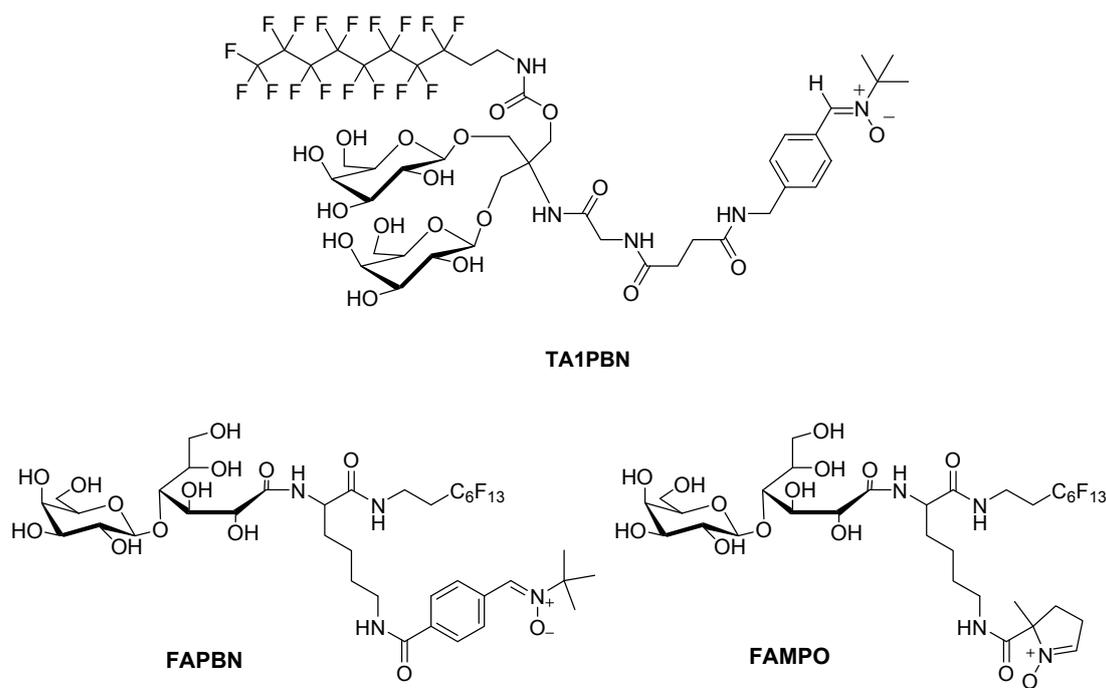


Figure 1-21. Structure chimique de la TA1PBN, de la FAPBN et de la FAMPO

La capacité anti-apoptotique de la TA1PBN a pu être évaluée sur des fibroblastes de patients atteints du syndrome de "neurogenic ataxia retinitis pigmentosa" (NARP), initié par une mutation du gène codant pour une protéine du complexe enzymatique V de la chaîne mitochondriale. Ces fibroblastes présentent une activité superoxyde dismutase (SOD) importante, et l'état de stress oxydant généré par cette mutation est accompagné d'une mort cellulaire par apoptose. Alors que la PBN, ne présente aucune activité protectrice de ces

fibroblastes, la TA1PBN provoque une baisse considérable de l'activité SOD et une forte diminution du nombre de cellules en état d'apoptose.¹⁶⁵

Cette étude préliminaire a permis, d'une part de confirmer l'implication des radicaux libres dans les phénomènes d'apoptose accompagnant ce déficit génétique. D'autre part, le caractère amphiphile se révèle capital dans la pénétration transmembranaire puisque ni la PBN ni des dérivés hydrophiles de la PBN se sont révélés actifs. Néanmoins la difficulté de la synthèse de la TA1PBN et son faible rendement global justifiait parfaitement la mise en place d'un schéma synthétique plus simple.

Les travaux suivants ont donc consisté en l'élaboration de nouvelles molécules plus faciles à synthétiser sur lesquelles la PBN reste en position latérale.¹⁴⁰ Suivant ce schéma général, les structures amphiphiles synthétisées possèdent une tête polaire de type lactobionamide, qui confère l'hydrosolubilité indispensable à la molécule, ainsi qu'une chaîne perfluorocarbonée, qui apporte quant à elle une hydrophobie suffisante et permet de s'affranchir des problèmes de détergence rencontrés avec les molécules hydrocarbonées. Ces deux composantes essentielles sont reliées entre elles par l'intermédiaire d'un bras écarteur de type acide aminé, qui permet une fonctionnalisation aisée pour le greffage de motif nitrones linéaire (FAPBN) et cyclique (FAMPO) (Figure 1-21).

Les résultats biologiques obtenus avec cette série de nitrones amphiphiles à fixation latérale dérivées d'un acide-aminé ont confirmé les premiers résultats, la biodisponibilité d'un antioxydant est un paramètre clef dans son activité protectrice, et l'efficacité biologique de l'antioxydant est intimement liée à sa balance hydrophile lipophile et à son amphiphilie.^{166,167,168}

2.2. Nitrones à fixation centrale

Une deuxième série de nitrone a également été développé au laboratoire.¹⁶⁹ Ces travaux consistaient à concevoir différentes molécules sur lesquelles différents paramètres ont été modulés, la nature de la tête polaire, la nature et la longueur de la chaîne hydrophobe et le type de jonction avec la PBN, qui se trouve cette fois-ci placée au centre de la structure amphiphile (Figure 1-22).

Les résultats biologiques obtenus avec cette seconde génération de structures PBN amphiphiles porteuses ont été globalement très positifs.^{170,171,172} L'une de ces nitrones amphiphiles, la LPBNAH composée d'une tête lactobionamide et d'une partie hydrophobe de type octanamide (Figure 1-22), a démontré une activité protectrice très largement supérieure à celle de la PBN *in-vitro*,¹⁷² *ex-vivo*¹⁷³ et *in-vivo*.^{174,175} Afin de mieux cerner les paramètres

structuraux responsables de la très haute activité de la LPBNAH, la variation du positionnement de la tête polaire et de la chaîne hydrophobe autour de la PBN a également été envisagée (Figure 1-22). Les résultats biologiques concernant l'isomère de position de la LPBNAH, la LPBNH15, ont été une fois encore très positifs car cette dernière a su démontrer une activité protectrice encore supérieure à la LPBNAH.¹⁷⁶

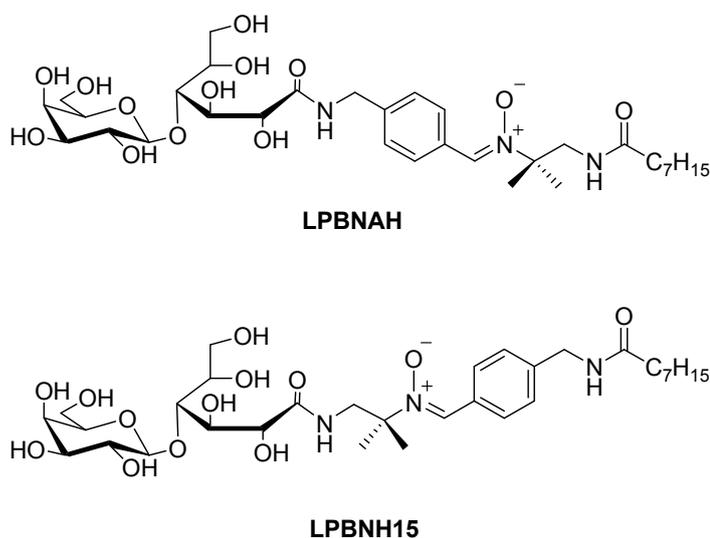


Figure 1-22. Structures chimiques de la LPBNAH et de la LPBNH15

Par conséquent, ces deux modèles de vectorisation ont confirmé que l'amphiphilie est un paramètre indispensable à l'amélioration de l'activité d'un antioxydant tel que la PBN, et que le positionnement de la tête polaire et de la chaîne hydrophobe autour de celle-ci peut influencer son activité protectrice lors d'expériences biologiques.

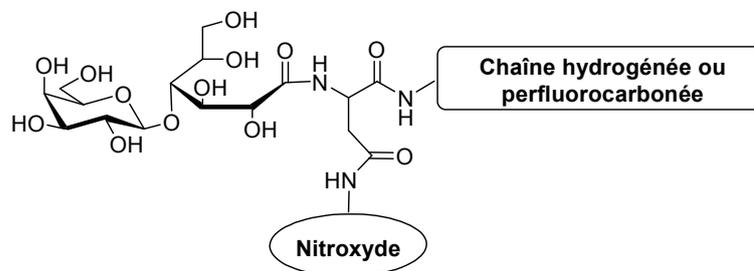
F. Objectifs de nos travaux

Tenant compte de l'ensemble des travaux déjà réalisés au laboratoire concernant la vectorisation d'antioxydants, il nous a paru opportun d'essayer de greffer sur ces structures monomoléculaires amphiphiles une nouvelle classe d'antioxydants synthétiques : les nitroxydes. Pour cela, nous avons choisi de reprendre le modèle de transporteurs amphiphiles dérivés d'un acide aminé qui permet le greffage de différents nitroxydes.

Ces travaux, qui font l'objet du deuxième chapitre de ce manuscrit, ont donc consisté à synthétiser quatre transporteurs de nitroxydes, deux dérivés de l'acide aspartique et deux dérivés de la lysine, comportant chacun soit une chaîne hydrogénée soit une chaîne

perfluorocarbonée (Figure 1-23). Il nous en effet paru intéressant de comparer l'influence que la nature de la partie apolaire peut avoir sur l'activité biologique du nitroxyde greffé.

Vecteurs acide aspartique



Vecteurs lysine

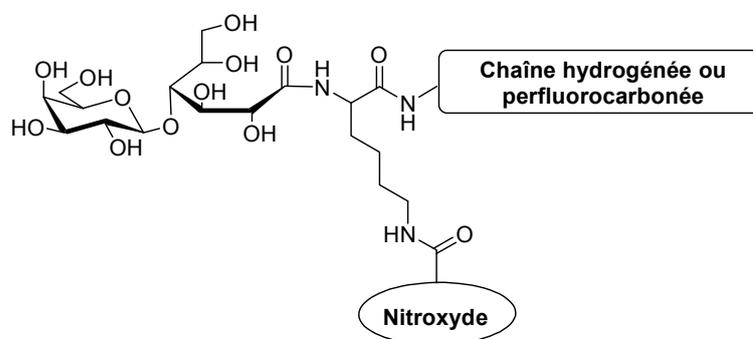


Figure 1-23. Structures générales des vecteurs amphiphiles porteurs de nitroxydes

Nous présenterons les résultats des études physico-chimiques réalisées sur ces quatre molécules qui ont consisté en la détermination de :

- leurs coefficients de partition par une technique chromatographique
- leurs capacités auto-associatives par diffusion dynamique de la lumière et par RPE
- leurs propriétés électrochimiques ainsi que de leur stabilité en milieu réducteur.

Enfin, nous finirons par présenter les résultats biologiques obtenus *in vitro* sur l'évaluation des potentialités de ces quatre nouvelles molécules.

Parallèlement à ces études, il nous a paru judicieux de poursuivre les nombreux travaux menés au laboratoire concernant l'insertion de la PBN au cœur même d'une structure amphiphile, dans le but d'en améliorer son passage transmembranaire et par conséquent sa biodisponibilité. Pour cela, nous avons choisi d'élaborer de nouveaux analogues de la LPBNAH et de la LPBNH15 (Figure 1-22), ces deux nitrones amphiphiles étant celles qui à

l'heure actuelle ont démontré les propriétés protectrices les plus spectaculaires, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Ces travaux, qui font l'objet du troisième chapitre de ce manuscrit, ont par conséquent consisté à synthétiser de nouvelles nitrones dérivées de la PBN, de nature plus ou moins amphiphile, afin d'évaluer l'impact de ce paramètre physico-chimique sur ses propriétés protectrices. Nous avons notamment modifié la chaîne hydrophobe de la LPBNAH et de la LPBNH15 en introduisant un motif cholestérol, afin d'augmenter l'hydrophobie de la PBN et ainsi lui permettre une meilleure affinité membranaire. Nous avons d'autre part substitué la tête lactobionolactone de la LPBNH15 par un résidu Glucose ou bien un résidu Tris, afin de mesurer l'influence que la nature de la partie polaire peut avoir sur l'activité biologique de la PBN. Enfin, nous avons mis au point la synthèse d'une série de nitrones à tête polaire Tris et à longueur de chaîne hydrogénée variable, dans le but d'obtenir une gamme de nitrones très facilement synthétisables.

Nous présenterons ensuite les résultats des études physico-chimiques qui ont consisté en la détermination de :

- leurs solubilités en milieu aqueux
- leurs coefficients de partition par une technique chromatographique
- leurs capacités à piéger les radicaux libres par mesure en RPE

Enfin, nous terminerons en présentant les résultats biologiques obtenus sur l'évaluation des potentialités neuroprotectrices de certaines de ces nouvelles nitrones.

Plus récemment, nous avons essayé d'élargir nos recherches, soit en greffant des antioxydants sur des structures macromoléculaires de type dendrimère, soit en modulant la BHL de la PBN selon un nouveau modèle de transporteur amphiphile.

Ces travaux, qui font l'objet du quatrième chapitre de ce manuscrit, ont donc consisté dans un premier temps à développer la synthèse de motifs poly-antioxydants de type dendrimères (Figure 1-24), dans le but d'amplifier leurs effets grâce à une multiplicité de motifs.

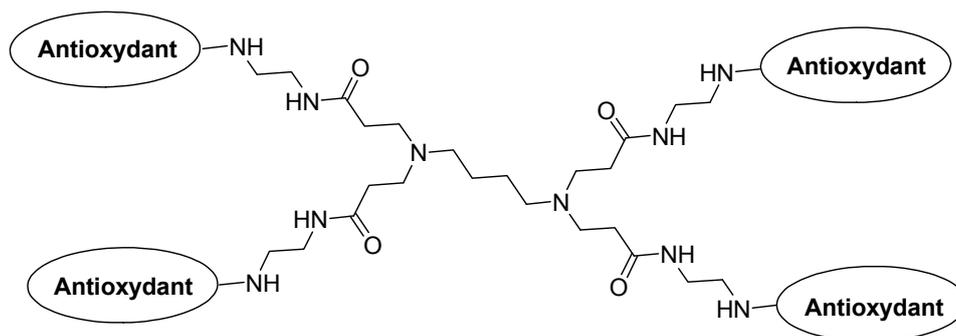


Figure 1-24. Structure générale d'un dendrimère PAMAM porteurs de quatre motifs antioxydants

Dans un second temps, ces travaux se sont orientés vers la synthèse d'une nouvelle nitrone dérivée de la PBN dont les composantes polaire et apolaire ne se situent plus de part et d'autre du motif PBN mais uniquement sur sa partie *tert*-butyle (Figure 1-25). Notre choix s'est alors porté sur un groupement pyridinium comme tête polaire, ainsi que sur une partie apolaire cyclique de type cyclohexane. La présence de ce groupement pyridinium devrait ainsi assurer à la molécule un ciblage mitochondrial, tandis que celle du cyclohexane devrait lui permettre une meilleure rigidité.

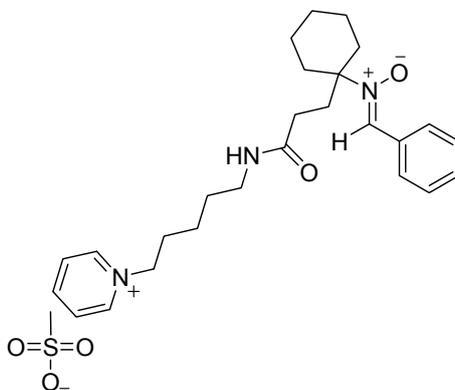


Figure 1-25. Structure de la nitrone *tert*-substituée dérivée de la PBN

RÉFÉRENCES

- ¹ Bielski B. H. J., Cabelli D. E., Arudi R. L., Ross A. B., Reactivity of hydroperoxyl/superoxide radicals in aqueous solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1993**, 14, 1041-1100.
- ² Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Biological relevant metal ion-dependant hydroxyl radical generation, *FEBS Letters.*, **1992**, 307, 108-112.
- ³ Wardman P., Candeias L. P., Fenton chemistry: an introduction, *Radiat Res.*, **1996**, 145, 523-531.
- ⁴ Delattre J., Beaudoux J-L., Bonnefont-Rousselot D., Radicaux libres et stress oxydant (Aspects biologiques et pathologiques), *Lavoisier*, **2005**.
- ⁵ Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A., Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation : The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch Biochem. Biophys.*, **1991**, 288, 481-487.
- ⁶ Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J. C., Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalysed by superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Physiol.*, **1992**, 298, 431-437.
- ⁷ Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 1620-1624.
- ⁸ Cadenas E., Davies J. A., Mitochondrial free radical generation, oxidase stress and aging. *Free Radical Bio. Med.*, **2000**, 29, 222-230.
- ⁹ Dawson T. L., Gores G. J., Niemien A. L., Herman B., Lemasters J., Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reduce stress in rat hepatocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **1993**, 264, 961-967.
- ¹⁰ Chance B., Sies H., Boveries A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, **1979**, 59, 527-605.
- ¹¹ Halliwell B., Gutteridge J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*, Troisième édition, Oxford university Press Inc., **1999**.
- ¹² Boveris A., Chance B., The mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem. J.*, **1973**, 134, 707-716.
- ¹³ Cadenas E., Boveris A., Ragan C. I., Stoppani A. O. M., Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase from beef-heart mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1977**, 180, 248-257.
- ¹⁴ Beckman K. B., Ames B. N., Mitochondrial aging: open questions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1998**, 854, 118-127.
- ¹⁵ Frankel E. N., Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance, *JAOCS*, **1984**, 61, 1908-1916.
- ¹⁶ Esterbauer H., Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1993**, 57, 779-786.
- ¹⁷ Zarcovic N., 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes, *Molecular Aspects of Medecine*, **2003**, 24, 281-291.
- ¹⁸ Berlett B. S., Stadtman E. R., Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 20313-20316.
- ¹⁹ Davies K. J. A., Delsignore M. E., Lin S. W., Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 9902-9907.
- ²⁰ Stadman E. R., Protein oxidation in aging and age-related diseases, *Ann. NY Acad. Sci.*, **2001**, 928, 22-38.
- ²¹ Esterbauer H., Schaur R. G., Zollner H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Rad. Biol. Med.*, **1991**, 11, 81-128.
- ²² Schaur R. J., Basic aspects of biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal, *Molecular Aspects of Medecine*, **2003**, 24, 149-159.
- ²³ Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J-L., Oxidative damage to DNA : Formation, measurement and biochemical features, *Mutat. Res.*, **2003**, 531, 5-23.
- ²⁴ Marnett L. J., Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, **2000**, 21, 361-370.
- ²⁵ Marnett L. J., Liid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde, *Mutat. Res.*, **1999**, 424, 83-95.
- ²⁶ Richter C., Park J. W., Ames B. N., Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **1988**, 85, 6465-6467.
- ²⁷ Zamzami N., Susin S. A., Marchetti P., Hirsch T., Gomez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G., Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J. Exp. Med.*, **1996**, 183, 1533-1544.
- ²⁸ Anderson K. M., Seed T., Harris J. E., Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell death, *Medical hypotheses*, **1999**, 52, 451-463.
- ²⁹ Kannan K., Jain S. K., Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology*, **2000**, 7, 153-163.
- ³⁰ Morel Y., Barouki R., Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem. J.*, **1999**, 342, 481-496.
- ³¹ Roussel A-M., Ferry M., Stress oxydant et vieillissement, *Nutrition clinique et métabolisme*, **2002**, 16, 285-291
- ³² Sies H., Oxidative stress : from basic research to clinical application, *Am. J. Med.*, **1991**, 91, 31S-38S.
- ³³ Rötig A., Cormier V., Rustin P., Munnich A., Aspects cliniques des maladies mitochondriales, *Médecine Thérapeutique*, **1995**, 1, 465-475.

- ³⁴ Von Kleist-Retzow J. C., Cormier-Daire V., De Lonlay P., Parfait B., Chretien D., Rustin P., Feingold J., Rötig A., Munnich A., A high rate (20%-30%) of parental consanguinity in cytochrome-oxidase deficiency, *Am. J. Human. Genet.*, **1998**, 63, 428-435.
- ³⁵ Bobko A.A., Kirilyuk I. A., Grigor'ev I. A., Zweier J. L., Khramtsov V. V., Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines : roles for ascorbate and glutathione, *Free Radical Biology & Medicine*, **2007**, 42, 404-412.
- ³⁶ Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K-I., Simone N. L., Cook J. A., Krishma M. C., Mitchell J. B., The chemistry and biology of nitroxide compounds, *Free Rad. Biol. Med.*, **2007**, 42, 1632-1650.
- ³⁷ Goldstein S., Samuni A., Hideg K., Merenyi G., Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110, 3679-3685.
- ³⁸ Krishna J. B., DeGraff W., Handovszky O. H., Sar C. P., Kalai T., Jekö J., Russo A., Mitchell J., Hideg B. K., Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 3477-3492.
- ³⁹ Mitchell J. B., Samuni A., Krishna C., DeGraff W. G., Ahn M. S., Samuni U., Russo A., Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics, *Biochemistry*, **1990**, 29, 2802-2807.
- ⁴⁰ Dhanasekaran A., Kotamraju S., Karunakaran C., Kalivendi S. V., Thomas S., Joseph J., Kalyanaraman B., Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide, *Free Radical Biol. Med.*, **2005**, 39, 567-583.
- ⁴¹ Krishna M. C., Grahame D. A., Samuni A., Mitchell J. B., Russo A., Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalysed dismutation of superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 5537-5541.
- ⁴² Kocherginsky N., Swartz H., Nitroxide spin labels : reactions in biology and chemistry, *Boca Raton, FL: CRC Press*, **1995**.
- ⁴³ Krishna M. C., Samuni A., Taira J., Goldstein S., Mitchell J. B., Russo A., Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins : kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 26018-26025.
- ⁴⁴ Miura Y., Utsumi H., Hamada A., Antioxidant activity of nitroxide radicals in lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1993**, 300, 148-156.
- ⁴⁵ Bar-on P., Mohsen M., Zhang R. L., Feigin E., Chevion M., Samuni A., Kinetics of nitroxide reaction with iron(II), *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8070-8073.
- ⁴⁶ Aronovitch Y., Godinger D., Israeli A., Krishna M. C., Samuni A., Goldstein S., Dual activity of nitroxides as pro- and antioxidants: catalysis of copper-mediated DNA breakage and H₂O₂ dismutation, *Free Rad. Biol. Med.*, **2007**, 42, 1317-1325.
- ⁴⁷ Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K-I., Simone N. L., Cook J. A., Krishma M. C., Mitchell J. B., The chemistry and biology of nitroxide compounds, *Free Rad. Biol. Med.*, **2007**, 42, 1632-1650.
- ⁴⁸ Chalfont G. R., Perkins M. J., Horsfield A., Probe for homolytic reactions in solution. II. Polymerization of styrene, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 7141-7142.
- ⁴⁹ Janzen E. G., Blackburn B. J., Detection and identification of short-lived free radicals by electron spin resonance trapping techniques (spin trapping). Photolysis of organolead, -tin, and -mercury compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 4481-4490.
- ⁵⁰ Janzen E. G., Spin-trapping, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, 4, 31-40.
- ⁵¹ Sankurati N., Kotake Y., Janzen E. G., Studies on the stability of oxygen radical spin adducts of a new spin trap : 5-methyl-5-phenylpyrroline-1-oxide (MPPPO), *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 21, 889.
- ⁵² Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E., J. Paxton J., Spin trapping of superoxide, *Mol. Pharmacol.*, **1979**, 16, 676-685.
- ⁵³ Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E., Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 4994-4999.
- ⁵⁴ Rosen G. M. B., Bradley E., Howard J., Pou S., *Free Radicals: Biology and Detection by spin trapping*, Oxford University Press, New York, **1999**.
- ⁵⁵ Villamena F. A., Xia S., Merle J. K., Lauricella R., Tuccio B., Hadad C. M., Zweier J. L., Reactivity of superoxide radical anion with cyclic nitrones : role of intramolecular h-bond and electrostatic effects. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 8177-8191.
- ⁵⁶ Schmid P., Ingold K. U., Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. 31. Rate constants for spin trapping .1. Primary alkyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 2493-2500.
- ⁵⁷ Maeda Y., Ingold K. U., Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. 34. Rate constants for spin trapping .2. Secondary alkyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 4975-4981.
- ⁵⁸ Chiu T. M., Siemiarz A., Wong S. K., Bolton J. R., Time resolution enhancement technique applied to a study of the absolute rate of reaction of ketyl radicals with a spin trap using flash photolysis electron paramagnetic resonance, *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 3343-3347.
- ⁵⁹ Janzen E. G., Evans C. A., Rate constants for spin trapping tert-butoxy radicals as studied by electron spin resonance, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 8205-8206.

- ⁶⁰ Tsai P., Ichikawa K., Mailer C., Pou S., Halpern H., J., Robinson B. H., Nielsen R., Rosen G. M., Esters of 5-carboxyl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide : a family of spin traps for superoxide, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 7811-7817.
- ⁶¹ Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts, *Mol. Pharmacol.*, **1982**, 21, 262-265.
- ⁶² Frejaville C., Karoui H., Tuccio B., Le Moigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R., Tordo P., 5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) : a new phosphorylated nitron for the efficient in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals, *J. Chem. Soc., Chem. comm.*, **1994**, 1793-1794.
- ⁶³ Frejaville C., Karoui H., Tuccio B., Le Moigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R., Tordo P., 5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) : a new phosphorylated nitron for the efficient in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 258-265.
- ⁶⁴ Stolze K., Udilova N., Nohl H., Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase. *Free Rad. Biol. Med.*, **2000**, 29, 1005-1014.
- ⁶⁵ Chalier F., Tordo P., 5-diisopropoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide, DIPPMPPO, a crystalline analog of the nitron DEPMPO : synthesis and spin trapping properties, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 2110-2117.
- ⁶⁶ Zhao H., Joseph J., Zhang H., Karoui H., Kalyanaraman B., Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap : a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathionyl radicals, *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, 31, 599-606.
- ⁶⁷ Villamena F., Zweier J., Superoxide radical trapping and spin adduct decay of 5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline N-Oxide (BocMPO) : kinetic and theoretical analysis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **2002**, 1340-1344.
- ⁶⁸ Stolze K., Udilova N., Rosenau T., Hofinger A., Nohl H., Synthesis and characterization of EMPO-derived 5,5-disubstituted 1-pyrroline N-oxides as spin traps forming exceptionally stable superoxide spin adducts, *Biol. Chem.*, **2003**, 384, 493-500.
- ⁶⁹ Olive G., Mercier A., Le Moigne F., Rockenbauer A., Tordo P., 2-ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide : evaluation of the spin trapping properties, *Free Rad. Biol. Med.*, **2000**, 28, 403-408.
- ⁷⁰ Zhang H., Joseph J., Vasquez-Vivar J., Karoui H., Nsanzumuhire C., Martasek P., Tordo P., Kalyanaraman B., Detection of superoxide anion using an isotopically labeled nitron spin trap : potential biological applications, *FEBS Lett.*, **2000**, 473, 58-62.
- ⁷¹ Stolze K., Udilova N., Rosenau T., Hofinger A., Nohl H., Spin adducts of superoxide, alkoxy, and lipid-derived radicals with EMPO and its derivatives, *Biol. Chem.*, **2002**, 383, 813-820.
- ⁷² Villamena F. A., Hadad C. M., Zweier J., Theoretical study of the spin trapping of hydroxyl radical by cyclic nitrones : a density functional theory approach, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 1816-1829.
- ⁷³ Villamena F. A., Rockenbauer A., Gallucci J., Velayutham M., Hadad C. M., Zweier J. L., Spin trapping by 5-carbamoyl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (AMPO) : theoretical and experimental studies, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 7994-8004.
- ⁷⁴ Villamena F. A., Merle J. K., Hadad C. M., Zweier J. L., Superoxide radical anion adduct of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). 2. The thermodynamics of decay and EPR spectral properties, *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 6089-6098.
- ⁷⁵ Han Y., Tuccio B., Lauricella R., Villamena F. A., Improved spin trapping properties by β -Cyclodextrin-cyclic nitron conjugate, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7108-7117.
- ⁷⁶ Kotake Y., Janzen E. G., Decay and fate of the hydroxyl radical adduct of α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) in aqueous media, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9503-9506.
- ⁷⁷ Janzen E. G., Blackburn B. J., Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5909-5910.
- ⁷⁸ Buettner G. R., Spin trapping : ESR parameters of spin adducts 1474 1528V, *Free Rad. Biol. Chem.*, **1987**, 3, 259-303.
- ⁷⁹ Zeghdaoui A., Tuccio B., Finet J. P., Cerri V., Tordo P., β -phosphorylated α -phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) analogues: a new series of spin traps for oxyl radicals, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1995**, 2087-2089.
- ⁸⁰ Tuccio B., Zeghdaoui A., Finet J. P., Cerri V., Tordo P., Use of new β -phosphorylated nitrones for the spin trapping of free radicals, *Res. Chem. Intermed.* **1996**, 22, 393-404.
- ⁸¹ Rizzi C., Marque S., Belin F., Bouteiller J-C., Lauricella R., Tuccio B., Cerri V., Tordo P., PPN-type nitrones : preparation and use of a new series of β -phosphorylated spin-trapping agents, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1997**, 2513-2518.
- ⁸² Roubaud V., Lauricella R., Bouteiller J-C., Tuccio B., N-2-(2-ethoxycarbonyl-propyl) α -phenylnitron : an efficacious lipophilic spin trap for superoxide detection, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**, 397, 51-56.

- ⁸³ Stolze K., Udilova N., Rosenau T., Hofinger A., Nohl H., Spin adducts of several N-2-(2-alkoxycarbonyl-propyl)- α -pyridyl-nitron derivatives with superoxide, alkyl and lipid-derived radicals, *Biochem. Pharma.*, **2003**, 66, 1717-1726.
- ⁸⁴ Allouch A., Roubaud V., Lauricella R., Bouteiller J-C., Tuccio B., Preparation and use as spin trapping agents of new ester-nitrones, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 593-598.
- ⁸⁵ Allouch A., Roubaud V., Lauricella R., Bouteiller J-C., Tuccio B., Spin trapping of superoxide by diester-nitrones, 2005, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 2458-2462.
- ⁸⁶ Novelli G. P., Angiolini P., Tani R., Consales G., Bordi L., Phenyl-t-butyl-nitron is active against traumatic shock in rats, *Free Rad. Res. Commun.*, **1985**, 1, 321-327.
- ⁸⁷ McKechnie K., Furman B. L., Parrat J. R., Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats, *Circ. Shock*, **1986**, 19, 429-439.
- ⁸⁸ Hamburger S. A., McCay P. B., Endotoxin-induced mortality in rats is reduced by nitrones, *Circ. Shock*, **1989**, 29, 329-334.
- ⁸⁹ Olivier C. N., Starke-Reed P. E., Stadtman E. R., Liu G. J., Carney J. M., Floyd R. A., Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury in gerbil brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1990**, 87, 5144-5147.
- ⁹⁰ Clough-Helfman C., Phillis J. W., The free radical trapping agent N-tert-butyl-alpha-phenyl nitron (PBN) attenuates cerebral ischaemic injury in gerbils, *Free Rad. Res. Comm.*, **1991**, 15, 177.
- ⁹¹ Mori H., Arai T., Ishii H., Adachi T., Endo N., Makino K., Mori K., Neuroprotective effects of pterin-6-aldehyde in gerbil global brain ischemia : comparison with those of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron, *Neurosci. Lett.*, **1998**, 241, 99-102.
- ⁹² Cao X., Phillis J. W., α -phenyl-tert-butyl nitron reduces cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia, *Brain Res.*, **1994**, 644, 267-272.
- ⁹³ Zhao Q., Pahlmark K., Smith M. L., Siesjö B. K., Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats, *Acta. Physiol. Scand.*, **1994**, 152, 349-350.
- ⁹⁴ Folbergrova J., Zhao Q., Katsura K. I., Siesjö B. K., α -Phenyl-N-tert-butyl-nitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 5057-5061.
- ⁹⁵ Li P. A., He Q. P., Nakamura L., Csiszar K., Free radical spin trap α -phenyl-N-tert-butyl-nitron inhibits caspase-3 activation and reduces brain damage following a severe forebrain ischemic injury, *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, 31, 1191-1197.
- ⁹⁶ Nakao N., Brundin P., Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid, *Neuroscience*, **1997**, 76, 749-761.
- ⁹⁷ Yamane H., Nakai Y., Takayama M., Iguchi H., Nakagawa T., Kojima A., Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*, **1995**, 252, 504-508.
- ⁹⁸ Evans P., Halliwell B., Free radicals and hearing : cause, consequence, and criteria, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1999**, 27, 1-19.
- ⁹⁹ Henderson D., Bielefeld E. C., Harris K. C., Hu B. H., The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss, *Ear Hear.*, **2006**, 27, 1-19.
- ¹⁰⁰ Fechter L. D., Liu Y., Pearce T. A., Cochlear protection from carbon monoxide exposure by free radical blockers in the guinea pig, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1997**, 142, 47-55.
- ¹⁰¹ Fechter L. D., Klis S. F., Shirwany N. A., Moore T. G., Rao D. B., Acrylonitrile produces transient cochlear function loss and potentiates permanent noise-induced hearing loss, *Toxicol. Sci.*, **2003**, 75, 117-123.
- ¹⁰² Rao D. B., Fechter L. D., Protective effects of Phenyl-N-tert-butyl-nitron on the potentiation of noise-induced hearing loss by carbon monoxide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2000**, 167, 125-131.
- ¹⁰³ Ranchon I., Chen S., Alvarez K., Anderson R. E., Systemic administration of Phenyl-N-tert-butyl-nitron protects the retina from light damage, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2001**, 42, 1375-1379.
- ¹⁰⁴ Ranchon I., LaVail M. M., Kotake Y., Anderson R. E., Free radical trap Phenyl-N-tert-butyl-nitron protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration, *J. Neurosci.*, **2003**, 23, 6050-6057.
- ¹⁰⁵ Choteau F., Durand G., Ranchon-Cole I., Cercy C., Pucci B. Cholesterol-based α -Phenyl-N-tert-butyl nitron derivatives as antioxidants against light-induced retinal degeneration. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2010**, 20, 7405-7409.
- ¹⁰⁶ Tabatabaie T., Kotake Y., Wallis G., Jacob J. M., Floyd R. A., Spin trapping agent α -phenyl-N-tert-butyl-nitron protects against the onset of drug-induced insulin-dependent diabetes mellitus, *FEBS Lett.*, **1997**, 407, 148-152.
- ¹⁰⁷ Jotti A., Paracchini L., Perletti G., Piccinini F., Cardiotoxicity induced by doxorubicin in vivo : protective activity of the spin trap alpha-phenyl-tert-butyl nitron, *Pharm. Res.*, **1992**, 26, 143-150.

- ¹⁰⁸ Paracchini L., Jotti A., Bottiroli G., Prosperi E., Supino R., Piccinini F., The spin trap alpha-phenyl-tert-butyl nitron protects against myelotoxicity of cardiotoxicity of adriamycin while preserving the cytotoxic activity, *Anticancer Res.*, **1993**, 13, 1607-1612.
- ¹⁰⁹ Parman T., Wiley M. J., Wells P. G., Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity, *Nature Medicine*, **1999**, 5, 582-585.
- ¹¹⁰ Carney J. M., Starke-Reed P. E., Olivier C. N., Landum R. W., Wu J. F., Floyd R. A., Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound α -phenyl-N-tert-butyl-nitron, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 3633-3636.
- ¹¹¹ Sack C. A., Socci D. J., Crandall B. M., Arendash G. W., Antioxidant treatment with α -phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) improves the cognitive performance and survival of aging rats, *Neuroscience Lett.*, **1996**, 205, 181-184.
- ¹¹² Saito K., Yoshioka H., Cutler R. G., A spin-trap, α -phenyl-N-tert-butyl-nitron, extends the life span of mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62, 792-794.
- ¹¹³ Atamna H., Robinson C., Ingersoll R., Elliott H., Ames B. N., N-t-Butyl hydroxylamine is an antioxidant that reverses age-related changes in mitochondria in vivo and in vitro, *FASEB J.*, **2001**, 15, 2196-2204.
- ¹¹⁴ Chen G., Bray T. M., Janzen E. G., McCay P. B., Excretion, metabolism and tissue distribution of a pin trapping agent α -phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) in rats, *Free Rad. Res. Commun.*, **1990**, 9, 317-323.
- ¹¹⁵ Cheng H. Y., Liu T., Feurstein G., Barone F. C., Distribution of spin-trapping compounds in rat blood and brain : in vivo microdialysis determination, *Free Rad. Biol. Med.*, **1993**, 14, 243.
- ¹¹⁶ Liu K. J., Kotake Y., Lee M., Miyake M., Sugden K., Yu Z., Swartz H. M., High-performance liquid chromatography study of the pharmacokinetics of various spin traps for application to in vivo spin trapping, *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 27, 82-89.
- ¹¹⁷ Janzen E. G., Poyer J. L., Scaeffler C. F., Downs P. E., DuBose C. M., Biological spin trapping II. Toxicity of nitron spin traps : dose-ranging in the rat, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1995**, 30, 239-247.
- ¹¹⁸ Schaefer C. F., Janzen E. G., West M. S., Poyer J. L., Kosanke S. D., *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 21, 427.
- ¹¹⁹ Haseloff R. F., Mertsch K., Rohde E., Baeger I., Grigor'ev I. A., Blasig I. E., Cytotoxicity of spin trapping compounds, *FEBS Letters*, **1997**, 418, 73-75.
- ¹²⁰ Hoye A. T., Davoren J. E., Wipf P., Targeting mitochondria, *Accounts of chemical research*, **2008**, 1, 87-87.
- ¹²¹ Zhao K., Zhao G. M., Wu D., Soong Y., Birk A. V., Schiller P. W., Szeto H. H., Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 34682-34690.
- ¹²² Winterbourn C. C., Parsons-Mair H. N., Gebicki S., Gebicki J. M., Davies M. J., Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides, *Biochem. J.*, **2004**, 381, 241-248.
- ¹²³ Zhao K., Luo G., Zhao G. M., Schiller P. W., Szeto H. H., Transcellular transport of a highly polar 3+ net charge opioid tetrapeptide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, 304, 425-432.
- ¹²⁴ Wipf P., Xiao J., Jiang J., Belikova N. A., Tyurin V. A., Fink M. P., Kagan V. E., Mitochondrial targeting of selective electron scavengers : synthesis and biological analysis of hemigrammidin-TEMPO conjugates, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 12460-12461.
- ¹²⁵ Muratovska A., Lightowers R. N., Taylor R. W., Wilce J. A., Murphy M. P., Targeting large molecules to mitochondria, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2001**, 49, 189-198.
- ¹²⁶ Sheu S. S., Nauduri D., Anders M. W., Targeting antioxidants to mitochondria : a new therapeutic direction, *BBA*, **2006**, 1762, 256-265.
- ¹²⁷ Liberman E.A., Topaly V. P., Tsofina L. M., Jasaitis A. A., Skulachev V. P., Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential in mitochondria, *Nature*, **1969**, 222, 1076-1078.
- ¹²⁸ Murphy M. P., Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 326-330.
- ¹²⁹ Murphy M. P., Smith R. A. J., Drug delivery to mitochondria : the key to mitochondria medicine, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2000**, 41, 235-250.
- ¹³⁰ Murphy M. P., Echtay K. S., Blaikie F. H., Asin-Cayuela J., Cochemé H. M., Green K., Buckingham J. A., Taylor E. R., Hurrell F., Hughes G., Miwa S., Cooper C. E., Svistunenko D. A., Smith R. A. J., Brand M. D., Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbonyl-centered radicals and initiating lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 48534-48545.
- ¹³¹ Xu Y., Kalyanaraman B., Synthesis and ESR studies of a novel cyclic nitron spin trap attached to a phosphonium group : a suitable trap for mitochondria-generated ROS?, *Free Rad. Res.*, **2007**, 41, 1-7.
- ¹³² Hardy M., Chalier F., Ouari O., Finet J. P., Rockenbauer A., Kalyanaraman B., Tordo P., Mito-DEPMPO synthesized from a novel NH₂-reactive DEPMPO spin trap : a new and improved trap for the detection of superoxide, *Chem. Commun.*, **2007**, 1083-1085.

- ¹³³ Hardy M., Rockenbauer A., Vasquez-Vivar J., Felix C., Lopez M., Srinivasan S., Avadhani N., Tordo P., Kalyanaraman B., Detection, characterization, and decay kinetics of ROS and thyl adducts of mito-DEPMPO spin trap, *Chem. Res. Toxicol.*, **2007**, 20, 1053-1060.
- ¹³⁴ Trnka J., Blaikie F. H., Smith R., Murphy M. P., A mitochondrial-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria, *Free Rad. Biol. Med.*, **2008**, 44, 1406-1419.
- ¹³⁵ Dessolin J., Schuler M., Quinart A., De Giorgi F., Ghosez L., Ichas F., Selective targeting of synthetic antioxidants to mitochondria: towards a mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases, *Eur. J. Pharmacol.*, **2002**, 447, 155-161.
- ¹³⁶ Sheu S. S., Nauduri D., Anders M. W., Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction, *BBA*, **2006**, 1762, 256-265.
- ¹³⁷ Smith R. A. J., Porteous C. M., Gane A. M., Murphy M. P., Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 5407-5412.
- ¹³⁸ Shao Z., Li Y., Chermak T., Mitra A. K., Cyclodextrins as mucosal adsorption promoters of Insulin II. Effects of β -cyclodextrin derivatives on ∞ -chymotryptic degradation and enteral adsorption of insulin in rats, *Pharm. Res.*, **1994**, 11, 1174-1179.
- ¹³⁹ Morandat S., Durand G., Polidori A., Desigaux L., Bortolato M., Roux B., Pucci B., PBN derived amphiphilic spin-traps. I/Synthesis and study of their miscibility with polyunsaturated phospholipids, *Langmuir*, **2003**, 19, 9699-9705.
- ¹⁴⁰ Ortial S., Synthèse, études physico-chimiques et biologiques de nouveaux vecteurs amphiphiles porteurs d'antioxydants, *Thèse de doctorat*, **2006**, Université d'Avignon.
- ¹⁴¹ Hardy M., Ouari O., Charles L., Finet J-P., Iacazio G., Monnier V., Rockenbauer A., Tordo P., Synthesis and spin-trapping behavior of 5-ChEPMPPO, a cholesteryl ester analogue of the spin trap DEPMPO, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 10426-10433.
- ¹⁴² Simons K., Ikonen E., How cells handle cholesterol, *Science*, **2000**, 290, 1721-1726.
- ¹⁴³ Han Y., Tuccio B., Lauricella R., Villamena F. A., Improved spin trapping properties by β -cyclodextrin-cyclic nitron conjugate, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7108-7117.
- ¹⁴⁴ Janzen E. G., Zawalski R. C., Synthesis of nitronyl alcohols and their benzoate esters, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 1900-1903.
- ¹⁴⁵ Janzen E. G., Dudley R. L., Shetty R. V., Synthesis and electron spin resonance chemistry of nitronyl labels for spin trapping. α -phenyl N-[5-(5-methyl-2,2-dialkyl-1,3-dioxanyl)] nitrones and α -(N-alkylpyridinium) N-(tert-butyl) nitrones, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 243-245.
- ¹⁴⁶ Janzen E. G., Coulter G. A., Spin trapping in SDS micelles, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 1962-1968.
- ¹⁴⁷ Huie R., Cherry W. R., Facile One-Step synthesis of Phenyl-tert-butyl nitron (PBN) and its derivatives, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1531-1532.
- ¹⁴⁸ Yang Y., Li Q., Shauaib A., Neuroprotection by 2-h postischemia administration of two radical scavengers, α -phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) and N-tert-butyl-(2-sulfophényl)-nitron (S-PBN), in rats subjected to focal embolic cerebral ischemia, *Exp. Neurol.*, **2000**, 163, 39-45.
- ¹⁴⁹ Marklund N., Clausen F., McIntosh T. K., Hillered L., Free radical scavenger post-treatment improves functional and morphological outcome after fluid percussion injury in the rat, *J. Neurotrauma*, **2001**, 18, 821-832.
- ¹⁵⁰ Green A. R., Ashwood T., Odegren T., Jackson D. M., Nitron as neuroprotective agents in cerebral ischemia, with particular reference to NXY-059, *Pharmacology and therapeutics*, **2003**, 100, 195-214.
- ¹⁵¹ Zhao Z., Cheng M., Maples K. R., Ma J. Y., Buchan A. M., NXY-059, a novel free radical trapping compound, reduces cortical infarction after permanent focal cerebral ischemia in the rat, *Brain Res.*, **2001**, 909, 46-50.
- ¹⁵² Kuroda S., Tsuchidate R., Smith M. L., Maples K. R., Siesjo B. K., Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal ischemia in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1999**, 18, 778-787.
- ¹⁵³ Green A. R., Lanbeck-Vallen K., Ashwood T., Lundquist S., Lindstrom Böö E., Jonasson H., Campbell M., Brain penetration of the novel free radical trapping neuroprotectant NXY-059 in rats subjected to permanent focal ischemia, *Brain Res.*, **2006**, 1072, 224-226.
- ¹⁵⁴ Thomas C. E., Ohlweiler D. F., Carr A. A., Nieduzac T. R., Hay D. A., Adams G., Vaz R., Bernotas R. C., Characterization of the radical trapping activity of a novel series of nitron spin trap, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 3097-3104.
- ¹⁵⁵ Johnson M. P., McCarty D. R., Velayo N. L., Markgraf C. G., Chmielewski P. A., Ficorilli J. V., Cheng H. C., Thomas C. E., MDL 101,002, a free radical spin trap, is efficacious in permanent and transient focal ischemia models, *Life Sci.*, **1998**, 63, 241-253.
- ¹⁵⁶ Thomas C. E., Ohlweiler D. F., Taylor V. L., Schmidt C. J., Radical trapping and inhibition of iron-dependent CNS damage by cyclic nitron spin traps, *J. Neurochem.*, **1997**, 68, 1173-1182.
- ¹⁵⁷ Dhainaut A., Tizot A., Raimbaud E., Lockart B., Lestage P., Golstein S., Synthesis, structure, and neuroprotective properties of novel imidazolyl nitrones, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 2165-2175.

- ¹⁵⁸ Becker D. A., Highly sensitive colorimetric detection and facile isolation of diamagnetic free radical adducts of novel chromotropic nitron spin trapping agents readily derived from guaiazulene, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 905-906.
- ¹⁵⁹ Yang L., Calingasan N. Y., Chen J., Ley J. J., Becker D. A., Beal M. F., A novel azulenyl nitron antioxidant protects against MPTP and 3-nitropropionic acid neurotoxicities, *Exp. Neurol.*, **2005**, 191, 86-93.
- ¹⁶⁰ Becker D. A., Ley J. J., Echevoyen L., Alvarado R., Stilbazulenyl nitron (STAZN): a nitronyl-substituted hydrocarbon with the potency of classical phenolic chain-breaking antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4678-4684.
- ¹⁶¹ Barclay L. R., Vinqvist M. R., Do spin traps also act as classical chain-breaking antioxidants? A quantitative kinetic study of phenyl *tert*-butylnitron (PBN) in solution and in liposomes, *Free Rad. Biol. Med.*, **2000**, 28, 1079.
- ¹⁶² Porcal W., Hernandez P., Gonzalez M., Ferreira A., Olea-Azar C., Cerecetto H., Castro A., Heteroarylnitrones as drugs for neurodegenerative diseases : synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 6150-6159.
- ¹⁶³ Ouari O., Chalier F., Bonaly R., Pucci B., Tordo P., Synthesis and spin-trapping behaviour of glycosylated nitrones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 2299-2307.
- ¹⁶⁴ Ouari O., Polidori A., Pucci B., Tordo P., Chalier F., Synthesis of a glycolipidic amphiphilic nitron as a new spin trap, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3554-3556.
- ¹⁶⁵ Geromel V., Kadhom N., Cebalos-Picot I., Ouari O., Polidori A., Munnich A., Rotig A., Rustin P., Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6-gene of the mitochondrial DNA, *Hum. Mol. Genet.*, **2001**, 10, 1221-1228.
- ¹⁶⁶ Périno S., Contino-Pépin C., Jasseron S., Rapp M., Maurizis J.C., Pucci B., Design, synthesis and preliminary biological evaluations of novel amphiphilic drug carriers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 1111-1114.
- ¹⁶⁷ Ortial S., Durand G., Poeggeler B., Polidori A., Pappolla M. A., Böker J., Hardeland R., Pucci B., Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers : a new class of protective agents, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2812-2820.
- ¹⁶⁸ Durand G., Proszak R. A., Yongbin H., Ortial S., Rockenbauer A., Pucci B., Villamena F. A., Spin trapping and cytoprotective properties of fluorinated amphiphilic carrier conjugates of cyclic versus linear nitrones, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, 22, 1570-1582.
- ¹⁶⁹ Durand G., Synthèse, études physico-chimiques et biologiques de nouveaux spin-traps amphiphiles, *Thèse de doctorat*, **2002**, Université d'Avignon.
- ¹⁷⁰ Durand G., Polidori A., Salles J-P., Prost M., Durand P., Pucci B., Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derived from PBN and Lipoic acid, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5320-5327.
- ¹⁷¹ Durand G., Polidori A., Salles J-P., Pucci B., Synthesis of a new family of glycolipidic nitrones as potential antioxidant drugs for neurodegenerative disorders, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 859-862.
- ¹⁷² Durand G., Poeggeler B., Böker J., Raynal S., Polidori A., Pappolla M. A., Hardeland R., Pucci B., Fine-tuning the amphiphilicity : a crucial parameter in the design of potent α -Phenyl-*N-tert*-butylnitron analogues, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3976-3979.
- ¹⁷³ Tanguy S., Durand G., Reboul C., Polidori A., Pucci B., Dautat M., Obert P., Protection against reactive oxygen species injuries in rat isolated perfused hearts : effect of LPBNAH, a new amphiphilic spin-trap derived from PBN, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2006**, 20, 147-149.
- ¹⁷⁴ Poeggeler B., Durand G., Polidori A., Pappolla M. A., Vega-Naredo I., Coto-Montes A., Böker J., Hardeland R., Pucci B., Mitochondrial medicine: neuroprotection and life extension by the new amphiphilic nitron LPBNAH acting as a highly potent antioxidant agent, *J. Neurochem.*, **2005**, 95, 962-973.
- ¹⁷⁵ Asanuma T., Yasui H., Inanami O., Walki K., Takahashi D., Iizuka T., Uemura G., Durand G., Polidori A., Kon Y., Pucci B., Kuwabara M., *Chemistry & Biodiversity*, **2007**, 4, 2253-2267.
- ¹⁷⁶ Durand G., Poeggeler B., Ortial S., Polidori A., Villamena F. A., Böker J., Hardeland R., Pappolla M. A., Pucci B., Amphiphilic amide nitrones: a new class of protective agents as modifiers of mitochondrial metabolism, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4849-4861.

Chapitre 2 : Nitroxydes amphiphiles

A. INTRODUCTION	52
1. CARACTERISTIQUES GENERALES DES TRANSPORTEURS AMPHIPHILES UTILISEES	52
2. TRAVAUX PRELIMINAIRES	53
3. PRESENTATION DES NOUVEAUX DERIVES AMPHIPHILES	56
B. SYNTHÈSE DES DERIVES AMPHIPHILES PORTEURS DE NITROXYDES	58
1. ANALYSE RETROSYNTHETIQUE	58
2. LES DIFFERENTES ETAPES DE LEURS SYNTHÈSES.....	59
C. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES	73
1. ÉTUDE DES COEFFICIENTS DE PARTITION ($\text{LOG } K'_w$)	73
2. ÉTUDE D'AUTO-ASSOCIATION EN MILIEU AQUEUX.....	77
3. ÉTUDE DES POTENTIELS OXYDANT ET REDUCTEURS.....	84
D. ETUDES BIOLOGIQUES <i>IN VITRO</i>	88
1. ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITE DES NITROXYDES.....	88
2. ÉTUDE DES PROPRIETES CYTOPROTECTIVES.....	90
E. CONCLUSION	92

A. Introduction

L'objectif de ce travail est d'améliorer l'activité protectrice d'antioxydants synthétiques de type nitroxyde, en modulant leur balance hydrophile lipophile afin de leur permettre un meilleur passage transmembranaire. L'intérêt de moduler la BHL de tels composés s'explique par les multiples propriétés antioxydantes qu'ils possèdent et que nous avons mentionné en détail dans l'introduction de ce manuscrit (cf. Partie B, §2). Ces nitroxydes ont donc été greffés sur des structures monomoléculaires amphiphiles, dont le potentiel de vectorisation a été démontré par le passé au laboratoire. L'impact de ce caractère amphiphile sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques a par la suite été précisé.

1. Caractéristiques générales des transporteurs amphiphiles utilisées

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, deux types de transporteurs monomoléculaires amphiphiles ont déjà été synthétisés et étudiés au laboratoire. Dans le cadre de ce deuxième chapitre, notre choix s'est porté sur l'utilisation du modèle moléculaire à fixation latérale, où les différentes parties indispensables à une bonne activité biologique s'articulent autour d'un acide aminé polyfonctionnel. La structure générale de tels transporteurs amphiphiles, (cf. Partie E, §2), peut être décrite de la façon suivante :

- une tête polaire de type lactobionamide, qui confère une bonne hydrosolubilité à la molécule,
- une chaîne hydrophobe, qui devrait favoriser le passage transmembranaire,
- un acide aminé, qui sert de lien entre la partie polaire et la partie apolaire et dont la chaîne latérale permet le greffage du principe actif.

Le choix d'un acide aminé comme motif central apparaît comme une évidence tant par son absence de toxicité que par ces nombreuses possibilités de fonctionnalisation. C'est ainsi que le laboratoire a choisi d'utiliser la lysine (fonction amine sur la chaîne latérale) et l'acide aspartique (fonction acide) car ils offrent la possibilité d'intégrer des antioxydants diversement substitués par des réactions de couplage peptidique classiques.

2. Travaux préliminaires

2.1. Etudes de biodistribution du transporteur lysine radiomarqué

Dans un premier temps, des études de biodistribution ont été menées sur un transporteur amphiphile dérivé de la lysine ne possédant pas de principe actif et dont la structure est représentée sur la figure 2-1.

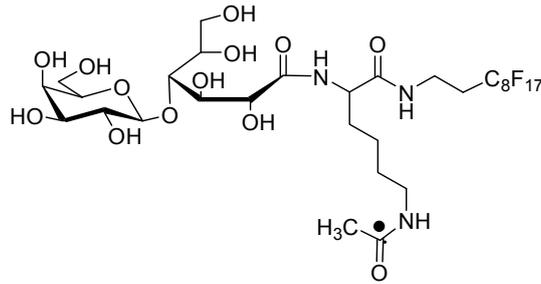


Figure 2-1. Structure chimique du transporteur lysine radiomarqué¹

Afin de favoriser l'étude de sa biodistribution après administration intraveineuse chez le rat, le principe actif a été remplacé par un groupement acétyle radiomarqué au ¹⁴C. La répartition de la radioactivité dans plusieurs organes à différents temps a montré qu'il était rapidement distribué dans tous les tissus et qu'il était lentement éliminé de l'organisme par voie biliaire, sans qu'une quelconque toxicité n'ait été observée. Par conséquent, la présence prolongée du transporteur dans l'organisme semble indiquer qu'il pourrait accroître la rémanence du principe actif et donc son activité potentielle.

2.2. Etudes de la vectorisation de différents principes actifs

Compte tenu des résultats satisfaisants obtenus lors de l'étude de biodistribution de ce premier transporteur muni d'un motif central de type acide aminé, la vectorisation de différents antioxydants synthétiques a pu être envisagée. Deux dérivés amphiphiles utilisables pour le transport de motifs à activité antioxydante ont alors été synthétisés. Le premier est composé de la lysine comme acide aminé central et d'une chaîne perfluorée dérivée du 1H,1H,2H,2H perfluorooctyle tandis que le second est composé de l'acide aspartique et de cette même chaîne fluorée. La tête polaire lactobionamide est quant à elle conservée pour ces deux dérivés amphiphiles (Figure 2-2).

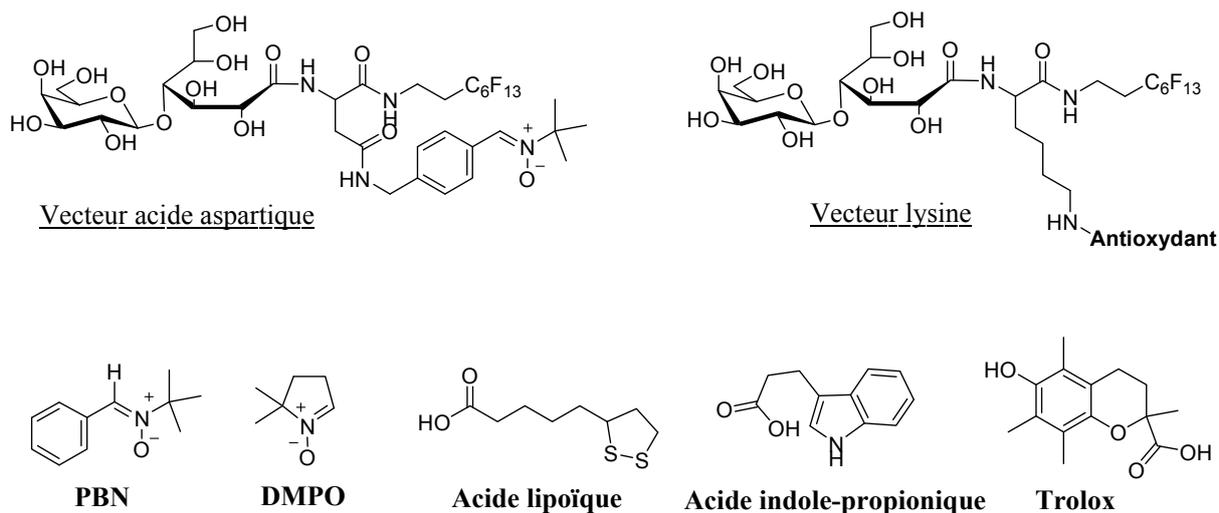


Figure 2-2. Structures chimiques des dérivés amphiphiles transporteurs d'antioxydants.

Dans le but de généraliser ce concept de vectorisation par le biais de ces deux transporteurs amphiphiles, plusieurs antioxydants synthétiques déjà reconnus pour leurs activités anti-radicalaires respectives, ont été choisis.

Lors d'une première étude, les propriétés protectrices de la nitroxe PBN, déjà détaillées dans l'introduction de ce manuscrit, ont été comparées à celles de trois antioxydants synthétiques² qui sont respectivement :

- l'acide lipoïque, qualifié d'antioxydant « métabolique », un très bon piègeur de diverses EOR et un agent protecteur très efficace,³
- l'acide indole-propionique, un excellent piègeur de radicaux hydroxyles et un agent neuroprotecteur puissant,⁴
- le trolox, un analogue synthétique de la vitamine E, très souvent utilisé comme référence dans les études biologiques mettant en jeu des radicaux libres.⁵

L'activité protectrice de ces quatre antioxydants et de leurs dérivés amphiphiles a dans un premier temps été évaluée *in vitro* sur des cellules corticales primaires, puis *in vivo* sur un modèle animal très sensible au stress oxydant, les rotifères *Philodina*. Ces cellules et ces rotifères ont été soumis durant 24 h aux antioxydants ainsi qu'à trois toxines qui sont respectivement : le peroxyde d'hydrogène, le peroxy-nitrite et la doxorubicine. La doxorubicine est notamment employée pour induire un stress oxydant d'origine mitochondrial. En effet elle possède une grande capacité à s'accumuler dans la mitochondrie,^{6,7} où son activation redox par les flavoprotéines réductases (cytochrome

P450, NOS) et les enzymes mitochondriales (NADH deshydrogénase) en intermédiaire semiquinone, conduit à la formation de radicaux oxygénés, parmi lesquels l'anion superoxyde impliqués dans l'inhibition du complexe I mitochondrial.⁸

Les diverses expériences menées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence une activité protectrice significative de la majorité des antioxydants amphiphiles, quel que soit le mode d'induction du stress oxydant. En effet, à l'exception de l'acide indole-propionique, les résultats obtenus sont particulièrement positifs, démontrant que la vectorisation d'antioxydants par ces transporteurs amphiphiles permet de multiplier au minimum par deux leurs activités protectrices dans le cas d'un stress oxydant sévère.²

Lors d'une seconde étude plus récente, les potentialités protectrices du transporteur dérivé de la lysine et porteur de la PBN ont été comparées à celles du dérivé porteur de la nitrone cyclique DMPO (Figure 2-2).⁹ L'activité protectrice de ces analogues amphiphiles ainsi que celles de la PBN et de la DMPO a été évaluée *in vitro* sur des cellules endothéliales aortiques bovines intoxiquées par du peroxyde d'hydrogène ou un donneur de peroxy-nitrite, le SIN-1.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont démontré que le dérivé amphiphile de la PBN était nettement plus efficace contre l'intoxication au peroxyde d'hydrogène que la PBN, alors que les dérivés DMPO conduisaient à une protection plus modeste. Au contraire le dérivé amphiphile de la DMPO s'est montré quant à lui le plus efficace contre l'intoxication au SIN-1, alors qu'aucune protection n'a pu être observée avec les dérivés PBN. Ces deux observations indiquent clairement que la fixation de ces deux types de nitrones sur le dérivé amphiphile lysine améliore très nettement leurs propriétés antioxydantes, qui restent toutefois de nature différente.

L'ensemble des études menées sur ces transporteurs amphiphiles dérivés d'acides aminés, nous permet de conclure que l'introduction d'un caractère amphiphile marqué sur un antioxydant augmente de manière générale son potentiel protecteur. De ce fait, dans le cadre de notre travail il nous a paru intéressant de chercher à améliorer les potentialités protectrices de nitroxydes vis-à-vis des phénomènes de stress oxydant, en les greffant sur des transporteurs monomoléculaires amphiphiles.

3. Présentation des nouveaux dérivés amphiphiles

Dans un premier temps, nous avons décidé de conserver l'acide aspartique et la lysine comme groupement central ainsi que la tête polaire lactobionamide pour la bonne hydrosolubilité qu'elle confère à la molécule. Par ailleurs, il nous a semblé intéressant de remplacer la chaîne perfluorocarbonée par une chaîne hydrogénée afin de pouvoir comparer l'influence de la nature de la partie apolaire sur l'activité biologique des deux nitroxydes amphiphiles.

3.1. Choix des chaînes hydrophobes

La nature de la chaîne hydrophobe présente un intérêt capital dans la mise au point de transporteurs monomoléculaires amphiphiles. En effet, les travaux menés au laboratoire ont permis de démontrer que les composés amphiphiles perfluorocarbonés présentent des propriétés tensioactives marquées mais non détergentes contrairement à leurs analogues hydrocarbonés.^{10,11} Cette absence de détergence leur confère une cytotoxicité nettement inférieure à celle des tensioactifs hydrogénés à des concentrations supérieures à leur concentration micellaire critique (cmc).¹² Par ailleurs, parmi l'ensemble des nitrones amphiphiles synthétisées au laboratoire, la LPBNAH et la LPBNH15, sur lesquelles la PBN est conjuguée à une chaîne heptyle, ont présenté jusqu'à présent les meilleurs potentiels antioxydant, largement supérieurs à ceux obtenus avec leurs analogues fluorés.¹³ Dès lors il nous a paru indispensable de comparer et d'évaluer les potentialités de structures amphiphiles analogues hydro- et perfluorocarbonées. En ce qui concerne la longueur de la chaîne notre choix s'est porté sur une chaîne heptyle pour les dérivés hydrogénés et 1H,1H,2H,2H perfluorooctyle pour les dérivés fluorés.

3.2. Choix des nitroxydes vectorisés

Sur la fonction acide carboxylique de l'acide aspartique a été fixé un nitroxyde cyclique de type pipéridine porteur d'une fonction amine, le 4-amino-TEMPO (4-AT), alors que sur la fonction amine de la lysine a été greffé un nitroxyde cyclique de type pyrrolidine porteur d'une fonction acide carboxylique, le 3-carboxyproxyl (3-CP) (Figure 2-3).

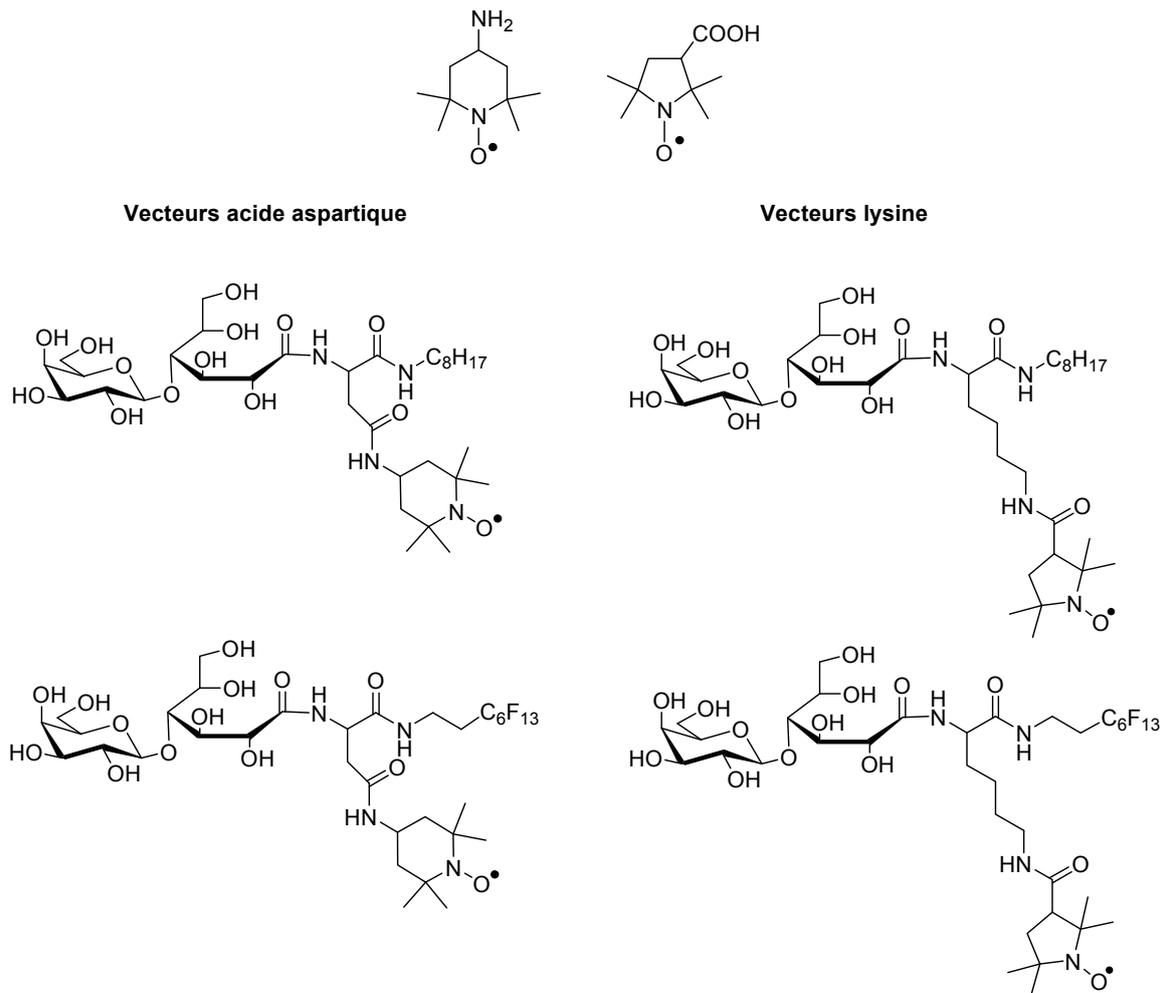


Figure 2-3. Structures chimiques des nitroxydes amphiphiles finaux et des nitroxydes parents

Le choix de ces deux nitroxydes cycliques, réside dans le fait qu'ils sont déjà connus pour leur excellente activité antioxydante, comme nous l'avons préalablement précisé dans l'introduction (cf. Partie C, §2). Nous avons donc synthétisé quatre transporteurs amphiphiles, deux dérivent de l'acide aspartique et sont porteurs du 4-AT et deux autres dérivent de la lysine et sont porteurs du 3-CP (Figure 2-3).

B. Synthèse des dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes

Nous présenterons dans un premier temps l'analyse rétrosynthétique de ces quatre dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes, puis nous verrons dans un second temps les différentes étapes nécessaires à la synthèse de ces composés.

1. Analyse rétrosynthétique

L'analyse rétrosynthétique des dérivés de l'acide aspartique et de la lysine s'articule sur trois principales déconnexions, représentées sur la figure 2-4, qui sont successivement :

- la déconnexion de la liaison amide qui assure la jonction entre le nitroxyde et la chaîne latérale de l'acide aminé. Cette première transformation nous permet d'un point de vue synthétique d'assurer le greffage de l'antioxydant en fin de synthèse, lui évitant ainsi d'éventuelles dégradations,
- la déconnexion de la liaison amide qui assure la jonction entre la tête polaire lactobionamide et la partie N-terminale de l'acide aminé,
- la déconnexion de la liaison amide qui assure la jonction entre la chaîne hydrophobe et la partie C-terminale de l'acide aminé.

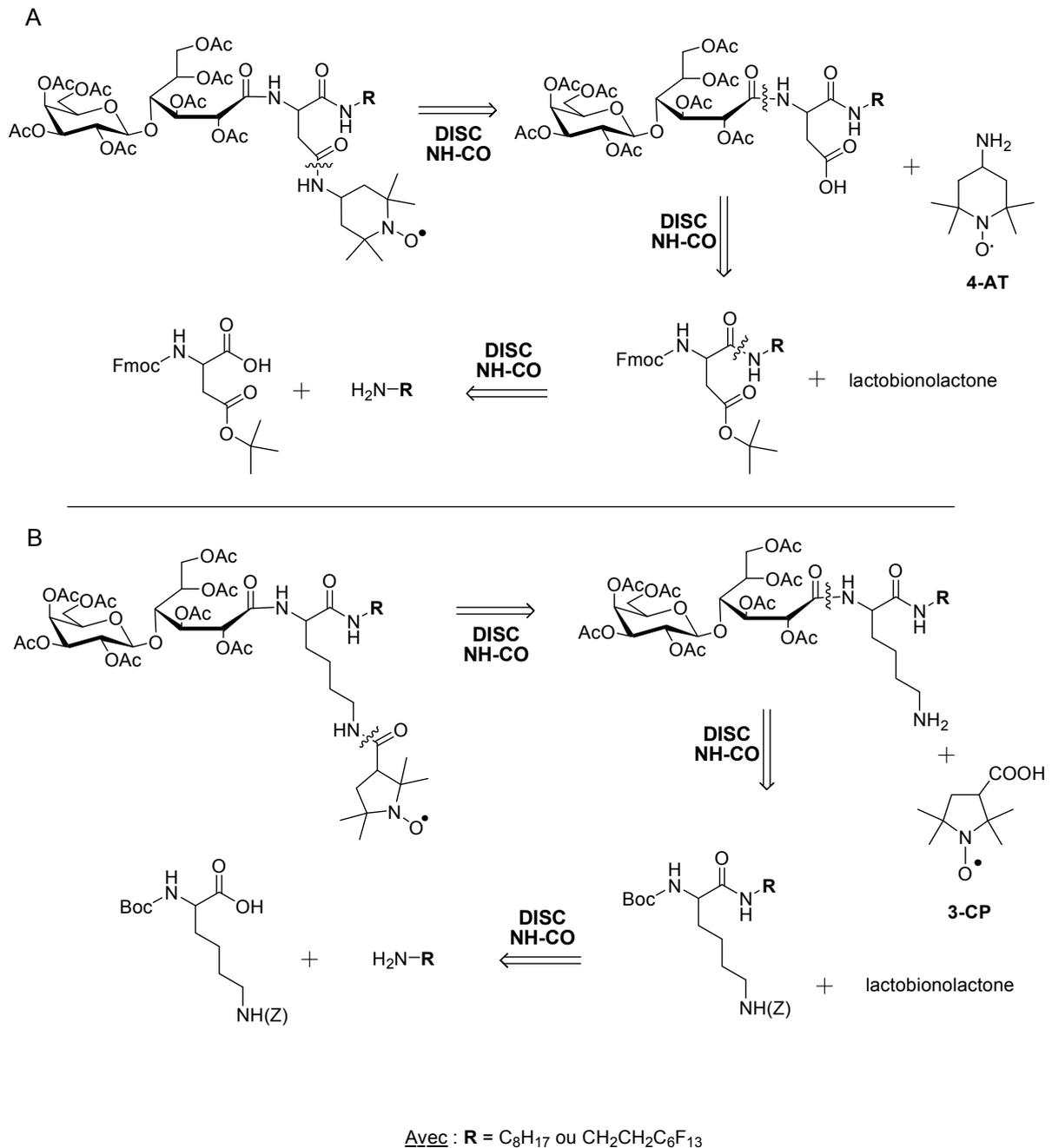


Figure 2-4. Analyse rétrosynthétique des dérivés amphiphiles de l'acide aspartique (A) et de la lysine (B).

2. Les différentes étapes de leurs synthèses

Dans une première partie nous allons décrire exclusivement la synthèse des deux dérivés amphiphiles à chaîne hydrogénée, puis nous verrons dans une deuxième partie la synthèse de leurs analogues à chaîne perfluorocarbonée.

2.1. Synthèse des deux dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes à chaîne hydrogénée

C'est ainsi que leur synthèse s'articule autour de trois principales étapes, qui vont maintenant pouvoir être successivement détaillées.

2.1.1. Introduction de la chaîne hydrogénée sur les acides aminés

La première étape de la synthèse consiste à introduire la chaîne hydrogénée sur les acides aminés, par l'intermédiaire d'une jonction amide. Les conditions de couplages font appel à des réactifs classiquement utilisés en synthèse peptidique. Les acides aminés sont activés par réaction avec la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) dans du dichlorométhane anhydre puis l'octylamine commerciale est alors ajoutée au milieu. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, les composés **1** et **2** sont obtenus avec respectivement 92 et 74% de rendement (Schéma 2-2).

2.1.2. Introduction de la tête polaire sur les acides aminés hydrophobes

La seconde étape de la synthèse consiste à introduire la tête polaire de type lactobionolactone, sur la partie N-terminale des deux acides aminés hydrophobes. Celle-ci est préparée par déshydratation de l'acide lactobionique en milieu acide selon un processus classiquement utilisé au laboratoire (Schéma 2-1). L'équilibre est ainsi déplacé vers la formation de la lactobionolactone par distillation azéotropique sous vide et à chaud de l'eau produite au cours de la réaction.

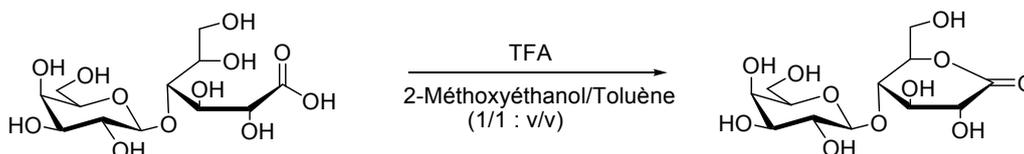


Schéma 2-1. Synthèse de la lactobionolactone à partir de l'acide lactobionique

Parallèlement, les groupements protecteurs de la fonction amine de la chaîne principale des composés **1** et **2** sont alors éliminés. Le groupement protecteur (Fmoc) de l'acide aspartique est clivé en milieu basique par une solution de DEA à 10% dans l'acétonitrile et après déprotection, le composé **3** est directement mis en réaction à 80°C avec la lactobionolactone fraîchement préparée dans le 2-méthoxyéthanol en présence de TEA. Le suivi de la consommation de l'amine **3** est réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM), et après disparition totale de l'amine, la réaction est stoppée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est alors acétylé par un mélange Ac_2O /Pyridine

(1/1 : v/v) et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **5** est obtenu avec 40% de rendement sur les trois étapes (Schéma 2-2).

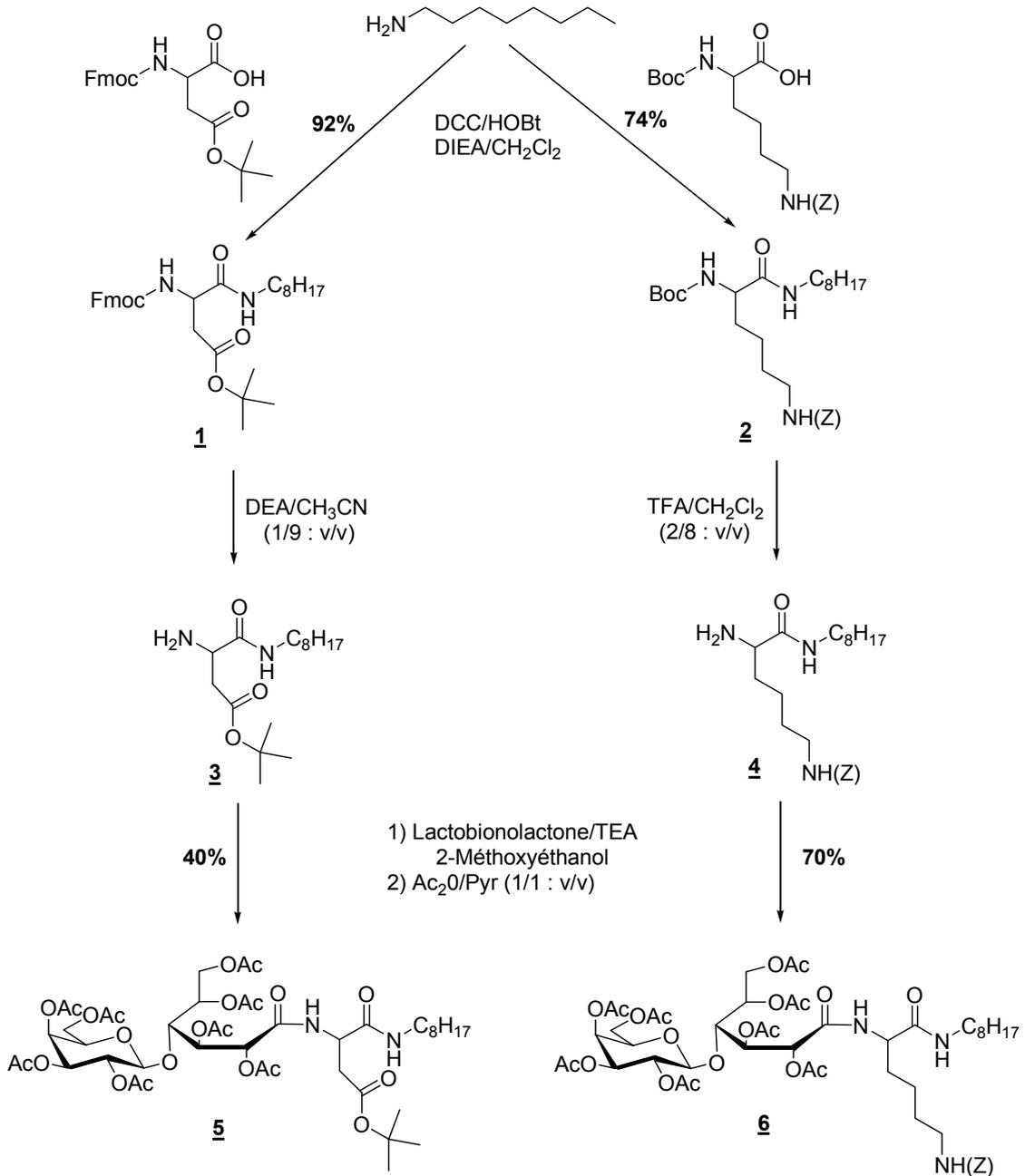


Schéma 2-2. Fixation de la chaîne hydrogénée et de la tête polaire lactobionamide sur l'acide aspartique (à gauche) et sur la lysine (à droite)

Le groupement protecteur (Boc) de la lysine est quant à lui clivé en milieu acide par une solution de TFA à 20% dans le dichlorométhane. De manière identique, le composé **4** déprotégé est couplé sur la lactobionolactone à 80°C dans le 2-méthoxyéthanol en présence de TEA puis acétylé par un mélange Ac₂O/Pyridine (1/1 : v/v). Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **6** est obtenu avec 70% de rendement sur les trois étapes (Schéma 2-2).

A ce stade, nous avons caractérisé les structures chimiques de ces deux nouveaux transporteurs amphiphiles à chaîne hydrogénée, par spectrométrie de masse et par RMN.

En spectrométrie de masse, le spectre du composé **5** (Figure 2-5), confirme bien la présence du pic moléculaire à $m/z = 977,3$ $[(M+H)^+]$ ainsi que celles des adduits avec l'ammonium à $m/z = 994,3$ $[(M+NH_4)^+]$, le sodium à $m/z = 999,3$ $[(M+Na)^+]$ et le potassium à $m/z = 1015,3$ $[(M+K)^+]$.

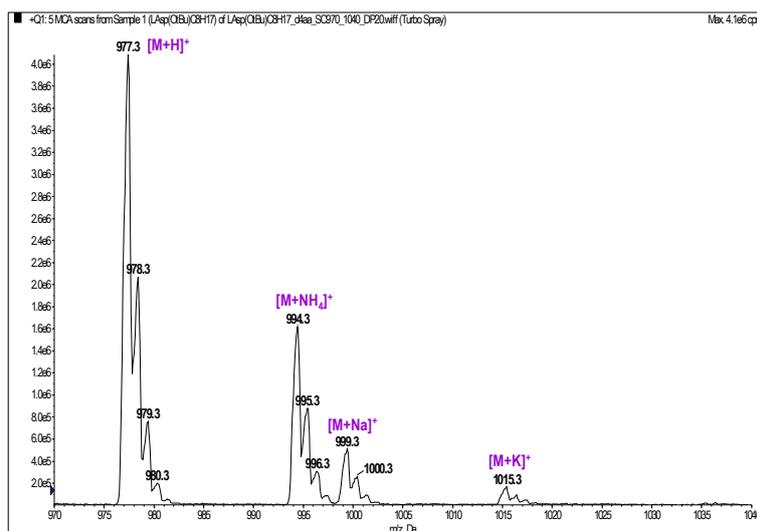


Figure 2-5. Spectre de masse en mode électrospray positif du composé **5**

De plus en RMN, le spectre ¹H du dérivé acide aspartique (Figure 2-6), nous confirme la présence :

- des signaux correspondants aux protons de la lactobionolactone entre 5,6 et 2,4 ppm,
- des signaux correspondants aux groupements hydroxyles acétylés entre 2,3 et 1,9 ppm,
- des signaux correspondants à la chaîne hydrogénée à 1,25 et 0,86 ppm,
- des signaux correspondants à la chaîne latérale avec notamment le singulet du groupement *tert*-butyle à 1,43 ppm.

Le spectre RMN du ^{13}C (Figure 2-6), confirme également la présence de toutes ces composantes.

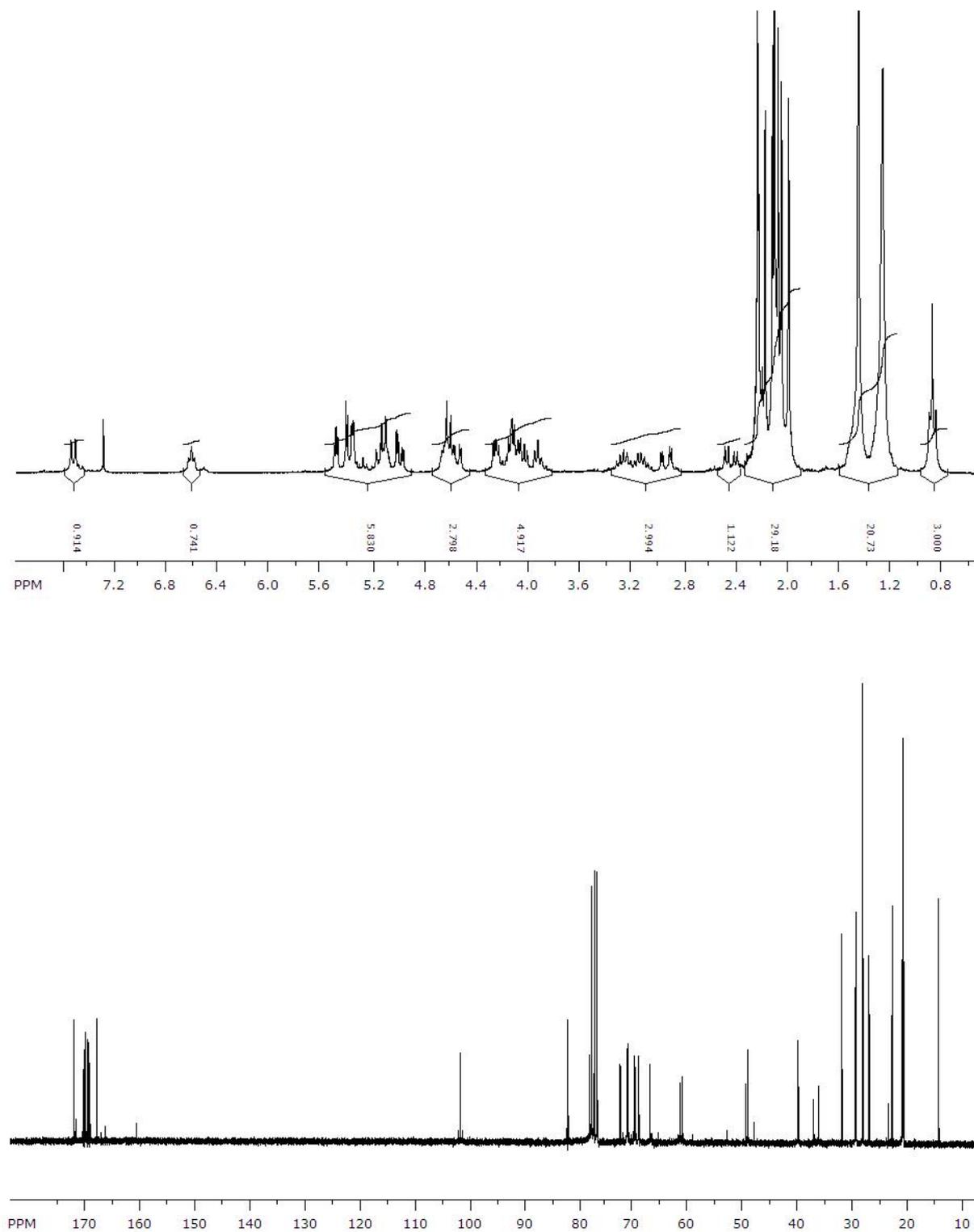


Figure 2-6. Spectre RMN du ^1H (en haut) et du ^{13}C (en bas) du composé **5**

Nous avons ensuite tenté de comprendre l'origine du plus faible rendement obtenu avec le dérivé de l'acide aspartique comparé à son analogue lysine. Lors de la synthèse de ce premier nous avons effectivement observé la présence d'un second produit sur la plaque ccm, légèrement plus polaire que le composé **5** initialement attendu. Nous avons alors isolé ce dernier et tenté de le caractériser par RMN.

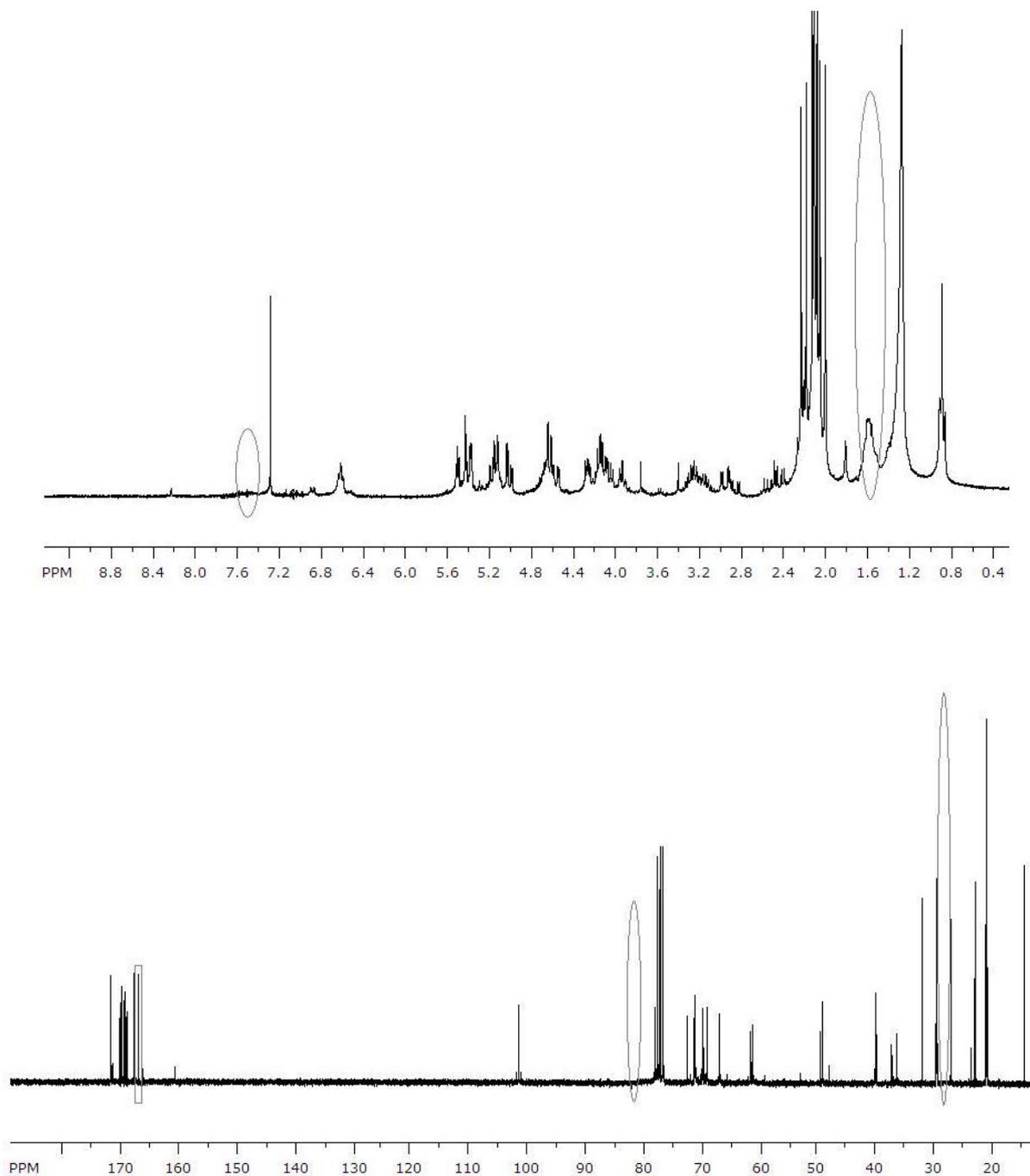


Figure 2-7. Spectre RMN du ^1H (en haut) et du ^{13}C (en bas) du second produit

L'observation de son spectre RMN du ^1H (Figure 2-7), nous a permis de constater l'absence du singulet à 1,43 ppm correspondant aux trois CH_3 du groupement *tert*-butyle, ainsi que celle du doublet à 7,52 ppm correspondant à la fonction amide de la chaîne hydrophobe.

L'observation de son spectre RMN du ^{13}C (Figure 2-7), nous a quant à lui révélé la présence d'un second pic à 167 ppm, correspondant très certainement à un deuxième groupement carbonyle, mais également la disparition du pic à 81,9 ppm correspondant au carbone quaternaire du groupement *tert*-butyle ainsi que celle du pic à 28,0 ppm correspondant à ses trois CH_3 .

Ces remarques nous ont conduit à proposer une cyclisation intra-moléculaire se produisant entre la fonction amine secondaire de la chaîne hydrophobe et la fonction carbonyle de la chaîne latérale. Cette cyclisation, représentée sur la figure 2-8, conduirait donc à un composé comportant un cycle à 5 atomes, dont la structure correspondrait aux spectres ^1H et ^{13}C présentés sur la figure 2-7.

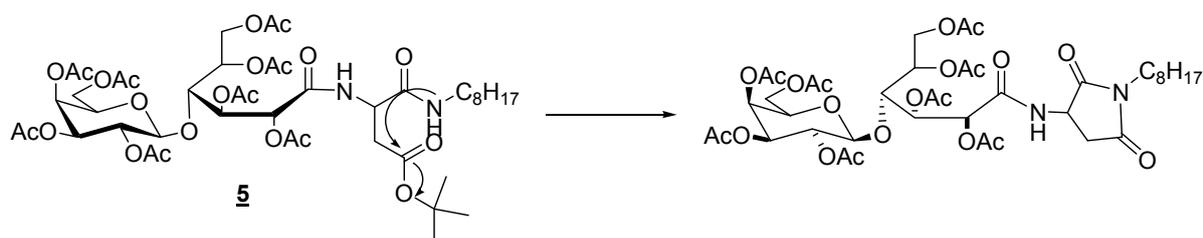


Figure 2-8. Formation éventuelle du produit secondaire par cyclisation intra-moléculaire du composé **5**

Cette cyclisation n'étant pas envisageable avec la chaîne latérale de la lysine, c'est pour cette raison que nous obtenons un meilleur rendement lors de la synthèse du composé **6**, dont les études par spectrométrie de masse et RMN ont été effectuées de même que pour le composé **5**, mais ne sont mentionnées que dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

2.1.3. Introduction des nitroxydes sur les acides aminés amphiphiles

La troisième étape de la synthèse consiste à introduire les molécules de type nitroxyde sur la chaîne latérale des deux acides aminés amphiphiles, toujours par l'intermédiaire d'une jonction amide. Les groupements protecteurs de la chaîne latérale des composés **5** et **6** sont alors éliminés afin d'y greffer respectivement le 4-AT et le 3-CP (Schéma 2-3).

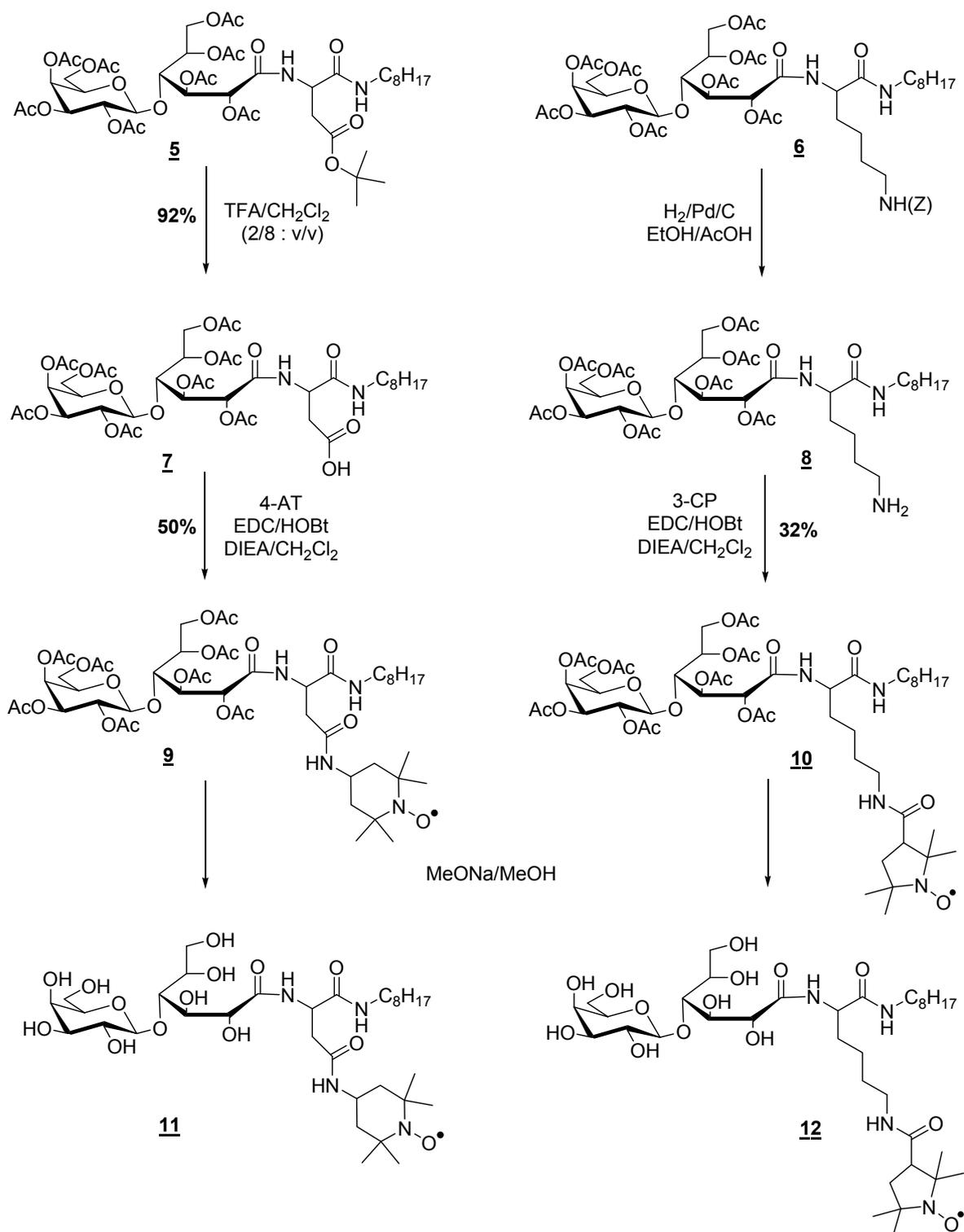


Schéma 2-3. Fixation des nitroxydes sur les transporteurs amphiphiles à chaîne hydrocarbonée dérivés de l'acide aspartique (à gauche) et de la lysine (à droite)

Le groupement protecteur (tBu) de l'acide aspartique est clivé en milieu acide par une solution de TFA à 20% dans le dichlorométhane pour conduire, après purification par chromatographie sur gel de silice, au composé **7** avec 92% de rendement. Le vecteur acide aspartique déprotégé est ensuite activé par réaction avec le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthyl-carbodiimide (EDC) et l'HOBt dans du dichlorométhane anhydre, puis le nitroxyde 4-AT (1,2 eq.) est ajouté au milieu. Enfin, après purification du brut réactionnel par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20, le composé **9** est obtenu avec 50% de rendement (Schéma 2-3).

Le groupement protecteur (Z) de la lysine est quant à lui clivé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon, pour conduire au composé **8** avec un rendement quantitatif. Pour des raisons évidentes d'instabilité, le vecteur lysine déprotégé n'est pas conservé sous sa forme amine et est directement mis en réaction, avec le nitroxyde 3-CP en présence d'EDC et d'HOBt dans du dichlorométhane anhydre. Enfin, après purification du brut réactionnel par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20, le dérivé amphiphile acétylé **10** est obtenu avec 32% de rendement sur deux étapes (Schéma 2-3).

A ce stade de la synthèse, nous avons vérifié et caractérisé la fixation des nitroxydes sur ces deux transporteurs amphiphiles à chaîne hydrocarbonée par spectrométrie de masse et infra-rouge, l'étude RMN n'étant plus envisageable à ce niveau à cause de la présence du groupement nitroxyde paramagnétique.

En spectrométrie de masse notamment, le spectre du composé **9** (Figure 2-9), confirme la présence du pic moléculaire à $m/z = 1074,4 [(M+H)^+]$ ainsi que celle d'un adduit avec le sodium à $m/z = 1096,4 [(M+Na)^+]$ et avec le potassium à $m/z = 1112,3 [(M+K)^+]$.

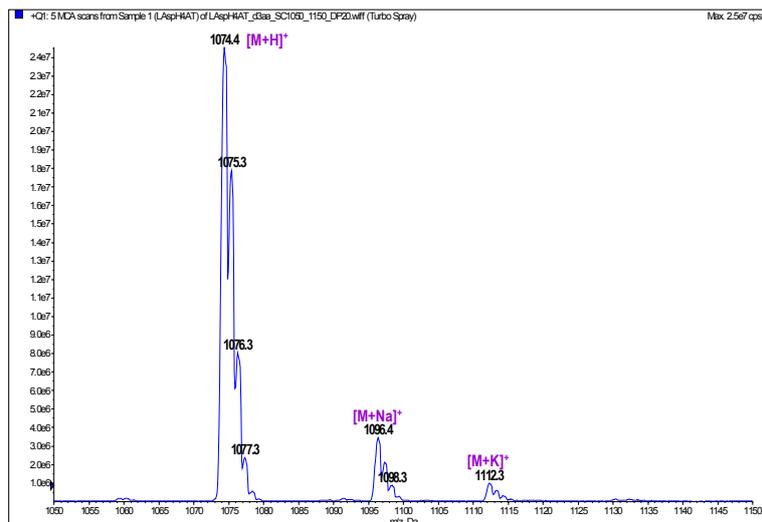


Figure 2-9. Spectre de masse en mode electrospray positif du composé **9**

De plus, son spectre infra rouge (Figure 2-10), montre la présence d'une bande caractéristique de la fonction nitroxyde à 1373 cm^{-1} .

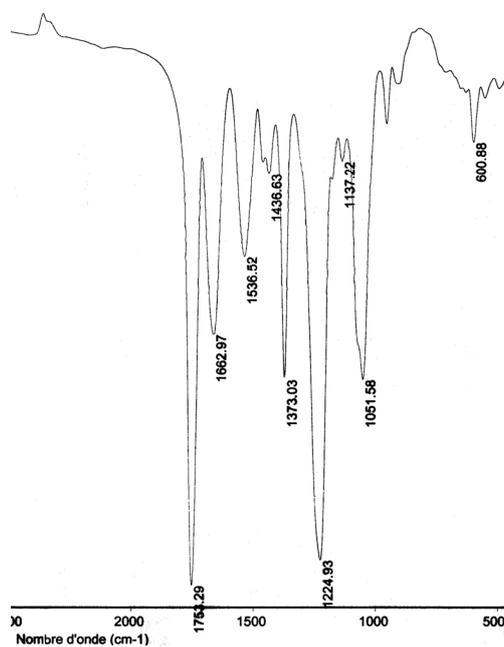


Figure 2-10. Spectre infra rouge du composé **9**

Ces études par spectrométrie de masse et infra rouge ont également été effectuées sur son analogue, le composé **10**, mais ne sont mentionnées que dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

La dernière étape de la synthèse consiste à déprotéger les fonctions hydroxyles de la tête polaire des composés **9** et **10** par réaction de transestérification de Zemplén en présence d'une quantité catalytique de méthanolate de sodium dans le méthanol. Après purification par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20, les composés finaux à chaîne hydrocarbonée **11** et **12** sont obtenus de manière quantitative à partir de leurs analogues acétylés respectifs (Schéma 2-3).

La caractérisation de ces deux composés finaux a de nouveau été réalisée par spectrométrie de masse et infra-rouge, afin de vérifier la complète déacétylation de tous les groupement hydroxyles. Ainsi, une fois leurs structures parfaitement mises en évidence, nous avons pu évaluer la pureté de ces deux composés finaux par CLHP en phase inverse à 229 nm pour le dérivé acide aspartique et à 203 nm pour le dérivé lysine. Les chromatogrammes correspondants aux composés **11** et **12** (Figure 2-11), montrent la bonne pureté de ces deux dérivés.

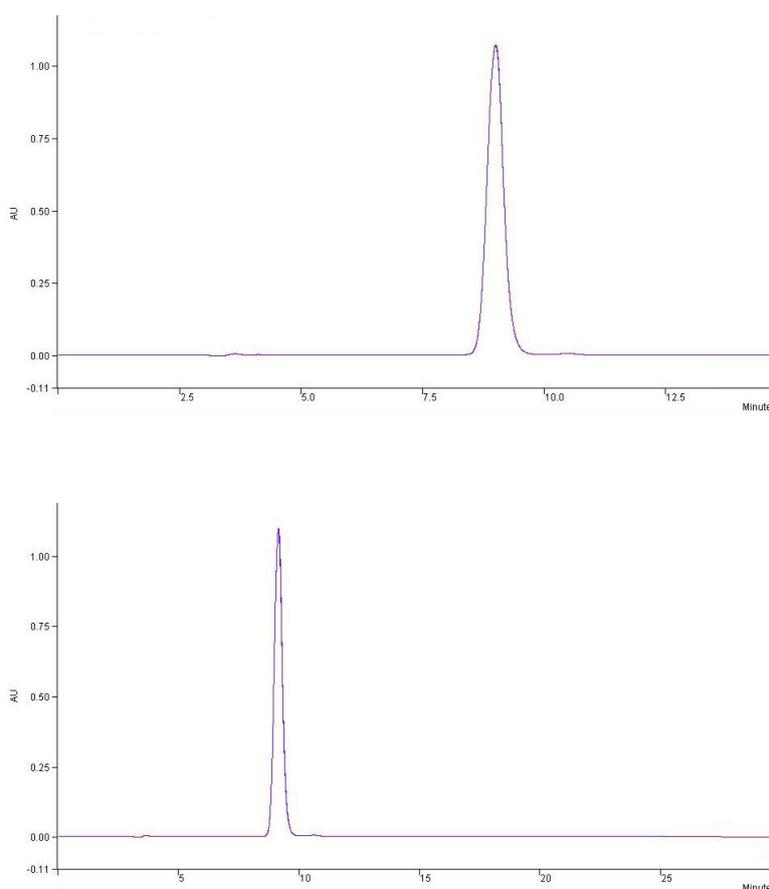


Figure 2-11. Chromatogrammes CLHP du composé **11** à 229 nm (en haut) et du **12** à 203 nm (en bas)
(Débit : 0,8 mL/min, Eluant : MeOH/H₂O 70/30)

2.2. Synthèse des deux dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes à chaîne perfluorocarbonée

La synthèse des deux dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes à chaîne perfluorocarbonée s'articule de manière identique autour des trois grandes étapes développées précédemment, mais compte tenu du fait que ces deux transporteurs fluorés ont déjà été décrits dans la littérature,^{2,14} nous développerons dans cette partie que la dernière étape de greffage.

La troisième étape de la synthèse consiste à introduire les nitroxydes sur la chaîne latérale des deux acides aminés amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée **13** et **14**, dont les structures chimiques sont rappelées sur le schéma 2-4. Pour cela, j'ai également été amené à synthétiser ces dérivés amphiphiles fluorés **13** et **14** durant mes travaux de thèse, mais les modes opératoires déjà décrits ne sont pas reportés dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

Le groupement protecteur (tBu) de l'acide aspartique est clivé en milieu acide pour donner après purification par chromatographie sur gel de silice, le composé **15** avec 88% de rendement. Le vecteur acide aspartique déprotégé est ensuite mis en réaction avec le 4-AT en présence d'EDC et d'HOBt dans du dichlorométhane anhydre, pour conduire, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20, au composé **17** avec 60% de rendement (Schéma 2-4).

Le groupement protecteur (Z) de la lysine est quant à lui clivé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon, pour conduire au composé **16** avec un rendement quantitatif. Le vecteur lysine déprotégé est à nouveau directement mis en réaction avec le 3-CP en présence d'EDC et d'HOBt dans du dichlorométhane anhydre, pour conduire après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20, au composé **18** avec 30% de rendement sur deux étapes (Schéma 2-4).

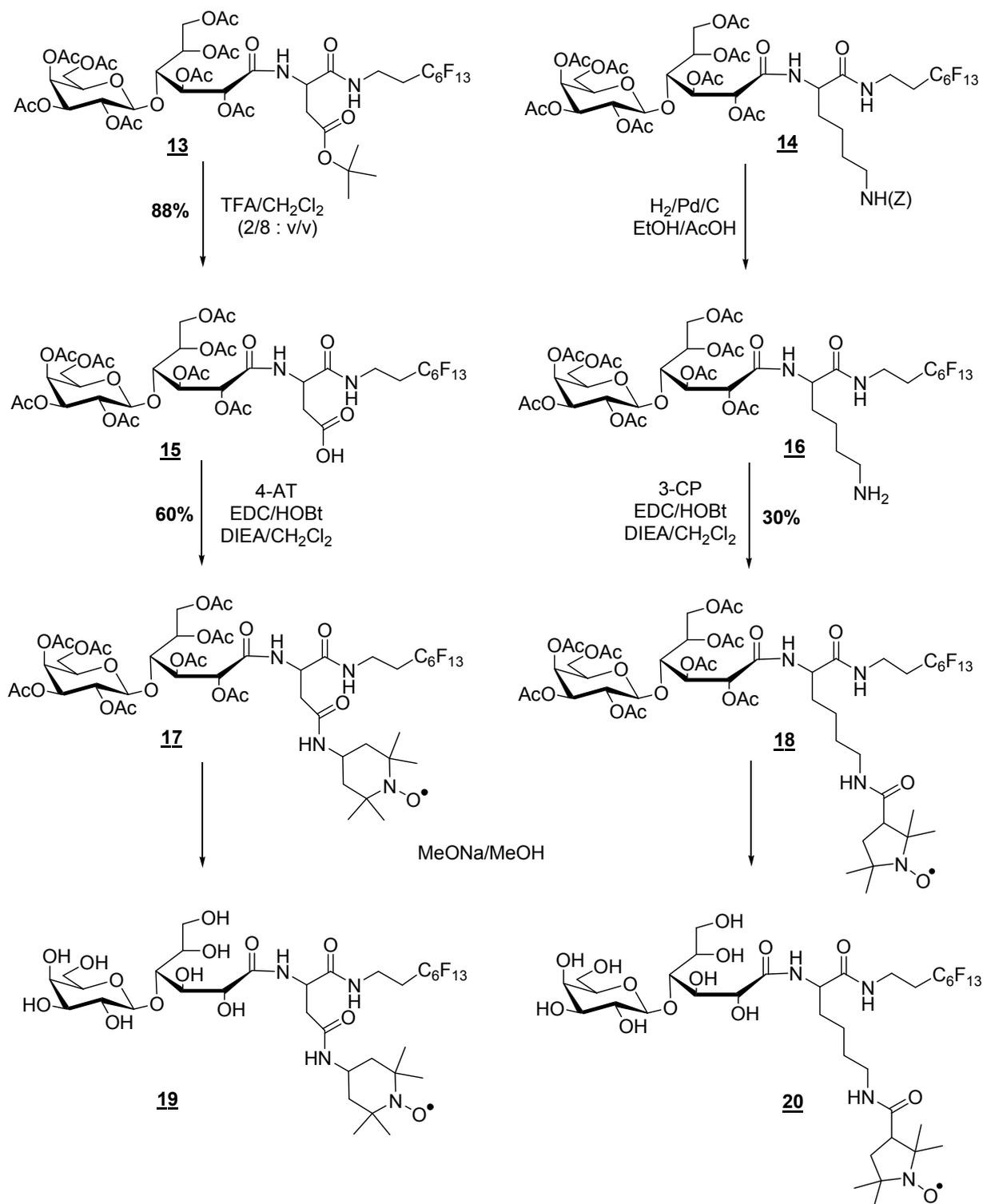


Schéma 2-4. Fixation des nitroxydes sur les transporteurs amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée dérivés de l'acide aspartique (à gauche) et de la lysine (à droite)

Nous avons ensuite vérifié la bonne fixation des nitroxydes sur ces deux transporteurs amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée par spectrométrie de masse et infra-rouge (cf. Partie expérimentale).

Les deux dérivés amphiphiles porteurs de nitroxydes ont ensuite été désacétylés par réaction de transestérification en présence de méthanolate de sodium dans le méthanol, pour conduire après purification par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20 aux composés finaux à chaîne perfluorocarbonée **19** et **20** (Schéma 2-4).

La caractérisation de ces deux composés **19** et **20** finaux a été à nouveau réalisée par spectrométrie de masse et infra-rouge, afin de vérifier la complète déprotection de la lactobionolactone. La pureté de ces deux composés finaux a été précisée par CLHP en phase inverse, à 229 nm pour le dérivé acide aspartique et à 203 nm pour le dérivé lysine. Les chromatogrammes correspondants aux composés **19** et **20** (Figure 2-12), montrent la bonne pureté de ces deux dérivés.

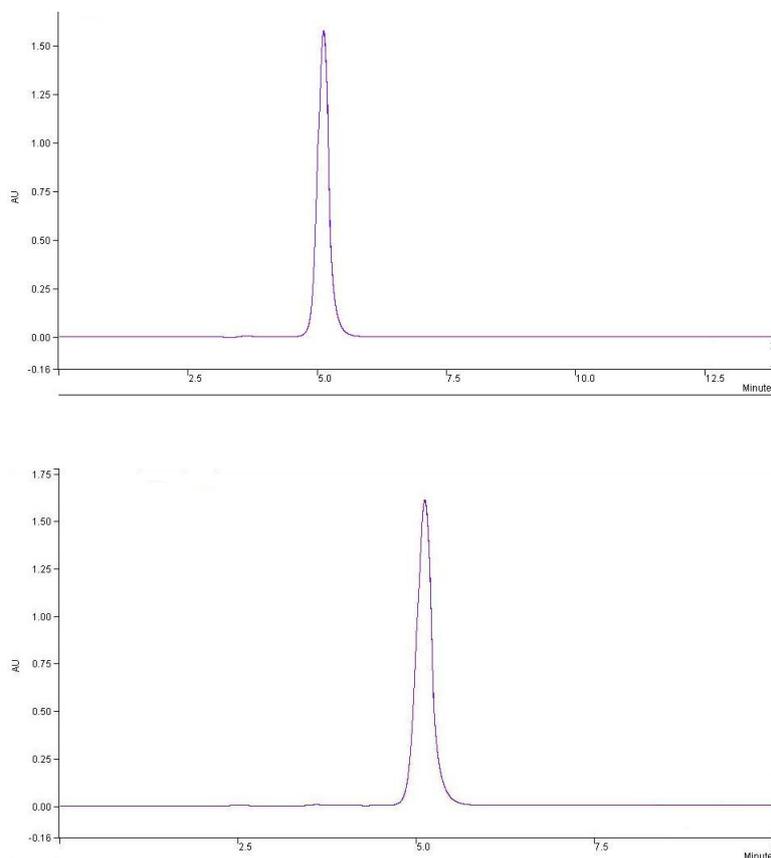


Figure 2-12. Chromatogrammes CLHP du composé **19** à 229 nm (en haut) et du **20** à 203 nm (en bas) (Débit : 0,8 mL/min, Eluant : MeOH/H₂O 80/20)

Nous avons ainsi obtenu, par une stratégie de synthèse relativement courte et facilement réalisable, quatre transporteurs amphiphiles porteurs de nitroxydes avec des rendements globaux variant de 12 à 24%.

2.4. Nomenclature des nitroxydes amphiphiles synthétisés

Compte tenu de la difficulté à nommer ces composés suivant la nomenclature officielle et pour faciliter la description des propriétés physico-chimiques, il nous paru opportun de leur attribuer une nomenclature spécifique dont les trois premières lettres symbolisent la structure du vecteur amphiphile :

- la première lettre **L** indique que la tête polaire est une lactobionamide,
- la deuxième lettre indique la nature de l'acide aminé : **A** pour l'acide aspartique et **L** pour la lysine,
- la troisième lettre indique la nature de la chaîne hydrophobe : **H** pour hydrogénée et **F** pour fluorée.

Enfin, ces trois lettres sont suivies du nom abrégé du nitroxyde vectorisé : 4-AT pour le 4-amino TEMPO et 3-CP pour le 3-carboxy proxyl.

Par cette méthode, nous obtenons quatre noms abrégés : LAH-4-AT, LAF-4-AT, LLH-3-CP et LLF-3-CP aisément utilisables pour désigner ces nouveaux substrats.

C. Etudes physico-chimiques

Dans un premier temps, le caractère hydrophobe de chacun de ces nitroxydes amphiphiles a été déterminé par le calcul de leurs coefficients de partition, puis nous avons étudié leurs capacités d'auto-association en milieu aqueux. Enfin, l'influence des structures amphiphiles sur les propriétés électrochimiques des nitroxydes a été estimée par l'étude de leur potentiel oxydant ainsi que de leur stabilité en milieu réducteur.

1. Etude des coefficients de partition ($\log k'_w$)

Cette première étude physico-chimique nous a permis, à travers la mesure de leur coefficient de partition, d'estimer l'aptitude au passage transmembranaire de ces nitroxydes amphiphiles.

1.1. Principe général

La capacité d'un principe actif à se rendre sans dégradation, du lieu de son administration jusqu'à son site d'action et un des facteurs majeurs dans la mesure de son

efficacité pharmacologique. Cependant, au cours de son transport dans l'organisme, un principe actif quel qu'il soit peut être confronté à différents milieux qui peuvent être hydrophiles (le sang par exemple) comme hydrophobes (les membranes). C'est sur ce principe que Hansch^{15,16,17} a mis au point un modèle d'étude basé sur l'aptitude des composés à se répartir entre deux phases, l'octanol et l'eau. L'octanol constitué d'une chaîne alkyle hydrophobe et d'un groupement hydroxyle susceptible de former des liaisons hydrogène, va mimer la membrane lipidique. Il a ainsi défini le coefficient de partage **P**, appelé **coefficient de partition** entre ces deux phases, calculé par la formule :

$$P = \frac{[\text{composé}]_{\text{oct}}}{[\text{composé}]_{\text{aq}}(1-\alpha)}$$

α = le degré de dissociation du composé dans l'eau

P est ainsi déterminé expérimentalement par décantation, en mesurant la concentration du composé dans des volumes variables d'octanol et d'eau.

Par ailleurs, Collander¹⁸ a également travaillé sur l'hydrophobie et a pu montrer que les mouvements des composés organiques au travers sont approximativement proportionnels au logarithme du coefficient de partition **P**. D'après ces observations, Hansch¹⁹ a pu établir une nouvelle relation :

$$\log 1/C = -k (\log P)^2 + k' (\log P) + k''$$

C = la concentration molaire produisant une réponse biologique standard

k, k', k'' = des constantes déterminées par la méthode des moindres carrés.

Cette relation permet de conclure, qu'au plus la valeur de log P sera grande et au plus le composé sera hydrophobe, et à l'inverse au plus la valeur de log P tendra vers 0 et au plus le composé sera hydrophile.

Dans l'idéal, il existe entre les valeurs extrêmes d'hydrophobie, log P = infini et log P = 0, une valeur de log P optimale qui caractérise un composé à la fois soluble en milieux aqueux et capable un passage transmembranaire efficace. A cette valeur de log P, la théorie garantit au principe actif une efficacité biologique optimum.

1.2. Détermination du coefficient de partition par CLHP

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse est une méthode alternative pour mesurer des coefficients de partition qui sont alors notés log k'_w . Cette méthode, applicable à une très large gamme de composés organiques, présente les avantages

de nécessiter une très faible quantité de produit, d'être rapide et simple à mettre en œuvre. Elle repose sur la capacité du composé à interagir avec les chaînes alkyles greffées sur la silice ainsi que sur la polarité de la phase mobile, ces deux facteurs influençant le paramètre essentiel de cette méthode, le temps de rétention, qui est propre à chaque composé pour chaque polarité de phase mobile utilisée.

Le mode opératoire suivi pour déterminer l'hydrophobie de chaque nitroxydes amphiphiles ainsi que des nitroxydes parents, est expliqué en détail dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

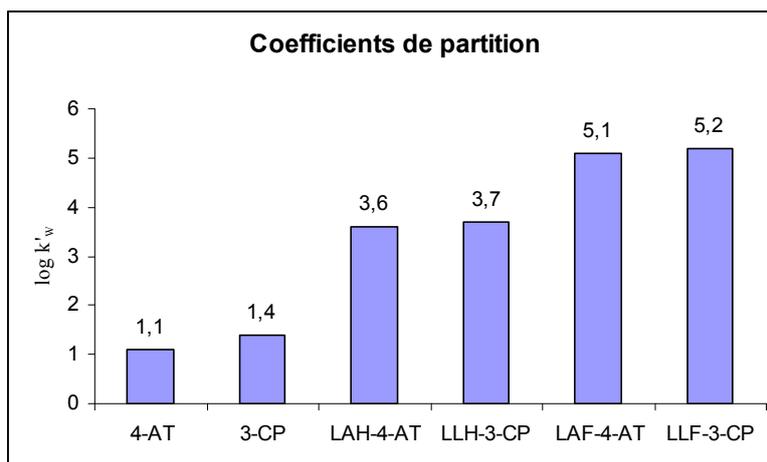
1.3. Résultats des mesures de $\log k'_w$

L'ensemble des données expérimentales est répertorié dans le tableau 2-1.

Composés	t_R					$\log k'$					R^2	$\log k'_w$
	MeOH/H ₂ O					MeOH/H ₂ O						
Eluant	80/20	70/30	60/40	50/50	40/60	80/20	70/30	60/40	50/50	40/60		
MeOH	3.20	3.21	3.23	3.36	3.38	-	-	-	-	-	-	-
4-AT	3.53	4.11	4.31	5.41	7.30	-0.99	-0.55	-0.43	-0.22	0.06	0.9987	1.1
3-CP	3.39	3.58	4.33	5.43	7.42	-1.24	-0.93	-0.42	-0.21	0.08	0.9986	1.4
LAH-4-AT	4.28	6.54	14.09	-	-	-0.47	0.02	0.54	-	-	0.9997	3.6
LAF-4-AT	4.50	10.28	34.08	-	-	-0.37	0.34	0.99	-	-	0.9999	5.1
LLH-3-CP	4.36	7.25	15.53	-	-	-0.44	0.10	0.59	-	-	0.9992	3.7
LLF-3-CP	4.57	10.43	35.25	-	-	-0.37	0.34	0.99	-	-	0.9992	5.2

Tableau 2-1. Temps de rétentions moyens, $\log k'$ et $\log k'_w$ pour les nitroxydes amphiphiles et pour les nitroxydes parents.

Dans le but d'avoir une meilleure visualisation de l'hydrophobie relative de l'ensemble de ces composés, nous avons reporté les valeurs des coefficients de partition sur un histogramme présenté sur le graphique 2-1.



Graphique 2-1. Variation de l'hydrophobie des nitroxydes amphiphiles ou parents

Les valeurs obtenues (Tableau 2-1 et Graphique 2-1) pour les quatre nitroxydes amphiphiles démontrent que le greffage d'un antioxydant sur un transporteur amphiphile augmente fortement son hydrophobie. Cette augmentation est d'autant plus forte si la chaîne hydrophobe du transporteur amphiphile est de nature perfluorocarbonée. En effet, les valeurs de $\log k'_w$ obtenues pour les dérivés fluorés (5,1 et 5,2) sont bien plus élevées que celles obtenues pour leurs analogues hydrogénés (3,6 et 3,7).

De plus, la nature de l'acide aminé semble également jouer un rôle dans ces valeurs de $\log k'_w$ puisque les dérivés de la lysine (5,2 et 3,7) se retrouvent légèrement plus hydrophobes que leurs analogues dérivés de l'acide aspartique (5,1 et 3,6). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des précédentes études physico-chimiques concernant les deux dérivés amphiphiles fluorés de la PBN.¹⁴

Enfin, la nature du nitroxyde greffé n'influe quant à elle que très peu sur l'hydrophobie globale de la molécule, car nous n'observons qu'une très faible différence de polarité entre les deux dérivés amphiphiles porteurs du 4-AT (3,6 et 3,7) et ceux porteurs du 3-CP (5,1 et 5,2), alors qu'une différence plus marquée est présente entre les deux nitroxydes parents (1,1 et 1,4).

Cette étude nous permet d'affirmer que l'hydrophobie de nos nitroxydes amphiphiles est principalement déterminée par la nature du transporteur monomoléculaire. Ainsi, l'introduction d'un caractère amphiphile à nos nitroxydes n'a fait qu'augmenter leur caractère hydrophobe, tout en maintenant ce qui est essentiel pour une administration intraveineuse, leur bonne solubilité dans l'eau.

2. Etude d'auto-association en milieu aqueux

Les quatre nitroxydes amphiphiles sont effectivement solubles en milieu aqueux jusqu'à des concentrations de 25 mM. Toutefois, les solutions contenant les deux nitroxydes amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée restent quelque peu visqueuses au-delà d'une concentration de 20 mM.

Le but de cette étude est donc de déterminer le comportement de nos quatre nitroxydes amphiphiles en milieu aqueux, et deux méthodes d'analyses bien distinctes ont été utilisées : la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la résonance paramagnétique électronique (RPE).

2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière est couramment utilisée pour déterminer la taille des agrégats formés par différentes macromolécules en milieu aqueux en fonction de leurs concentrations.

2.1.1. Principe général

Cette technique est basée sur le principe de diffusion de la lumière par des particules colloïdales en solution qui se déplacent selon un mouvement aléatoire, appelé mouvement brownien. Un faisceau de lumière est envoyé à travers la solution et deux faisceaux principaux en sont issus, le faisceau transmis et le faisceau diffusé. Cependant seul ce dernier est considéré par le détecteur et son intensité est alors fonction de la vitesse et de la direction du mouvement de chaque macromolécule individuelle. Ainsi, le volume diffusant contenant un grand nombre de ces macromolécules se déplaçant à des vitesses et dans des directions différentes, on peut en déduire certaines propriétés dynamiques des particules en solution avec notamment le coefficient de diffusion translationnel (D). Ainsi, la connaissance de leur coefficient de diffusion translationnel, permet de déterminer la taille des macromolécules en solution, par le calcul de leur diamètre hydrodynamique (D_H) à partir de la loi de Stocke-Einstein.

$$D_H = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

Avec k_B : constante de Boltzmann ; T : température absolue ; η : viscosité dynamique du milieu de dilution et D : coefficient de diffusion translationnel.

Le diamètre hydrodynamique D_H d'une macromolécule représente le diamètre de la sphère dure qui diffuse en solution avec le même coefficient de diffusion translationnel.

Ainsi, comme toutes ces macromolécules sont supposées former des sphères homogènes en milieu aqueux, nous pouvons en déterminer également la polydispersité en taille.

Le mode opératoire suivi pour déterminer la polydispersité et la distribution de taille des agrégats formés pour chaque nitroxydes amphiphiles, est expliqué en détail dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

2.1.2. Résultats

L'ensemble des données expérimentales obtenues par DLS pour les quatre nitroxydes amphiphiles est rassemblé dans le tableau 2-2.

Concentration	LAH-4-AT		LAF-4-AT		LLH-3-CP		LLF-3-CP	
	D_H (nm)	LMH (nm)	D_H (nm)	LMH (nm)	D_H (nm)	LMH (nm)	D_H (nm)	LMH (nm)
20 mM	19.0 (59%) 110.9 (41%)	5.1 67.8	n.d.	n.d.	29.2	32.5	n.d.	n.d.
10 mM	20.0 (51%) 105.1 (49%)	5.8 118.7	5.5	1.2	30.7	35.8	6.0	1.3
5 mM	18.7 (46%) 109.0 (53%)	6.4 73.7	5.6	1.2	29.6	37.3	5.9	1.3
1 mM	21.0 (27%) 108.1 (71%)	5.4 71.6	21.0 (38%) 133.6 (57%)	6.0 136.2	33.6	44.1	5.8	1.2

Tableau 2-2. Polydispersité et tailles des agrégats formés par les nitroxydes amphiphiles en solution aqueuse à différentes concentrations.

Le symbole LMH correspond à la Largeur à Mi-Hauteur du pic obtenu sur une moyenne de 8 à 10 mesures et reflète le degré de polydispersité de l'échantillon. L'absence de pourcentage à côté de certaines valeurs de D_H signifie que le pourcentage de distribution de taille en volume est $> 98\%$.

Dans le but d'illustrer les résultats présentés dans le tableau précédent, nous avons choisi de présenter le profil de distribution statistique en volume du diamètre hydrodynamique D_H obtenus pour nos quatre nitroxydes amphiphiles à une concentration de 10 mM (Figure 2-13).

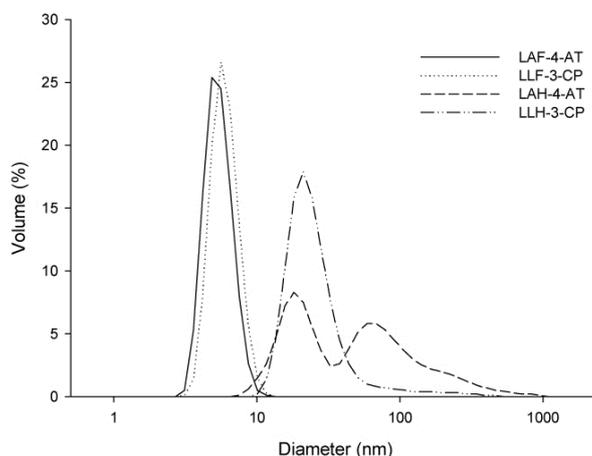


Figure 2-13. Distribution volumétrique du diamètre hydrodynamique des nitroxydes amphiphiles à 10 mM

Les valeurs présentées dans le tableau 2-2 ainsi que les courbes présentent sur la figure 2-13, montrent clairement que la taille et la distribution volumétrique des agrégats présents en solution aqueuse, sont dépendantes à la fois de la structure chimique du transporteur amphiphile mais également de la concentration au cours de la mesure. En effet, les deux dérivés amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée s'associent tous deux de manière monodisperse, sous forme de petits agrégats d'environ 5,5-6 nm de diamètre avec une largeur à mi-hauteur proche de 1 nm. La taille de ces agrégats est quasi-identique à celle précédemment observée avec des tensioactifs fluorés à tête sucre,²⁰ ainsi qu'à celle obtenue avec les deux dérivés lysine à chaîne perfluorocarbonnée porteurs de la PBN et de la DMPO.¹⁴ En outre, il a été montré que leurs analogues porteurs de la PBN forment des micelles à des concentrations de 0,05 mM pour le dérivé de l'acide aspartique, et de 0,35 mM pour le dérivé de la lysine.² Par conséquent, nous pouvons supposer que les agrégats formés à 10 mM par les nitroxydes amphiphiles à chaîne perfluorocarbonnée sont probablement des micelles de forme sphérique.

Les deux dérivés amphiphiles à chaîne hydrocarbonée s'associent quant à eux sous forme d'agrégats de taille bien plus importante. En effet, le LAH-4-AT forme à 20 mM deux types d'agrégats de distribution volumique identique, d'environ 20 et 110 nm de diamètre. Tandis que le LLH-3-CP forme à cette même concentration un seul type d'agrégats d'environ 30 nm de diamètre. Par conséquent, les agrégats formés par les deux nitroxydes amphiphiles à chaîne hydrogénée ne semblent plus correspondre à des micelles, mais plutôt à des agrégats plus larges et moins organisés.

Pour finir, les deux nitroxydes amphiphiles dérivés de la lysine semblent former les mêmes agrégats au cours des différentes dilutions, alors que leurs analogues dérivés de l'acide aspartique forment subitement deux populations d'agrégats de tailles différentes à la concentration de 1 mM.

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer le comportement auto-associatif en milieu aqueux bien plus fort des dérivés amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée par rapport à leurs analogues hydrocarbonés. Elle nous a également permis de confirmer que les dérivés de la lysine possèdent, dans l'eau, un comportement auto-associatif sensiblement plus marqué que leurs analogues dérivés de l'acide aspartique.

2.2. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La spectroscopie RPE est couramment employée pour étudier la dynamique d'auto-association ou de complexation d'espèces paramagnétiques en milieu aqueux.²¹

2.2.1. Phénomènes d'agrégations et spectres RPE

Le premier paramètre modifié lors d'un phénomène d'agrégation, est la constante de couplage hyperfin attribuée à l'atome d'azote (a_N), qui représente l'interaction entre le spin de l'atome d'azote et celui de l'électron célibataire. Etant donné que cette valeur est proportionnelle à la densité de charge présente sur l'atome d'azote, elle est par conséquent directement affectée par la polarité environnant le nitroxyde. Ainsi, l'agrégation des nitroxydes amphiphiles dans le milieu provoque une diminution de la présence du solvant autour de la fonction aminoxyle et par conséquent une diminution de la polarité environnant le nitroxyde. Ce phénomène entraîne une diminution de la constante de couplage a_N , ce qui est clairement observable sur les spectres RPE.

Le second paramètre modifié lors d'un phénomène d'agrégation, concerne la résolution du spectre RPE qui se trouve être affectée par toute perturbation du libre mouvement des molécules en solution. Ainsi tout phénomène d'agrégation dans le milieu, empêche les molécules paramagnétiques de se déplacer librement en solution, et induit par conséquent des spectres présentant un caractère anisotrope.

L'ensemble des mesures RPE a été réalisé par Grégory Durand dans le laboratoire du Pr. Frederick Villamena au sein du Département de Pharmacologie à Columbus (Ohio, USA). Les simulations ont ensuite été effectuées par Antal Rockenbauer au sein du Centre de Recherches Chimiques à Budapest (Hongrie).

2.2.2. Résultats

Les signaux présents sur les spectres RPE de nitroxydes tels que le 3-CP ou le 4-AT, possèdent tous une structure hyperfine sous forme d'un triplet (1.1.1), dû au couplage hyperfin entre l'électron non apparié et l'azote ^{14}N de la fonction aminoxyle.

Les spectres RPE obtenus pour les deux dérivés amphiphiles de la lysine, porteurs du 3-CP, sont présentés sur la figure 2-14. A gauche sont représentés les spectres simulés du LLF-3-CP à haute et basse concentration et à droite ceux simulés pour le LLH-3-CP à haute et basse concentration. Les spectres enregistrés à haute concentration correspondent aux nitroxydes amphiphiles sous forme agrégée formant ainsi un cluster, alors que ceux enregistrés à basse concentration laissent apparaître un nitroxyde amphiphile libre de mouvement.

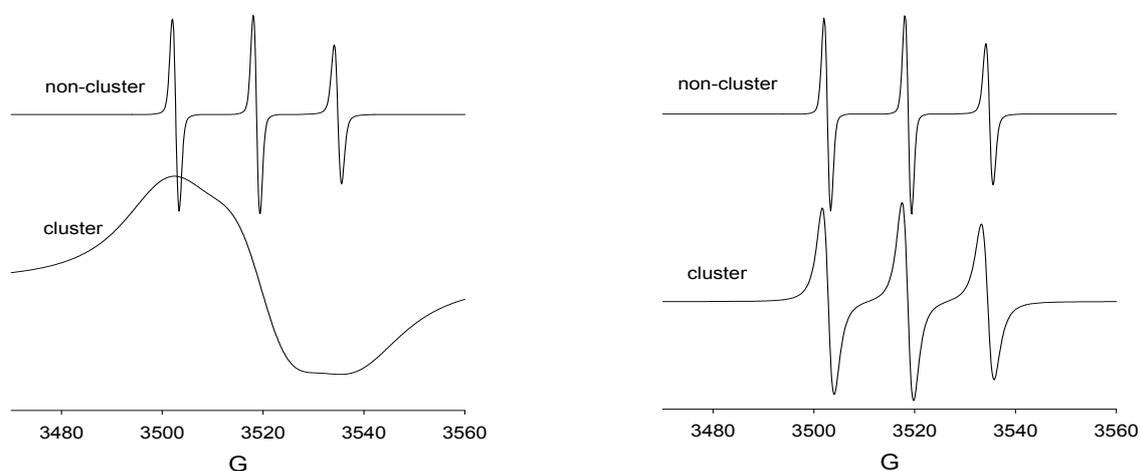


Figure 2-14. Spectres RPE obtenus pour les formes agrégées (en bas) et non-agrégées (en haut) des composés LLF-3-CP (à gauche) et LLH-3-CP (à droite)

A la vue de cette figure, il est intéressant de remarquer la différence d'allure entre les spectres du LLF-3CP et du LLH-3CP sous forme de cluster. Avec le dérivé fluoré la forme de triplet a complètement disparue alors que pour le dérivé hydrogéné on observe un élargissement des pics de résonance. Le fait que le spectre RPE du LLF-3CP soit fortement anisotrope indique la présence d'interactions magnétiques entre les motifs nitroxydes au sein de l'agrégat. Ceci témoigne donc d'une organisation compacte et de petite taille de la particule formée. Une différence de comportement des nitroxydes dérivés de l'acide aspartique sous forme agrégée a également pu être observée. Néanmoins dans le cas du composé LAF-4-AT sous forme agrégée la présence d'un triplet légèrement mieux résolu que

pour le LLF-3CP est observée. Ceci indique la présence d'interactions magnétiques moins fortes entre les nitroxydes au sein de l'agrégat et suggère une organisation un peu moins compacte de la particule formée.

L'observation de ces spectres démontre bien que l'auto-association des nitroxydes amphiphiles en milieu aqueux entraîne un changement environnemental aux environs de la fonction aminoxyle. Ce qui nous a permis, lors d'une seconde étude RPE, de déterminer avec plus de précision la concentration à laquelle chaque nitroxyde amphiphile commence à s'agréger dans l'eau. Nous avons ainsi reportés sur la figure 2-15 la répartition normalisée entre nitroxydes libres et agrégés en fonction de la concentration en nitroxyde dans le milieu. Les concentrations d'apparition des premiers agrégats peuvent donc être apparentées à une concentration d'agrégation critique (cac) pour chaque composé.

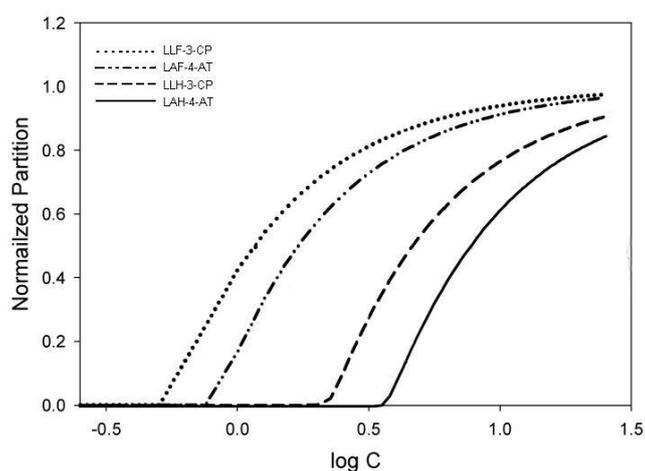


Figure 2-15. Radical distributions entre la forme agrégée et non-agrégée des quatre nitroxydes amphiphiles en fonction du log C (exprimée en mmol)

De manière générale, l'observation de ces courbes démontre bien une nette cassure dans la distribution de chaque nitroxyde amphiphile entre sa forme agrégée et non-agrégée. Cette dernière se produit effectivement à une certaine concentration, qui correspond à un changement du microenvironnement aux alentours de la fonction aminoxyle, indiquant le début de la formation d'agrégats dans le milieu. Ainsi, tant que la distribution normalisée reste à 0 les nitroxydes amphiphiles sont sous leurs formes libres, tandis que dès que qu'une rupture de pente apparaît sur le graphique on peut considérer qu'il s'agit de la formation des premiers agrégats. Les courbes augmentent ensuite progressivement en se rapprochant du

niveau 1, indiquant que ces derniers s'auto-associent de plus en plus jusqu'à arriver à la situation où ils ne sont plus que sous leur forme agrégée.

La cassure s'opère à des concentrations respectives d'environ 0,5 et 0,75 mM pour les deux dérivés fluorés, LLF-3-CP et LAF-4-AT, tandis qu'elle s'effectue à des concentrations d'environ 3,6 et 2,1 mM pour les deux dérivés hydrogénés, LAH-4-AT et LLH-3-CP, respectivement.

L'ensemble de ces études physico-chimiques portant sur l'hydrophobie et sur l'auto-association en milieu aqueux, nous amène maintenant à faire différents commentaires sur la cohérence de ces résultats.

Dans un premier temps, nous pouvons affirmer que les comportements de chaque nitroxyde amphiphile en milieu aqueux, obtenus par DLS et RPE, sont en accord avec les valeurs de $\log k'_w$ obtenues. En effet, parmi ces quatre composés, les deux dérivés fluorés plus hydrophobes, sont ceux qui présentent les propriétés auto-associatives les plus marquées de ce fait les valeurs de cac les plus basses. De plus, les dérivés de la lysine, légèrement plus hydrophobes que leurs analogues dérivés de l'acide aspartique, présentent également des propriétés d'auto-association dans l'eau plus marquées et cela à des concentrations plus basses.

Dans un second temps, nous pouvons mentionner que les résultats de DLS sont quelques peu en désaccord avec ceux obtenus par RPE. En effet, tandis qu'en DLS le LAF-4-AT forme de façon monodisperse des agrégats de petites taille (5,5-6 nm de D_H), jusqu'à une concentration comprise entre 1 et 5 mM, la RPE indique pour ce composé une cac inférieure à 1 mM. De plus, la RPE indique une cac d'environ 2,1 mM pour le LLH-3-CP alors que la DLS a démontré que ce composé formé de façon monodisperse des agrégats plus larges (30 nm de D_H) au moins jusqu'à une concentration de 1 mM.

Par conséquent, malgré ces quelques différences, l'ordre obtenu en RPE pour les cac des quatre nitroxydes amphiphiles est parfaitement en accord avec celui trouvé pour les valeurs de $\log k'_w$. Ainsi, les quelques différences observées peuvent parfaitement s'expliquer par le fait que ces études physico-chimiques dépendent de multiples paramètres intrinsèques, qui peuvent dans certains cas altérer les résultats.

3. Etude des potentiels oxydant et réducteurs

Cette troisième étude physico-chimique va nous permettre de déterminer les propriétés électrochimiques de chaque nitroxyde à travers l'étude de leurs potentiels oxydants ainsi que de leurs stabilités en milieu réducteur.

3.1. Etude du potentiel oxydant des nitroxydes par voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est couramment utilisée en raison de sa simplicité et de sa rapidité pour la caractérisation initiale d'un système redox actif, ce qui est le cas des nitroxydes. En effet, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les nitroxydes peuvent lors de transformations redox monoélectronique, se présenter sous deux autres formes, hydroxylamine et cation oxoammonium.

3.1.1. Principe de la méthode

Au cours d'une expérience de voltampérométrie cyclique, on mesure la variation du courant faradique (un courant faradique étant un courant dû à une réaction d'oxydo-réduction) par rapport à la variation du potentiel appliqué au système redox. La réponse du courant est alors mesurée sur un intervalle de potentiel défini, d'une valeur initiale jusqu'à une valeur limite, avec une variation linéaire du potentiel entre ces deux valeurs extrêmes. Ainsi, une fois arrivé à cette valeur de potentiel limite, le sens du balayage est inversé et ainsi la même fenêtre de potentiel est balayée dans le sens opposée, d'où le terme « cyclique ». Cela signifie que, par exemple, les espèces formées par oxydation lors d'un premier balayage peuvent être réduites lors du second.

Dans le but d'obtenir ces variations de courant, tout système voltampérométrique doit être constitué par l'électrolyte étudié sous la forme d'une solution, un électrolyte support assurant une conductivité suffisante dans la solution, et trois électrodes qui sont :

- une électrode de travail, servant de site pour la réaction de transfert d'électrons et qui est donc le cœur de ce système,
- une électrode de référence, possédant quant à elle un potentiel spécifique et constant,
- une électrode auxiliaire, assurant le passage du courant dans la pile et permettant ainsi sa mesure.

Un circuit électronique appelé « potentiostat » doit ensuite appliquer au système une gamme de potentiels afin d'en mesurer le courant faradique de réponse. Il est ainsi possible de connaître la différence de potentiel existante entre l'électrode de travail et l'électrode de

référence et donc d'en mesurer la différence de courant faradique s'écoulant entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire.

Les expériences de voltampérométrie cyclique ont été à nouveau réalisées par Grégory Durand dans le laboratoire du Pr. Frederick Villamena.

3.1.2. Résultats

Dans le but d'illustrer le type de courbes obtenues en voltampérométrie cyclique, le voltamogramme obtenu avec le 4-AT est représenté sur la figure 2-16. Celui-ci est un parfait exemple des courbes obtenues lors des deux balayages de la gamme de potentiels, effectués de manière consécutive et dans des sens opposés. Toutes deux représentent la variation du courant faradique s'écoulant aux bornes de l'électrode de travail (cathode) et de l'électrode auxiliaire (anode) en fonction de la différence de potentiel induite entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (Ag/AgCl).

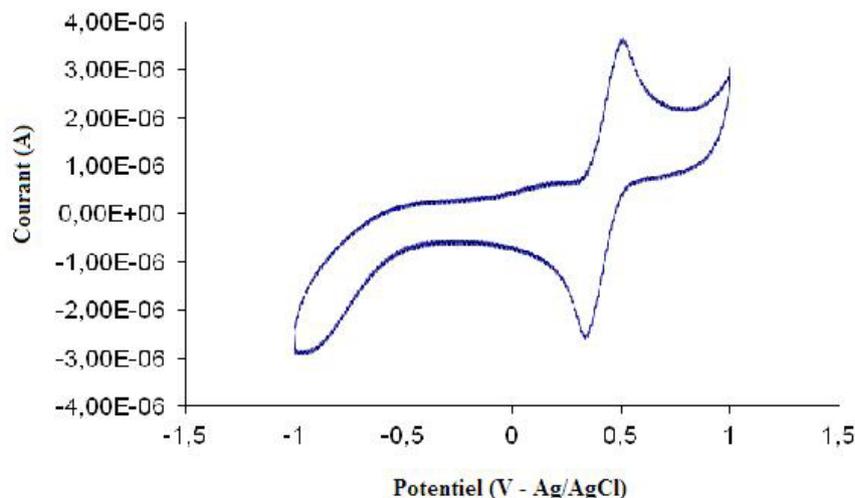


Figure 2-16. Courbes de voltampérométrie cyclique obtenue pour le 4-AT

D'après ces courbes, différents paramètres sont définis et notamment le potentiel d'oxydation $E_{1/2}(\text{ox}) = (E_{\text{pc}} + E_{\text{pa}})/2$ de chaque électrolyte étudié. Ainsi, les potentiels d'oxydation expérimentaux obtenus par voltampérométrie cyclique pour les quatre nitroxydes amphiphiles ainsi que pour leur nitroxydes parents, sont répertoriés dans le tableau 2-3.

Nitroxydes	$E_{1/2}$ (ox) (mV)
4-AT	612 ± 7
4-AcT	421
TEMPO	402
LAH-4-AT	532 ± 14
LAF-4-AT	545 ± 11
3-CP	288
LLH-3-CP	582
LLF-3-CP	664

Tableau 2-3. Potentiels d'oxydation obtenus pour différents nitroxydes

Nous avons inclus dans ce tableau les valeurs mesurées pour deux autres nitroxydes pipéridiniques, le 4-AcT et le TEMPO, afin d'évaluer l'influence du substituant sur le potentiel d'oxydation de la fonction aminoxyle.

Concernant les nitroxydes pipéridiniques, le 4-AT est celui qui possède le plus fort potentiel d'oxydation (612 mV), tandis que le TEMPO est celui possédant le plus faible (402 mV), indiquant une oxydation plus aisée pour ce dernier. Il semble donc que le substituant présent sur le cycle pipéridinique joue un rôle non négligeable dans l'oxydation du nitroxyde, ce qui est en accord avec de précédentes études réalisées sur les effets de substituants sur les potentiels d'oxydation de nitroxydes.^{22,23} De plus, l'acétylation du 4-AT diminue la valeur du potentiel d'oxydation (421 mV), ce qui confirme à nouveau l'effet du substituant présent sur le cycle. Cependant, la présence d'une liaison amide n'altère que très peu le potentiel d'oxydation du nitroxyde, comparé au TEMPO, nitroxyde non-substitué. Enfin, le greffage du 4-AT sur un transporteur amphiphile ne semble que légèrement affecter les valeurs de potentiel d'oxydation comparé au nitroxyde parent.

Concernant les nitroxydes pyrrolidiniques, les valeurs de potentiel d'oxydation du LLH-3-CP et du LLF-3-CP sont cette fois-ci bien plus élevées que celle concernant leur nitroxyde parent, le 3-CP. Ce dernier affiche toutefois une valeur anormalement basse pour un nitroxyde pyrrolidinique.

Concernant maintenant les nitroxydes amphiphiles entre eux, on peut constater que ceux porteurs du 3-CP possèdent des potentiels d'oxydation supérieurs à ceux porteurs du 4-AT, ce qui est en accord avec la littérature sur le fait que les nitroxydes pipéridiniques s'oxydent plus facilement.^{23,24}

En conclusion de cette étude, nous pouvons affirmer que la présence d'un transporteur amphiphile ne fait qu'augmenter la valeur du potentiel d'oxydation des deux nitroxydes parents, empêchant ces derniers de s'oxyder rapidement. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la structure amphiphile induit un encombrement stérique autour de la fonction aminoxyle, cette dernière ne pouvant par conséquent interagir facilement avec l'électrode de travail, ce qui réduit considérablement le processus d'oxydation du nitroxyde amphiphile.

3.2 Etude de la stabilité des nitroxydes en milieu réducteur

La détermination de la vitesse relative de réduction de chaque nitroxyde est réalisée par étude cinétique en RPE, en présence d'une certaine concentration en ascorbate dans le milieu. Les valeurs obtenues pour les quatre nitroxydes amphiphiles ainsi que pour leurs nitroxydes parents, sont répertoriés dans le tableau 2-4.

Nitroxydes	Taux de réduction
4-AT	n.d.
4-AcT	106,7
TEMPO	23,1
LAH-4-AT	117,0
LAF-4-AT	114,1
3-CP	1,0
LLH-3-CP	3,2
LLF-3-CP	3,0

Tableau 2-4. Valeurs relatives des vitesses de réduction de chaque nitroxyde, en présence d'ascorbate à 5 mM.

Avant toutes remarques, il convient de préciser que sont exprimées dans ce tableau les vitesses relatives de réduction des nitroxydes et que le 3-CP, possédant la vitesse la plus faible et se révélant le plus difficilement réductible, a été choisi comme référence. Ainsi, concernant les nitroxydes pyrrolidiniques, le 3-CP se trouve être trois fois plus stable que ses dérivés amphiphiles, le LLF-3-CP et le LLH-3-CP. La présence de la fonction acide carboxylique sur le 3-CP semble donc être un élément important dans sa stabilité vis-à-vis de l'ascorbate. De ce fait, sa fixation sur une structure amphiphile entraîne une perte de ces interactions répulsives et le motif nitroxyde se retrouve plus facilement réduit et donc moins stable. Cependant, une très faible différence est observée entre les vitesses de réduction du LLF-3-CP et du LLH-3-CP, ce qui suggère que la nature de la chaîne hydrophobe n'a pas d'influence sur la stabilité du nitroxyde greffé.

Concernant les nitroxydes pipéridiniques, le TEMPO est le plus stable, avec toutefois une vitesse de réduction environ 23 fois plus importante que celle du 3-CP, alors que le 4-AT est tellement réactif que sa vitesse relative n'a pu être déterminée. Cette très haute réactivité est certainement due à une attraction électrostatique entre la nature cationique de la fonction amine du 4-AT et la nature anionique de l'ascorbate, ce qui confirme les précédents travaux de Morris *et al.*²⁵ L'acétylation de l'amine du 4-AT diminue de manière significative cette réactivité vis-à-vis de l'ascorbate, mais la vitesse de réduction du 4-AcT reste toutefois 5 fois plus élevée que celle observée pour le TEMPO non-substitué. Ce qui confirme que l'effet attracteur du substituant rend le motif nitroxyde plus facilement réductible et par conséquent beaucoup moins stable. De plus, les dérivés amphiphiles LAH-4-AT et LAF-4-AT présentent une vitesse relative semblable à celle du 4-AcT, ce qui indique que la présence du transporteur acide aspartique, quelle que soit la nature de la chaîne hydrophobe, n'affecte en rien la stabilité du motif nitroxyde en milieu réducteur.

En conclusion, les résultats obtenus confirment les résultats précédemment décrits par d'autres auteurs.^{25,26,27} De manière générale, les nitroxydes pipéridiniques sont plus rapidement réduits que les pyrrolidiniques et l'impact de la nature des substituants sur cette réactivité (qui peuvent agir par effets inductifs et électrostatiques avec les charges négatives de l'ascorbate) a également pu être confirmée.

D. Etudes biologiques *in vitro*

L'ensemble de ces études biologiques a été réalisé par Robert Prosak dans le laboratoire du Pr. Frederick Villamena aux USA, sur des cellules endothéliales aortiques bovines.

1. Etude de la cytotoxicité des nitroxydes

Au cours de cette étude de toxicité, les cellules endothéliales bovines sont placées durant 24 h en présence de nitroxyde à différentes concentrations. Les résultats expérimentaux exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire, présentés sur la figure 2-17, ont été obtenus selon la méthode d'analyse au 3-[4,5-diméthylthiazo-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Cette méthode est basée sur la formation du MTT en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux bleus ainsi formés sont ensuite solubilisés et peuvent être quantifiés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm.

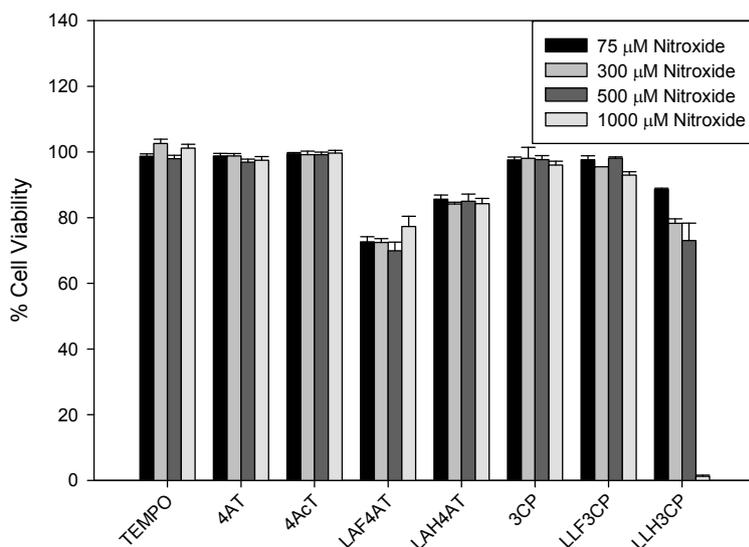


Figure 2-17. Cytotoxicités des différents nitroxydes à 75, 300, 500 et 1000 μM

Dans un premier temps, cette étude de cytotoxicité démontre que les nitroxydes non-conjugués ne présentent aucune toxicité vis-à-vis de ces cellules dans la gamme de concentration 75-1000 μM . Cette première observation concernant les nitroxydes pipéridiniques TEMPO, 4-AT et 4-AcT est en accord avec la littérature.²⁸ Toutefois, l'absence de toxicité du 3-CP dans la gamme de concentrations utilisée lors de cette étude contredit quelque peu les données de la littérature. En effet, il a été démontré que les nitroxydes pipéridiniques présentaient une plus faible toxicité que les pyrrolidiniques sur différents modèles cellulaires.^{29,30}

Dans un second temps, cette étude démontre que parmi les nitroxydes amphiphiles, seul le LLF-3CP a montré une absence totale de toxicité. Les valeurs des nitroxydes amphiphiles LAF-4-AT et le LAH-4-AT démontrent quant à elles que ces composés induisent une légère toxicité, entraînant une mort cellulaire <30% dans la gamme de concentration utilisée. Au contraire, le LLH-3-CP induit une toxicité beaucoup plus marquée avec une mort complète des cellules à 1000 μM . Cette toxicité aiguë est très certainement due aux propriétés détergentes du LLH-3-CP à des concentrations proches ou supérieures à sa cmc. Cette hypothèse est confirmée par l'observation des résultats concernant son analogue à chaîne perfluorocarbonée, le LLF-3-CP, qui ne présente aucun signe de toxicité à cette même concentration. Il est en effet maintenant couramment admis que les chaînes perfluorées présentes sur les agents amphiphiles n'induisent aucun effet détergent.

Ces observations nous amènent à conclure que la fixation de nitroxydes sur une structure amphiphile semble induire une légère toxicité à de fortes concentrations. Ceci est en accord avec les travaux réalisés sur les transporteurs fluorés dérivés de la lysine et porteurs de nitrones PBN et DMPO. En effet, tandis que le transporteur amphiphile dérivé de la PBN s'est montré dépourvu de toxicité, son analogue dérivé de la DMPO s'est révélé toxique dans la même gamme de concentration ($>500 \mu\text{M}$). Ceci est d'autant plus surprenant que ni le transporteur dépourvu de motif PBN, ni de motif DMPO se sont révélés toxiques à cette gamme de concentration.

2. Etude des propriétés cytoprotectives

Au cours de cette étude de cytoprotection, les cellules endothéliales aortiques bovines sont tout d'abord placées durant 24 heures en absence ou en présence de nitroxydes à différentes concentrations, puis sont intoxiquées par du peroxyde d'hydrogène à une concentration de $300 \mu\text{M}$. La viabilité cellulaire est ensuite observée 24 heures après l'intoxication. Les résultats expérimentaux, exprimés en pourcentage de cellules viables, sont présentés sur la figure 2-18.

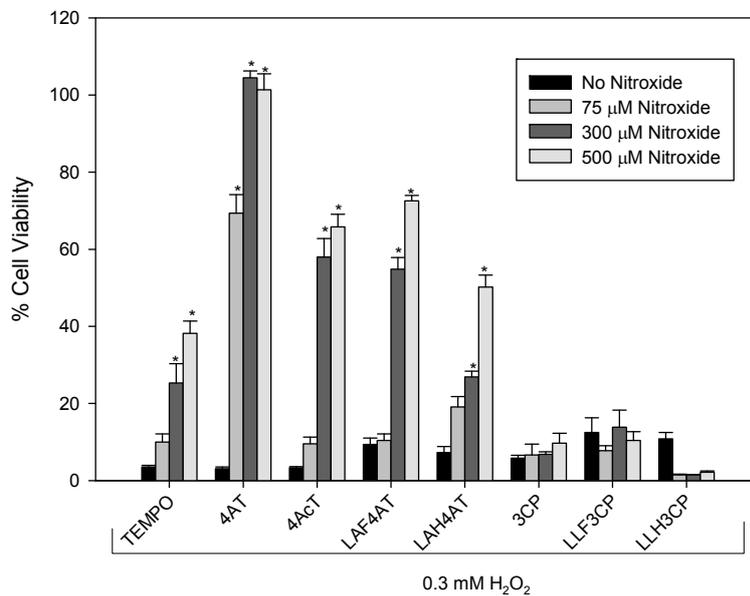


Figure 2-18. Propriétés cytoprotectives de différents nitroxydes à 0, 75, 300 et 500 μM évaluées sur des cellules endothéliales aortiques bovines soumises à 300 μM en H_2O_2

Les résultats de cytoprotection démontrent que d'un point de vue général, les nitroxydes cycliques pyrrolidiniques ne présentent aucune activité protectrice dans cette gamme de concentrations, tandis que les nitroxydes pipéridiniques possèdent une activité protectrice plus ou moins marquée.

En effet, parmi les nitroxydes pipéridiniques différents degrés de cytoprotection sont observés. Le 4-amino TEMPO est de loin celui dont l'activité cytoprotective est la plus marquée, suivi de son dérivé acétylé, le 4-acétamido TEMPO, et du dérivé amphiphile à chaîne fluorée, le LAF-4-AT. Les nitroxydes LAH-4-AT et TEMPO présentent quant à eux une activité cytoprotectrice nettement moins prononcée. Ces observations sont ainsi en accord avec les travaux réalisés par Czepas *et al.*,²⁶ qui ont prouvé que la substitution en position C-4 des nitroxydes pipéridiniques est un paramètre affectant de manière significative leurs propriétés biologiques. Le 4-AT et le 4-AcT se sont par conséquent révélés potentiellement plus efficaces que le TEMPO et que son dérivé hydroxylé, le TEMPOL, vis-à-vis d'un stress oxydant généré par du H₂O₂.

De plus, il semblerait que le peroxyde d'hydrogène diffuse à travers les membranes des cellules et ainsi une concentration inhabituelle de celui-ci dans le milieu intra-cellulaire induirait d'importants dégâts aux constituants cellulaires, par un phénomène d'apoptose ou de nécrose.³¹ L'excellente activité protectrice du nitroxyde 4-AT semble donc provenir de sa rapide réduction en hydroxylamine qui resterait sous cette forme réduite dans le compartiment cytoplasmique,^{26,32} alors que le 4-AcT qui est réduit plus lentement, ne permettrait pas une assez grande quantité de sa forme hydroxylamine dans le milieu intra-cellulaire. L'absence d'activité protectrice du nitroxyde TEMPO peut quant à elle s'expliquer par sa réduction à la fois sous sa forme amine et hydroxylamine, cette première étant dépourvue de toute activité antioxydante.³³

L'ensemble de ces viabilités cellulaires nous permettent de conclure en classant les nitroxydes pipéridiniques, du plus protecteur au moins efficace envers les cellules endothéliales intoxiquées au peroxyde d'hydrogène, de la façon suivante : 4-AT > 4-AcT = LAF-4-AT > LAH-4-AT > TEMPO. Ce classement suggère que le transporteur amphiphile ne joue pas un rôle majeur dans l'activité cytoprotective des nitroxydes, mais également que l'activité antioxydante offerte par les nitroxydes semble provenir de leur réduction en leur forme hydroxylamine, ces dernières agissant probablement dans le compartiment intra-cellulaire où se trouvent la plus grande concentration en peroxyde d'hydrogène.

E. Conclusion

Les travaux de recherche proposés dans le cadre de ce deuxième chapitre, portaient sur le développement de nouveaux dérivés amphiphiles d'acides aminés capables d'améliorer le transport d'agents antioxydants synthétiques : les nitroxydes. Ce travail s'inscrit dans les recherches de nouveaux agents thérapeutiques potentiels applicables dans la lutte contre les phénomènes de stress oxydant.

D'un point de vue synthèse, une nouvelle série de dérivés amphiphiles possédant une tête polaire lactobionolactone, une chaîne hydrophobe hydro- ou perfluorocarbonée et un acide aminé central fixant le 4-AT ou le 3-CP, a été synthétisé de manière relativement aisée.

D'un point de vue physico-chimique, il a été démontré que ces dérivés amphiphiles induisent une nette augmentation de l'hydrophobie des nitroxydes greffés, augmentation d'autant plus marquée pour les structures amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée. Par conséquent, les nitroxydes amphiphiles fluorés sont ceux qui ont présenté les propriétés d'auto-association en milieu aqueux les plus marquées, comparativement à leurs analogues hydrogénés. La nature de l'acide aminé joue également un rôle car les dérivés de la lysine ont présenté une hydrophobie légèrement plus marquée que les dérivés de l'acide aspartique. Cependant, le caractère amphiphile apportés à nos deux nitroxydes ne semble que faiblement renforcer leurs potentiels oxydants et ne démontre aucune influence notable sur leurs stabilités en milieu réducteur.

D'un point de vue biologique, les essais préliminaires qui ont pu être réalisés semblent montrer que la vectorisation du 4-AT et du 3-CP par ce modèle de transporteurs amphiphiles n'a pas permis d'améliorer leurs propriétés protectrices vis-à-vis d'un phénomène de stress oxydant. En effet, tandis que les nitroxydes pyrrolidiniques ne démontrent aucun potentiel protecteur, l'ordre décroissant dans l'activité cytoprotective des nitroxydes pipéridiniques est le suivant : 4-AT > 4-AcT = LAF-4-AT > LAH-4-AT > TEMPO.

RÉFÉRENCES

- ¹ Périno S., Contino-Pépin C., Jasseron S., Rapp M., Maurizis J. C., Pucci B., Design, synthesis and preliminary biological evaluations of novel amphiphilic drug carriers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 1111-1114.
- ² Ortial S., Durand G., Poeggeler B., Polidori A., Pappolla A., Böker J., Hardeland R., Pucci B., Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers : a new class of protective agents, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2812-2820.
- ³ Smith A. R., Shenvi S. V., Wildansky M., Suh J. H., Hagen T. M., Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress, *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 1135-1146.
- ⁴ Bendheim, P. E., Poeggeler B., Neria E., Ziv V., Pappolla M., Chain G. G., Development of indole-3-propionic acid (OXIGON) for Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.* **2002**, 19, 213-218.
- ⁵ Usuki F., Yasutake A., Umehara F., Tokunaga H., Matsumoto M., Eto K., Ishiura S., Higuchi I., In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamine E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat, *Neurosci. Lett.*, **2001**, 304, 199-203.
- ⁶ Konorev E. A., Kennedy M. C., Kalyanaraman B., Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, 368, n°2, 421-428.
- ⁷ Sarvazyan N., Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **1996**, 271, 2079-2085.
- ⁸ Kotamraju S., Konorev E. A., Joseph J., Kalyanaraman B., Doxorubicin-induced apoptosis in Endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 33585-33592.
- ⁹ Durand G., Prosak R. A., Yongbin H., Ortial S., Rockenbauer A., Pucci B., Villamena F. A., Spin trapping and cytoprotective properties of fluorinated amphiphilic carrier conjugates of cyclic versus linear nitrones, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, 22, 1570-1582.
- ¹⁰ Durand G., Polidori A., Salles J-P., Prost M., Durand P., Pucci B., Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derivated from PBN and Lipoic acid, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5320-5237.
- ¹¹ Durand G., Polidori A., Salles J-P., Pucci B., Synthesis of a new family of glycolipidic nitrones as potential antioxidant drugs for neurodegenerative disorders, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 859-862.
- ¹² Chabaud E., Barthelemy N., Mora N., Popot J. L., Pucci B., Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solutions using fluorinated surfactants, *Biochimie*, **1998**, 80, 515-530.
- ¹³ Durand G., Poeggeler B., Ortial S., Polidori A., Villamena F. A., Böker J., Hardeland R., Pappolla M. A., Pucci B., Amphiphilic amide nitrones: a new class of protective agents as modifiers of mitochondrial metabolism, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4849-4861.
- ¹⁴ Durand G., Prosak R. A., Yongbin H., Ortial S., Rockenbauer A., Pucci B., Villamena F. A., Spin trapping and cytoprotective properties of fluorinated amphiphilic carrier conjugates of cyclic versus linear nitrones, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, 22, 1570-1582.
- ¹⁵ Hansch C., Maloney P. P., Fujita T., Muir R., Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients, *Nature*, **1962**, 194, 178-180.
- ¹⁶ Hansch C., Fujita T., A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1616-1626.
- ¹⁷ Hansch C., Fujita T., Isawa J., A new substituent constant, π , derived from partition coefficients, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 5175-5180.
- ¹⁸ Collander R., The permeability of Nitella cells to nonelectrolytes, *Physiol. Plantarum.*, **1954**, 7, 420-445.
- ¹⁹ Hansch C., Steward A. R., Anderson S. M., Bentley D., Parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics, *J. Med. Chem.*, **1968**, 11, 1-11.
- ²⁰ Abla M., Durand G., Pucci B., Glucose-based surfactants with hydrogenated, fluorinated, or hemifluorinated tails : synthesis and comparative physical-chemical characterization, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 8142-8153.
- ²¹ Freed J. H., *Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides*, Academic, New York, NY, 1976.
- ²² Nakahara K., Iwasa S., Iriyama J., Morioka Y., Suguro M., Satoh M., Cairns E. J., *Electrochim. Acta*, **2006**, 52, 921.
- ²³ Blinco J. P., Hodgson J. L., Morrow B. J., Walker J. R., Will G. D., Coote M. L., Bottle S. E., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 6763-6771.
- ²⁴ Hodgson J. L., Namazian M., Bottle S. E., Coote M. L., *J. Phys. Chem. A*, **2007**, 111, 13595-13605.
- ²⁵ Morris S., Sosnovsky G., Hui B., Huber C. O., Rao N. U. M., Swartz H. M., Chemical and electrochemical reduction rates of cyclic nitroxides (nitroxyls), *J. Pharm. Sci.*, **1991**, 80, 149-152.
- ²⁶ Couet W. R., Brasch R. C., Sosnovsky C., Lukszo J., Prakash I., Gnewech C. T., Tozer T. N., Influence of chemical structure of nitroxyl spin labels on their reduction by ascorbic acid, *Tetrahedron.*, **1985**, 41, 1165-1172.
- ²⁷ Mravljak J., Pecar S., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 567.
- ²⁸ Czepas J., Koceva-Chyla A., Gwozdziński K., Jozwiak Z., Different effectiveness of piperidine nitroxides against oxidative stress induced by doxorubicin and hydrogen peroxide, *Cell Biol. Toxicol.*, **2008**, 24, 101-112.

²⁹ Damiani E., Greci L., Hrelia P., Cyto- and genotoxic effects of novel aromatic nitroxide radicals in vitro, *Free Radical Biol. Med.*, **2000**, 28, 330-336.

³⁰ Kocherginsky N., Swartz H. M., Sentjurc M., Toxicity and the use of nitroxides as drugs. In : Kocherginsky N., Swartz H. M., eds. Nitroxide spin labels, reactions in biology and chemistry, *Boca Raton: CRC Press*, **1995**, 175-198.

³¹ Gardner A. M., Xu F., Fady C., Jacoby F. J., Duffey D. C., Tu Y., Lichtenstein A., Apoptotic vs. Nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide, *Free Radical Biol. Med.*, **1997**, 22, 73-83.

³² Kroll C., Langner A., Borchert H. H., *Free Radical Biol. Med.*, **1999**, 26, 850-857.

³³ Krishna M. C., Degraff W., Hankovszky O. H., Sar C. P., Kalai T., Jeko J., Russo A., Mitchell J. B., Hideg K., Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 3477-3492.

Chapitre 3 :

Nitrones dérivées de la PBN

A. INTRODUCTION	96
1. CARACTERISTIQUES GENERALES DES STRUCTURES AMPHIPHILES UTILISEES.....	96
2. TRAVAUX PRELIMINAIRES	97
3. PRESENTATION DES NOUVEAUX DERIVES DE LA PBN	101
B. SYNTHÈSE DES NOUVEAUX TRANSPORTEURS DE LA PBN	103
1. SYNTHÈSE DES DERIVES LIPOPHILES DE LA PBN A MOTIF CHOLESTEROL	103
2. SYNTHÈSE DES DERIVES AMPHIPHILES DE LA PBN A TÊTE POLAIRE TRIS	118
3. SYNTHÈSE DE L'ANALOGUE DE LA LPBNH15 A TÊTE POLAIRE GLUCOSE	124
C. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES	126
1. ETUDE DE SOLUBILITE EN MILIEU AQUEUX	126
2. ETUDE DES COEFFICIENTS DE PARTITION	127
3. ETUDE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ÉLECTRONIQUE (RPE)	129
D. ETUDES <i>IN VIVO</i> MENEES SUR LA DEGENERESCENCE RETINIENNE	132
1. QU'EST-CE QUE LA DEGENERESCENCE RETINIENNE ?	132
2. LA DEGENERESCENCE RETINIENNE INDUITE PAR LA LUMIERE OU PHOTODEGENE-RESCENCE RETINIENNE	133
3. PRINCIPE DE L'ETUDE <i>IN VIVO</i>	134
4. RESULTATS DES DIFFERENTES EXPERIENCES.....	135
E. CONCLUSION	138

A. Introduction

L'intérêt de moduler la balance hydrophile lipophile (BHL) de la PBN s'explique par les propriétés thérapeutiques particulièrement prometteuses et diverses qu'elle possède et qui ont été présentées de manière détaillée dans le chapitre 1 (cf. Partie C, §2). Cependant, son activité protectrice vis-à-vis d'une surproduction de radicaux libres et du stress oxydant qui l'accompagne, requiert généralement des doses élevées de PBN (de 100 à 300 mg/kg) lors d'études *in vivo*. Ainsi, dans le but de diminuer les doses requises pour aboutir à une activité antioxydante convenable, il nous a paru opportun de moduler sa balance hydrophile lipophile afin d'améliorer et contrôler son passage membranaire et donc sa biodisponibilité. Nous avons ainsi choisi d'élaborer différentes nitrones dérivées de la PBN, de nature plus ou moins amphiphile, afin d'évaluer l'impact de ce paramètre physico-chimique sur ses propriétés protectrices.

1. Caractéristiques générales des structures amphiphiles utilisées

Dans le cadre de ce troisième chapitre, notre choix s'est cette fois-ci porté sur l'utilisation du modèle moléculaire à fixation centrale, où le motif PBN est introduit au cœur même de la structure de transport amphiphile. Le motif nitronne joue alors non seulement le rôle de fonction biologiquement active de la molécule, mais également celui de bras de liaison entre sa partie polaire et apolaire. Ces deux composantes, indispensables à l'amphiphilie de la molécule, sont placées soit sur la partie *tert*-butyle de la PBN, soit sur le cycle aromatique (Figure 3-1).

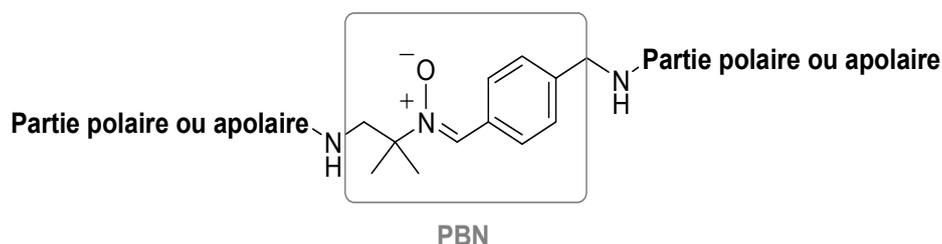
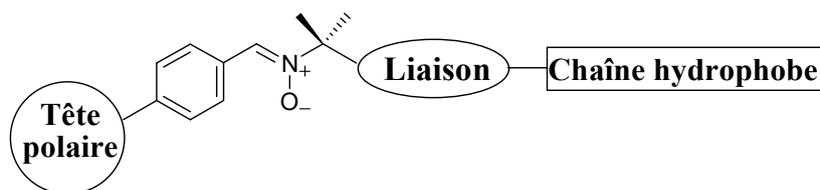


Figure 3-1. Structure générale des nitrones amphiphiles dérivées de la PBN

2. Travaux préliminaires

2.1. Premières modifications structurales réalisées sur ce modèle de transporteur

Une première série de nitrones amphiphiles, comportant une chaîne hydrophobe sur la partie *tert*-butyle de la PBN et la tête polaire sur son noyau aromatique, en position para de la fonction nitrone, a été synthétisée au laboratoire. Les différents membres de cette série diffèrent par la nature de leur tête polaire, de leur chaîne hydrophobe ou de la liaison entre cette dernière et la nitrone centrale (Figure 3-2).



Tête polaire	Liaison	Chaîne hydrophobe	Nom de la molécule
		CH ₂ CH ₂ C ₆ F ₁₃	APBNSF
		C ₈ H ₁₇	CarboxPBNSH
		C ₇ H ₁₅	LPBNAH
		CH ₂ CH ₂ C ₆ F ₁₃	LPBNAF
		C ₆ H ₁₃	LPBNUH
		CH ₂ CH ₂ C ₆ F ₁₃	LPBNSF
		C ₈ H ₁₇	LPBNSH
	-	-	TGPBN
		C ₇ H ₁₅	TGPBNAH
		C ₇ H ₁₅	EPBNAH

Figure 3-2. Structures et noms des nitrones amphiphiles de la première série^{1,2,3}

La partie polaire peut être de nature ionique ou non ionique. Les chaînes hydrophobes sont de nature hydrocarbonée ou perfluorocarbonnée, de longueur comprise entre 6 et 8 atomes de carbone et les liaisons qui maintiennent ces dernières à l'ensemble de la structure sont de type amide, uréthane ou thioéther.

Ces diverses nitrones amphiphiles ont par la suite été étudiées *in vitro* sur divers modèles cellulaires, ce qui a permis d'en déduire plusieurs paramètres structuraux essentiels à leurs activités protectrices vis-à-vis d'une surproduction de radicaux libres. En premier lieu, des études menées sur des cultures de fibroblastes présentant la mutation génétique NARP, ont démontré que les dérivés amphiphiles à tête polaire de type lactobionolactone présentaient une aptitude à réduire les phénomènes d'apoptose supérieure à celle de la PBN. Les composés à têtes polaires ioniques ont quant à eux présenté une cytotoxicité importante et ont été éliminés de la liste des candidats potentiels.² De plus, les études menées *in vitro* sur des cellules corticales primaires (présentées dans la suite de ce chapitre) ont confirmé que parmi les nitrones à tête polaire non ionique, celles possédant la lactobionolactone présentaient une activité anti-oxydante supérieure à celles possédant une tête polaire de type Tris (TGPBN et TGPBNAH), ou Ethoxy (EPBNAH) (Figure 3-2).⁴

Deuxièmement, plusieurs études menées *in vitro*,⁴ *ex vivo*⁴ et/ou *in vivo*^{5,6} ont mis en évidence la grande efficacité antioxydante de la nitrone à tête polaire lactobionamide et à chaîne heptyle (LPBNAH), comparativement aux nitrones glycosidiques à chaîne plus courte ainsi qu'à son analogue à chaîne équivalente perfluorocarbonnée (LPBNAF). Ces résultats ont ainsi permis de démontrer que la présence de la lactobionolactone ainsi que la nature et la longueur de la chaîne tenaient un rôle important dans le potentiel antioxydant des nitrones amphiphiles. Par conséquent, la chaîne heptyle présente sur la LPBNAH semble être la longueur de chaîne optimale pour envisager une activité antioxydante importante. La nature de la liaison entre cette chaîne hydrophobe et la partie nitrone a également son importance car, comme nous venons de le mentionner, la LPBNAH qui possède une liaison de type amide est la nitrone amphiphile dont le pouvoir protecteur vis-à-vis d'un phénomène de stress oxydant est le plus marqué.

Ces très bons résultats ont ainsi amené le laboratoire à développer de nouveaux analogues structuraux de la LPBNAH, afin d'établir une relation structure-activité permettant de mieux comprendre le mode d'action de cette nitrone amphiphile et ainsi espérer augmenter encore d'avantage son activité antioxydante.

2.2. Inversion du positionnement des parties polaires et apolaires autour de la PBN

La conception de ces nouvelles nitrones amphiphiles a reposé sur l'inversion des composantes polaire et apolaire autour de la PBN, la tête lactobionamide étant cette fois-ci fixée sur la partie *tert*-butyle de la PBN et la chaîne hydrophobe sur le motif phényle, en para de la fonction nitrone (Figure 3-3). Comme nous l'avons précisé, la supériorité de l'activité antioxydante de la LPBNAH par rapport à son analogue fluoré a déjà été démontrée, cependant le laboratoire a tenu à confirmer ce résultat sur cette deuxième série de molécules. Les deux analogues possédant soit une chaîne heptyle (LPBNH15) soit une chaîne 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyle (LPBNF13) ont ainsi été synthétisés. Ces deux composantes hydrophobes indispensables à l'amphiphilie du substrat, ont donc, compte tenu des observations précédentes, été reliées à la fonction nitrone par une jonction amide.

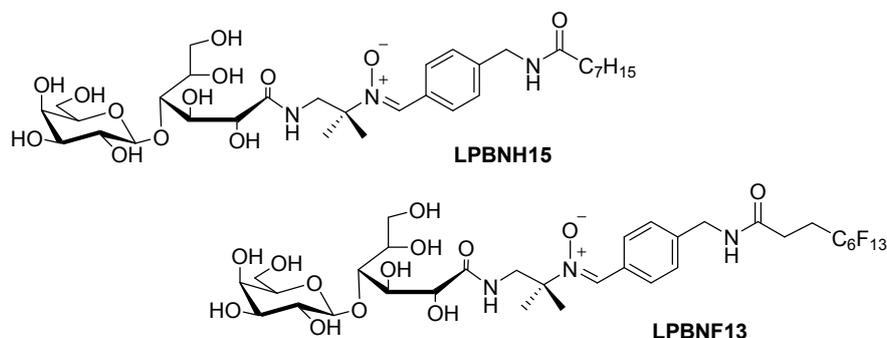


Figure 3-3. Structures chimiques de la LPBNH15 et de la LPBNF13

2.3. Présentation des résultats *in vitro*

Les études ont été menées sur des cellules corticales primaires exposées à différentes toxines. Les résultats, exprimés en pourcentage d'inhibition de mort cellulaire 24 h après ajout de la toxine et de la nitrone, sont reportés dans le tableau 3-1.^{6,7}

Les valeurs obtenues avec la LPBN et la TGPBN permettent d'affirmer que des nitrones de nature hydrophile, ne comportant pas de chaîne hydrophobe, ne sont pas de bons candidats à une protection optimale vis-à-vis d'un stress oxydant. Les valeurs de protection relativement limitées de la TGPBNAH confirment l'importance de la tête polaire lactobionolactone dans la haute activité de la LPBNAH. En effet, malgré la nature amphiphile de la TGPBNAH, cette nitrone à tête Tris n'induit pas une aussi bonne protection que la LPBNAH, notamment pour l'intoxication au peroxyde d'hydrogène et au peroxyde nitrite. Enfin, les valeurs concernant la LPBNAF et la LPBNF13 démontrent bien que les nitrones

amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée sont deux fois, voire trois fois, moins efficaces que leurs analogues à chaîne hydrogénée. Pour finir, les valeurs obtenues avec la LPBNAH et la LPBNH15 mettent parfaitement en évidence la supériorité anti-oxydante de ces deux nitrones amphiphiles à tête polaire lactobionolactone, à chaîne heptyle et à jonction amide.

Nitrones (10 μ M)	H ₂ O ₂ (200 μ M)	Peroxynitrite (200 μ M)	Doxorubicine (200 μ M)
PBN	25,0 \pm 0,9	20,6 \pm 0,7	24,2 \pm 0,7
LPBN	18,3 \pm 0,7	17,3 \pm 0,4	18,5 \pm 0,9
TGPBN	54,4 \pm 1,2	31,0 \pm 1,0	63,5 \pm 1,2
TGPBNAH	33,8 \pm 0,7	30,5 \pm 1,3	74,3 \pm 0,6
LPBNAH	81,0 \pm 1,0	61,0 \pm 1,3	82,0 \pm 1,3
LPBNAF	63,4 \pm 1,1	40,1 \pm 1,0	34,9 \pm 0,8
LPBNH15	93,0 \pm 1,1	90,1 \pm 1,9	93,0 \pm 0,7
LPBNF13	42,6 \pm 1,0	30,3 \pm 1,1	32,8 \pm 0,8

Tableau 3-1. Inhibition, par des dérivés amphiphiles de la PBN, de la mort cellulaire provoquée par différentes toxines sur des cultures de cellules corticales

2.4. Présentation des résultats *in vivo*

Ces excellents résultats obtenus avec la LPBNAH et la LPBNH15 *in vitro* ont été confirmés par des études *in vivo* réalisées sur un modèle animal très sensible au stress oxydant, le rotifère *Philodina*. En effet, l'administration de faibles doses (10 μ M) de LPBNH15 permet de maintenir en vie l'ensemble des rotifères intoxiqués par différentes toxines, tandis que l'administration de LPBNAH aux mêmes doses conduit à environ 20% de mortalité.^{7,8} De plus, le traitement quotidien à de faibles doses (5 μ M) par ces deux nitrones conduit à une augmentation de la durée de vie des rotifères en cultures, comme représenté sur la figure 3-4. Les courbes obtenues pour la LPBNAH (au centre) et pour la LPBNH15 (à droite) montrent effectivement que le taux de 100% de viabilité dépassent 20 jours pour la LPBNAH et 30 jours pour la LPBNH15 et que le taux de 50% de mortalité est repoussé dans le temps, atteignant les valeurs respectives de 35 et 45 jours pour la LPBNAH et son analogue inverse.

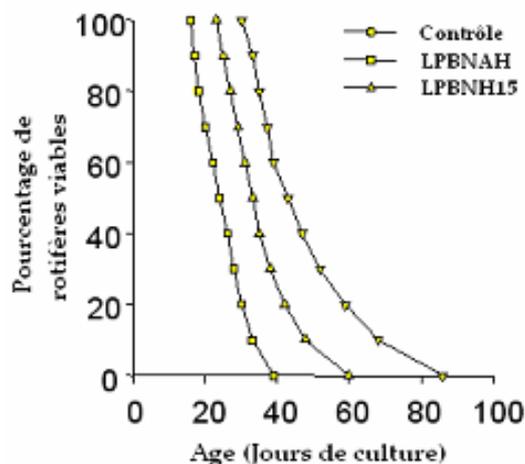


Figure 3-4. Activité anti-âge de la LPBNAH et de la LPBNH15

En conclusion, on peut donc affirmer que la modification et le contrôle de la BHL de la PBN est un paramètre essentiel à l'amélioration de son activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*. Cependant, le caractère amphiphile de ces dérivés de la PBN ne semble pas être le seul paramètre influant leur activité biologique puisque la LPBNH15, isomère de position de la LPBNAH et possédant de ce fait un même degré d'amphiphilie, s'est montrée plus efficace dans l'ensemble des expériences.

3. Présentation des nouveaux dérivés de la PBN

Au regard de ces excellents résultats, nous avons choisi de synthétiser de nouveaux analogues monocaténaires de la LPBNAH et de la LPBNH15, qui diffèrent soit par la nature de leurs constituants hydrophobes ou hydrophiles, soit par la nature plus ou moins amphiphile de leurs structures.

3.1. Les dérivés amphiphiles de la LPBNAH et de la LPBNH15 à motif cholestérol

Notre objectif s'est tout d'abord porté sur l'augmentation du caractère lipophile de la LPBNAH et de la LPBNH15, dans le but d'en faire de meilleurs agents neuroprotecteurs. Ainsi, comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre 1 de ce manuscrit (cf. Partie D, §2), afin de favoriser la localisation membranaire de certaines nitrones, de nombreux travaux ont été consacrés à l'introduction d'un caractère lipophile marqué sur ces molécules, tels que le greffage d'une ou deux longues chaînes alkyle,^{9,10,11,12} ou encore d'un motif cholestérol.¹³ C'est donc dans la perspective que la présence d'un groupement fortement lipophile leur apporterait une meilleure hydrophobie, et de ce fait une meilleure affinité membranaire, que nous avons développé deux nouvelles nitrones sur lesquelles la chaîne heptyle a été remplacée par un motif cholestérol. Ce dernier a été greffé sur la partie *tert*-butyle de la PBN pour

l'analogue de la LPBNAH, tandis que pour l'analogue de la LPBNH15 il a été placé sur la partie aromatique de la PBN, en para de la fonction nitrone (Figure 3-5).

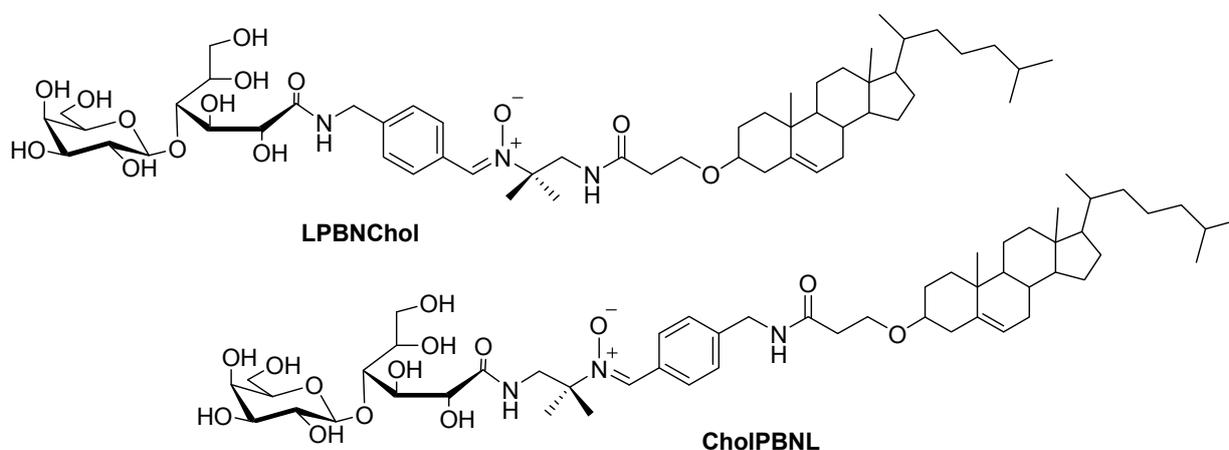


Figure 3-5. Structures chimiques de la LPBNChol et de la CholPBNL

3.2. Dérivés amphiphiles de la PBN à tête polaire Tris

Notre objectif s'est ensuite porté sur l'élaboration d'une série de nitrones à caractère plus ou moins amphiphile, avec pour préoccupation de limiter au maximum le nombre d'étapes nécessaires à la synthèse. Nous avons alors choisi de placer sur ces nitrones une tête polaire Tris, dont le dérivé nitro est commercial, et une partie aromatique, dérivée du benzaldéhyde, sur laquelle nous pouvons greffer par l'intermédiaire d'une liaison amide une chaîne hydrogénée de longueur comprise entre trois et neuf atomes de carbones. Ces synthèses, comprenant entre 1 et 5 étapes, nous ont ainsi aisément conduit à l'obtention de cinq nouvelles nitrones plus ou moins amphiphiles (Figure 3-6).

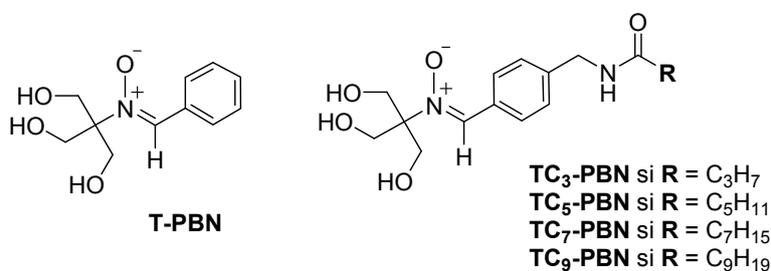


Figure 3-6. Structures chimiques de la série de nitrones à tête polaire Tris

3.3. Le dérivé amphiphile de la LPBNH15 à tête polaire glucose

Pour finir, notre objectif s'est porté sur l'élaboration d'une nitrone analogue de la LPBNH15 et de la TC₇-PBN à tête polaire glucose, dans le but de comparer l'influence de la nature de la tête polaire sur l'activité antioxydante de la nitrone amphiphile (Figure 3-7). Nous avons alors choisi de placer un motif glucose sur cette nouvelle nitrone amphiphile, nommée GluPBNH15, qui certes confère à la structure une tête polaire moins volumineuse, mais qui toutefois par sa nature glycosidique devrait lui conférer une bonne solubilité dans l'eau.

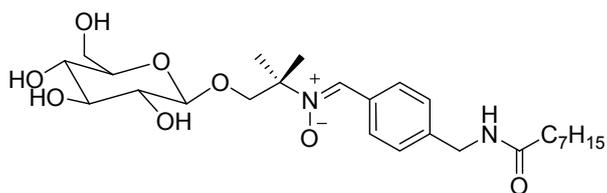


Figure 3-7. Structure chimique de la GluPBNH15

B. Synthèse des nouveaux transporteurs de la PBN

Dans cette partie, nous allons décrire la synthèse des différents analogues de la LPBNAH et de la LPBNH15 présentés précédemment.

1. Synthèse des dérivés lipophiles de la PBN à motif cholestérol

La stratégie de synthèse concernant l'obtention de ces deux nitrones lipophiles s'appuie sur la fonctionnalisation de deux composés commerciaux qui sont le 4-cyanobenzaldéhyde et le 2-méthyl-2-nitropropanol, dans le but d'obtenir des précurseurs de tête polaire et de partie apolaire, respectivement à fonction aldéhyde et hydroxylamine. Ces deux composantes sont ensuite couplées entre elles pour obtenir la fonction nitrone au cœur même de la structure amphiphile.

1.1. Synthèse de l'analogue de la LPBNAH à motif cholestérol

La synthèse convergente de cette première nitrone lipophile, à groupement cholestérol sur la partie *tert*-butyle de la PBN, s'effectue suivant trois parties qui sont :

- synthèse de l'hydroxylamine à motif cholestérol à partir du 2-méthyl-2-nitropropanol,

- synthèse de l'aldéhyde à motif lactobionolactone à partir du 4-cyanobenzaldéhyde,
- formation de la fonction nitrone par condensation de l'aldéhyde polaire avec l'hydroxylamine apolaire.

1.2.2. Synthèse du précurseur hydrophobe à fonction hydroxylamine

Notre première problématique a été de trouver un bras écarteur pouvant faire le lien entre la fonction alcool du cholestérol et la fonction amine présente sur la 2-méthyl-2-nitropropanamine, dont la synthèse développée au laboratoire sera succinctement rappelée sur le schéma 3-4. Les études présentées précédemment nous ont montré que les nitrones amphiphiles les plus actives sont celles possédant une jonction amide entre leur partie hydrophobe et la fonction nitrone. Nous avons donc choisi de greffer au cholestérol un bras écarteur possédant une fonction acide carboxylique à son extrémité, cette dernière permettant bien évidemment le greffage ultérieur de ce groupement hydrophobe sur la fonction amine par simple couplage peptidique.

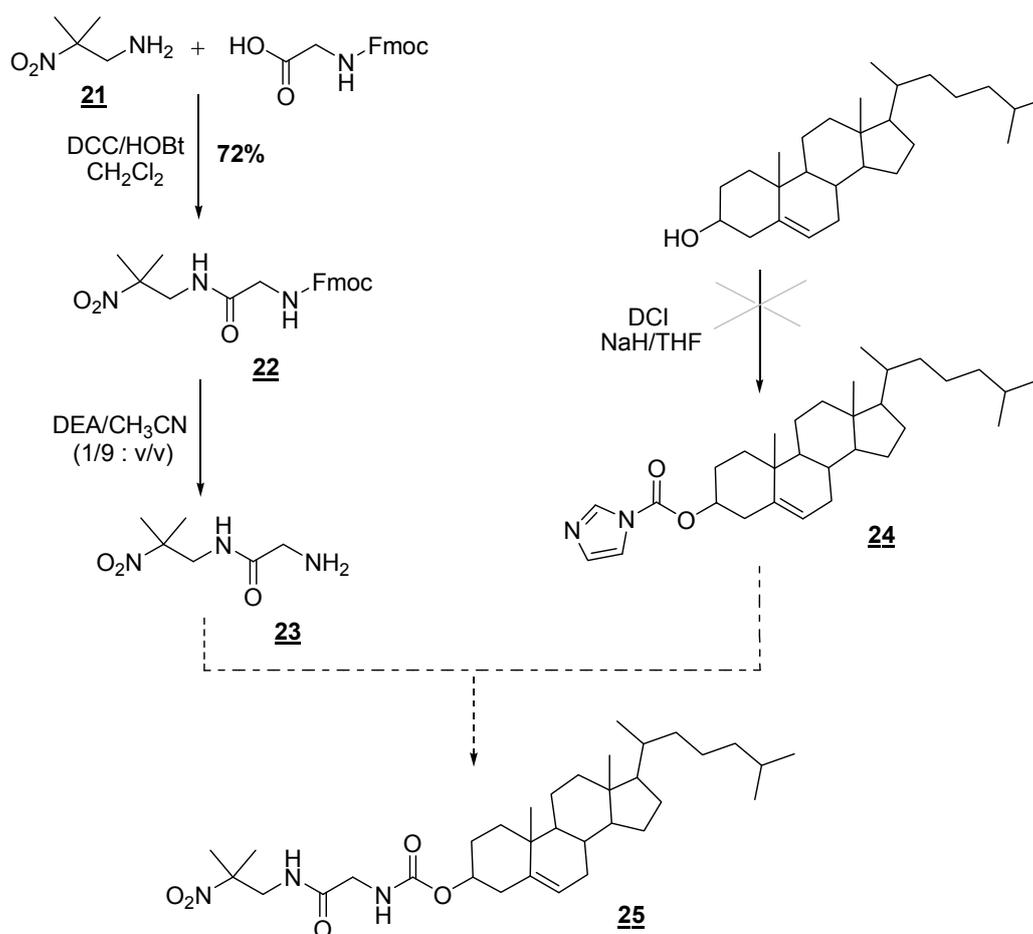


Schéma 3-1. Essai de fixation de la glycine sur le motif cholestérol

Dans un premier temps, nous avons envisagé de coupler la 2-nitro-2-méthylpropanamine sur le cholestérol par l'intermédiaire d'un bras écarteur de type glycine. La fonction amine de cette dernière permettrait en effet le greffage ultérieur du cholestérol par l'intermédiaire d'une liaison uréthane. La glycine dotée d'un groupement protecteur de type Fmoc sur sa fonction amine, est préalablement couplée sur la 2-méthyl-2-nitropropanamine **21** présence de DCC et d'HOBt dans du dichlorométhane et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice le composé **22** est obtenu avec 72% de rendement. Le groupement protecteur (Fmoc) de la glycine est ensuite hydrolysé en milieu basique par une solution de DEA à 10% dans l'acétonitrile pour conduire au composé **23** avec un rendement quantitatif. Parallèlement, afin d'introduire la liaison uréthane lors de l'addition du résidu glycine sur le cholestérol, nous avons essayé d'activer l'hydroxyle en position 3 de ce dernier sous forme d'intermédiaire carbonyl imidazole par action de la *N,N'*-carbonyl diimidazole (CDI) dans le THF, réaction déjà appliquée au laboratoire lors de la synthèse de différents tensioactifs.^{14,15} Malheureusement cette réaction n'a pas permis dans notre cas de synthétiser le composé **24** et par conséquent nous n'avons pu envisager obtenir par la suite le composé **25** (Schéma 3-1).

Comme tenu de cet échec, il nous a alors paru opportun d'utiliser l'hydroxyle en 3 comme groupement réactif et donc de renforcer son caractère nucléophile en le transformant en alcoolate en milieu basique, pour ensuite y greffer des réactifs possédant une fonction acide carboxylique libre ou protégée en bout de chaîne, apte à favoriser le greffage ultérieur de la 2-méthyl 2-nitropropanamine **21**.

Dans un premier temps, nous avons envisagé de substituer l'atome de brome présent sur l'acide α -bromo-acétique par le cholestérol (Schéma 3-2). Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir le composé **26**.

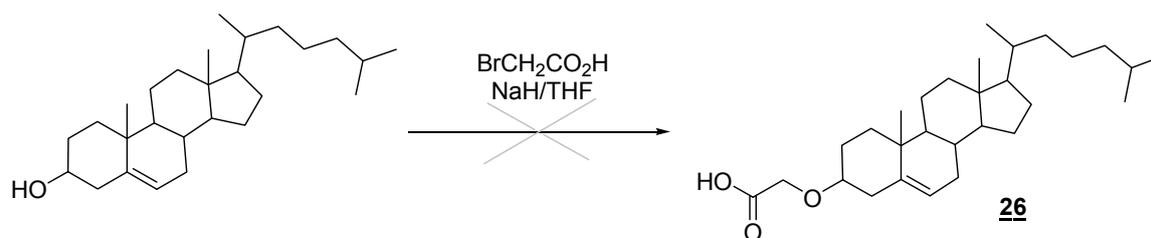


Schéma 3-2. Essai de couplage de l'alcoolate du cholestérol sur l'acide α -bromo-acétique

Partant de l'hypothèse que la fonction acide libre pourrait perturber cette réaction, nous avons alors utilisé le bromoacétate d'éthyle. Un produit de couplage a cette fois-ci pu être isolé avec un rendement de 70%. Néanmoins, nous nous sommes aperçu qu'il s'agissait du produit de transestérification de la fonction ester éthylique et non du produit de substitution du brome comme nous le souhaitions (Schéma 3-3).

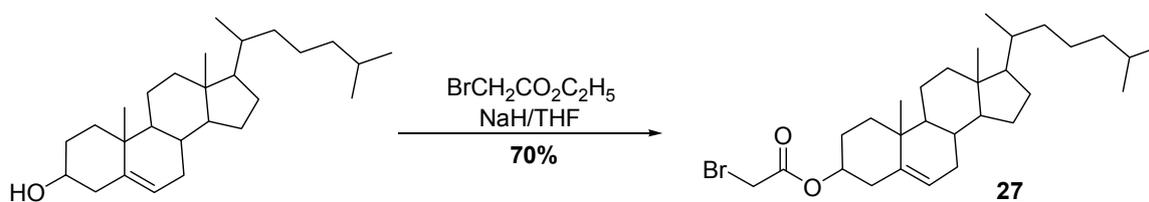


Schéma 3-3. Essai de couplage de l'alcoolate du cholestérol sur le bromoacétate d'éthyle

Cette réaction de transestérification est clairement mise en évidence sur le spectre RMN du ^1H du composé **27** (Figure 3-8). Nous pouvons noter la présence du singulet correspondant aux deux protons en α du brome à 3,84 ppm, mais l'absence du triplet correspondant au CH_3 (vers 1,31 ppm) du groupement éthyle ainsi que celle du quadruplet correspondant à son CH_2 (vers 4,24 ppm). Les autres signaux présents correspondent aux 45 protons du cholestérol.

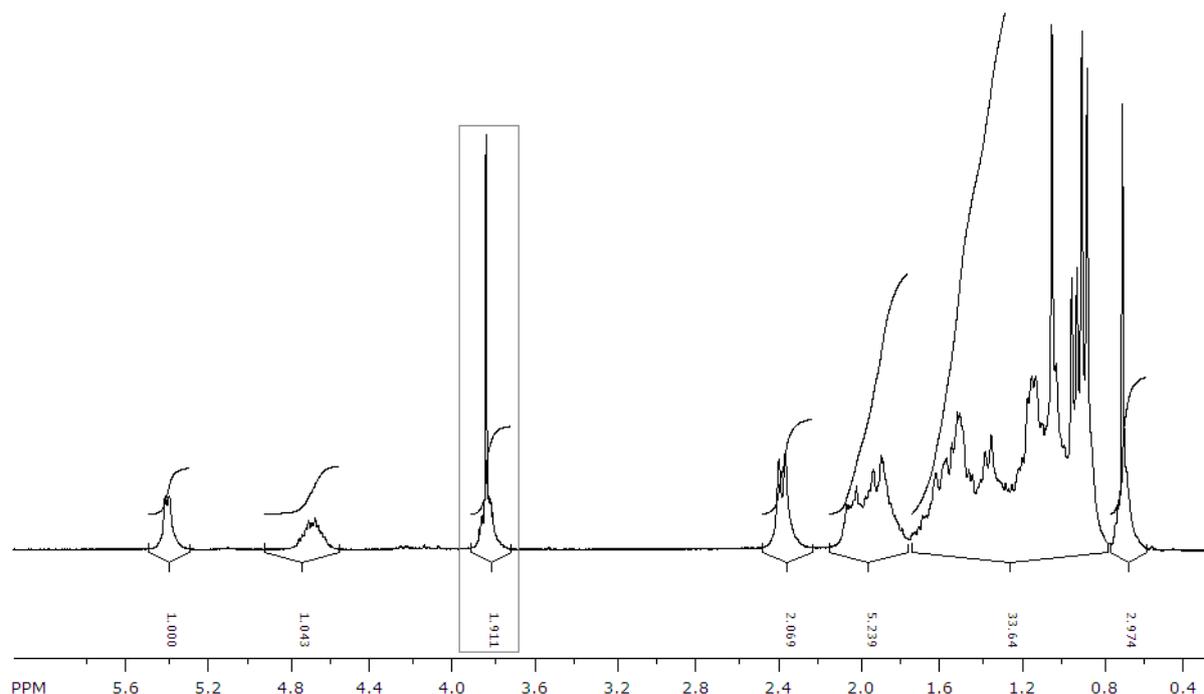


Figure 3-8. Spectre RMN du ^1H du composé **27**

Notre choix s'est alors porté sur l'utilisation de l'acrylate de *tert*-butyle. Dans ce cas, une réaction d'addition de type Michael de l'alcoolate sur le groupement acryloyle est attendue. Le cholestérol est mis en réaction avec l'acrylate de *tert*-butyle en présence de NaH dans du THF anhydre à température ambiante, et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice puis recristallisation le composé **28** est obtenu avec 72% de rendement (Schéma 3-4). Le groupement *tert*-butyl est par la suite clivé en milieu acide par une solution de TFA à 20% dans le dichlorométhane, et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **29** est obtenu avec 81% de rendement (Schéma 3-4).

Ce groupement cholestérol à fonction acide carboxylique se prête ainsi aisément à un greffage sur la fonction amine de la 2-méthyl-2-nitropropanamine, dont la synthèse rappelée sur le schéma 3-4 ne sera pas détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit, car préalablement décrite dans la littérature.³

Le résidu hydroxyle est tout d'abord activé par réaction avec le chlorure de tosyloxy dans un mélange dichlorométhane/pyridine à 0°C, puis après purification par recristallisation, le composé **30** est obtenu avec 80% de rendement. Ce bon groupement partant est alors substitué par un groupement azoture dans le DMF. La réaction a lieu sous activation par ultra-sons, afin d'augmenter la vitesse de la réaction, et conduit au composé **31** avec un rendement de 89%. La dernière étape nous permet enfin de réduire la fonction azoture en amine par la méthode de Staudinger. Le dérivé amine **21** ainsi obtenu avec 87% de rendement, peut être mis directement en réaction ou stocké sous forme de chlorure. L'acide 3-cholesteryl propanoïque **29** peut maintenant être greffé sur ce dérivé amine **21** en présence de DCC et d'HOBt dans du dichlorométhane. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **32** est obtenu avec 96% de rendement. La dernière étape de la synthèse de cette partie apolaire, consiste à réduire le groupement nitro en hydroxylamine selon un mode opératoire mis au point au laboratoire par Stéphanie Ortial durant sa thèse.⁸ Le dérivé nitro **32** est ainsi mis en présence de chlorure d'ammonium dans un mélange THF/H₂O (3/1 : v/v), dans lequel la proportion de THF est de 1,75 mL/mmol de dérivé nitro mis en jeu. Le mélange est ensuite refroidi à 0°C pendant l'ajout du zinc puis ramené doucement à température ambiante et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **33** est obtenu avec 40% de rendement. La formation de l'hydroxylamine reste une des étapes limitantes de cette synthèse convergente, nécessitant un bon contrôle de la température de réaction. En effet, cette dernière ne doit pas dépasser 15°C, au risque de voir

apparaître la formation d'un second dérivé organique plus polaire, qui pourrait correspondre à la réduction du groupement nitro en amine.

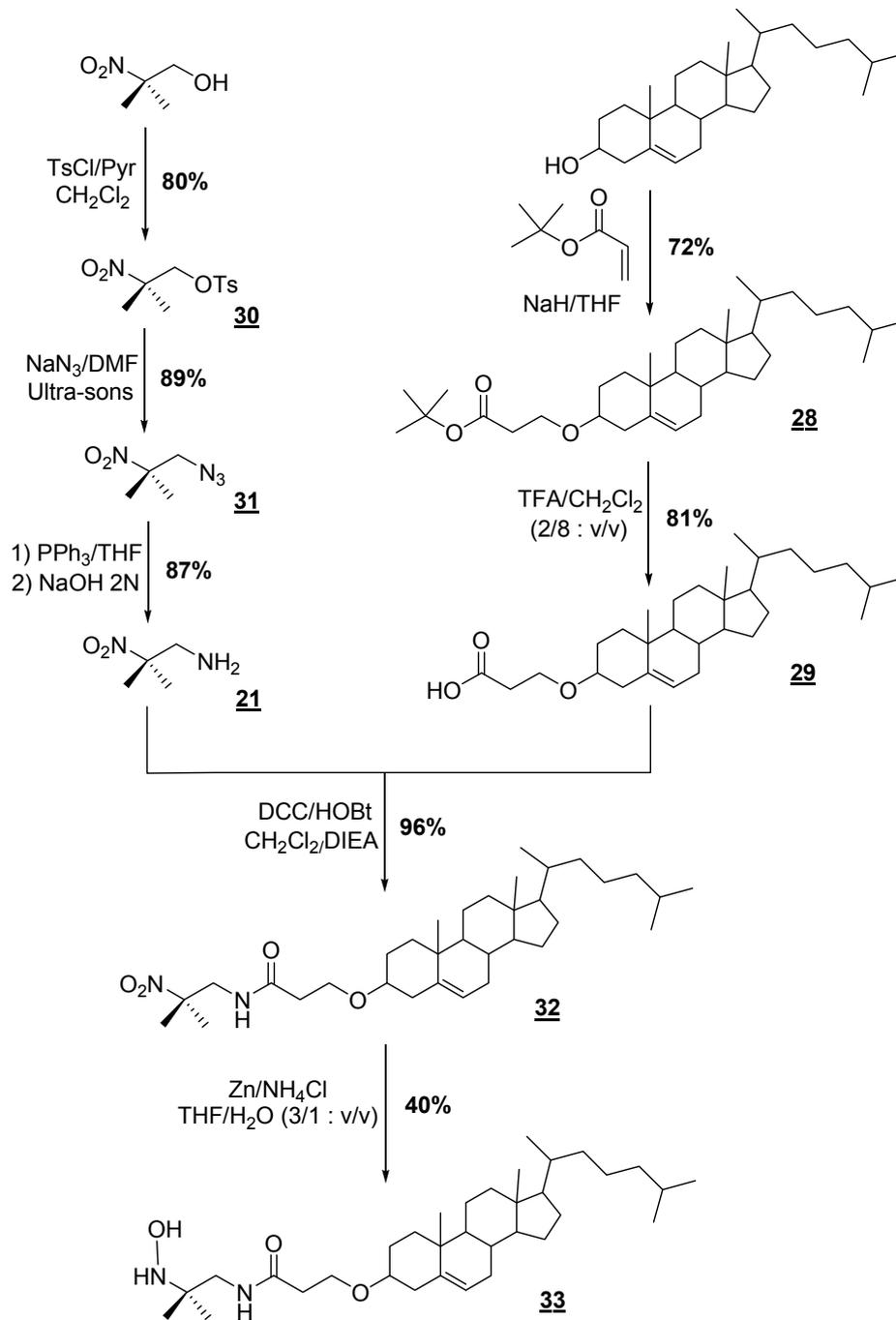


Schéma 3-4. Synthèse de l'hydroxylamine à motif cholestérol dérivée du 2-méthyl-2-nitropropanol

1.1.2. Synthèse du précurseur de la tête polaire à fonction aldéhyde

La synthèse de cette partie polaire ne sera pas détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit, car préalablement décrite dans la littérature.¹⁶ Nous avons toutefois tenu à résumer sa synthèse sur le schéma 3-5.

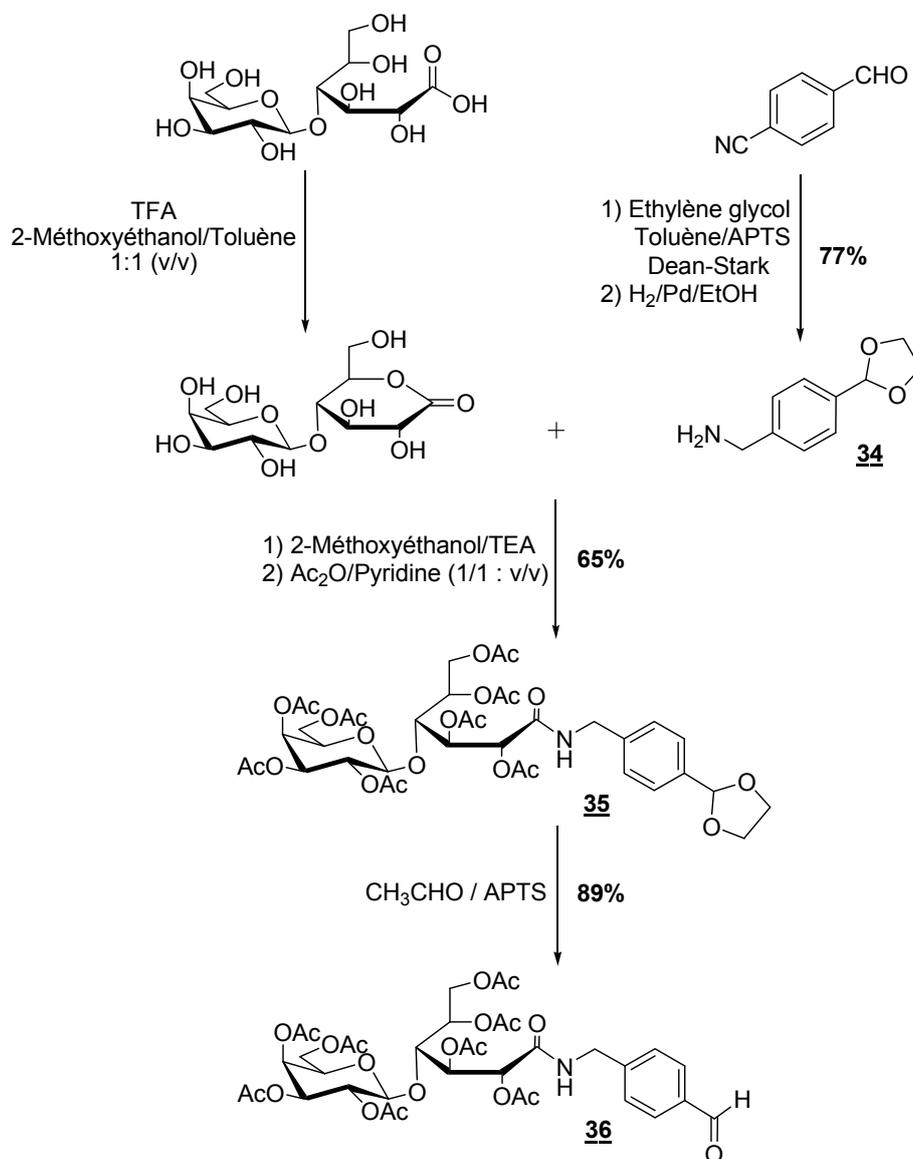


Schéma 3-5. Synthèse de l'aldéhyde à motif lactobionolactone dérivé du 4-cyanobenzaldéhyde

La protection sous forme d'acétal de la fonction carbonyle du 4-cyanobenzaldéhyde est effectuée dans le toluène en présence d'un excès d'éthylène glycol et d'APTS comme catalyseur acide. Contrairement à la procédure classique qui consiste à réduire le groupement nitrile en présence d'hydrure d'aluminium lithium dans le THF, nous avons procédé par hydrogénation catalytique dans l'éthanol en présence de palladium sur charbon. En effet, nous

avons trouvé que cette dernière réaction était plus simple et rapide à mettre en œuvre, tout en conduisant à des rendements en amine identiques. Ainsi, après réduction du groupement nitrile par hydrogénation catalytique sous pression, nous obtenons l'amine **34** correspondante avec 77% de rendement sur les deux étapes. Celle-ci est alors directement mise en réaction avec la lactobionolactone, fraîchement préparée, dans le 2-méthoxyéthanol en présence d'une quantité catalytique de TEA. Le produit de couplage obtenu est ensuite acétylé par un mélange anhydride acétique/pyridine (1/1) et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice le composé **35** est obtenu avec 65% de rendement sur les deux étapes. Enfin, le groupement dioxolane est clivé par transacétalisation dans des conditions douces avec un large excès d'acétaldéhyde, pour conduire à l'aldéhyde **36** avec 89% de rendement.

1.2.3 Synthèse de la fonction nitronne

Les composés de type hydroxylamine **33** et benzaldéhyde **36** sont mis en réaction dans un mélange THF/AcOH (3/2 : v/v) puis le milieu est chauffé à 60°C sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière (Schéma 3-6), l'avancement du couplage étant suivi par CCM.

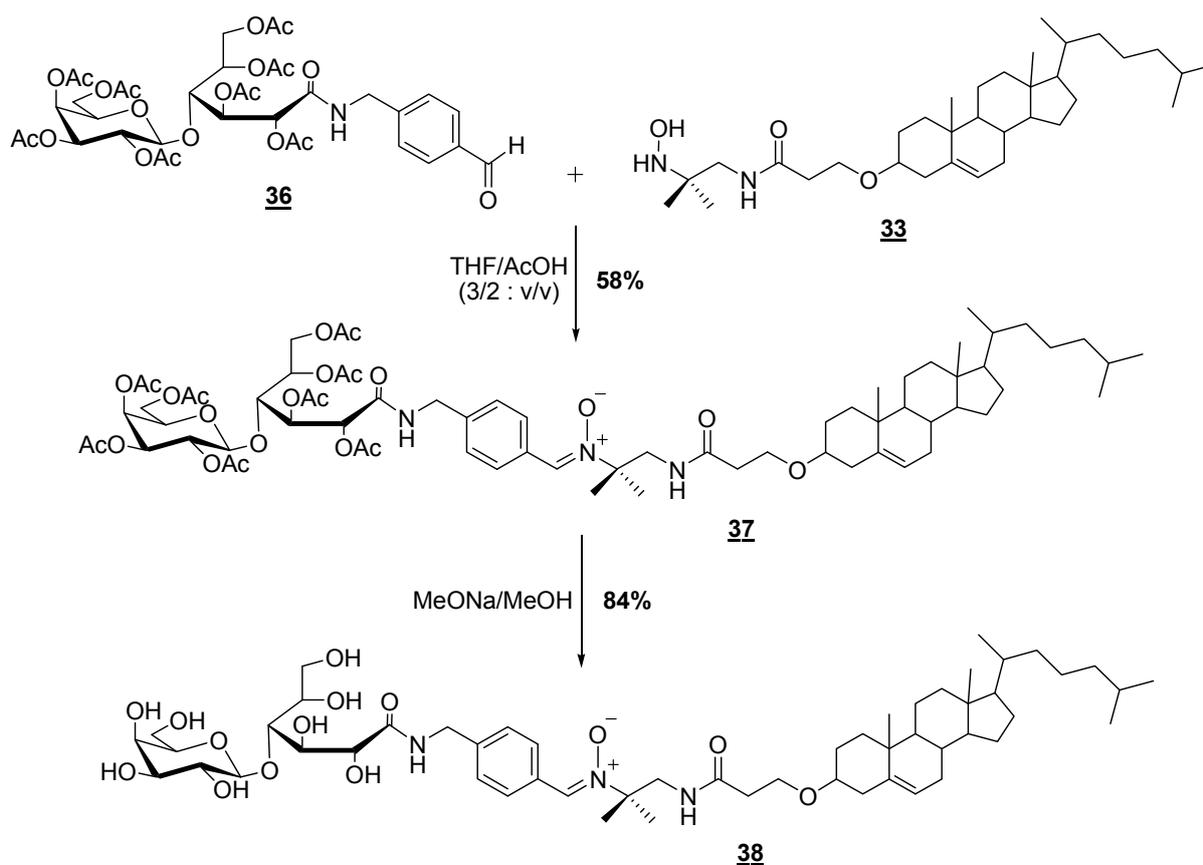


Schéma 3-6. Synthèse de la nitronne lipophile LPBNChol

Compte tenu de la fragilité de l'hydroxylamine il est nécessaire de procéder à des ajouts réguliers d'une quantité aliquote d'hydroxylamine. En effet, la formation de produits secondaires de type nitroso est généralement observée lors de la synthèse de nitrones par addition d'hydroxylamines sur un benzaldéhyde. De plus, il est important d'effectuer ce couplage en présence de tamis moléculaire, celui-ci permettant de piéger les molécules d'eau formées lors de cette réaction et par conséquent de déplacer l'équilibre dans le sens de la formation de la nitrone. Ainsi, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille, le dérivé acétylé **37** est obtenu avec un rendement de 58%.

En spectrométrie de masse, le spectre du composé **37** (Figure 3-9) présente le pic moléculaire à $m/z = 1338,6$ $[(M+H)^+]$ ainsi que les signaux des adduits avec l'ammonium à $m/z = 1355,7$ $[(M+NH_4)^+]$, le sodium à $m/z = 1360,6$ $[(M+Na)^+]$ et le potassium à $m/z = 1376,6$ $[(M+K)^+]$.

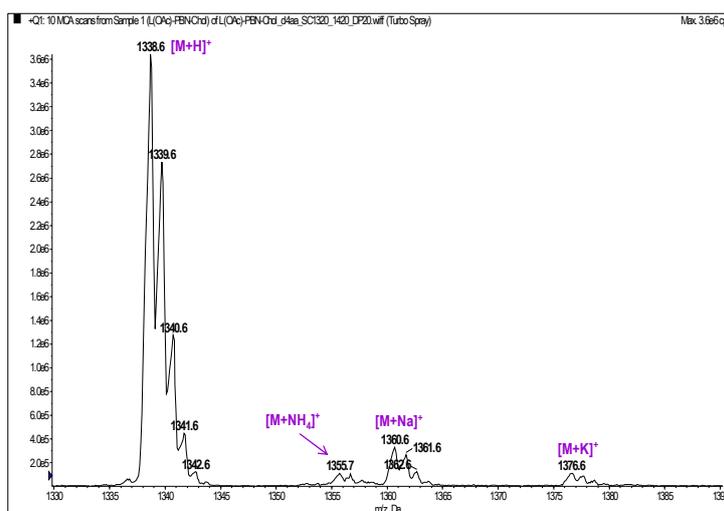


Figure 3-9. Spectre de masse en mode électrospray positif du composé **37**

En RMN, le spectre proton du composé **37** (Figure 3-10), nous montre la présence des quatre protons aromatiques de la PBN entre 8,2 et 7,2 ppm ainsi que celle du proton en α de la fonction nitrone à 7,50 ppm. Les protons du groupement lactobionyle apparaissent entre 5,8 et 3,6 ppm, tandis que ceux du groupe cholestérol sont présents entre 3,4 et 0,6 ppm à l'exception du proton de la double liaison à 5,6 ppm sous forme de doublet.

L'étude du spectre RMN du ^{13}C du composé **37** (Figure 3-10), confirme également la présence de toutes ces composantes.

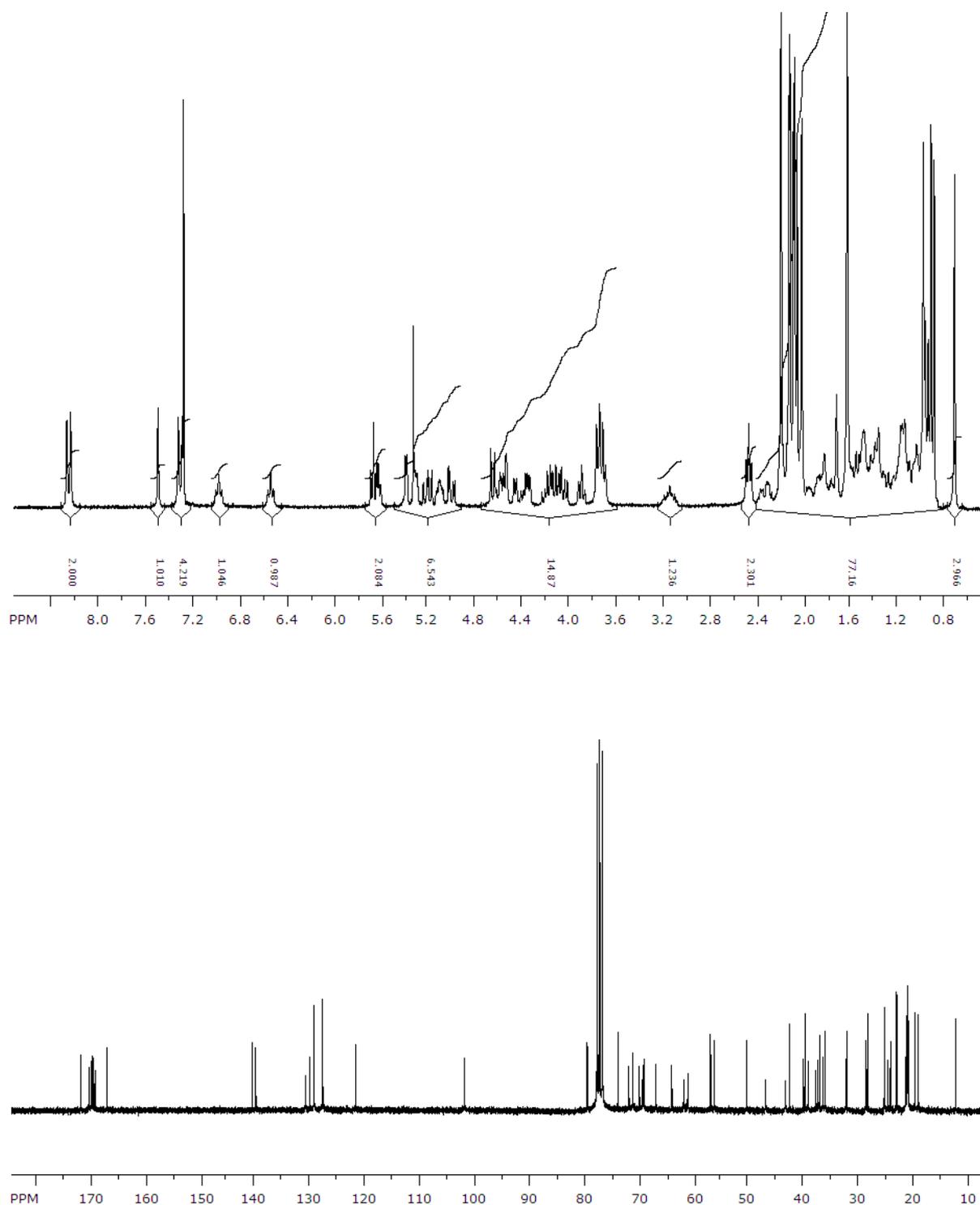


Figure 3-10. Spectres RMN du ^1H (en haut) et du ^{13}C (en bas) de la LPBNChol acétylée dans le CDCl_3

La dernière étape de cette synthèse consiste donc en la déprotection des fonctions hydroxyles de la tête polaire de la nitrone **37**. Ainsi, après transestérification selon la méthode de Zemplén et purification par chromatographie d'exclusion de taille, la nitrone LPBNChol **38**, est obtenu avec 84% de rendement (Schéma 3-6).

Une fois sa structure parfaitement caractérisée par RMN et par spectrométrie de masse, sa pureté a pu être évaluée par CLHP en phase inverse à 300 nm. Le chromatogramme de la LPBNChol (Figure 3-11), montre la très bonne pureté de cette première nitrone lipophile.

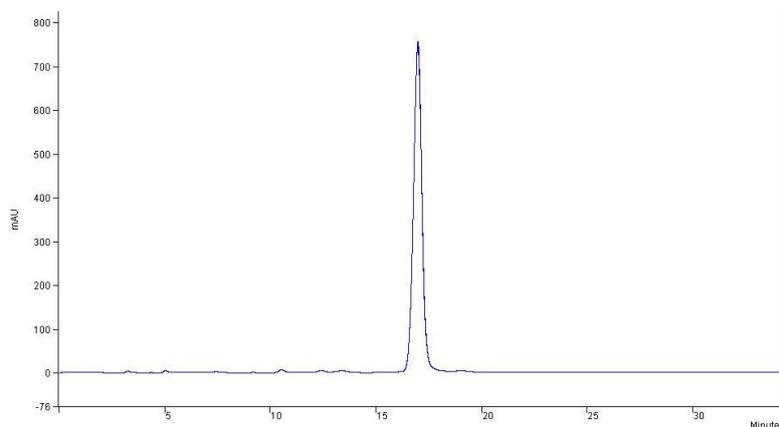


Figure 3-11. Chromatogramme CLHP de la LPBNChol à 300 nm
(Débit : 0,8 mL/min, Eluant : MeOH/H₂O 95/5)

1.3. Synthèse de l'analogue de la LPBNH15 à motif cholestérol

La synthèse convergente de cette seconde nitrone lipophile, comportant quant à elle le groupement cholestérol sur la partie aromatique de la PBN, s'effectue également en trois parties distinctes qui sont :

- synthèse de l'hydroxylamine à motif lactobionolactone à partir du 2-méthyl-2-nitropropanol,
- synthèse de l'aldéhyde à motif cholestérol à partir du 4-cyanobenzaldéhyde,
- formation de la fonction nitrone par condensation de l'aldéhyde apolaire avec l'hydroxylamine polaire.

1.3.1. Synthèse du précurseur de la tête polaire à fonction hydroxylamine

La synthèse de cette partie polaire, déjà décrite dans la littérature,¹⁷ ne sera pas détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit mais nous avons toutefois tenu à la rappeler sur le schéma 3-7.

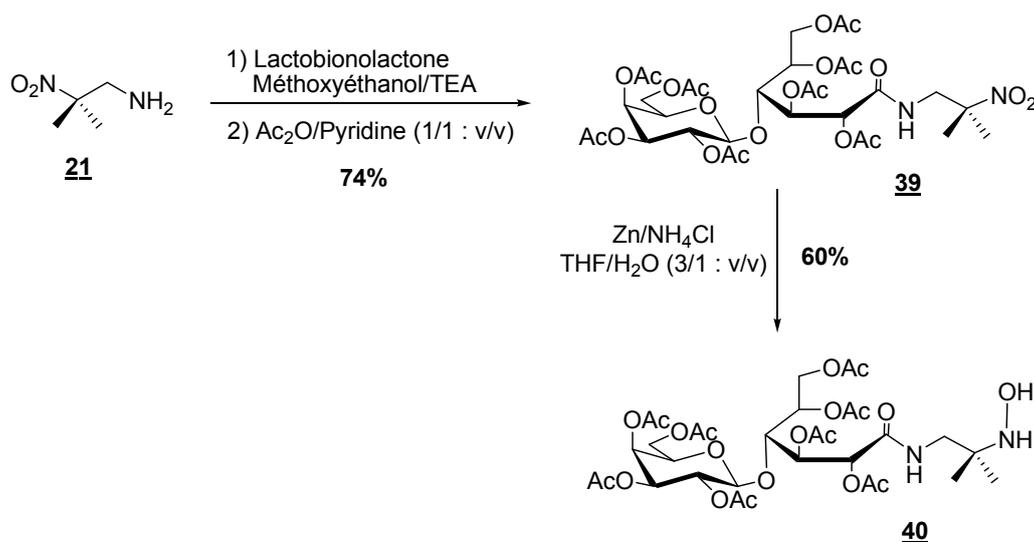


Schéma 3-7. Synthèse de l'hydroxylamine à motif lactobionolactone dérivée du 2-méthyl-2-nitropropanol

De manière identique, la lactobionolactone fraîchement préparée est mise en réaction à 80°C avec la 2-méthyl-2-nitropropanamine **21** dans le 2-méthoxyéthanol en présence de TEA. Après acétylation des groupements hydroxyles et purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **39** est obtenu avec 74% de rendement. Le dérivé nitro est alors réduit en hydroxylamine par réaction avec le zinc et le chlorure d'ammonium dans un mélange THF/H₂O pour conduire, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, au composé **40** avec 60% de rendement (Schéma 3-7).

1.3.2. Synthèse du précurseur hydrophobe à fonction aldéhyde

La synthèse de cette partie apolaire, consiste à insérer le dérivé acide carboxylique **29** porteur du motif cholestérol sur la benzylamine **34** par l'intermédiaire d'une jonction amide (Schéma 3-8).

Par conséquent, l'acide 3-cholestéryl propanoïque **29** est à nouveau activé par réaction avec la DCC et le HOBt dans du dichlorométhane anhydre puis l'amine **34** est ajoutée au milieu. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **41** est obtenu avec 72% de rendement. Le groupement dioxolane est ensuite hydrolysé en milieu acide par un mélange AcOH/H₂O (7/3 v/v) et après purification par chromatographie sur gel de silice, le dérivé aldéhyde **42** est obtenu avec 92% de rendement (Schéma 3-8).

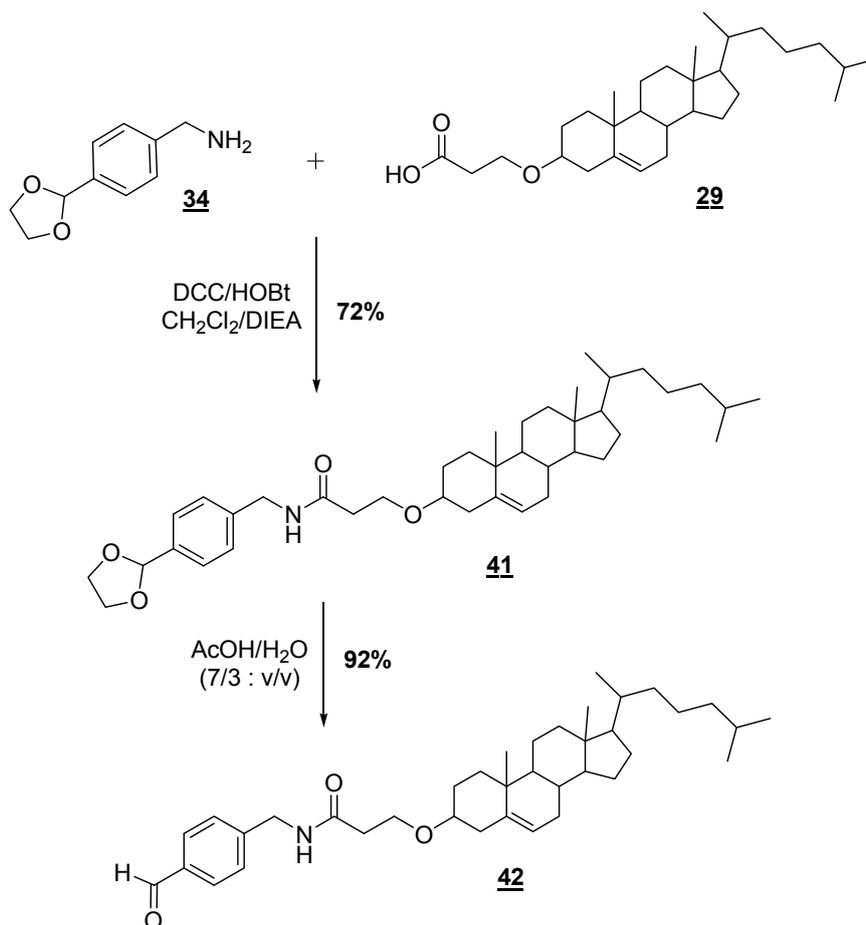


Schéma 3-8. Synthèse de l'aldéhyde à motif cholestérol dérivé du 4-cyanobenzaldéhyde

1.3.3. Synthèse de la fonction nitrone

L'hydroxylamine **40** et l'aldéhyde **42** sont mis en réaction dans un mélange THF/AcOH (3/2 : v/v), sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière (Schéma 3-9). Le milieu réactionnel est chauffé durant 10 heures à 60°C et l'ajout régulier d'hydroxylamine (0,2 eq toutes les 3 heures) permet ici une consommation quasi-totale de l'aldéhyde conduisant à la formation de la fonction nitrone avec un rendement supérieur à celui obtenu lors de la synthèse de la LPBNChol. En effet, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille, la nitrone **39** est obtenue avec 82% de rendement (Schéma 3-9).

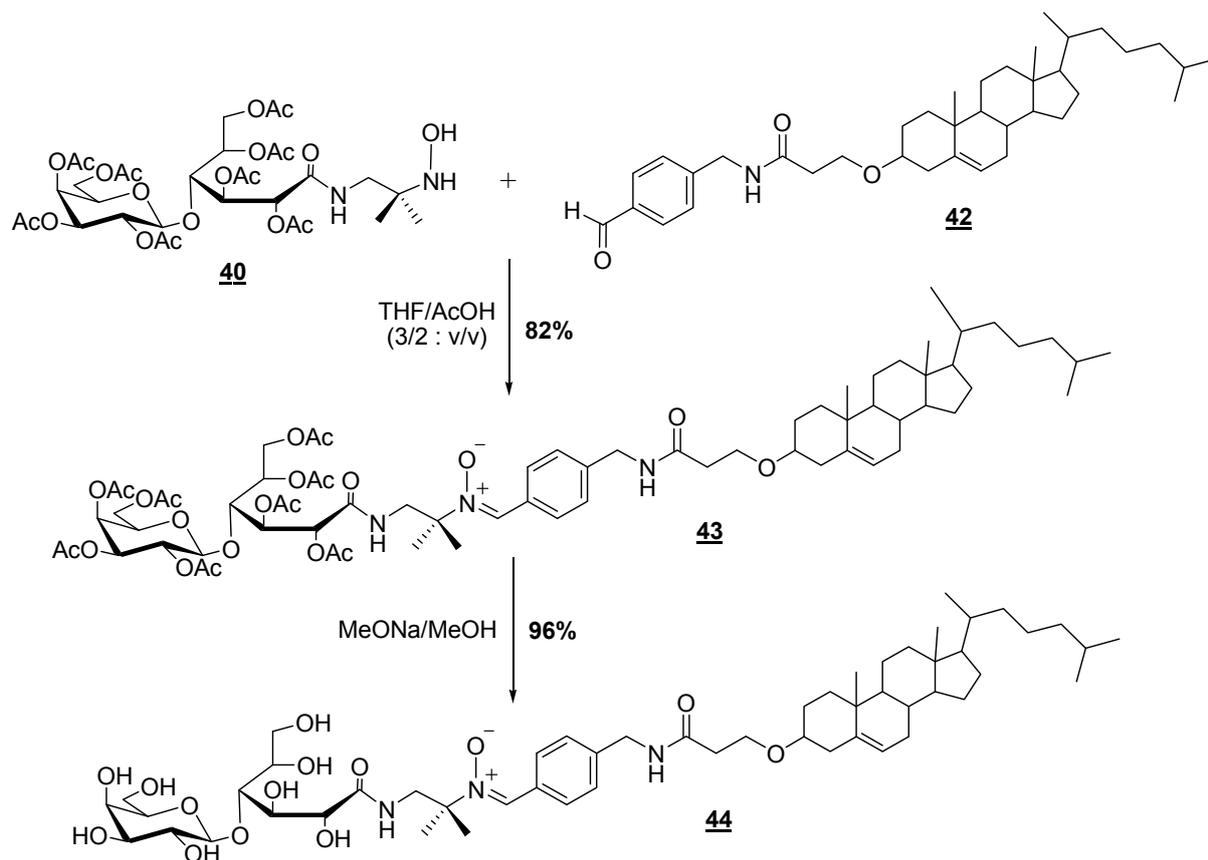


Schéma 3-9. Synthèse de la seconde nitrone lipophile : la CholPBNL

En spectrométrie de masse, le spectre du composé **43** (Figure 3-12) présente le pic moléculaire à $m/z = 1338,6$ $[(M+H)^+]$ ainsi que les signaux des adduits avec l'ammonium à $m/z = 1355,7$ $[(M+NH_4)^+]$, le sodium à $m/z = 1360,6$ $[(M+Na)^+]$ et le potassium à $m/z = 1376,6$ $[(M+K)^+]$.

De plus en RMN, les spectres proton et carbone du composé **43** confirme bien la présence de la fonction nitrone, ainsi que celles de la lactobionolactone et du motif cholestérol.

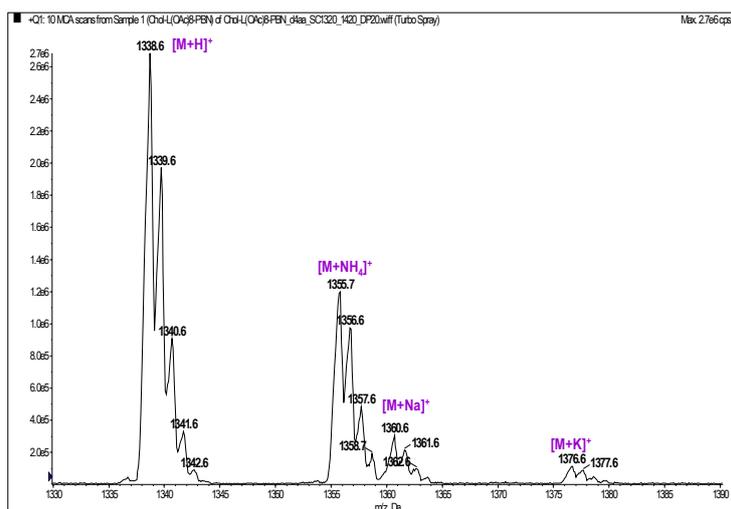


Figure 3-12. Spectre de masse en mode electrospray positif du composé **43**

Le clivage des résidus acétyle est ensuite réalisé par réaction de transestérification en milieu basique et après purification par chromatographie d'exclusion de taille, la nitrone CholPBNL **44**, est obtenue avec 96 % de rendement.

Après caractérisation par RMN et par spectrométrie de masse de cette seconde nitrone lipophile, sa pureté a également pu être évaluée par CLHP en phase inverse à la longueur d'onde de 300 nm. Le chromatogramme de la CholPBNL (Figure 3-13), montre sa très bonne pureté.

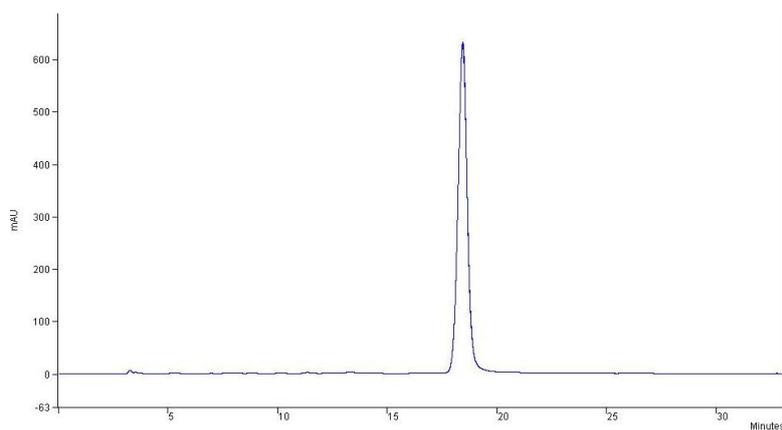


Figure 3-13. Chromatogramme CLHP de la CholPBNL à 300 nm
(Débit : 0,8 mL/min, Eluant : MeOH/H₂O 95/5)

Nous avons ainsi obtenu deux nitrones lipophiles à motif cholestérol, la LPBNChol et la CholPBNL, selon des stratégies de synthèse convergentes relativement faciles à mettre en œuvre.

2. Synthèse des dérivés amphiphiles de la PBN à tête polaire Tris

La stratégie de synthèse de cette série de nitrones à tête polaire Tris est divisée en deux parties qui sont :

- la synthèse des différents aldéhydes à chaînes hydrogénées à partir du 4-cyanobenzaldéhyde,
- la formation de la fonction nitrone par condensation du dérivé nitro à motif Tris sur les différents aldéhydes apolaires.

2.1. Synthèse des précurseurs hydrophobes à fonction aldéhyde

La synthèse de ces parties apolaires, consiste à insérer les différentes chaînes hydrogénées sur la (4-(1,3-dioxolan-2-yl)phenyl)methanamine **34** par l'intermédiaire d'une jonction amide (Schéma 3-10).

Les acides butanoïque, hexanoïque, octanoïque et pentanoïque sont préalablement activé en présence de DCC/HOBt dans du dichlorométhane anhydre, puis, après simple filtration du milieu réactionnel sur fritté les esters actifs correspondants sont directement mis en réaction avec l'amine **34** dans du dichlorométhane anhydre. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, les composés **45** à **48** sont obtenus respectivement avec des rendements de 58 à 70% sur les deux étapes. Les groupements dioxolane sont ensuite clivés en milieu acide par un mélange AcOH/H₂O (7/3 : v/v) et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, les dérivés aldéhydes **49** à **52** sont obtenus quantitativement (Schéma 3-10).

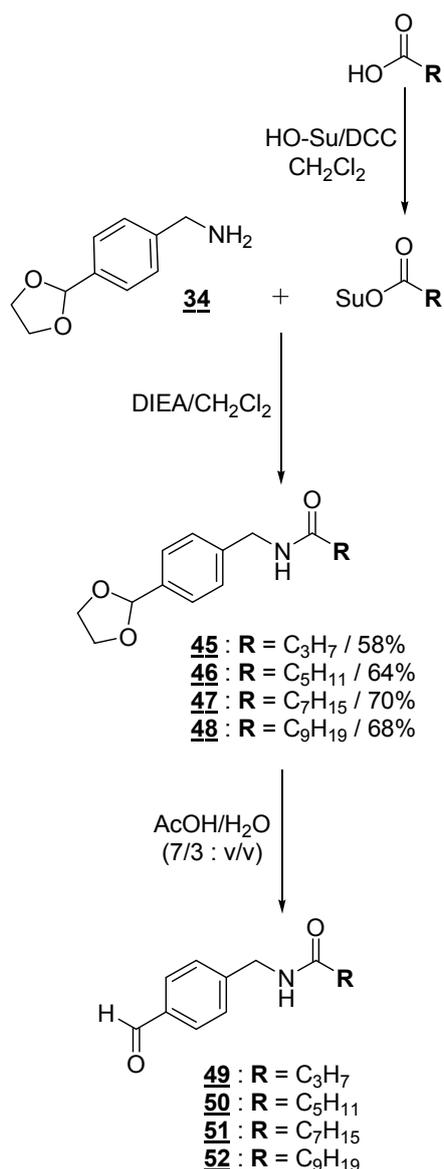


Schéma 3-10. Synthèse des aldéhydes à chaîne hydrogénée variable dérivés du 4-cyanobenzaldéhyde

2.2. Synthèse des fonctions nitrones

La voie habituellement choisie au laboratoire pour la synthèse de la fonction nitro, consiste à réduire un groupement nitro en hydroxylamine afin de condenser ensuite cette dernière sur une fonction aldéhyde. Cependant, d'une part la réaction de formation de l'hydroxylamine est délicate, ne donnant pas toujours des rendements très satisfaisants, et d'autre part le couplage de celle-ci sur la fonction aldéhyde est de même une réaction qui nécessite beaucoup de précautions.

Dans ces conditions, nous avons voulu explorer deux autres voies de synthèse, déjà répertoriées à de nombreuses reprises dans la littérature, afin de simplifier la formation de la

fonction nitrone. Les divers essais ont été réalisés avec des produits commerciaux, le benzaldéhyde et le tris(hydroxyméthyl)-nitrométhane, qui permettent de former la nitrone à tête polaire Tris et dépourvue de chaîne hydrogénée, nommée T-PBN.

2.2.1. Première voie de synthèse de la T-PBN

Nous avons commencé par utiliser une voie de synthèse fréquemment employée dans la littérature et plus précisément dans les travaux de Bernotas *et al.*^{18,19,20} Cette dernière consiste à former en premier lieu une imine, qui est par la suite réduite en amine secondaire oxydable en nitrone. Selon ce mode opératoire, différents tests de mise au point ont été effectués sur les deux dernières étapes de cette synthèse (Schéma 3-11).

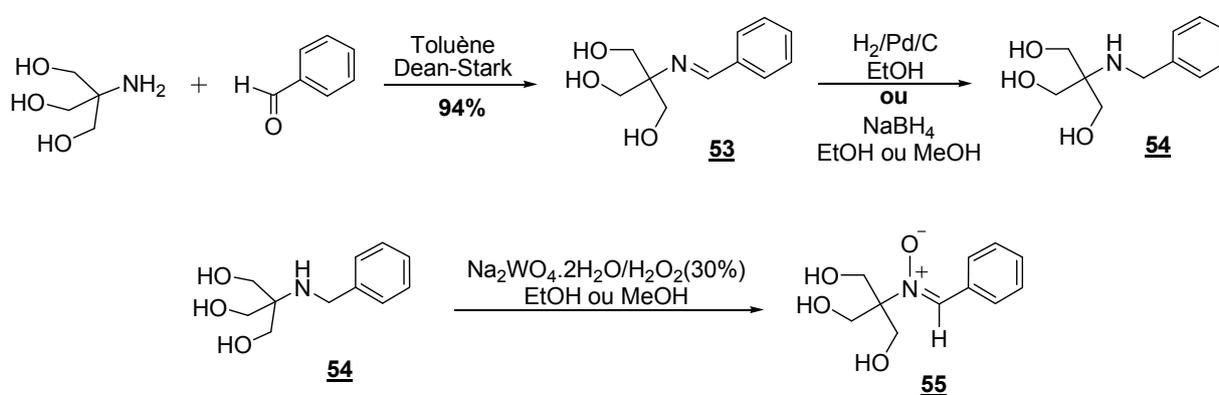


Schéma 3-11. Synthèse de la T-PBN en trois étapes successives

Dans un premier temps, un léger excès (1,2 eq) de Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane est mis en réaction avec le benzaldéhyde dans du toluène, à l'intérieur d'un montage dean-stark chauffé à reflux durant toute une nuit. Ce montage permet de déplacer aisément la réaction dans le sens de la formation de l'imine en éliminant les molécules d'eau formées au fur et à mesure du couplage de l'amine sur l'aldéhyde. Le milieu réactionnel est ensuite filtré et après évaporation du solvant l'imine **53** est obtenue avec 94% de rendement (Schéma 3-11). Un premier essai de purification de cette imine par chromatographie sur colonne de gel de silice nous a conduit à une dégradation partielle de l'imine, et dans ces conditions, il nous a paru plus judicieux d'utiliser directement le brut réactionnel, présentant un degré de pureté acceptable, pour poursuivre la séquence réactionnelle.

L'imine obtenue est ensuite réduite en amine secondaire par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C dans l'éthanol ou par réduction avec le borohydrure de sodium, soit dans le méthanol soit dans l'éthanol (Tableau 3-2).

Conditions opératoires	Solvant	Rendement
H ₂ /Pd/C	EtOH	72%
NaBH ₄	MeOH	34%
NaBH ₄	EtOH	28%

Tableau 3-2. Essais de réduction de l'imine **53** en amine secondaire **54**

La synthèse de l'amine **54** s'effectue dans les deux cas en moins de quatre heures, mais l'hydrogénation catalytique se révèle nettement plus performante, c'est donc une hydrogénation catalytique dans l'éthanol qui sera réalisée pour la suite de la synthèse.

L'amine secondaire **54** est ensuite oxydée en présence d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% et d'une quantité catalytique de tungstate de sodium dans de l'éthanol anhydre. Les différents essais réalisés se différencient soit par la quantité de peroxyde d'hydrogène mise en jeu soit par la température à laquelle on ajoute les réactifs à l'amine **54** préalablement dissoute dans l'éthanol (Tableau 3-3).

Nombre d'équivalent de H ₂ O ₂ par rapport à l'amine secondaire	Température au début de la réaction	Rendements
2	ambiante	28%
2	0°C	36%
3	0°C	28%
4	0°C	20%

Tableau 3-3. Essais d'oxydation de l'amine secondaire **54** en T-PBN

La formation de la fonction nitrone s'effectue dans tous les cas en moins de trois heures, cependant il paraît préférable de placer l'amine secondaire **54** dans le l'éthanol à 0°C, avant d'y ajouter seulement 2 équivalents de solution de peroxyde d'hydrogène à 30% et une quantité catalytique de tungstate de sodium. Le milieu est ensuite abandonné et la réaction se poursuit à température ambiante. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, la nitrone T-PBN **55**, est obtenue avec 36% de rendement (Schéma 3-11).

En conclusion, malgré les différents essais que nous avons réalisé pour améliorer cette première voie de synthèse, la T-PBN est obtenue en trois étapes avec au mieux un rendement global de 27%.

2.2.2. Deuxième voie de synthèse de la T-PBN

En vue de ce premier résultat peu satisfaisant, nous avons tenté d'accéder à la T-PBN par condensation directe du benzaldéhyde et du Tris-(hydroxyméthyl)-nitrométhane, cette réaction devant conduire en une seule étape à la nitrone recherchée. Les travaux de Gautheron-Chapoulaud *et al.*²¹ ont en effet démontré que la réduction *in situ* par le Zinc de dérivés nitro en présence de dérivés aldéhydes, est une méthode directe et très efficace pour former une large gamme de nitrones. En fonction de la nature de l'aldéhyde et du dérivé nitro mis en jeu, il est possible de préparer des nitrones à la fois aromatiques, aliphatiques mais également de nature glucidique. Cette méthode de réduction-condensation « one-pot » présente par conséquent de nombreux avantages qui sont :

- la large gamme de dérivés nitro commerciaux ou facilement synthétisables pouvant être utilisés,
- la large gamme d'aldéhydes polyfonctionnels pouvant être utilisés,
- la préparation aisée de nitrones en grande quantité (50 mmol).

Par conséquent deux équivalents de Tris-(hydroxyméthyl)-nitrométhane sont mis en réaction avec un équivalent de benzaldéhyde dans de l'éthanol anhydre, en présence de six équivalents d'acide acétique. Le mélange est ensuite refroidi à 0°C et quatre équivalents de Zinc sont alors délicatement ajoutés. Une fois l'addition terminée, le milieu est ramené lentement à température ambiante puis chauffé à 60°C durant 20 heures. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie de deux recristallisations successives, la nitrone T-PBN **55**, est obtenue avec 72% de rendement (Schéma 3-12).

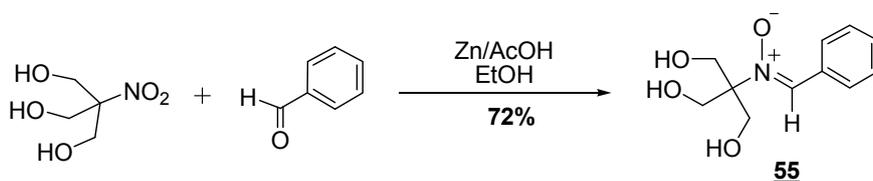


Schéma 3-12. Synthèse de la T-PBN par couplage « one-pot »

Nous pouvons constater que contrairement à la première voie de synthèse explorée, ce couplage « one-pot » permet de former la fonction nitrone en une seule étape et avec un rendement très satisfaisant. Nous avons par conséquent conservé ce mode opératoire pour la formation des différentes nitrones à tête polaire Tris et à chaîne hydrophobe.

2.2.3. Synthèse des nitrones à longueur de chaîne variable

De manière identique, deux équivalents de Tris-(hydroxyméthyl)-nitrométhane sont mis en réaction avec l'un des quatre aldéhydes hydrophobes dans de l'éthanol anhydre, en présence de six équivalents d'acide acétique. Les mélanges sont ensuite refroidis à 0°C pendant l'ajout des quatre équivalents de Zinc, ramenés lentement à température ambiante une fois l'addition terminée puis chauffés à 60°C durant 20 heures. Ainsi, après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie de deux recristallisations successives, les nitrones TC₃-PBN **56**, TC₅-PBN **57**, TC₇-PBN **58** et TC₉-PBN **59**, sont obtenues respectivement avec des rendements de 64 à 72% (Schéma 3-13).

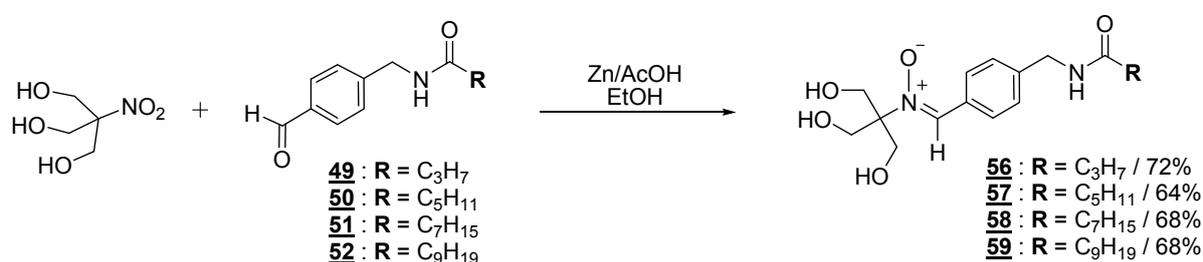


Schéma 3-13. Synthèse de la TC₃-PBN, de la TC₅-PBN, de la TC₇-PBN et de la TC₉-PBN

Les structures de chacune de ces cinq nitrones ont bien évidemment été confirmées par étude complète en RMN ainsi que par analyse en spectrométrie de masse. Leurs puretés ont ensuite été évaluées par CLHP en phase inverse à la longueur d'onde de 300 nm.

Nous avons ainsi obtenu une nouvelle série de nitrones dérivées de la PBN à tête polaire Tris par une voie synthétique courte, permettant d'obtenir la nitrone T-PBN en une seule étape avec un rendement de 72% ainsi que quatre nitrones amphiphiles en seulement 4 étapes et avec des rendements globaux de 42 à 48%.

3. Synthèse de l'analogue de la LPBNH15 à tête polaire Glucose

La synthèse convergente de cette nitrone amphiphile, comportant une tête polaire glucose sur la partie *tert*-butyle de la PBN et une chaîne heptyle sur sa partie aromatique, est réalisée en trois parties distinctes qui sont :

- la synthèse du dérivé nitro à motif glucose à partir du 2-méthyl-2-nitropropanol,
- la synthèse de l'aldéhyde à chaîne heptyle à partir du 4-cyanobenzaldéhyde,
- la formation de la fonction nitrone par condensation de ces deux précurseurs.

3.1. Synthèse du précurseur de la tête polaire glucose

Nous avons choisi de réaliser la réaction de glycosylation suivant la procédure d'Helferich classiquement utilisée au laboratoire en présence d'acétobromoglucose et de cyanure de mercure. La préparation de l'acétobromoglucose décrite dans la littérature²² ne sera donc pas détaillée dans la partie expérimentale de ce manuscrit mais est succinctement rappelée dans le schéma 3-14.

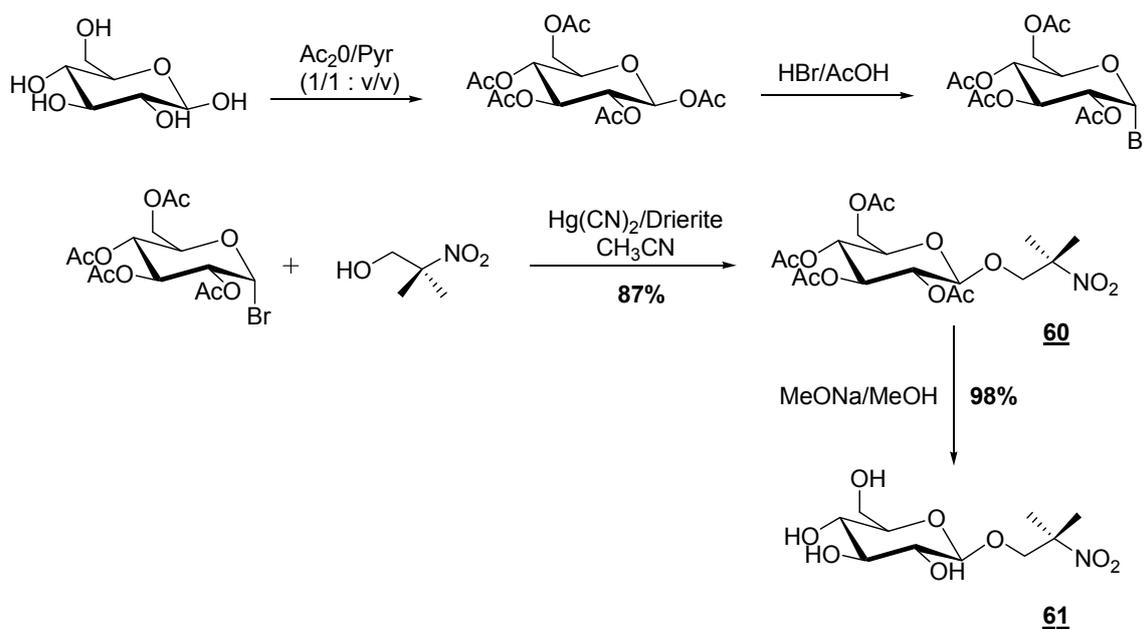


Schéma 3-14. Synthèse du dérivé nitro à motif glucose dérivé du 2-méthyl-2-nitropropanol

La glycosylation du 2-méthyl-2-nitropropanol suivant la procédure d'Helferich²³ est réalisée dans l'acétonitrile anhydre en présence de drierite. Après six heures d'agitation à température ambiante et purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **60** est obtenu avec 87 % de rendement. Les fonctions hydroxyles du glucose sont

alors régénérées par transestérification de Zemplén en présence de méthanolate de sodium dans le méthanol, pour conduire au composé **61** de façon quantitative (Schéma 3-14).

3.2. Synthèse de la fonction nitrone

Pour la formation de cette nitrone glycosidique, nous avons trouvé judicieux de reprendre les conditions du couplage « one-pot » mises au point précédemment pour la série de nitrones à tête polaire Tris. C'est ainsi que deux équivalents du dérivé nitro à motif glucose **61** sont mis en réaction avec un équivalent de l'aldéhyde **51** dans de l'éthanol anhydre, en présence de six équivalents d'acide acétique. Le mélange est ensuite refroidi à 0°C durant l'ajout des quatre équivalents de Zinc, ramené lentement à température ambiante puis chauffé à 60°C durant 20 heures. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille, la nitrone GluPBNH15 **62**, est obtenue avec 80% de rendement (Schéma 3-15).

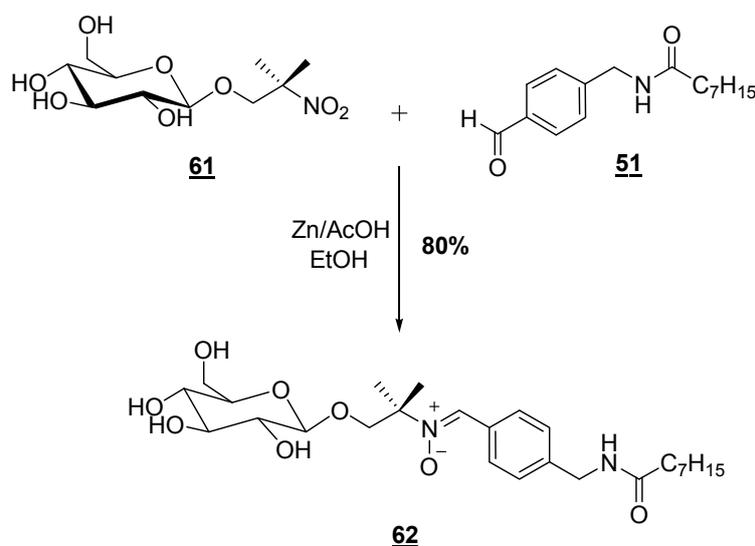


Schéma 3-15. Synthèse de la GluPBNH15

La structure de cette nitrone glycosidique a été confirmée par étude complète en RMN ainsi que par analyse en spectrométrie de masse. La pureté de cette nitrone a par ailleurs pu être évaluée par CLHP en phase inverse à la longueur d'onde de 300 nm.

Nous avons ainsi obtenu une nouvelle nitrone amphiphile dérivée de la PBN à tête polaire Glucose par une voie synthétique relativement aisée, qui nous permet d'obtenir la nitrone en 7 étapes avec un rendement global de 44%.

C. Etudes physico-chimiques

1. Etude de solubilité en milieu aqueux

Les études de solubilité dans l'eau précédemment établies au laboratoire avaient montré que la présence d'un disaccharide confère une très bonne hydrosolubilité à la PBN. En effet, comme nous pouvons le voir sur le tableau 3-4, la solubilité dans l'eau de la LPBNAH et la LPBNH15 est environ 20 fois plus élevée que celle de la PBN seule.

Cependant, lors des tests de solubilité réalisés sur la LPBNChol et la CholPBNL, nous avons remarqué que ces deux nitrones présentent quant à elles de très faibles solubilités dans l'eau (<0,5 g/L). Cette première observation démontre que la présence du motif cholestérol apporte bien à ces deux nitrones un fort caractère lipophile, malgré la présence de la tête polaire lactobionolactone.

Composés	Solubilités	
	g/L	mol/L
PBN	26,5	0,15
LPBNAH	570	0,9
LPBNH15	530	0,8
T-PBN	16,7	$7,4 \cdot 10^{-2}$
TC ₃ -PBN	7,7	$2,4 \cdot 10^{-2}$
TC ₅ -PBN	1,7	$4,8 \cdot 10^{-3}$
TC ₇ -PBN	0,54	$1,4 \cdot 10^{-3}$
TC ₉ -PBN	0,25	$6,1 \cdot 10^{-4}$
GluPBNH15	6,2	$1,2 \cdot 10^{-2}$

Tableau 3-4. Hydrosolubilités des nouvelles nitrones dérivées de la PBN comparées à celles de la PBN, de la LPBNAH et de la LPBNH15

En ce qui concerne les valeurs des cinq nitrones à tête Tris, nous pouvons constater que la présence des trois groupements hydroxyles en tant que partie polaire ne favorise pas la solubilité de la molécule dans l'eau. En effet, la valeur de solubilité de la nitrone TC₇-PBN est seulement de 0,54 g/L, ce qui est 1 000 fois inférieur à celle de son analogue lactobionamide, la LPBNH15. De plus, au fur et à mesure que la longueur de la chaîne hydrogénée augmente, l'hydrosolubilité de ces nitrones diminue, jusqu'à la valeur de 0,25 g/L pour la TC₉-PBN. Enfin, il est encore plus surprenant de constater que la valeur de solubilité de la T-PBN, de

15,1 g/L, est plus basse que celle de la PBN, de 26,5 g/L, alors que la T-PBN possède tout de même une tête polaire Tris comparativement à la PBN qui possède un groupement *tert*-butyle.

Ces remarques nous ont par conséquent conduits à émettre l'hypothèse que la faible hydrosolubilité de cette série de nitrones pouvait être attribuée à la formation intramoléculaire de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles du motif Tris, ces dernières réduisant fortement les possibilités d'hydratation des molécules.

En ce qui concerne maintenant la valeur d'hydrosolubilité de la GluPBNH15, nous pouvons de même remarquer que la présence d'un motif glucose confère une moins bonne solubilité dans l'eau que la lactobionolactone. En effet, la valeur de solubilité de la GluPBNH15 est seulement de 6,2 g/L, ce qui est environ 80 fois inférieure à celle de son analogue, la LPBNH15.

2. Etude des coefficients de partition

Dans le but de compléter cette première étude de solubilité, nous avons ensuite évalué le caractère hydrophobe de l'ensemble de ces nouvelles nitrones par la détermination de leurs coefficients de partition respectifs. Ainsi, les $\log k'_w$ ont été mesurés expérimentalement par la technique de CLHP en phase inverse présentée dans le Chapitre 2, et sont consignés dans le tableau 3-5. Les temps de rétention obtenus après élution des échantillons dans différents éluants composés de méthanol et d'eau ainsi que les $\log k'$ sont quant à eux reportés dans la Partie expérimentale de ce manuscrit.

Composés	Log k'_w
PBN	1,62
LPBNAH	2,76
LPBNH15	2,86
LPBNChol	8,83
CholPBNL	8,98
T-PBN	0,64
TC ₃ -PBN	0,74
TC ₅ -PBN	1,56
TC ₇ -PBN	2,54
TC ₉ -PBN	3,40
GluPBNH15	3,40

Tableau 3-5. Coefficients de partition des nouvelles nitrones dérivées de la PBN comparés à ceux de la PBN, de la LPBNAH et de la LPBNH15

Les très hautes valeurs de $\log k'_w$ de la LPBNChol et la CholPBNL comparées à celles de la LPBNAH et la LPBNH15 confirme que la présence du motif cholestérol augmente très fortement l'hydrophobie générale de la molécule. En effet, les valeurs de ces deux nitrones lipophiles sont trois fois plus élevées que celles de leurs analogues à chaîne heptyle et environ cinq fois et demi plus élevées que celle de la PBN. Cependant, le fait que le motif cholestérol soit greffé sur la partie aromatique ou sur la partie *tert*-butyle de la PBN n'affecte en rien le caractère lipophile de la nitrone. En effet, les coefficients de partition de la LPBNChol et de la CholPBNL sont quasi-identiques (8,83 et 8,98), ce qui confirme les résultats précédemment obtenus avec la LPBNAH et la LPBNH15 (respectivement 2,76 et 2,86).

Ensuite, afin de mieux évaluer l'hydrophobie des nitrones à tête Tris, nous avons reporté leurs valeurs de $\log k'_w$ ainsi que celles de la LPBNAH, LPBNH15 et GluPBNH15 sur la figure 3-14.

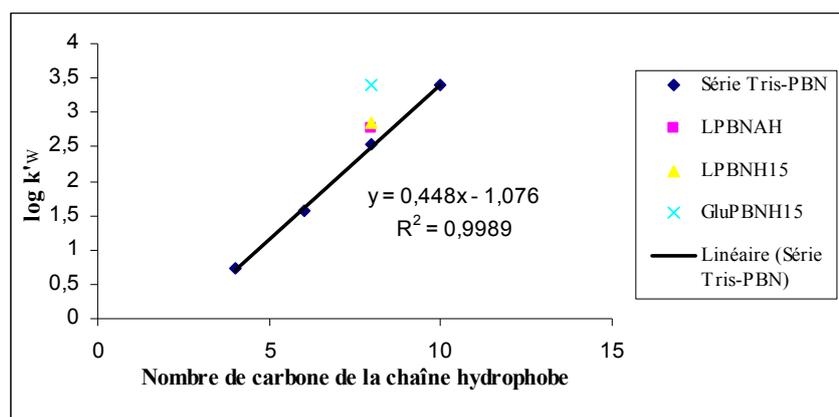


Figure 3-14. Variation de l'hydrophobie des nitrones amphiphiles en fonction de leurs longueurs de chaîne hydrophobe ou de la nature de leurs têtes polaires

On constate alors que le caractère hydrophobe des nitrones à tête Tris est directement proportionnel à la longueur de la chaîne hydrogénée présente sur la partie aromatique puisque nous obtenons une régression linéaire proche de 1. Par conséquent, notre but qui était de concevoir une gamme de nitrones plus ou moins amphiphiles est parfaitement atteint, car nous obtenons bien une série de nitrones à tête polaire Tris possédant des caractères hydrophobes variés. Nous partons effectivement d'une nitrone très polaire, la T-PBN avec un $\log k'_w$ à 0,64, pour aboutir à une nitrone bien plus hydrophobe, la TC₉-PBN avec un $\log k'_w$ à 3,40. De plus, il est important de remarquer que la PBN avec un $\log k'_w$ à 1,62 possède une hydrophobie très proche de celle de la TC₅-PBN ($\log k'_w = 1,56$), qui se trouve au centre de la gamme.

A l'heure actuelle, il nous reste donc à corréliser les activités biologiques de ces nitrones avec leurs valeurs d'hydrophobie.

En ce qui concerne maintenant les quatre valeurs correspondantes aux nitrones amphiphiles à chaîne heptyle, on peut en déduire que la nature de la tête polaire influence également l'hydrophobie de la molécule mais de manière moins prononcée. En effet, comparativement aux valeurs de $\log k'_w$ de la LPBNAH et de la LPBNH15 qui sont de 2,76 et 2,86, nous obtenons une valeur de 2,54 pour la TC₇-PBN et de 3,40 pour la GluPBNH15. Ces valeurs n'ont par conséquent pas beaucoup d'écart entre elles et démontrent seulement qu'une tête polaire Tris diminue quelque peu l'hydrophobie globale de la molécule, tandis qu'une tête polaire Glucose a tendance à légèrement l'augmenter par rapport à une tête polaire lactobionolactone.

3. Etude par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

Au cours de cette partie nous présentons les analyses RPE obtenues avec les cinq nitrones à tête polaire Tris, qui ont été réalisées par Béatrice Tuccio-Lauricella au sein de l'équipe de Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale à l'Université de Provence (Aix-Marseille I). Les manipulations ont été réalisées sur des lots de nitrones recristallisées deux fois successivement afin d'éliminer tout signal parasite. Les spectres expérimentaux enregistrés dans le DMF ou le méthanol ont ensuite été simulés et les valeurs correspondantes aux constantes de couplage sont reportées dans le tableau 3-6.

Un exemple de spectres obtenus dans le DMF pour les nitrones TC₃-PBN et TC₉-PBN est représenté sur la figure 3-15.

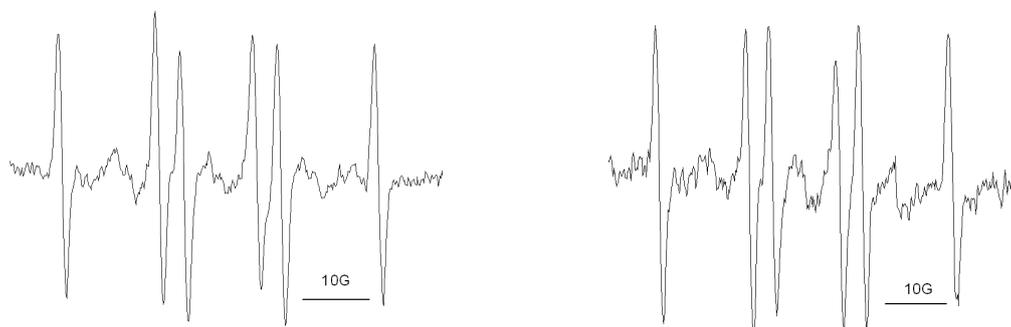


Figure 3-15. Signaux de RPE enregistré avec la TC₃-PBN (à gauche) et avec la TC₉-PBN (à droite) dans le DMF.

Nitrones	Solvant	Analyse RPE des Nitroxydes formés
T-PBN	DMF	Type A : 78%, $a_N = 14,8$ G, $a_H = 19,8$ G Type B : 22%, $a_N = 14,0$ G, $a_H = 1,7$ G
	MeOH	Type A : 100%, $a_N = 15,1$ G, $a_H = 19,8$ G
TC ₃ -PBN	DMF	Type A : 82%, $a_N = 14,6$ G, $a_H = 18,3$ G Type B : 18%, $a_N = 14,0$ G, $a_H = 1,7$ G
	MeOH	Type A : 100%, $a_N = 14,9$ G, $a_H = 18,4$ G
TC ₅ -PBN	DMF	Type A : 85%, $a_N = 14,6$ G, $a_H = 18,3$ G Type B : 15%, $a_N = 14,0$ G, $a_H = 1,7$ G
	MeOH	Type A : 100%, $a_N = 14,9$ G, $a_H = 18,34$ G
TC ₇ -PBN	DMF	Type A : 79%, $a_N = 14,6$ G, $a_H = 18,3$ G Type B : 21%, $a_N = 14,0$ G, $a_H = 1,7$ G
	MeOH	Type A : 100%, $a_N = 14,9$ G, $a_H = 18,4$ G
TC ₉ -PBN	DMF	Type A : 77%, $a_N = 14,6$ G, $a_H = 18,3$ G Type B : 23%, $a_N = 14,0$ G, $a_H = 1,7$ G
	MeOH	Type A : 100%, $a_N = 14,9$ G, $a_H = 18,4$ G

Tableau 3-6. Proportions et constantes hyperfines correspondantes aux nitroxydes de type A et B, pour chaque nitrones à tête polaire Tris dans différents solvants

Ces valeurs démontrent la présence de deux espèces nitroxides de type **A** et **B** lorsque les expériences sont conduites dans le DMF avec, cependant, une plus forte proportion de l'espèce **A**, alors que dans le méthanol elle est l'unique espèce observée.

Le signal à six raies ainsi observé sur les spectres de toutes les nitrones correspond au nitroxyde cyclique de type **A** (Schéma 3-16). Nous avons alors pensé qu'il pouvait être formé à la suite d'une addition nucléophile intramoléculaire selon un mécanisme de Forrester-Hepburn. Ce mécanisme est en effet très souvent observé dans le cas d'expériences de spin-trapping réalisées avec des nitrones en milieu aqueux (addition nucléophile d'eau) et conduit dans la plupart des cas à des artefacts. Néanmoins, dans notre cas, c'est uniquement la présence du groupement hydroxyle le plus proche de la liaison C-H qui permet par son caractère nucléophile l'addition intra-moléculaire sur la fonction nitronyle pour conduire, après protonation, à une hydroxylamine (N-OH). Cette dernière est ensuite très facilement oxydée en nitroxyde par n'importe quel oxydant présent dans le milieu, le dioxygène solubilisé dans le milieu étant déjà considéré comme un oxydant suffisamment efficace. Par conséquent, compte tenu des conditions expérimentales utilisées, il est bien évident que la

réaction s'effectue dans un solvant oxygéné (pendant 5-10 min), puis l'oxygène est éliminé par bullage d'argon afin d'obtenir des spectres RPE à raies fines.

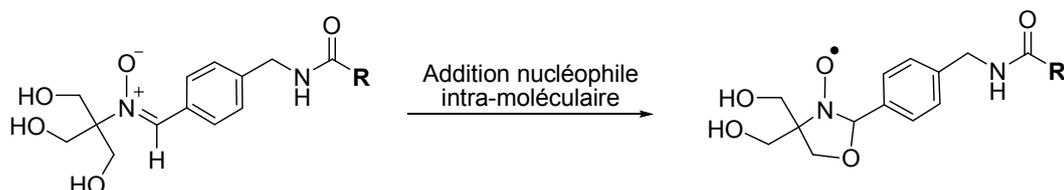


Schéma 3-16. Formation du nitroxyde de type A par addition nucléophile intra-moléculaire

En présence de DMF, nous avons également constaté la présence d'un signal minoritaire, qui pourrait correspondre à un adduit acyclique de type Nitron-OX. Il pourrait alors s'agir du produit résultant d'une addition nucléophile bimoléculaire, correspondant au nitroxyde de type **B**, toujours selon un mécanisme de Forrester-Hepburn (Schéma 3-17).

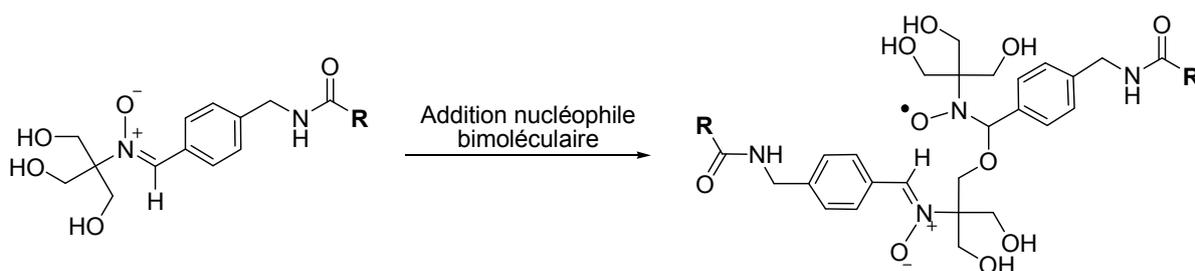


Schéma 3-17. Formation du nitroxyde de type B par addition nucléophile bimoléculaire

Il apparaît donc que ce mécanisme de Forrester-Hepburn, qui en temps normal se produit en milieu aqueux, se produit même dans un solvant peu basique comme le méthanol. Cependant, la plus faible caractéristique basique de ce solvant comparé au DMF, permet uniquement la formation du nitroxyde cyclique de type **A**, l'addition intra-moléculaire étant ici thermodynamiquement favorisée puisqu'elle conduit à un cycle à 5 chaîsons. L'addition bimoléculaire est en effet moins favorisée car elle nécessite la rencontre de deux molécules, ainsi seul la présence d'un solvant plus basique comme le DMF peut néanmoins permettre de l'observer, mais en proportion minimale comparée à la cyclisation intra-moléculaire.

Quelques essais de *spin trapping* ont par la suite été réalisés avec la nitrone T-PBN dans l'eau, en générant le radical HO· soit seul, soit en présence de méthanol, éthanol, ou formiate de sodium. Dans tous les cas, des mélanges complexes de radicaux ont été obtenus,

avec toujours la présence prépondérante de l'adduit cyclique de type A. De plus, divers adduits peuvent être formés suite à la génération puis au piégeage de radicaux par arrachement des H en alpha des fonctions alcools de la nitrone.

L'ensemble de ces expériences démontre donc que la série de nitrones à tête polaire Tris présente certes des capacités de piégeage des radicaux libres, mais reste toutefois inutilisable dans la détection et l'identification de ces derniers, du fait de la grande complexité des résultats obtenus.

D. Etudes *in vivo* menées sur la dégénérescence rétinienne

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Biophysique des Handicaps Sensoriels d'Isabelle Ranchon-Cole à Clermont Ferrand, l'opportunité nous a été offerte de déterminer les propriétés neuroprotectrices de la LPBNChol et de la CholPBNL sur un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne induite par la lumière.

1. Qu'est-ce que la dégénérescence rétinienne ?

La rétine, tissu neurosensoriel qui tapisse le fond du globe oculaire (75% de la face interne du globe oculaire), est à l'origine de la genèse du signal visuel. Elle est constituée de différents types de cellules dont les cellules photoréceptrices qui sont responsables de l'absorption de la lumière et de la transformation du signal lumineux en un signal électrophysiologique. Deux types de cellules photoréceptrices sont toutefois présentes au niveau de la rétine : les cônes et les bâtonnets. Les cônes sont peu sensibles à la lumière et ont besoin de beaucoup de lumière pour être activés, ils sont responsables de la vision diurne et colorée. Les bâtonnets eux, sont très sensibles à la lumière et sont activés dans des conditions de faible luminosité, ils sont responsables de la vision crépusculaire et nocturne en « noir et blanc ».

Les dégénérescences rétiniennes sont caractérisées par une disparition progressive de ces photorécepteurs conduisant à une perte de vision qui peut dans certains cas aboutir à la cécité. Parmi les formes les plus courantes, on distingue les rétinopathies pigmentaires qui sont des dégénérescences rétiniennes héréditaires, les rétinopathies diabétiques qui comme leur nom l'indique sont secondaires au diabète et les dégénérescences maculaires liées à l'âge (DMLA) qui sont caractérisées par une disparition des cellules à cônes et sont liées au vieillissement.

La DMLA est à l'heure actuelle la principale cause de troubles de la vision dans les pays industrialisés. Bien que les mécanismes physiopathologiques ne soient encore que partiellement connus, le stress oxydant semble jouer un rôle essentiel dans le déclenchement et l'évolution de la DMLA. En effet, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, au cours du vieillissement la diminution de l'efficacité des systèmes de défenses antioxydants permettrait aux radicaux libres oxygénés d'exercer d'avantage leurs effets néfastes (oxydation de protéines, d'acides gras, d'ADN etc.). Cependant, actuellement, aucun traitement efficace n'est disponible pour lutter contre cette pathologie de la rétine. Par conséquent, l'une des stratégies pour prévenir ou limiter la progression de la maladie a pour but d'augmenter les systèmes antioxydants et piègeurs de radicaux libres.

2. La dégénérescence rétinienne induite par la lumière ou photodégénérescence rétinienne

Bien que la fonction première de la rétine soit la perception de la lumière et la transformation du signal lumineux en un signal électrophysiologique, de nombreuses études ont montré que les cellules photoréceptrices sont fragiles et peuvent être facilement lésées par la lumière environnante qu'elle soit naturelle ou artificielle. En effet, la lumière via la production de radicaux libres oxygénés favoriserait le dysfonctionnement cellulaire et à terme, la mort cellulaire.

C'est ainsi que la rétine est tout particulièrement sensible à la production de radicaux libres et donc au stress oxydant du fait :

- de sa forte concentration en oxygène,
- de son exposition importante à la lumière de par sa fonction,
- de la proportion élevée d'acides gras polyinsaturés dans les segments externes des photorécepteurs,
- des nombreux chromophores présents dans la rétine et l'épithélium pigmentaire rétinien (rhodopsine, lipofuscine, mélanine, cytochrome c, oxydase...),
- de la production de radicaux libres par l'épithélium pigmentaire rétinien lors de la phagocytose des photorécepteurs.

Le modèle expérimental de dégénérescence rétinienne consiste donc à exposer des animaux à une lumière intense, ce qui se caractérise à terme par une diminution du nombre de photorécepteurs présents dans leurs rétines. Ce modèle a tout d'abord été quantifié par

électrorétinographie et histologie,²⁴ pour ensuite démontrer que le mécanisme dégénératif implique la production de radicaux libres^{25,26} et que les cellules photoréceptrices meurent par apoptose. Ce modèle de photodégénérescence rétinienne permet donc l'étude de l'apoptose des cellules photoréceptrices induite par un stress oxydant.

Des molécules synthétiques ou naturelles, reconnues pour leurs propriétés antioxydantes ou de piégeage de radicaux libres telle que la diméthylthiourée (DMTU),^{23,27} la phényl *N-tert* butyl nitrone (PBN),²⁴ l'extrait de ginkgo biloba (EGb 761)²³ et certains nitroxydes cycliques²⁸ ont montré leur efficacité *in-vivo* en tant que neuroprotecteur visant à lutter contre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière.

Dans ce contexte, nous avons testé l'effet neuroprotecteur de nos deux nouvelles nitrones, la LPBNChol et la CholPBNL dans ce modèle de photodégénérescence rétinienne.

3. Principe de l'étude *in vivo*

Des rats albinos sont élevés en lumière cyclique faible (12 heures de noir ; 12 heures de lumière < 10 lux). Le lux correspond à l'éclairement d'une surface qui reçoit, de manière uniformément répartie, un flux lumineux de 1 lumen par m². Ainsi à titre d'exemple, une nuit de pleine lune correspond à 0,5 lux, un stade de nuit correspond à 1500 lux tandis qu'une journée ensoleillée correspond à plus de 50 000 lux.

A l'âge de 7 à 8 semaines, les animaux sont non traités ou reçoivent une injection dans le vitré de 2 µL d'une solution contenant soit :

- ✓ du DMSO à 2%,
- ✓ de la PBN à 1 ou 9 mM dans du PBS (Phosphate buffered saline) 1X,
- ✓ de la LPBNChol ou de la CholPBNL à 1 mM dans du DMSO 2%.

Après les injections, les animaux sont placés pendant 18 heures dans le noir puis soit ils restent au noir (non exposés) soit ils sont exposés pendant 24 heures à une lumière blanche fluorescente de 3400 lux. A la fin des 24 heures tous les animaux sont replacés en lumière cyclique faible. Deux semaines plus tard les animaux sont sacrifiés pour l'étude histologique de leurs rétines.

Les lésions rétiniennes sont alors évaluées par la mesure de l'épaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) de la rétine. Cette dernière contient les noyaux des photorécepteurs et la mesure de son épaisseur donne une estimation du nombre de photorécepteurs présents dans la rétine, et par conséquent une approximation du potentiel anti-radicalaire que peut

induire chaque nitrone testée. C'est ainsi que la réduction de l'épaisseur de la couche externe de la rétine est inversement proportionnelle à la protection induite par les nitrones, dont l'efficacité est directement corrélée à la préservation des photorécepteurs des attaques radicalaires.

Il est toutefois important de préciser à ce niveau que les effets de l'injection intravitréenne de DMSO 2% et de PBS 1X sur les dommages causés à la rétine par la lumière ont préalablement été évalués, aucune protection rétinienne n'est induite par ces deux solvants.²⁹

4. Résultats des différentes expériences

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3-15 sous forme de trois graphiques (A, B, et C). Les deux premiers graphiques représentent l'épaisseur de la CNE en fonction de la distance au nerf optique, tandis que le troisième représente les aires sous les courbes dans la partie inférieure et supérieure de la rétine.

Chez les animaux non traités-non exposés (Figure A), l'épaisseur de la couche nucléaire externe est comprise entre 35 et 40 μm . Chez les animaux exposés et traités avec le DMSO 2% (Figure C) la CNE est réduite de 23% dans le pôle inférieur et de 51% dans le pôle supérieur après exposition à la lumière, ce qui nous sert de groupe « référence » lors d'une exposition sans la présence de nitrones.

La PBN injectée à 9 mM (Figure A), permet de protéger la rétine contre les lésions induites par la lumière. En effet, les épaisseurs de la couche nucléaire externe du côté inférieur et supérieur de la rétine sont similaires à celles du groupe non traité-non exposé, conduisant à des aires sous les courbes après exposition identiques à celles du groupe non exposé (Figure C). Ces résultats montrent donc que la PBN a un effet neuroprotecteur même 18 heures après son injection dans le vitré. Jusqu'à présent l'effet neuroprotecteur de la PBN dans la photodégénérescence rétinienne n'avait été mis en évidence que lors d'injections intrapéritonéales et ce, pendant l'exposition à la lumière. Par contre, il est à noter qu'une injection de PBN à 1 mM (Figure A) n'apporte aucune protection puisque l'épaisseur de la CNE du groupe exposé et traité avec la PBN à 1mM est similaire à celle du groupe exposé et traité avec le DMSO à 2%.

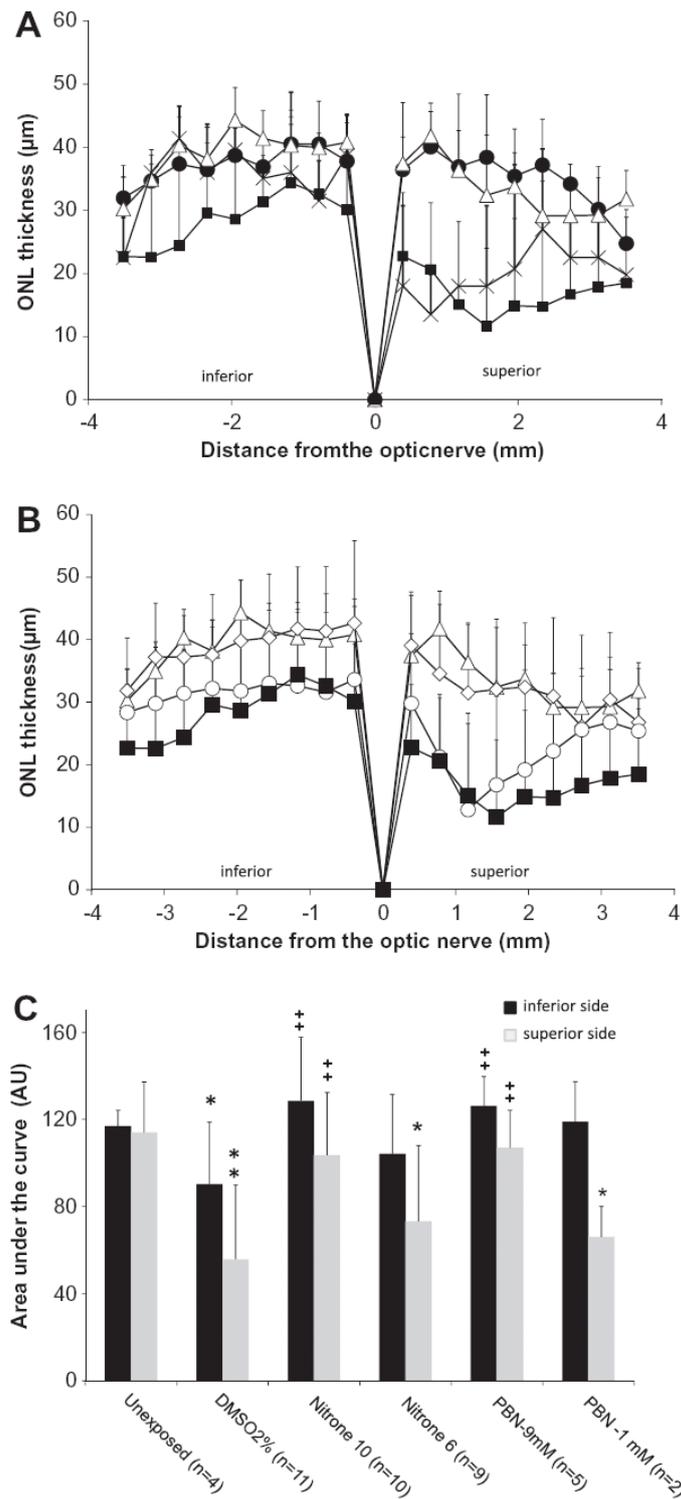


Figure 3-16. Histologie : épaisseur latérale de la couche nucléaire externe de la rétine.
A Groupe contrôle non-traité et non-exposé (\bullet), Groupe traité avec la PBN à 9 mM (Δ),
 Groupe traité avec la PBN à 1 mM (\times), Groupe traité avec le DMSO à 2% (\blacksquare).
B Groupe traité avec la CholPBNL à 1 mM (\diamond), Groupe traité avec la LPBNChol à 1 mM (\circ).
C Aires présentes sous les courbes obtenues pour l'épaisseur de la couche externe de la rétine
 de son côté inférieur et supérieur, calculées par le programme Origin 6.0 (Microcal), C-10 correspond
 au groupe traité avec la CholPBNL à 1 mM, C-6 correspond au groupe traité avec la LPBNChol à 1 mM.

Dans le groupe exposé et ayant reçu une injection de la nitrone CholPBNL à 1 mM (Figure B), l'épaisseur de la CNE est similaire à celle du groupe non traité-non exposé. Par conséquent, la CholPBNL à une concentration de 1 mM offre une protection de la rétine contre les lésions induites par la lumière similaire à celle de la PBN à 9 mM (Figure C). Cependant, l'épaisseur de la CNE dans le groupe exposé et traité avec la LPBNChol à 1 mM (Figure B) n'est pas différente de celle du groupe exposé et traité avec la DMSO à 2%, et par conséquent les aires sous les courbes ne sont pas significativement différentes (Figure C). Ces deux observations démontrent que seule la nitrone CholPBNL, et non la LPBNChol, possède un effet neuroprotecteur contre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière à la concentration d'étude de 1 mM.

Cette différence de protection ne peut pas s'expliquer par des différences de lipophilie et donc de capacité à pénétrer dans la rétine puisque les deux molécules possèdent un $\log k'_w$ identique. Toutefois, il est important de rappeler à ce niveau de l'étude, qu'entre la CholPBNL et la LPBNChol la chaîne hydrophobe et la tête polaire sont inversées par rapport à la fonction nitrone centrale. Hors, il a été montré avec la LPBNAH et la LPBNH15 que l'inversion de ces deux substituants altérerait leurs potentiels antioxydants, bien que ne modifiant pas l'hydrophobie de la molécule.⁸ En effet, il a été prouvé lors d'études menées *in vitro* et *in vivo* que la LPBNH15, qui a une orientation des deux substituants similaire à celle de la CholPBNL, était plus protectrice contre un stress oxydant induit par différentes toxines que la LPBNAH, qui a quand à elle une orientation similaire à la LPBNChol.

Ces deux remarques nous amènent donc à conclure que les nitrones amphiphiles possédant la tête polaire sur la partie *tert*-butyle de la PBN et la partie apolaire sur sa partie aromatique sont potentiellement plus protectrices que leurs analogues inversées vis-à-vis des phénomènes de stress oxydant.

Néanmoins, il est important de noter que les injections de nitrones sont réalisées 18 heures avant l'exposition à la lumière blanche fluorescente. Par conséquent, du fait du faible temps de demi-vie des nitrones dans la rétine (PBN \sim 2 h),²⁴ il est probable que celles-ci soient présentes à plus faibles concentrations au moment de l'exposition. Ainsi, en accord avec la littérature,^{30,31,32} ces résultats suggèrent que la protection induite par les nitrones n'est pas due directement à leur capacité de piègeur de radicaux libres mais très certainement à un autre mécanisme d'action. Par conséquent, il est impératif que de nouvelles expériences soient réalisées dans un futur proche afin d'élucider le mécanisme moléculaire par lequel opère la PBN et la CholPBNL, comparée à la LPBNChol dépourvue d'activité neuroprotectrice.

E. Conclusion

Les travaux de recherche proposés dans le cadre de ce troisième chapitre, portaient sur le développement de nouveaux dérivés de la PBN capables d'améliorer et contrôler son passage membranaire et donc sa biodisponibilité dans l'organisme, par la modulation de sa balance hydrophile-lipophile.

Nous avons tout d'abord obtenus deux analogues de la LPBNAH et de la LPBNH15 à motif cholestérol, aisément obtenus par une stratégie de synthèse convergente avec de bons rendements. Nous avons ensuite eu recours à une nouvelle méthode de formation de la fonction nitrone par couplage « one-pot » entre un dérivé nitro et un dérivé aldéhyde sans passer par l'étape limitante de réduction du dérivé nitro en hydroxylamine. Nous avons ensuite mis en application cette méthode de condensation afin d'obtenir une série de nitrones à tête Tris et à longueur de chaîne variable ainsi qu'un analogue de la LPBNH15 à tête Glucose, tous obtenus avec de très bons rendements.

Nous avons par la suite démontré que le motif cholestérol présent sur la LPBNChol et la CholPBNL induit un fort caractère hydrophobe à la PBN, rendant ces deux nitrones insoluble en milieu aqueux malgré la présence de la tête lactobionolactone. De plus, nous avons prouvé que la longueur de la chaîne hydrophobe présente sur la partie aromatique des nitrones à tête Tris a permis d'obtenir une gamme de molécules plus ou moins amphiphiles. La présence du motif Tris en tant que tête polaire ne permet pas, cependant, une bonne solubilité de ces nitrones en milieu aqueux, très certainement du à la formation de liaisons hydrogènes intra-moléculaires. Cette série de nitrones à tête Tris a tout de même démontré des capacités de piégeage des radicaux libres lors d'études RPE. Enfin, nous avons constaté que comparativement à une tête lactobionolactone la présence d'un motif Glucose en tant que tête polaire ne modifie en rien le caractère hydrophobe de la molécule, mais diminue, cependant, fortement sa solubilité en milieu aqueux.

Enfin, nous avons constaté que l'un de nos deux analogues lipophiles de la PBN, la CholPBNL, possède un effet neuroprotecteur marqué sur un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Qui plus est, cette nitrone a démontrée une activité neuroprotectrice comparable à celle de la PBN mais à des concentrations 9 fois inférieure. Par conséquent, ces résultats préliminaires permettent une nouvelle fois de mettre en évidence l'intérêt de la vectorisation de la PBN par une structure monomoléculaire

amphiphile, et suggère que la nitrone CholPBNL peut très certainement être un candidat potentiel pour le traitement contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

Dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire en Pologne, l'opportunité nous a récemment été offerte de déterminer les propriétés protectrices de la TC₇-PBN et de la Glu-PBNH15 sur des cellules atteintes de la mutation génétique de NARP, en comparaison avec la PBN, LPBNAH et LPBNH15. Cependant, ces études sont actuellement en cours de réalisation et n'ont par conséquent pu être présentées dans ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- ¹ Durand G., Polidori A., Salles J-P., Prost M., Durand P., Pucci B., Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derivated from PBN and Lipoic acid, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5320-5237.
- ² Durand G., Polidori A., Salles J-P., Pucci B., Synthesis of a new family of glycolipidic nitrones as potential antioxidant drugs for neurodegenerative disorders, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 859-862.
- ³ Durand G., Poeggeler B., Böker J., Raynal S., Polidori A., Pappolla M. A., Hardeland R., Pucci B., Fine-tuning the amphiphilicity : a crucial parameter in the design of potent α -Phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone analogues, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3976-3979.
- ⁴ Tanguy S., Durand G., Reboul C., Polidori A., Pucci B., Dauzat M., Obert P., Protection against reactive oxygen species injuries in rat isolated perfused hearts :effect of LPBNAH, a new amphiphilic spin-trap derivated from PBN, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **2006**, 20, 147-149.
- ⁵ Poeggeler B., Durand G., Polidori A., Pappolla M. A., Vega-Naredo I., Coto-Montes A., Böker J., Hardeland R., Pucci B., Mitochondrial medicine: neuroprotection and life extension by the new amphiphilic nitronone LPBNAH acting as a highly potent antioxidant agent, *J. Neurochem.*, **2005**, 95, 962-973.
- ⁶ Asanuma T., Yasui H., Inanami O., Walki K., Takahashi D., Iizuka T., Uemura G., Durand G., Polidori A., Kon Y., Pucci B., Kuwabara M., *Chemistry & Biodiversity*, **2007**, 4, 2253-2267.
- ⁷ Durand G., Poeggeler B., Ortial S., Polidori A., Villamena F. A., Böker J., Hardeland R., Pappolla M. A., Pucci B., Amphiphilic amide nitrones: a new class of protective agents as modifiers of mitochondrial metabolism, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4849-4861.
- ⁸ Ortial S., Synthèse, études physico-chimiques et biologiques de nouveaux vecteurs amphiphiles porteurs d'antioxydants, *Thèse de doctorat*, **2006**, Université d'Avignon.
- ⁹ Stolze K., Udilova N., Rosenau T., Hofinger A., Nohl H., Spin trapping of superoxide, alkyl- and lipid-derivated radicals with derivatives of the spin trap EPPN, *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 66, 1717-1726.
- ¹⁰ Morandat S., Durand G., Polidori A., Desigaux L., Bortolato M., Roux B., Pucci B., PBN derived amphiphilic spin-traps. I/ Synthesis and study of their miscibility with polyunsaturated phospholipids, *Langmuir*, **2003**, 19, 9699-9705.
- ¹¹ Hay A., Burkitt M. J., Jones C. M., Hartley R. C., Development of a new EPR spin trap, DOD-8C (N-[4-dodecyloxy-2-(7'-carboxyhept-1'-yloxy)benzylidene]-*N*-*tert*-butylamine N-oxid), for the trapping of lipid radicals at a predetermined depth within biological membranes, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **2005**, 435, 336-346.
- ¹² Han Y., Liu Y., Rockenbauer A., Zweier J. L., Durand G., Villamena F. A., Lipophilic β -cyclodextrin cyclic-nitronone conjugate : synthesis and spin trapping studies, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5369-5380.
- ¹³ Hardy M., Ouari O., Charles L., Finet J-P., Iacazio G., Monnier V., Rockenbauer A., Tordo P., Synthesis and spin-trapping behavior of 5-ChEPMPPO, a cholesteryl ester analogue of the spin trap DEPMPO, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 10426-10433.
- ¹⁴ Polidori A., Michel N., Fabiano A-S., Pucci B., Exotic aqueous behavior of synthetic lipids : formation of vesicular nanotubes, *Chem. Phys. Lipids*, **2005**, 136, 23-46.
- ¹⁵ Dauvergne J., Polidori A., Vénien-Bryan C., Pucci B., Synthesis of a hemifluorinated amphiphile designed for self-assembly and two-dimensional crystallization of membrane protein, *Tett. Lett.*, **2008**, 49, 2247-2250.
- ¹⁶ Ouari O., Chalier F., Bonaly R., Pucci B., Tordo P., Synthesis and spin-trapping behaviour of glycosylated nitrones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 2299-2307.
- ¹⁷ Ortial S., Durand G., Poeggeler B., Polidori A., Pappolla M. A., Böker J., Hardeland R., Pucci B., Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers : a new class of protective agents, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2812-2820.
- ¹⁸ Bernotas R. C., Adams G., Carr A. A., Synthesis of benzazepine-based nitrones as radical traps, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 6519-6526.
- ¹⁹ Bernotas R. C., Adams G., Synthesis of a 1-benzylpiperazin-2-one nitronone and its reaction with alkynes and alkenes, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 7339-7342.
- ²⁰ Bernotas R. C., Thomas C. E., Carr A. A., Nieduzak T. R., Adams G., Ohlweiler D. F., Hay D. A., Synthesis and radical scavenging activity of 3,3-dialkyl-3,4-dihydro-isoquinoline 2-oxides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 1105-1110.
- ²¹ Gautheron-Chapoulaud V., Pandya S. U., Cividino P., Masson G., Py S., Vallée Y., One-pot synthesis of functionalized nitrones from nitro compounds, *Synlett*, **2001**, 8, 1281-1283.
- ²² Rosvear P., Vanken T., Baxter J. Miller S. F., Alkyl Glycoside detergents : a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **1980**, 19, 4108-4115.
- ²³ Helferich B., Zimmer J., Zur synthese von tetraacetyl-hexosen mit freiem 2-hydroxyl. Synthese einiger disaccharide, *Chem. Ber.*, **1962**, 95, 2604-2611.
- ²⁴ Ranchon I., Gorrand J-M., Cluzel J., Vennat J-C., Doly M., Light induced variation on retinal sensitivity in rats, *Curr. Eye Res.*, **1998**, 17, 14-23.

- ²⁵ Ranchon I., Gorrand J-M., Cluzel J., Droy-Lefaix M-T., Doly M., Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by mimethylthiourea and Ginkgo biloba extract, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1999**, 40, 1191-1199.
- ²⁶ Ranchon I., Chen S., Alvarez K., Anderson R. E., Systemic administration of Phenyl-*N-tert*-butylnitronone protects the retina from light damage, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2001**, 42, 1375-1379.
- ²⁷ Organisciak D. T., Darrow R. M., Jiang R. M., Marak G. E., Blanks J. C., Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1992**, 33, 1599-1609.
- ²⁸ Tanito M., Li F., Elliott M. H., Dittmar M., Anderson R. E., Protective effect of TEMPOL derivatives against light-induced retinal damage in rats, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2007**, 48, 1900-1905.
- ²⁹ Perche O., Doly M., Ranchon-Cole I., Caspase-dependant apoptosis in light-induced retinal degeneration, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2007**, 48, 2753-2759.
- ³⁰ Floyd R. A., Kopke R. D., Choi C-H., Foster S. B., Doblaz S., Towner R. A., Nitrones as therapeutics, *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, 45, 1361-1374.
- ³¹ Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P., Salsman S., Floyd R. A., Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury, *Free Radical. Biol. Med.* **2000**, 28, 1456-1462.
- ³² Floyd R. A., Hensley K., Kelleher-Anderson J. A. Wood P. L., Nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging, *Mech. Ageing Dev.*, **2002**, 123, 1021-1031.

Chapitre 4 :

Nouveaux transporteurs d'antioxydants

A. TRANSPORTEURS MACROMOLECULAIRES DE TYPE DENDRIMERE	142
1. PRESENTATION GENERALE	142
2. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS PAMAM PORTEURS D'ANTIOXYDANTS SYNTHÉTIQUES	143
B. NOUVEAU TRANSPORTEUR MONOMOLECULAIRE DE LA PBN	147
1. PRESENTATION GENERALE	147
2. SYNTHÈSE DE LA NITRONE DÉRIVÉE DE LA PBN A MOTIFS PYRIDINIUM ET CYCLOHEXANE	148
C. CONCLUSION	154

Dans ce chapitre « d'ouverture », nous élargissons nos recherches consacrées à la vectorisation d'antioxydants, vers de nouveaux transporteurs potentiels macromoléculaires et monomoléculaires. Dans la première partie de ce chapitre, nous décrivons la synthèse de nouveaux transporteurs macromoléculaires de type dendrimère, porteurs de différents antioxydants synthétiques. Puis, dans la seconde partie, nous présentons la synthèse d'une nouvelle nitroène amphiphile dérivée de la PBN, sur laquelle les composantes polaire et apolaire sont positionnées sur sa partie *tert*-butyle.

A. Transporteurs macromoléculaires de type dendrimère

1. Présentation générale

Les dendrimères sont des macromolécules hyperbranchées, chimiquement définies, synthétisées par séquences itératives d'étapes de réaction ajoutant au fur et à mesure une couche supplémentaire de branches. On appelle par conséquent « génération » le nombre de séquences nécessaires à la synthèse du dendrimère.

L'un des intérêts multiples de telles structures est de favoriser en pharmacologie l'administration et le transport *in vivo* d'un nombre défini de substances actives capables d'être libérées simultanément sur le site d'action et provoquer ainsi un effet de Cluster, c'est-à-dire une multiplication de l'activité de l'actif nettement supérieure à sa concentration réelle.

Nous avons donc choisi de placer un antioxydant synthétique aux extrémités de chaque branche d'une structure dendrimère afin de déterminer si une telle procédure peut effectivement induire un effet de Cluster sur l'activité des antioxydants choisis.

1.1. Présentation de la structure du dendrimère

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de travailler avec un dendrimère de type PAMAM, de corps 1,4-diaminobutane et de génération 0, ayant pour extrémités quatre fonctions amines (Figure 4-1). Ce PAMAM de génération 0 nous permettra dans un premier temps, d'évaluer en fonction des résultats biologiques obtenus l'effet du greffage de quatre motifs antioxydants sur une seule et même structure de type dendrimère. Suivant les résultats, nous pourrions envisager de travailler avec des dendrimères PAMAM de génération supérieure, dans le but d'augmenter la multiplicité des motifs antioxydants greffés et pourquoi pas y ajouter également des motifs de ciblage.

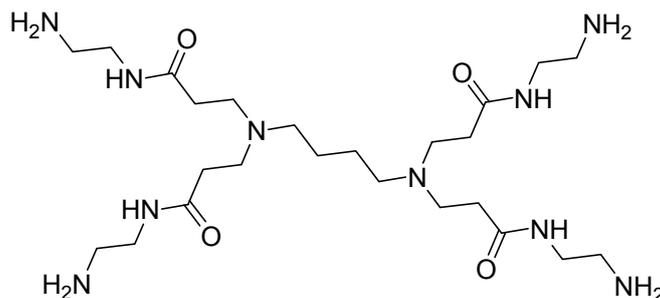


Figure 4-1. Structure chimique du PAMAM 1,4-diaminobutane de génération 0

1.2. Choix des antioxydants

Dans le but de généraliser ce concept, nous avons souhaité coupler à ce dendrimère PAMAM trois antioxydants qui sont :

- la PBN, dont les propriétés thérapeutiques ont déjà été présentées dans le Chapitre 1 (cf. Partie C, §2),
- la CMPO, un dérivé acide de la nitrone cyclique DMPO, qui a de même déjà été présenté dans le Chapitre 1 (cf. Partie C, §1),
- l'acide lipoïque, présenté dans l'introduction du Chapitre 2 et à de nombreuses reprises dans la littérature.^{1,2,3,4}

2. Synthèse des dérivés PAMAM porteurs d'antioxydants synthétiques

Au regard des résultats précédents, nous avons choisi de greffer ces trois antioxydants au PAMAM par le biais d'une jonction amide. Par conséquent, nous avons utilisé les dérivés acides carboxyliques de la PBN et de la DMPO, respectivement la 4-HOOC-PBN et la CMPO, l'acide lipoïque possède quant à lui déjà une fonction acide carboxylique.

La synthèse de ces trois dérivés PAMAM porteurs d'antioxydants se décompose ainsi en deux étapes qui sont :

- la préparation des antioxydants sous leur forme acide carboxylique ou ester actif
- le greffage de ces derniers sur les fonctions amines libres du PAMAM.

2.1. Préparation des antioxydants sous leur forme ester actif ou acide carboxylique

2.1.1. Préparation de l'ester actif dérivé de la PBN

Le dérivé acide de la PBN est tout d'abord obtenu en une seule étape à partir du 4-carboxybenzaldéhyde et de l'acétate de N-(*tert*-butyl)hydroxylamine suivant une procédure déjà décrite au laboratoire.⁵ Afin d'obtenir un couplage optimum, il est nécessaire de travailler en excès d'hydroxylamine mais par ajout régulier de petites fractions au cours du temps.

Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice puis par recristallisation, le composé **63** est obtenu avec 64% de rendement (Schéma 4-1). Cet acide est ensuite transformé en ester actif du N-hydroxysuccinimide, en présence de DCC dans le dichlorométhane et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice le composé **64** est obtenu avec 86% de rendement (Schéma 4-1).

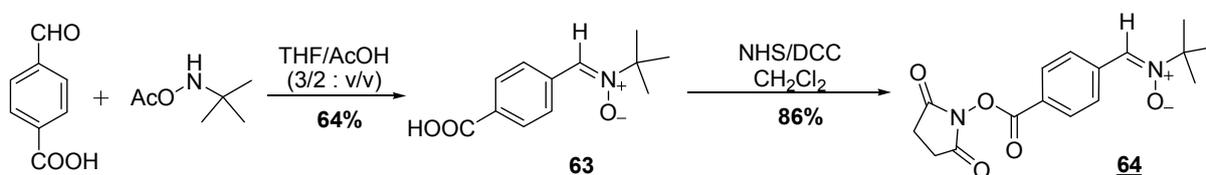


Schéma 4-1. Synthèse de l'ester actif **64** dérivé de la PBN

2.1.2. Préparation de l'ester actif dérivé de l'acide lipoïque

Suivant le même mode opératoire que pour la PBN, l'acide lipoïque est mis en réaction avec le N-hydroxysuccinimide dans le dichlorométhane, en présence de DCC et après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice le composé **60** est obtenu avec 92% de rendement (Schéma 4-2).

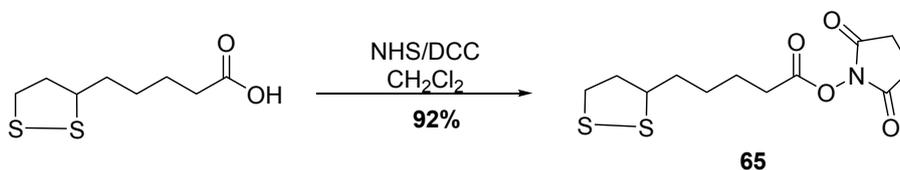


Schéma 4-2. Synthèse de l'ester actif **65** dérivé de l'acide lipoïque

2.1.3 Préparation de l'acide dérivé de la DMPO

La synthèse de la CMPO a été réalisée à partir de la forme ester EMPO, synthétisée au laboratoire du Pr. Frederick Villamena. La régénération de la fonction acide carboxylique s'effectue par réaction de saponification, dans une solution de NaOH à 2,5% à 50°C, puis une fois la réaction terminée le brut du composé **66** est directement mis en réaction avec le dérivé PAMAM (Schéma 4-3).

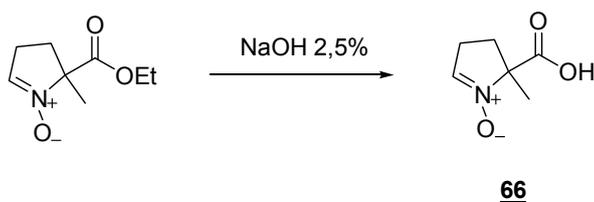


Schéma 4-3. Synthèse de la nitronne acide **66** dérivé de la EMPO

2.2. Fixation des antioxydants sur le PAMAM

La PBN et l'acide lipoïque ainsi activé sont ensuite greffés sur le dérivé PAMAM dans le DMF en présence de TEA (pH = 9), 1,2 équivalents d'esters actifs par fonction amine étant utilisés pour le couplage. Le solvant est ensuite éliminé par distillation sous pression réduite et après purification par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20 les composés **67** et **68** sont obtenus respectivement avec 76 et 72% de rendement (Schéma 4-4).

La CMPO est quand à elle activé par réaction avec le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthyl-carbodiimide (EDC) et l'HOBt dans du DMF, puis le PAMAM est ajouté au milieu. Le solvant est évaporé sous pression réduite et après purification par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH-20 pour conduire au composé **69** avec 64% de rendement (Schéma 4-4).

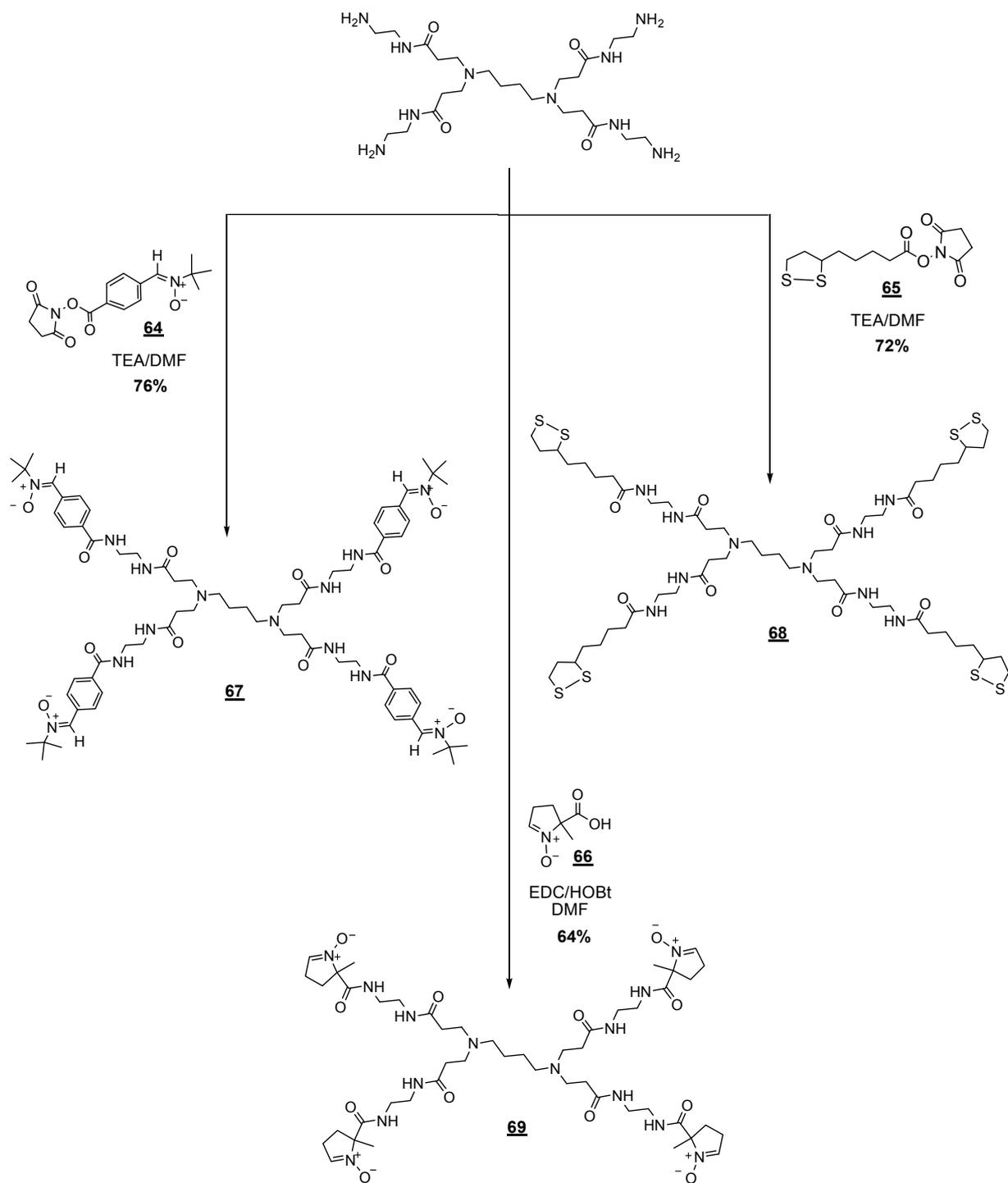


Schéma 4-4. Synthèse des dendrimères PAMAM porteurs de PBN, d'acide lipoiq̃ue et de CMPO

Nous avons par la suite vérifié et caractérisé le couplage de ces trois antioxydants au dérivé PAMAM par études complètes en RMN et par analyses en spectrométrie de masse (cf. Partie expérimentale).

B. Nouveau transporteur monomoléculaire de la PBN

1. Présentation générale

Au cours des travaux présentés dans le Chapitre 3, portant sur les nitrones amphiphiles dérivées de la PBN, il est clairement apparu que le positionnement des parties hydrophobe et hydrophile joue un rôle important dans l'activité protectrice de la PBN. Au cours de ces derniers mois de thèse, il nous a donc paru intéressant dans le cadre d'un travail préliminaire d'étudier les potentialités offertes par l'insertion de ces deux composantes, polaire et apolaire, non plus de part et d'autre du motif PBN mais ensemble sur sa partie *tert*-butyle.

1.1. Choix de la composante polaire

Comme nous l'avons évoqué dans le Chapitre 1 de ce manuscrit (cf. Partie D, §2) la mitochondrie est un organe cellulaire essentiel à tout organisme vivant et son exposition permanente aux EOR/EAR qu'elle génère la rend directement vulnérable. C'est pour cette raison que de nombreuses stratégies visant à cibler le compartiment mitochondrial sont actuellement développées. L'une d'entre elles exploite notamment le potentiel de membrane interne négatif (~150-180 mV) de la mitochondrie, qui est susceptible d'attirer toutes molécules chargées positivement et qui favorise ainsi les recherches portant sur l'insertion de groupements cationiques sur les actifs que l'on désire délivrer au cœur de la mitochondrie.

Dans cette optique, nous avons choisi comme composante polaire de cette nouvelle nitronne dérivée de la PBN un motif de type pyridinium, qui devrait assurer à la molécule un ciblage mitochondrial préférentiel (Figure 4-2).⁶

1.2. Choix de la composante apolaire

Comme nous l'avons également mentionné dans le Chapitre 1 de ce manuscrit (cf. Partie E, §1), de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des capacités de piégeage de la PBN notamment en augmentant la stabilité des adduits formés et en rigidifiant la fonction nitronne par cyclisation. Thomas *et al.*⁷ par exemple, ont montré que la présence d'un cycle aromatique à proximité de la fonction nitronne confère aux structures une rigidité supérieure et une stabilisation élevée des adduits de spin formés par réaction de la PBN avec les EOR.

Sur la base de cette observation, nous avons choisi comme composante apolaire de cette nouvelle nitronne dérivée de la PBN, en lieu et place du motif *tert*-butyle, un motif cyclohexane qui devrait permettre d'augmenter la rigidité globale de la molécule et ainsi améliorer ses capacités de piégeage d'EOR/EAR (Figure 4-2).

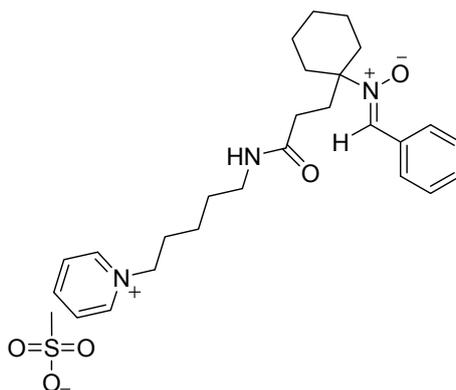


Figure 4-2. Structure chimique de la nitron dérivée de la PBN à motifs pyridinium et cyclohexane

2. Synthèse de la nitron dérivée de la PBN à motifs pyridinium et cyclohexane

La stratégie de synthèse concernant l'obtention de cette nouvelle nitron est quelque peu différente des synthèses précédemment présentées, où la PBN se trouvait au cœur même de la structure amphiphile. Nous avons en effet choisi de former la nitron comportant la partie cyclique au préalable, pour ensuite y greffer la partie polaire pyridinium. Cette voie de synthèse devrait nous permettre d'obtenir une nitron apolaire possédant une fonction acide carboxylique sur sa chaîne latérale, sur laquelle de nombreuses parties polaires pourraient être greffées lors de prochains travaux.

La synthèse convergente de cette nitron *tert*-substituée s'appuie donc sur trois étapes qui sont :

- synthèse de l'amine à motif pyridinium à partir du 5-aminopentanol,
- synthèse de l'acide carboxylique à motif PBN à partir du nitrocyclohexane,
- couplage peptidique entre l'amine polaire porteuse du groupement pyridinium et l'acide carboxylique apolaire porteur de la nitron.

2.1. Synthèse du précurseur de la tête polaire à motif pyridinium et à fonction amine

La synthèse de cette partie polaire, consiste à insérer le groupement pyridinium sur le 5-aminopentanol commercial, par l'intermédiaire de sa fonction alcool. Il faut par conséquent que la fonction amine soit préalablement protégée afin que la fonction alcool soit ensuite activée (Schéma 4-5).

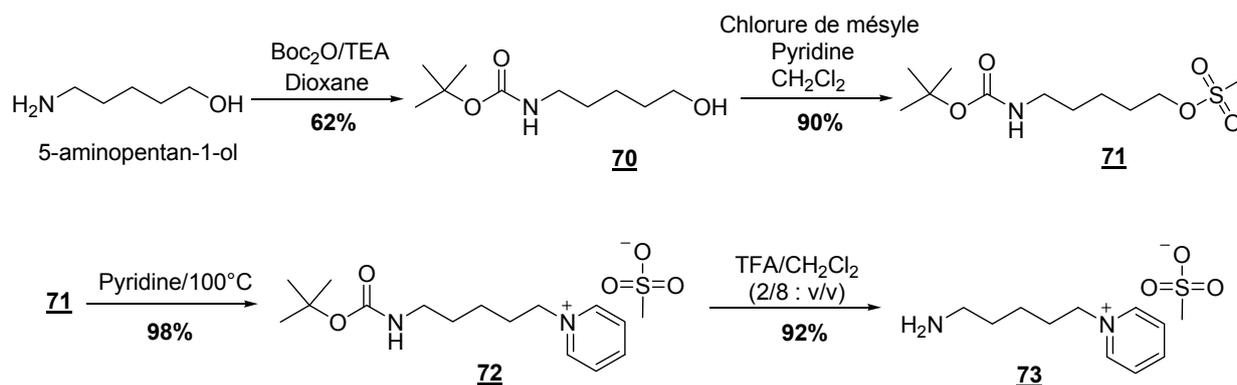


Schéma 4-5. Synthèse de la partie polaire pyridinium à partir de la 5-amino-1-pentanol

La protection sous forme de groupement *tert*-butyle de la fonction amine est effectuée dans le dioxane en présence de Boc_2O et de triéthylamine, puis après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice le composé **70** est obtenu avec 62% de rendement. Le résidu hydroxyle est ensuite activé par réaction avec le chlorure de tosyle dans un mélange dichlorométhane/pyridine à 0°C et après purification par recristallisation, le composé **71** est obtenu avec 90% de rendement. Ce bon groupement partant est alors substitué par un groupement pyridinium dans la pyridine à 100°C , ainsi après purification par recristallisation le composé **72** est obtenu avec 98% de rendement.

A ce stade de la synthèse, le spectre de masse du composé **72** a permis de confirmer la présence du cation $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$ à ($m/z = 265$). De plus, l'étude de son spectre RMN du ^1H , présenté sur la figure 4-3 ci-dessous, montre la présence des cinq protons aromatiques du groupement pyridinium entre 8 et 9 ppm, ainsi que celle du CH_3 de l'anion mésyle à 2,32 ppm.

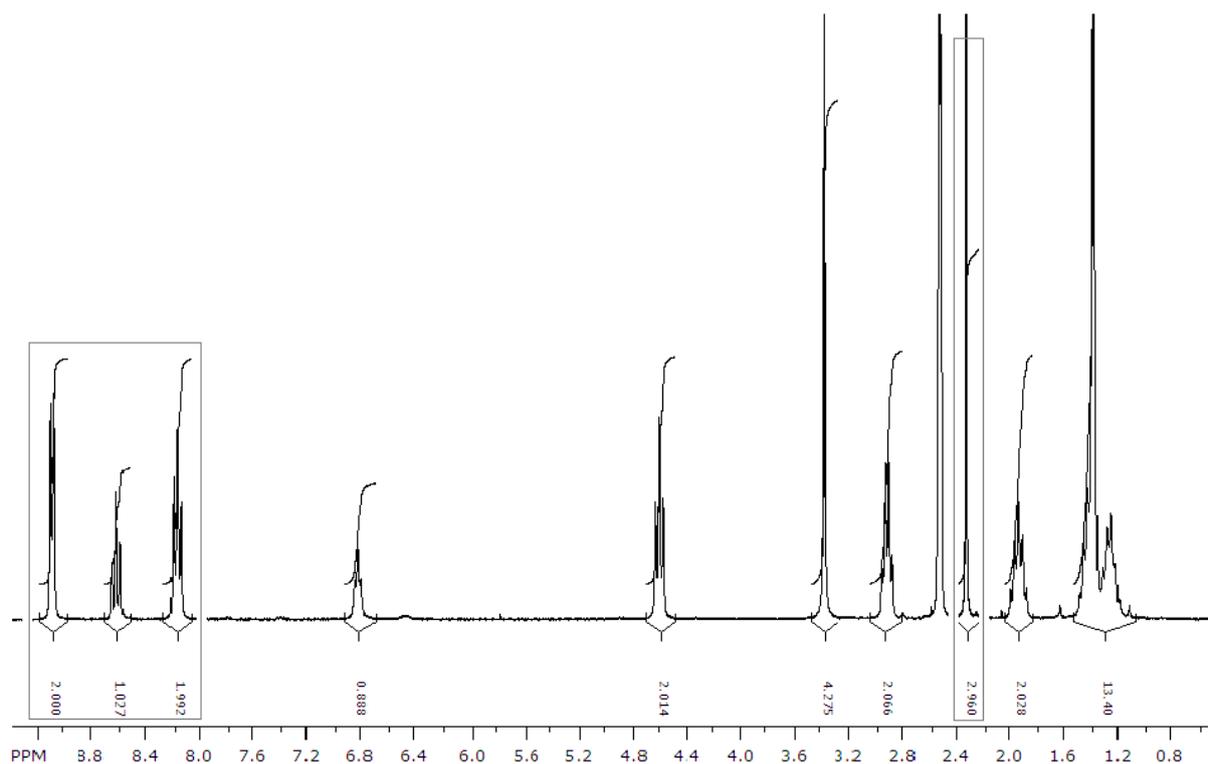


Figure 4-3. Spectre RMN du ^1H du composé **72** dans le DMSO

Enfin, le groupement *tert*-butyle est clivé en milieu acide par une solution de TFA à 20% dans le dichlorométhane, pour conduire au composé **73** de façon quantitative. Pour des raisons évidentes d'instabilité, ce dérivé amine est directement mis en réaction avec la nitrone apolaire à fonction acide carboxylique, dont la synthèse est présentée par la suite.

La régénération de la fonction a parfaitement été validée par l'étude du spectre RMN du ^1H du composé **73**, représenté sur la figure 4-4 ci-dessous, qui montre la présence du multiplet à 7,79 ppm correspondant aux deux protons de la fonction amine et bien entendu l'absence du singulet à 1,37 ppm correspondant aux CH_3 du groupement *tert*-butyle. De plus, nous constatons toujours la présence du singulet à 2,38 ppm correspondant au CH_3 de l'anion mésyle, ce qui prouve que la présence de TFA ne modifie en rien la nature de l'anion du groupement pyridinium.

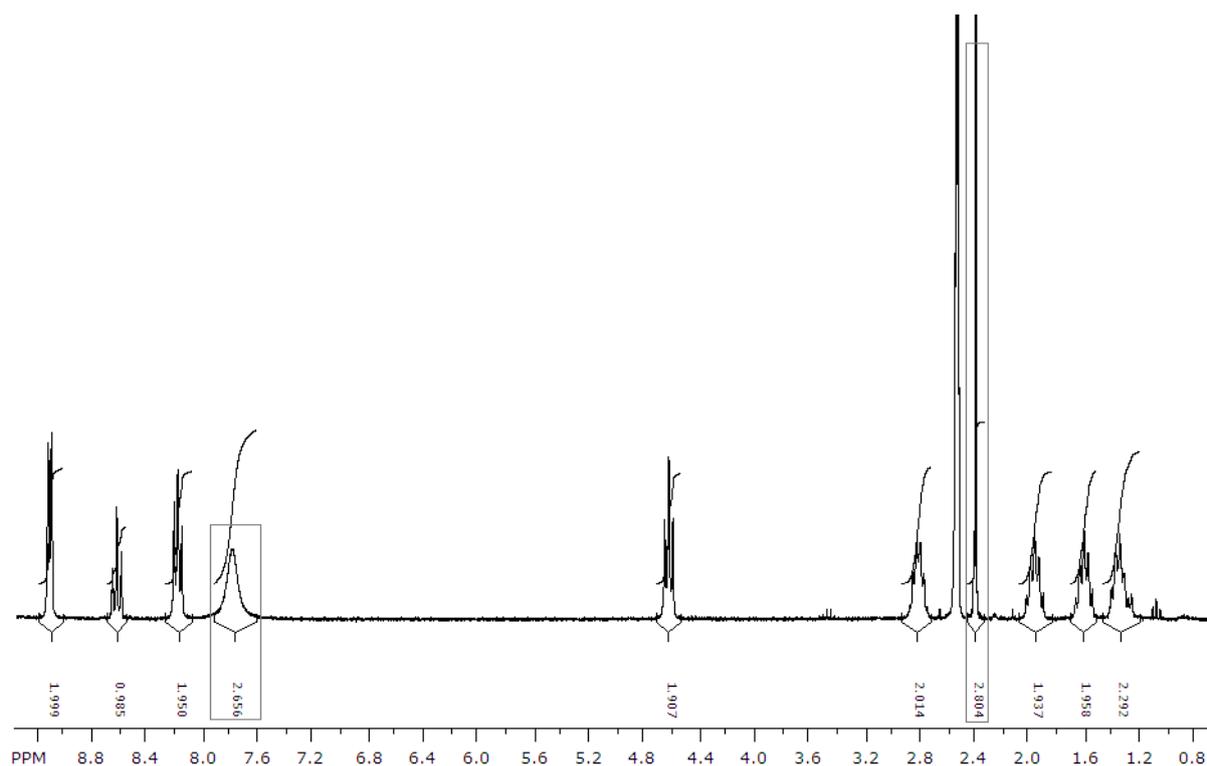


Figure 4-4. Spectre RMN du ¹H du composé **73** dans le DMSO

2.2. Synthèse de la nitrone apolaire à motif cyclohexane et à fonction acide carboxylique

La synthèse de cette partie apolaire, consiste tout d'abord à insérer l'acrylate de *tert*-butyle sur le nitrocyclohexane (Schéma 4-6), afin de former par la suite la fonction nitrone entre le dérivé nitro ainsi obtenu et le benzaldéhyde commercial (Schéma 4-7).

Dans un premier temps, le nitrocyclohexane est donc couplé à l'acrylate de *tert*-butyle par le biais d'une addition de Michaël réalisée en milieu basique. Nous avons employé le *tert*-butylate de potassium comme base en raison du pKa relativement bas du proton en position α du groupement nitro (~ 10). Par conséquent, le nitrocyclohexane est mis en réaction dans du THF anhydre en présence de *tert*-butylate de potassium puis l'acrylate de *tert*-butyle est ajouté au milieu et la réaction est laissée à température ambiante durant 16 heures. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **74** est alors obtenu avec 78% de rendement. Cependant, malgré le très bon rendement obtenu lors de ce premier essai, nous avons rencontré quelques difficultés de reproductibilité lors des trois essais suivants, comme le montre les rendements présentés dans le tableau 4-1.

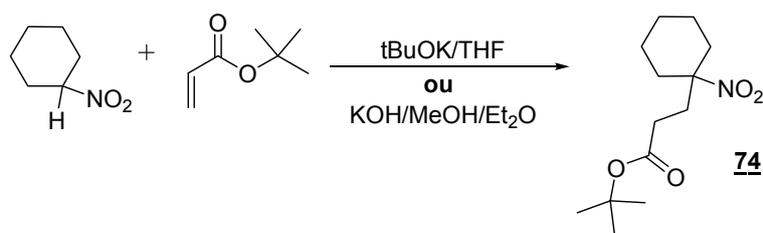


Schéma 4-6. Insertion de l'acrylate de *tert*-butyle sur le nitrocyclohexane

Par conséquent, afin de contourner le problème nous nous sommes tourné vers les travaux de Kolter *et al.*,⁸ qui utilisent un mélange KOH/MeOH à 15% en masse pour réaliser une réaction de Henri dans l'éther. Le nitrocyclohexane est alors dissout dans de l'éther anhydre puis à 0°C la solution de KOH à 15% massique dans du méthanol et l'acrylate de *tert*-butyle sont ajoutés au milieu. Après 16 heures d'agitation à température ambiante et purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **74** est alors obtenu avec 67% de rendement (Schéma 4-6). Contrairement au mode opératoire précédent, nous avons pu observer une bonne reproductibilité au cours des deux essais réalisés, comme le montre les rendements présentés dans le tableau 4-1.

Conditions opératoires	Rendements des différents essais
tBuOK/THF	78%
	31%
	21%
	60%
KOH/MeOH/Et ₂ O	67%
	64%

Tableau 4-1. Essais de couplage de l'acrylate de *tert*-butyle sur le nitrocyclohexane

Dans un second temps, nous avons formé la fonction nitroène par couplage « one-pot » entre ce dérivé nitro **74** et le benzaldéhyde. De manière identique au mode opératoire présenté dans le Chapitre 3, deux équivalents de composé **74** sont mis en réaction avec un équivalent de benzaldéhyde dans de l'éthanol anhydre, en présence de six équivalents d'acide acétique. Le mélange est ensuite refroidi à 0°C pendant l'ajout des quatre équivalents de Zinc, ramené lentement à température ambiante une fois l'addition terminée puis chauffé à 60°C durant

20 heures. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, la nitrone **75** est obtenu avec 20% de rendement (Schéma 4-7).

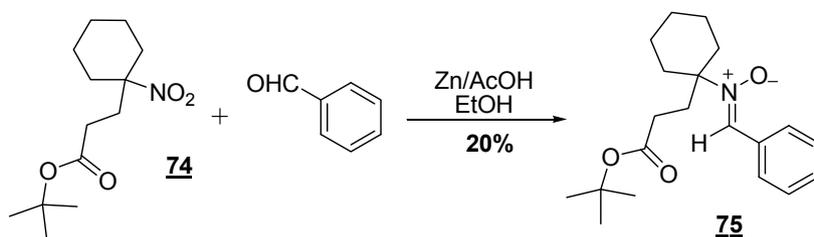


Schéma 4-7. Formation de la nitrone **75** par couplage « one-pot »

Cependant, contrairement aux précédents couplages « one-pot » présentés au Chapitre 3, pour lesquels les rendements étaient compris entre 64 et 80%, nous obtenons ici un rendement de 20% seulement. Par conséquent, nous avons choisi de revenir à la méthode couramment utilisée au laboratoire qui consiste à isoler l'hydroxylamine après réduction du dérivé nitro **74**, afin de la coupler au benzaldéhyde dans une étape supplémentaire. Le composé **74** est ainsi mis en présence de chlorure d'ammonium dans un mélange THF/H₂O (3/1 : v/v), dans lequel la proportion de THF est de 1,75 mL/mmol de dérivé nitro mis en jeu. Le mélange est ensuite refroidi à 0°C pendant l'ajout du zinc puis ramené lentement à température ambiante. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé **76** est obtenu avec 60 % de rendement (Schéma 4-8).

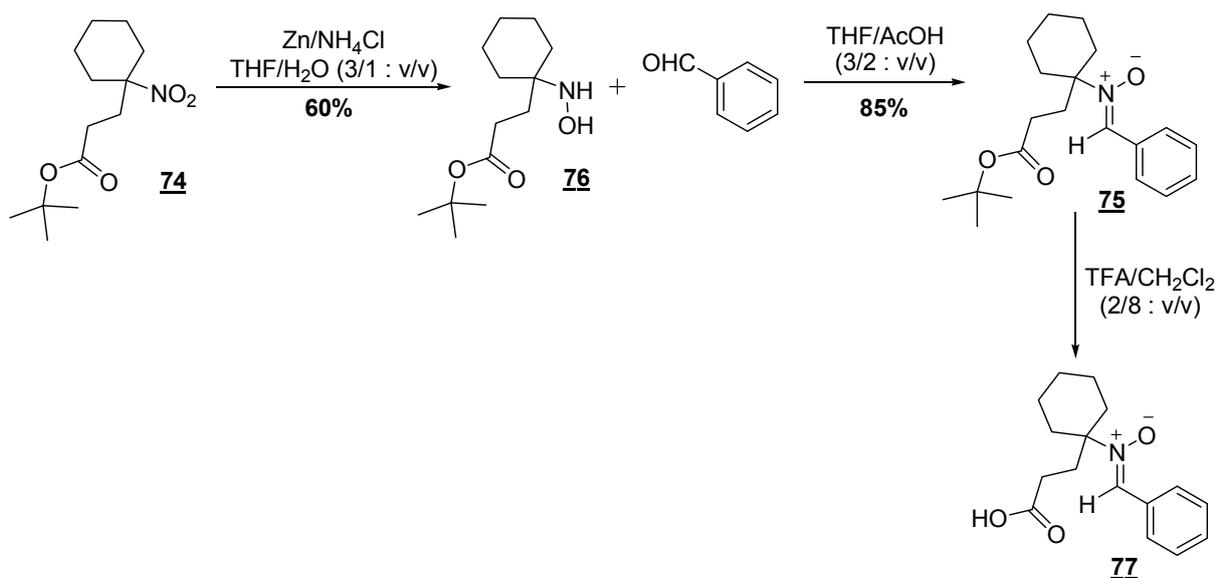


Schéma 4-8 Schéma 4-. Formation de la nitrone cyclohexane à fonction acide carboxylique

L'hydroxylamine **76** et le benzaldéhyde sont alors mis en réaction dans un mélange THF/AcOH, sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière. Le milieu réactionnel est chauffé durant 18 heures à 60°C et l'ajout régulier d'hydroxylamine (0,2 eq) permet ici une consommation quasi-totale de l'aldéhyde, ce qui conduit après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille, à l'obtention du composé **75** avec 85% de rendement. Pour finir, le groupement *tert*-butyl est clivé en milieu acide par une solution de TFA à 20% dans le dichlorométhane afin d'obtenir le composé **77** de façon quantitative.

A ce stade de la synthèse, nous avons parfaitement caractérisé cette nitronne apolaire dérivée de la PBN par études complètes en RMN et par analyses en spectrométrie de masse (cf Partie expérimentale).

L'étape de couplage entre cette nitronne à fonction acide carboxylique et l'amine à motif pyridinium s'est révélée nettement plus délicate que prévu et n'a pu être réalisée dans de bonnes conditions jusqu'à ce jour. Le travail se poursuit toutefois au laboratoire et des essais sont en cours de réalisation dans le cadre du stage de Master 2 de Djilali Lahouel.

C. Conclusion

Les travaux de recherche proposés dans le cadre de ce quatrième chapitre portaient sur le développement de nouveaux transporteurs d'antioxydants capables d'améliorer leur activité anti-radicalaire.

Dans cette optique, nous avons tout d'abord obtenus trois dendrimères du PAMAM porteurs soit de la PBN, de l'acide lipoïque ou de la CMPO, aisément accessibles en 2 ou 3 étapes et avec de très bons rendements. Des études biologiques concernant ces trois composés sont actuellement en cours au laboratoire du Dr. Frederick Villamena à Columbus.

Nous avons ensuite développé une stratégie de synthèse convergente d'une nouvelle nitronne dérivée de la PBN comportant une tête polaire à motif pyridinium et une partie apolaire à motif cyclohexane sur sa partie *tert*-butyle. Néanmoins, nous n'avons pu aboutir qu'à la synthèse de ses deux précurseurs, la nitronne cyclohexane à fonction acide carboxylique et le bras écarteur à motif pyridinium et à fonction amine.

RÉFÉRENCES

- ¹ Navari-Izzo F., Quartacci M. F., Sgherri D., Lipoic acid : a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species, *Plant Physiol. Biochem.*, **2002**, 40, 463-470.
- ² Packer L., Tritschler H.J, Wessel K., Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid, *Free Rad. Biol. Med.*, **1997**, 22, 359-378.
- ³ Faust A., Burkart V., Ulrich H., Weischer C. H., Kolb H., Effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced diabetes and insulinitis in non-obese diabetic mice, *Int J Immunopharmacol.*, **1994**, 16, 61-66.
- ⁴ Kawabata T., Tritschler H. J., Packer L., Reaction of (R, S)-dihydrolipoic acid and homologs with iron, *Methods Enzymol.*, **1997**, 252, 325-332.
- ⁵ Ortial S., Durand G., Poeggeler B., Polidori A., Pappolla M. A., Böker J., Hardeland R., Pucci B., Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers :a new class of protective agents, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2812-2820.
- ⁶ Novgorodov A. S., Szulc Z. M., Luberto C., Jones J. A., Bielawska A., Hannun Y. A., Obeid L. M., Positively charged ceramide is a potent inducer of mitochondrial permeabilization, *J. Biol. Med.*, **2005**, 280, 16096-16105.
- ⁷ Thomas C. E., Ohlweiler D. F., Carr A. A., Nieduzac T. R., Hay D. A., Adams G., Vaz R., Bernotas R. C., Characterization of the radical trapping activity of a novel series of nitron spin trap, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 3097-3104.
- ⁸ Kolter T., Van Echten-Deckert G., Sandhoff K., Synthesis of sphinganine analogues modified in the head group, *Tetrahedron.*, **1994**, 50, 13425-13432.

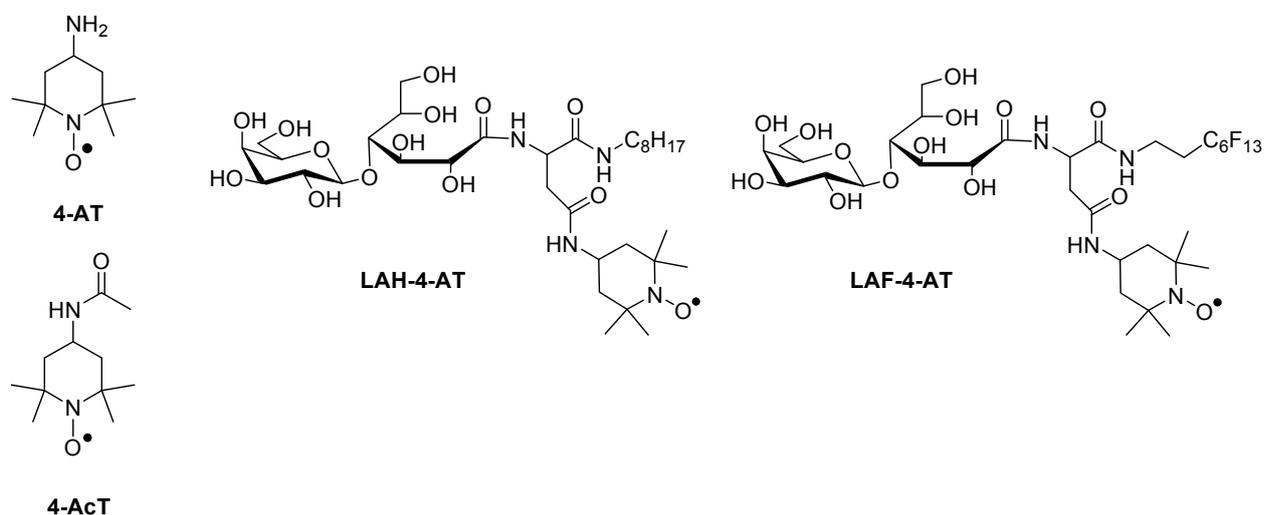
Conclusion générale

Le but du travail entrepris dans cette thèse portait sur l'amélioration de la biodisponibilité d'agents anti-radicalaires artificiels de type nitroène et nitroxyde en les insérant sur différentes structures amphiphiles monomoléculaires. Ces deux classes d'antioxydants synthétiques ont été choisies pour leur activité de piègeurs de radicaux libres, substances particulièrement délétères impliquées dans un grand nombre de pathologies. En favorisant le transport de ces agents antioxydants au sein des fluides biologiques ainsi que leur passage au travers des membranes cellulaires, nous souhaitons disposer d'outils plus efficaces dans le traitement de maladies associées à ces espèces hautement réactives.

Nous avons choisi dans un premier temps de poursuivre les recherches menées au laboratoire sur un modèle de transporteurs monomoléculaires amphiphiles à fixation latérale. Ce concept de vectorisation qui repose sur la fixation de l'antioxydant à un acide aminé comprenant une partie hydrophile et une chaîne hydrophobe, a démontré par le passé qu'il était tout à fait généralisable à différents antioxydants ou agents thérapeutiques. Il nous a donc paru opportun d'y greffer une classe d'antioxydants synthétiques encore non utilisée au laboratoire et qui possède de bonnes propriétés anti-radicalaires : les nitroxydes. Dans ce but, le cœur de l'agent de transport de type lysine ou acide aspartique a été conservé ainsi que la tête polaire lactobionamide pour la bonne hydrosolubilité qu'elle confère à la molécule. Par ailleurs, il nous a semblé intéressant de remplacer la chaîne perfluorocarbonée par une chaîne hydrogénée afin de pouvoir comparer l'influence de la nature de la partie apolaire sur l'activité biologique des nitroxydes amphiphiles. Nous avons ainsi obtenu quatre transporteurs amphiphiles porteurs de nitroxyde, selon une voie de synthèse relativement courte et qui permet d'obtenir de bons rendements globaux.

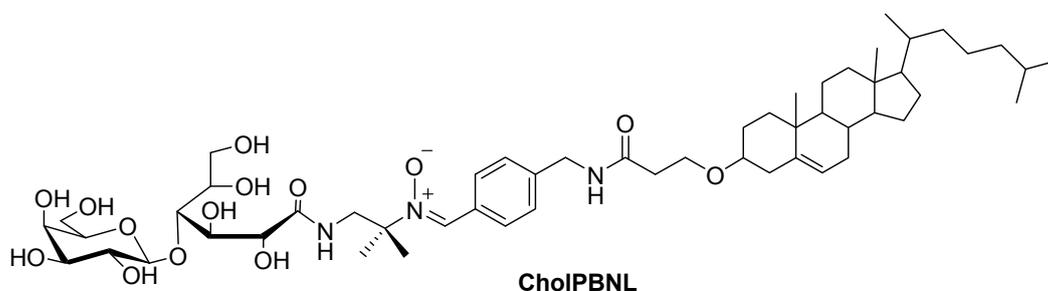
Les études des propriétés physico-chimiques de ces composés ont permis de préciser une nouvelle fois l'intérêt de ce concept de vectorisation à fixation latérale dans la modification de la balance hydrophile-lipophile de l'antioxydant greffé. En effet, nous avons démontré que ces dérivés amphiphiles induisent une nette augmentation de l'hydrophobie des nitroxydes greffés, augmentation nettement plus marquée pour les structures amphiphiles à chaîne perfluorocarbonée que celles à chaîne hydrogénée. De plus, nous avons montré que la nature de l'acide aminé est également un paramètre non négligeable puisque les dérivés de la lysine ont présenté une hydrophobie légèrement plus marquée que les dérivés de l'acide aspartique. Néanmoins, le caractère amphiphile apporté aux nitroxydes greffés n'a pas sensiblement amélioré leur potentiel oxydant, ni même leur stabilité en milieu réducteur.

Les études biologiques conduites *in vitro* n'ont quant à elles pas permis de valider ce modèle de vectorisation, contrairement aux résultats très satisfaisants obtenus par le passé sur des modèles de type nitrone. En effet, la vectorisation des nitroxydes par ces transporteurs monomoléculaires amphiphiles n'a pas amélioré leurs propriétés protectrices vis-à-vis des phénomènes de stress oxydant. De plus, tandis que les nitroxydes pyrrolidiniques sont dépourvus d'activité antioxydante, parmi les nitroxydes pipéridiniques, c'est le 4-amino Tempo qui présente la meilleure activité protectrice, activité bien supérieure à celles des nitroxydes amphiphiles, le LAF-4-AT et le LAH-4-AT. De ce fait, en accord avec des données de la littérature, nous avons conclu que la présence de ce groupement amino est indispensable à une bonne activité antioxydante, suggérant que le greffage sur un autre centre mérité dès lors d'être envisagé.



Dans un second temps, nous avons tenu à poursuivre les recherches menées au laboratoire sur un modèle de transporteurs monomoléculaires amphiphiles à fixation centrale, permettant d'améliorer la biodisponibilité de la PBN. La PBN est selon ce concept de vectorisation insérée au cœur même de la structure amphiphile, ce qui permet par la modulation de sa balance hydrophile-lipophile d'améliorer et de contrôler son passage transmembranaire et par conséquent sa biodisponibilité dans l'organisme. Dans cette optique, nous avons choisi de synthétiser de nouveaux analogues de la LPBNAH et de la LPBNH15, qui à ce jour restent les deux nitrones amphiphiles dérivées de la PBN qui ont présenté les meilleures activités antioxydantes à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous avons pour cela fait varier soit la nature de la tête polaire lactobionamide, soit la nature ou la longueur de leur chaîne hydrophobe.

Nous avons obtenu deux premiers analogues à tête lactobionamide et à groupement cholestérol selon une voie de synthèse convergente qui permet d'obtenir ces deux composés en 14 étapes et avec des rendements globaux très satisfaisants. Les études biologiques réalisées avec ces deux composés sur un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne induite par la lumière ont permis de valider pleinement ce concept de vectorisation de la PBN. En effet, le dérivé CholPBNL a démontré une activité neuroprotectrice comparable à celle de la PBN mais à des concentrations 9 fois inférieures. De plus, l'absence d'activité neuroprotectrice de son analogue inversé, le LPBNChol, a permis de démontrer une fois encore que les transporteurs monomoléculaires possédant la tête polaire sur la partie *tert*-butyle de la PBN et la partie apolaire sur sa partie aromatique sont potentiellement plus protecteurs vis-à-vis des phénomènes de stress oxydant.



Une deuxième série de nitrones amphiphiles à tête polaire Tris et à longueur de chaîne hydrophobe variable, dénommés TC_n-PBN, a été préparée. Ces analogues ont pu être facilement synthétisés et avec de très bons rendements grâce notamment à la mise au point d'un couplage « one-pot » permettant de former la fonction nitrone directement entre un dérivé nitro et un dérivé aldéhyde. Enfin, un dernier analogue de type nitrone à tête polaire glucosylée et porteur d'une chaîne heptyle (appelé GluPBNH15) a été obtenu selon une stratégie de synthèse convergente en seulement 5 étapes. De nouveaux résultats biologiques permettant de comparer l'activité antioxydante de la TC₇-PBN et de la GluPBNH15 à celle de la PBN, de la LPBNAH et de la LPBNH15 sur des cellules atteintes de la mutation génétique NARP devraient nous parvenir très prochainement, nous pourrions dès lors affiner notre modèle et mieux préciser l'impact de la structure de la tête polaire sur l'activité de ces substrats.

Dans une autre optique, utiliser le potentiel négatif de la membrane interne de la mitochondrie pour assurer son ciblage par des structures cationiques adaptées paraissait également opportun. Nous avons donc opté pour la fixation sur la PBN d'un motif pyridinium, tenant lieu de partie hydrophile, et d'un groupement cyclohexane, devant assurer un caractère hydrophobe. La présence du motif cationique a pour rôle un ciblage spécifique de la mitochondrie, tandis que celle du groupement cyclohexane doit lui conférer une meilleure rigidité et par conséquent une meilleure stabilité des adduits de spin formés. Contrairement aux transporteurs monomoléculaires présentés dans le Chapitre 3 de ce manuscrit, ces composantes polaires et apolaires ne sont plus placées de part et d'autre du motif PBN mais uniquement sur sa partie *tert*-butyle. A ce jour, nous avons pu mettre au point la synthèse d'une nitrone apolaire comportant un groupement cyclohexane et une fonction acide libre. Cette molécule pourra dès lors servir de structure basale pour l'étude ultérieure de l'impact des groupements cationiques sur le ciblage mitochondrial. Il nous reste maintenant à coupler sur cette nitrone la partie polaire à groupement pyridinium, dont la synthèse a été réalisée en parallèle. Ces nouveaux objectifs sont actuellement poursuivis au sein du laboratoire.

Partie expérimentale

1. Synthèse

Les solvants utilisés sont préalablement distillés dans les conditions suivantes :

- sur sodium et benzophénone, pour l'éther et le tétrahydrofurane (THF),
- sur hydrure de calcium, pour le dichlorométhane, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle,
- sur sodium, pour le méthanol et l'éthanol.

Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince Merck 60F₂₅₄. Les plaques de gel de silice ont été révélées par lumière UV à 254 nm puis par un spray d'une solution éthanolique d'H₂SO₄ ou de ninhydrine 5% suivi d'un chauffage à 150°C.

Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été effectuées avec de la silice Merck silica gel Geduran Si 60 (40-63 µm).

Les chromatographies par exclusion de taille ont été effectuées sur résine LH-20 (Amersham Biosciences).

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire, ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un appareil BRUCKER AC-250. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au signal du solvant utilisé. Les abréviations suivantes ont été utilisées afin de caractériser les signaux observés : s (singulet), d (doublet), q (quadruplet), m (multiplet) et dd (doublet de doublets). Les séquences DEPT, COSY, et HMQC ont été employées pour une meilleure attribution sur certains spectres.

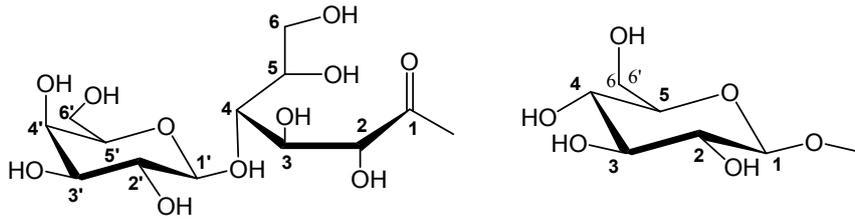
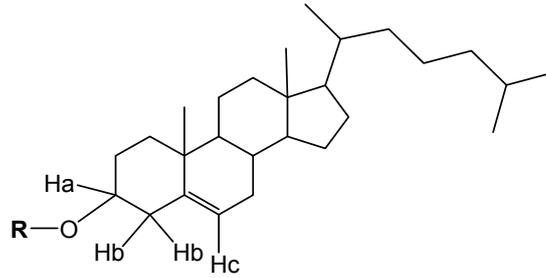
Les spectres de masse ont été réalisés au Spectropôle d'Aix-Marseille III et ont été enregistrés sur un spectromètre 3200 QTRAP (Applied Biosystems SCIEX) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil Electrothermal IA9100, marquant le début de décomposition du produit et n'ont pas été corrigés.

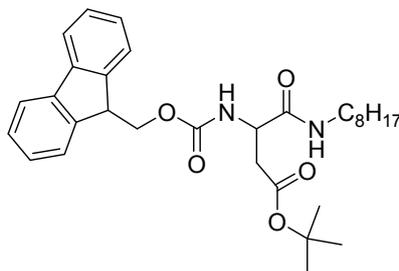
Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à 25°C à l'aide d'un polarimètre PERKIN ELMER MC 241.

Les spectres UV-Visible ont été réalisés sur un spectrophotomètre VARIAN modèle CARY 100.

Les spectres Infra rouge ont été réalisés sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier MATTSON série 1000 UNICAM associé à une station de calcul KENITEC 386 SX-20 équipée du logiciel FIRST.

Numérotation de la lactobionolactone et du glucose :**Légende du cholestérol :**

Synthèse de la *N*-(9-Fluorénylméthylloxycarbonyl)- β -(*tert*-butyloxycarbonyl)-L-aspartyl-octanamide (1)



Dans un ballon monocol, 0,75 g ($5,83 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) d'octylamine, 2 g ($4,86 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de FmocAsp(OtBu)OH, 1,2 g ($5,83 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de DCC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 2 heures. La DCU formée est filtrée sur verre fritté et le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2) pour conduire au composé **1** sous forme d'une poudre blanche (2,34 g, $4,47 \cdot 10^{-3}$ mol, 92%).

Formule brute : $C_{31}H_{42}N_2O_5$

MM : $522,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) = 0,53

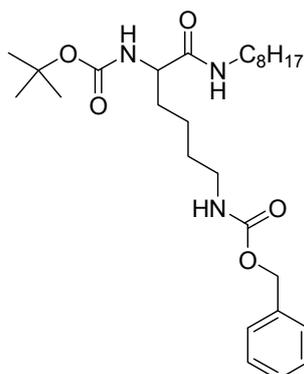
$[\alpha]_D^{20}$: + 13,7 (c, 1, CH_2Cl_2)

Point de fusion : 116-117°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,80 (2H, d, CH Fmoc, $J = 7,6$ Hz) ; 7,61 (2H, d, CH Fmoc, $J = 7,3$ Hz) ; 7,47-7,29 (4H, m, CH Fmoc) ; 6,48 (1H, m, NH-CO) ; 5,98 (1H, d, NH-CO, $J = 7,7$ Hz) ; 4,47 (3H, m, $\text{CH}_2\text{-O}$ et CH Fmoc) ; 4,25 (1H, t, CH Asp, $J = 6,8$ Hz) ; 3,26 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 2,98-2,53 (2H, m) ; 1,48 (12H, s, 6 CH_2) ; 1,29 (9H, s, tBu) ; 0,9 (3H, t, CH_3 , $J = 7,1$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 171,3 (CO-NH) ; 170,2 (OCO) ; 155,4 (OCO-NH) ; 143,7, 141,3 (C^{IV} Fmoc) ; 127,8, 127,1, 125,0, 120,1, 120,0 (CH Fmoc) ; 82,9 (C^{IV} Fmoc) ; 67,1 (CH_2 Fmoc) ; 51,1 (CH Asp) ; 47,2 (CH Fmoc) ; 39,7 (CH_2 Asp) ; 37,6 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 31,8, 29,5, 29,2 (CH_2 chaîne) ; 28,1 (CH_3 tBu) ; 26,8, 22,6 (CH_2 chaîne) ; 14,1 (CH_3).

Synthèse de la *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)- N^ϵ -(Benzyloxycarbonyl)-L-Lysinyl-octanamide (2)



Dans un ballon monocol, 1,22 g ($9,46 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) d'octylamine, 3 g ($7,88 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de BocLys(Z)OH, 1,9 g ($9,46 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de DCC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 24 heures. La DCU formée est filtrée sur verre fritté et le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2) pour conduire au composé **2** sous forme d'une poudre blanche (2,88 g, $5,86 \cdot 10^{-3}$ mol, 74%).

Formule brute : $C_{27}H_{45}N_3O_5$

MM : $491,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle 5/5) = 0,46

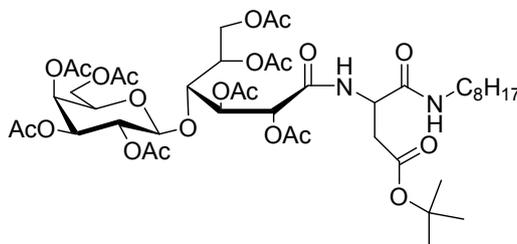
$[\alpha]_D^{20}$: - 6 (c, 1, CH_2Cl_2)

Point de fusion : 77-78°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,34 (5H, s, H arom) ; 6,49 (1H, m, NH-CO) ; 5,36 (1H, d, NH-CO, $J = 7,87$ Hz) ; 5,09 (3H, s, $\text{CH}_2\text{-O}$ et CH Lys) ; 4,05 (1H, d, NH ur, $J = 5,91$ Hz) ; 3,19 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 1,86-1,11 (6H, m, 3 CH_2 Lys) ; 1,43 (9H, s, tBu) ; 1,27 (12H, s, 6 CH_2 chaîne) ; 0,88 (3H, t, CH_3 , $J = 6,52$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,4 (CO-NH) ; 156,6 (OCONH) ; 136,6 (C^{IV} Ph) ; 128,5, 128,1 (CH Ph) ; 80,4 (C^{IV} tBu) ; 66,7 (CH_2 (Z)) ; 54,4 (CH Lys) ; 31,9 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ Lys) ; 31,8 ($\text{CH}_2\text{-NH}$ chaîne) ; 29,5, 29,3 (CH_2 chaîne) ; 29,2 (CH_2 Lys) ; 28,2 (CH_3 tBu) ; 26,9, 25,6, 25,0, 22,7 (CH_2 chaîne) ; 22,6 (CH_2 Lys) ; 14,1 (CH_3).

Synthèse de la *N*-(Octa-*O*-acétyl-lactobionyl)- β -(tert-butyloxycarbonyl)-L-aspartyl-octanamide (**5**)



Dans un ballon monocol, 0,8 g ($1,53 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **1** sont dissouts dans un mélange DEA/ CH_3CN (1/9 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante durant une heure puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le composé **3** ainsi obtenu sera directement mis en réaction avec la lactobionolactone.

Parallèlement, dans un ballon monocol, 0,71 g ($1,99 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,3 eq) d'acide lactobionique sont mis en suspension dans un mélange 2-méthoxyéthanol/toluène (5/5 : v/v) avec quelques gouttes de TFA. Le mélange est tout d'abord solubilisé à 50°C pendant 10 min, avant d'être concentré sous pression réduite. Cette même étape est répétée quatre fois, sans ajout de TFA.

La lactobionolactone ainsi préparée et le composé **3** sont ensuite mis en réaction dans le 2-méthoxyéthanol, en présence de TEA (pH = 8-9) et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 65°C durant 28 heures. Lorsque le dérivé acide aspartique **3** est complètement consommé (observation en CCM), la solution est évaporée sous pression réduite et le brut réactionnel, refroidi dans un bain de glace, est acétylé par addition goutte à

goutte d'un mélange Ac₂O/Pyridine (1/1 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 12 heures puis le milieu réactionnel est jeté dans 150 mL d'HCl 1N et extrait 3 fois au dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) pour conduire au composé **5** sous forme d'une poudre blanche (0.58 g, 5,99.10⁻⁴ mol, 40%).

Formule brute : C₄₄H₆₈N₂O₂₂

MM : 976,4 g.mol⁻¹

Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) = 0,4

[α]_D²⁰ : + 52 (c, 1, CH₂Cl₂)

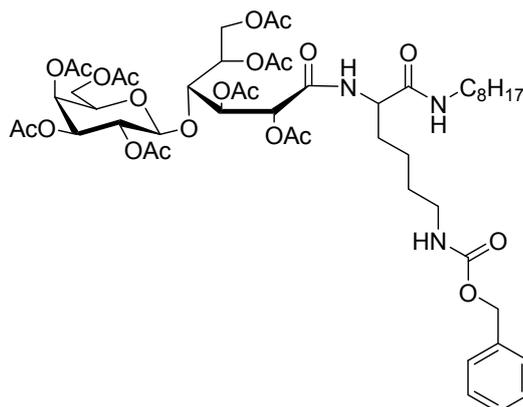
Point de fusion : 48,2-49,3°C (début de décomposition)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 7,52 (1H, d, NH, *J* = 8,3 Hz) ; 6,6 (1H, t, NH, *J* = 5,6 Hz) ; 5,49 (1H, m, H-2) ; 5,38 (2H, m, H-2' et H-4') ; 5,11 (2H, m, H-3 et H-3') ; 4,99 (1H, m, H-5) ; 4,66-4,52 (3H, m, H-1', H-4 et CH Asp) ; 4,15-3,98 (5H, CH₂-6, CH₂-6' et H-5') ; 3,18 (2H, m, CH₂-NH) ; 2,93 (1H, dd, CH₂ Asp, *J* = 3,6 et 17 Hz) ; 2,42 (1H, dd, CH₂ Asp, *J* = 6,4 et 17 Hz) ; 2,23-1,98 (24H, m, 8 CH₃-CO) ; 1,43 (9H, s, tBu) ; 1,25 (12H, s, 6 CH₂) ; 0,86 (3H, t, CH₃, *J* = 6,5 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 172,1-168,0 (CO-NH, O-CO) ; 101,5 (CH-1') ; 81,9 (C^{IV} tBu) ; 78,0 (CH-4) ; 72,3 (CH-2) ; 71,1 (CH-5') ; 71,0 (CH-3') ; 69,8 (CH-2') ; 69,6 (CH-3) ; 68,9 (CH-4') ; 66,9 (CH-5) ; 61,4, 61,1 (CH₂-6 et CH₂-6') ; 49,0 (CH Asp) ; 39,9 (CH₂ Asp) ; 31,8 (CH₂-NH) ; 29,3, 29,2 (CH₂ chaîne) ; 28,0 (CH₃ tBu) ; 26,8; 22,6 (CH₂ chaîne) ; 20,8, 20,7, 20,6, 20,5 (CH₃-CO) ; 14,1 (CH₃).

MS (ESI+, *m/z*) : 977,3 [(M+H)⁺], 994,3 [(M+NH₄)⁺], 999,3 [(M+Na)⁺], 1015,3 [(M+K)⁺].

Synthèse de la *N*-(Octa-O-acétyl-lactobionyl)-N^ε-(benzyloxycarbonyl)-L-Lysinyl-octanamide (**6**)



Dans un ballon monocol, 2,86 g (5,82.10⁻³ mol, 1 eq) de composé **2** sont dissouts dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (3/7 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 3 heures puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le composé **4** ainsi obtenu est directement mis en réaction avec la lactobionolactone.

La lactobionolactone (7,57.10⁻³ mol, 1,3 eq) fraîchement préparée selon la technique précédemment décrite et le composé **4** sont mis en réaction dans le 2-méthoxyéthanol, en présence de TEA (pH = 8-9) et sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est ensuite

chauffé à 65°C durant 24 heures. Lorsque le dérivé lysine observée en CCM est totalement consommé, la solution est évaporée sous pression réduite et le brut réactionnel, refroidi dans un bain de glace, est acétylé par addition goutte à goutte d'un mélange Ac₂O/Pyridine (1/1 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante pendant 12 heures puis le milieu réactionnel est jeté dans 150 mL d'HCl 1N et extrait 3 fois au dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) pour conduire au composé **6** sous forme d'une poudre blanche (2,8 g, 2,62.10⁻³ mol, 45%).

Formule brute : C₅₀H₇₃N₃O₂₂

MM : 1067,5 g.mol⁻¹

Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) = 0,2

[α]_D²⁰ : + 5,4 (c, 1, CH₂Cl₂)

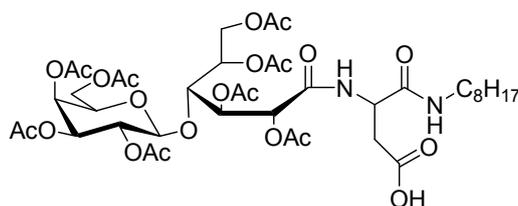
Point de fusion : 62,1-63,3°C (début de décomposition)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 7,36 (5H, s, Ph) ; 6,61 (1H, d, NH, *J* = 8,0 Hz) ; 6,08 (1H, m, NH) ; 5,54 (1H, m, H-4') ; 5,38 (1H, m, H-3) ; 5,32 (1H, m, H-2) ; 5,16-5,01 (5H, m, H-2', H-5, H-3', CH₂-Ph) ; 4,61 (1H, d, H-1', *J* = 7,8 Hz) ; 4,54 (1H, dd, H-4, *J* = 2,9 et 12,5 Hz) ; 4,26-4,04 (5H, m, 2 H-6, 2 H-6', H-5') ; 3,91 (1H, t, CH Lys, *J* = 6,6 Hz) ; 3,23-3,17 (4H, m, 2 CH₂-NH) ; 2,24-2,0 (24H, m, 8 CH₃-CO) ; 1,90-1,38 (6H, m, 3 CH₂ Lys) ; 1,28 (12H, s, 6 CH₂) ; 0,89 (3H, t, CH₃, *J* = 6,5 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 170,6-156,6 (CO-NH, O-CO) ; 136,7 (C^{IV} Ph) ; 128,5, 128,1, 128,0 (CH Ph) ; 101,7 (CH-1') ; 77,9 (CH-4) ; 72,6 (CH-2) ; 71,1 (CH-5') ; 70,9 (CH-3') ; 69,9 (CH-5) ; 69,3 (CH-3) ; 68,9 (CH-2') ; 66,8 (CH-4') ; 66,5 (CH₂ (Z)) ; 61,2, 61,0 (CH₂-6 et CH₂-6') ; 52,7 (CH Lys) ; 39,8 (CH₂-NH) ; 31,8 (CH₂-NH) ; 29,4, 29,2 (CH₂ Lys) ; 26,9, 22,6 (CH₂ chaîne) ; 22,2 (CH₂ Lys) ; 20,9, 20,8, 20,7, 20,6, 20,5 (CH₃-CO) ; 14,1 (CH₃).

MS (ESI+, *m/z*) : 1068,4 [(M+H)⁺], 1085,4 [(M+NH₄)⁺], 1090,4 [(M+Na)⁺], 1106,4 [(M+K)⁺].

Synthèse de la *N*-(Octa-O-acétyl-lactobionyl)-L-aspartyl-octanamide (**7**)



Dans un ballon monocol, 0,5 g (5,12.10⁻⁴ mol) de composé **5** sont dissouts dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (4/6 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante durant 3 heures puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 7/3) pour conduire au composé **7** sous forme d'une poudre blanche (0,43 g, 4,71.10⁻⁴ mol, 92%).

Formule brute : C₄₀H₆₀N₂O₂₂

MM : 920,4 g.mol⁻¹

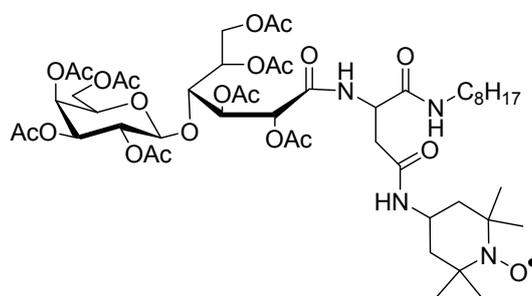
Rf (acétate d'éthyle) = 0,33

Point de fusion : 56,2-57,4°C (début de décomposition)

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,50 (1H, d, NH-CO, $J = 8,2$ Hz) ; 6,78 (1H, t, NH-CO, $J = 5,5$ Hz) ; 5,48 (1H, m, H-2) ; 5,36 (2H, m, H-2' et H-4') ; 5,10 (2H, m, H-3 et H-3') ; 4,99 (1H, m, H-5) ; 4,70-4,50 (3H, m, H-1', H-4 et CH Asp) ; 4,21-3,92 (5H, CH_2 -6, CH_2 -6' et H-5') ; 3,18 (2H, m, CH_2 -NH) ; 2,96 (1H, dd, CH_2 Asp, $J = 3,4$ et 16,8 Hz) ; 2,42 (1H, dd, CH_2 Asp, $J = 6,2$ et 16,8 Hz) ; 2,19-1,97 (24H, m, 8 CH_3 -CO) ; 1,24 (12H, s, 6 CH_2) ; 0,84 (3H, t, CH_3 , $J = 6,4$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,1-168,0 (CO-NH, O-CO) ; 101,5 (CH-1') ; 77,9 (CH-4) ; 72,2 (CH-2) ; 71,0 (CH-5') ; 70,8 (CH-3') ; 69,6 (CH-2') ; 69,4 (CH-3) ; 68,9 (CH-4') ; 66,9 (CH-5) ; 61,4, 61,1 (CH_2 -6 et CH_2 -6') ; 49,0 (CH Asp) ; 39,9 (CH_2 Asp) ; 31,8 (CH_2 -NH) ; 29,3, 29,2 (CH_2 chaîne) ; 26,8; 22,6 (CH_2 chaîne) ; 20,8, 20,7, 20,6, 20,5 (CH_3 -CO) ; 14,1 (CH_3).

Synthèse de la *N*-(Octa-O-acétyl-lactobionyl)- β -(4-amino-TEMPO)-L-aspartyl-octanamide (**9**)



Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 0,3 g ($3,26 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) de l'acide **7**, 0,024 g ($4,24 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,3 eq) de 4-AT, 0,075 g ($3,91 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 eq) de EDC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 36 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 7/3) puis par colonne chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1), pour conduire au composé **9** sous forme d'une poudre orange (0,17 g, $1,62 \cdot 10^{-4}$ mol, 50%).

Formule brute : $\text{C}_{49}\text{H}_{77}\text{N}_4\text{O}_{22}$

MM : $1073,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle) = 0,42

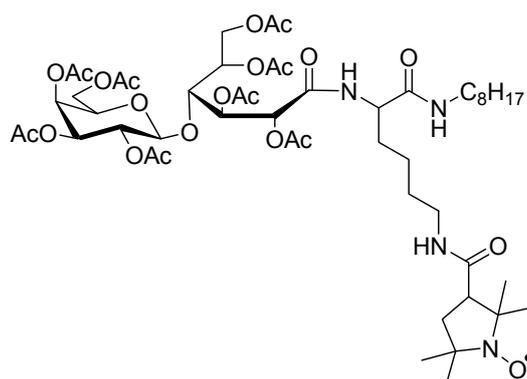
Point de fusion : 73,1-74,2°C (début de décomposition)

UV (CH_2Cl_2) : $\lambda_{\text{max}} = 229 \text{ nm}$

IR (KBr) : 3397, 2933, 1753, 1663, 1537, 1373 (NO^\bullet), 1226, 1052 cm^{-1} .

MS (ESI+, m/z) : 1074,4 [$(\text{M}+\text{H})^+$], 1096,4 [$(\text{M}+\text{Na})^+$], 1112,3 [$(\text{M}+\text{K})^+$].

Synthèse de la *N*-(Octa-*O*-acétyllactobionyl)-*N*^ε-(carboxypropyl)-*L*-Lysinyl-octanamide (**10**)



Dans un ballon monocol, 0,3 g ($2,81 \cdot 10^{-4}$ mol) de composé **6** sont dissouts dans un mélange éthanol/acide acétique (99/1 : v/v) puis 0,018 g de Pd/C sont lentement ajoutés. Le milieu est ensuite placé sous pression d'hydrogène (8 bars) durant 12 heures. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur célite puis concentré sous pression réduite pour conduire de façon quantitative à l'amine **8** sous forme d'une poudre blanche.

Puis dans un bicol placé sous atmosphère inerte, 0,24 g ($2,57 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) de l'amine **8** obtenue sont directement mis en réaction avec 0,019 g ($3,34 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,3 eq) de 3-CP, 0,059 g ($3,08 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 eq) de EDC et une quantité catalytique d'HOBt dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 18 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 8/2) puis par colonne chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1) pour conduire au composé **10** sous forme d'une poudre jaune (0,076 g, $0,69 \cdot 10^{-4}$ mol, 32%).

Formule brute : $C_{51}H_{81}N_4O_{22}$

MM : $1101,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle) = 0,33

$[\alpha]_D^{20}$: + 10,5 (c, 1, CH_2Cl_2)

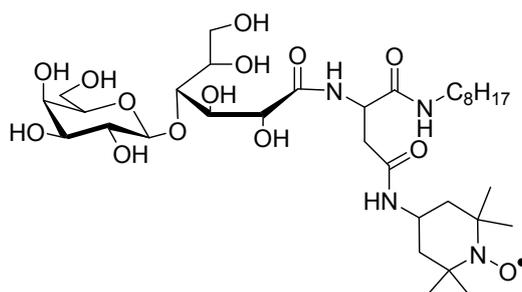
Point de fusion : 98,5-99,4°C (début de décomposition)

UV (CH_2Cl_2) : $\lambda_{\text{max}} = 231 \text{ nm}$

IR (KBr) : 3382, 2918, 1749, 1662, 1541, 1375 (NO^-), 1230, 1048 cm^{-1} .

MS (ESI+, m/z) : 1102,7 $[(M+H)^+]$, 1119,7 $[(M+NH_4)^+]$, 1124,6 $[(M+Na)^+]$, 1140,7 $[(M+K)^+]$.

Synthèse de la *N*-Lactobionyl- β -(4-amino-TEMPO)-*L*-aspartyl-octanamide (**11**)



Dans un ballon monocol, 0,16 g ($1,49 \cdot 10^{-4}$ mol) de composé **9** sont dissouts dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 4 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec quelques gouttes d'HCl 1N et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Séphadex LH 20 (éluant : méthanol) pour conduire au composé **11** sous forme d'une poudre orange ($0,084$ g, $1,12 \cdot 10^{-4}$ mol, 90%).

Formule brute : $C_{33}H_{61}N_4O_{14}$

MM : $737,4184 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) : 0,5

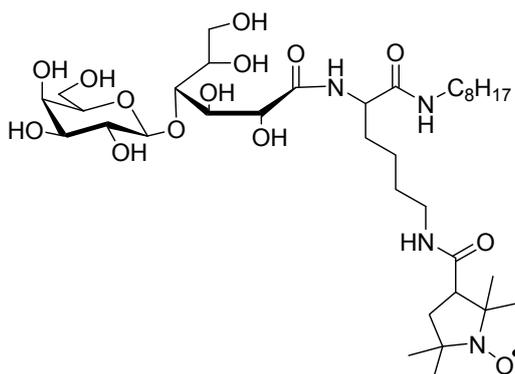
$[\alpha]_D^{20}$: + 26,3 (c, 1, MeOH)

Point de fusion : 88.6-89.4°C (début de décomposition)

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 229 \text{ nm}$

HR-MS (ESI+, m/z) : 738,4266 $[(M+H)^+]$.

Synthèse de la *N*-Lactobionyl-*N*^e-(carboxypropyl)-*L*-Lysinyl-octanamide (**12**)



Dans un ballon monocol, 0,06 g ($0,54 \cdot 10^{-4}$ mol) de composé **10** sont dissouts dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 4 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec quelques gouttes d'HCl 1N et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Séphadex LH 20 (éluant : méthanol) pour conduire au composé **12** sous forme d'une poudre jaune ($0,04$ g, $0,52 \cdot 10^{-4}$ mol, 96%).

Formule brute : $C_{35}H_{65}N_4O_{14}$

MM : $765,4497 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

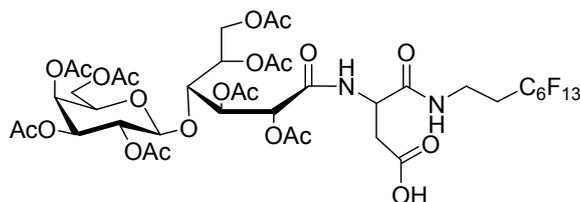
Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) : 0,41

$[\alpha]_D^{20}$: + 19,0 (c, 0,1, MeOH)

Point de fusion : 118,2-119,4°C (début de décomposition)

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 231 \text{ nm}$

HR-MS (ESI+, m/z) : 766,4537 $[(M+H)^+]$.

***N*-(Octa-O-acétyllactobionyl)-L-aspartyl-1H,1H,2H,2H-perfluooctanamide (15)**

Dans un ballon monocol, 0,25 g ($2,0 \cdot 10^{-4}$ mol) de composé **13** sont dissouts dans un mélange TFA/CH₂Cl₂ (4/6 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante durant 4 heures puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 7/3) pour conduire au composé **15** sous forme d'une poudre blanche (0,2 g, $1,76 \cdot 10^{-4}$ mol, 88%).

Formule brute : C₄₀H₄₇F₁₃N₂O₂₂

MM : 1154,2 g.mol⁻¹

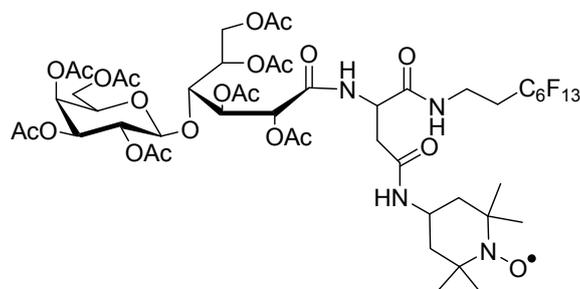
Rf (acétate d'éthyle) = 0,46

Point de fusion : 63,0-64,2°C (début de décomposition)

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 7,58 (1H, d, NH-CO, *J* = 8,0 Hz) ; 7,0 (1H, t, NH-CO, *J* = 5,3 Hz) ; 5,45 (1H, m, H-2) ; 5,41 (2H, m, H-2' et H-4') ; 5,15 (2H, m, H-3 et H-3') ; 5,03 (1H, m, H-5) ; 4,68-4,58 (3H, m, H-1', H-4 et CH Asp) ; 4,16-3,92 (5H, CH₂-6, CH₂-6' et H-5') ; 3,57 (2H, m, CH₂-NH) ; 3,03 (1H, dd, CH₂ Asp, *J* = 3,2 et 16,6 Hz) ; 2,38 (3H, m, CH₂-CF₂ et CH₂ Asp) ; 2,22-1,98 (24H, m, 8 CH₃-CO).

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 250 MHz) δ : -80,7 (3F, CF₃) ; -114,1 (2F, CF₂-CH₂) ; -121,8, -122,8, -123,6 (6F, CF₂) ; -126,1 (CF₂-CF₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 172,1-168,4 (CO-NH, O-CO) ; 101,5 (CH-1') ; 77,9 (CH-4) ; 72,1 (CH-2) ; 71,2 (CH-5') ; 70,9 (CH-3') ; 70,0-69,6 (CH-5 et CH-2') ; 69,4 (CH-3) ; 68,9 (CH-4') ; 61,6, 61,0 (CH₂-6 et CH₂-6') ; 49,0 (CH Asp) ; 41,8 (CH₂-NH) ; 35,5 (CH₂ Asp) ; 31,8 (CH₂-NH) ; 30,2 (CH₂-CF₂) ; 20,8, 20,7, 20,6, 20,5 (CH₃-CO).

Synthèse de la *N*-(Octa-O-acétyllactobionyl)-β-(4-amino-TEMPO)-L-aspartyl-1H,1H,2H,2H-perfluooctanamide (17)

Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 0,13 g ($1,13 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) de l'acide **15**, 0,025 g ($1,46 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,3 eq) de 4-AT, 0,026 g ($1,36 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 eq) de EDC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est

ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 30 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 7/3) puis par colonne chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1), pour conduire au composé **17** sous forme d'une poudre orange ($0,088\text{ g}$, $0,67 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$, 60%).

Formule brute : $\text{C}_{49}\text{H}_{64}\text{F}_{13}\text{N}_4\text{O}_{22}$

MM : $1307,4\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle) : 0,56

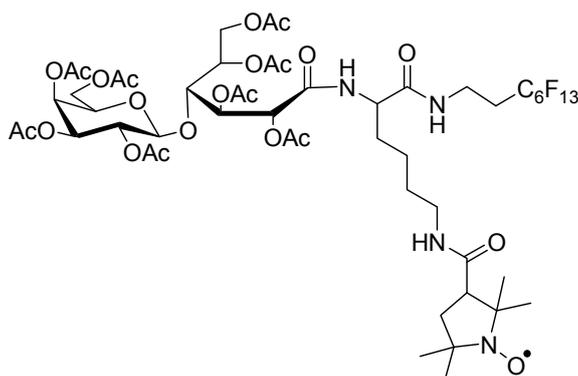
Point de fusion : $66\text{-}67^\circ\text{C}$ (début de décomposition)

UV (CH_2Cl_2) : $\lambda_{\text{max}} = 229\text{ nm}$

IR (KBr) : 3435, 2937, 1754, 1671, 1537, 1373 (NO^\bullet), 1236, 1052 cm^{-1} .

MS (ESI+, m/z) : 1308,4 [$(\text{M}+\text{H})^+$], 1330,4 [$(\text{M}+\text{Na})^+$], 1346,4 [$(\text{M}+\text{K})^+$].

Synthèse de *N*-(Octa-*O*-acétyllactobionyl)-*N*^ε-(carboxypropyl)-*L*-Lysinyl-1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctanamide (**18**)



Dans un ballon monocol, $0,3\text{ g}$ ($2,30 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$) de composé **14** sont dissouts dans un mélange éthanol/acide acétique (99/1 : v/v) puis $0,018\text{ g}$ de Pd/C sont lentement ajoutés. Le milieu est ensuite placé sous pression d'hydrogène (8 bars) durant 12 heures. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur célite puis concentré sous pression réduite pour conduire de façon quantitative à l'amine **16** sous forme d'une poudre blanche.

Puis dans un bicol placé sous atmosphère inerte, $0,25\text{ g}$ ($2,14 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$, 1 eq) de l'amine **16** obtenue sont directement mis en réaction avec $0,016\text{ g}$ ($2,78 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$, 1,3 eq) de 3-CP, $0,049\text{ g}$ ($2,57 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$, 1,2 eq) de EDC et une quantité catalytique d'HOBt dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 18 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite. Le brut ainsi obtenu est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 7/3) puis par colonne chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1) pour conduire au composé **18** sous forme d'une poudre jaune ($0,088\text{ g}$, $6,59 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$, 30%).

Formule brute : $\text{C}_{51}\text{H}_{68}\text{F}_{13}\text{N}_4\text{O}_{22}$

MM : $1335,4\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle) = 0,58

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} : + 3,6$ (c, 1, CH_2Cl_2)

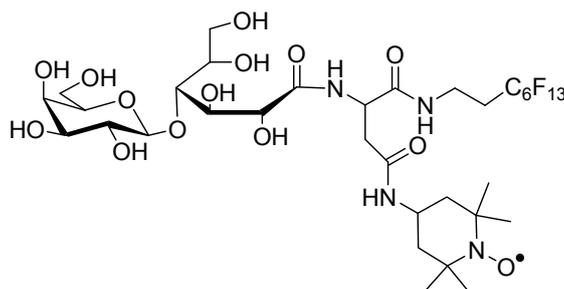
Point de fusion : 82,6-83,8°C (début de décomposition)

UV (CH₂Cl₂) : λ_{\max} = 203 nm

IR (KBr) : 3426, 2922, 1750, 1670, 1541, 1375 (NO[•]), 1242, 1048 cm⁻¹.

MS (ESI+, *m/z*) : 1336,5 [(M+H)⁺], 1353,6 [(M+NH₄)⁺], 1358,5 [(M+Na)⁺], 1374,5 [(M+K)⁺].

Synthèse de la *N*-Lactobionyl- β -(4-amino-TEMPO)-L-aspartyl-1H,1H,2H,2H-perfluoro octanamide (19)



Dans un ballon monocol, 0,08 g ($6,12 \cdot 10^{-5}$ mol) de composé **17** sont dissout dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 3 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec quelques gouttes d'HCl 1N et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Séphadex LH 20 (éluant : méthanol) pour conduire au composé **19** sous forme d'une poudre orange ($0,069$ g, $7,12 \cdot 10^{-5}$ mol, 86%).

Formule brute : C₃₃H₄₈F₁₃N₄O₁₄

MM : 971,2959 g.mol⁻¹

Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) : 0,55

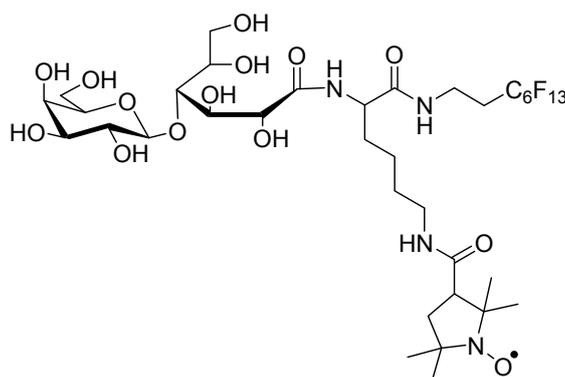
$[\alpha]_D^{20}$: + 18,2 (c, 0,1, MeOH)

Point de fusion : 78-79°C (début de décomposition)

UV (MeOH) : λ_{\max} = 229 nm

HR-MS (ESI+, *m/z*) : 972,3030 [(M+H)⁺].

N-Lactobionyl-N^ε-(carboxypropyl)-L-Lysinyl-1H,1H,2H,2H-perfluoro octanamide (20)



Dans un ballon monocol, 0,07 g ($5,24 \cdot 10^{-5}$ mol) de composé **18** sont dissouts dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 3 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec quelques gouttes d'HCl 1N et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Séphadex LH 20 (éluant : méthanol) pour conduire au composé **20** sous forme d'une poudre jaune (0,046 g, $4,6 \cdot 10^{-5}$ mol, 88%).

Formule brute : $C_{35}H_{52}F_{13}N_4O_{14}$

MM : $999,3272 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) : 0,51

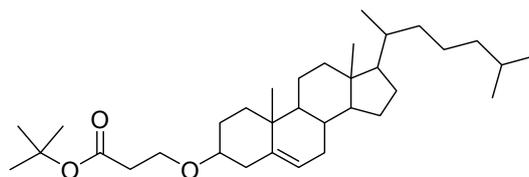
$[\alpha]_D^{20}$: + 11,3 (c, 0,1, MeOH)

Point de fusion : 108,5-109,5°C (début de décomposition)

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 203 \text{ nm}$

HR-MS (ESI+, m/z) : 1000,3353 [(M+H)⁺].

Synthèse du 3-(cholesteryloxy)propionate de *tert*-butyle (**28**)



Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 0,83 g ($20,68 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 eq) de NaH sont lavés à deux reprises avec du THF, puis sont dissouts dans 10 mL de THF anhydre. Ensuite, 2 g ($1,03 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de cholestérol, dissouts dans 10 mL de THF, sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. Après 30 minutes d'agitation, 750 μL ($0,52 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'acrylate de *tert*-butyle sont additionnés et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 16 heures, 1 eq d'acrylate étant rajouté à $t = 2$ et $t = 6$ heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et repris dans de l'actétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée 2 fois avec du HCl 1N puis 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/dichlorométhane 6/4) puis par recristallisation dans un mélange éther/méthanol, pour conduire au composé **28** sous forme d'une poudre blanche (1,92 g, $3,73 \cdot 10^{-3}$ mol, 72%).

Formule brute : $C_{34}H_{58}O_3$

MM : $514,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2) = 0,68

$[\alpha]_D^{20}$: - 27,1 (c, 1, CH_2Cl_2)

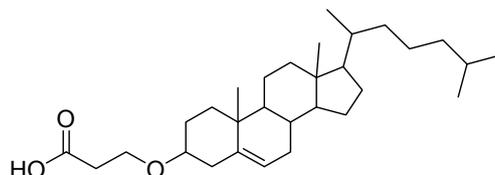
Point de fusion : 78,4-79,2°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 5,37 (1H, m, Hc Chol) ; 3,73 (2H, t, CH₂-O, $J = 6,55 \text{ Hz}$) ; 3,19 (1H, m, Ha Chol) ; 2,50 (2H, t, CH₂-CO, $J = 6,56 \text{ Hz}$) ; 2,38 et 2,20 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,1-1,8 (5H, m, H Chol) ; 1,65-0,87 (33H, m, H Chol) ; 1,48 (9H, s, tBu) ; 0,7 (3H, s, CH₃ Chol).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 171,1 (CO-tBu) ; 140,9 (C_1 Chol) ; 121,6 (C_2 Chol) ; 80,4 (C^{IV} tBu) ; 79,2 (C_3 Chol) ; 63,8 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 56,8, 56,2, 50,2, 42,3, 39,8, 39,5 (C Chol) ; 39,1 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 36,9, 36,8, 36,2, 35,8, 32,0, 28,4, 28,3 (C Chol) ; 28,1 (tBu) ; 28,0, 23,8, 22,9, 22,6, 21,1, 19,4, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, m/z) : 515,4 [(M+H) $^+$], 532,5 [(M+NH $_4$) $^+$], 537,4 [(M+Na) $^+$].

Synthèse de l'acide 3-(cholestéroxy)propanoïque (29)



Dans un ballon monocol, 1,37 g ($2,66 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **28** sont dissouts dans un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (2/8 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante durant 2 heures puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2) pour conduire au composé **29** sous forme d'une poudre blanche (0,99 g, $2,15 \cdot 10^{-3}$ mol, 81%).

Formule brute : $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$

MM : $458,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 5/5) = 0,54

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 23,3 (c, 1, CH_2Cl_2)

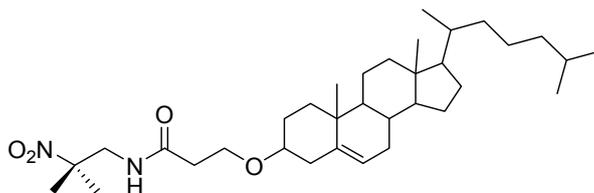
Point de fusion : 154,5-155,3°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 5,38 (1H, m, Hc Chol) ; 3,79 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J = 6,35$ Hz) ; 3,23 (1H, m, Ha Chol) ; 2,65 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 6,29$ Hz) ; 2,39 et 2,23 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,06-1,76 (5H, m, H Chol) ; 1,68-0,86 (33H, m, H Chol) ; 0,7 (3H, s, CH_3 Chol).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 176,8 (COOH) ; 140,6 (C_1 Chol) ; 121,9 (C_2 Chol) ; 79,6 (C_3 Chol) ; 63,0 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 56,8, 56,1, 50,2, 42,3, 39,8, 39,5 (C Chol) ; 38,9 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 32,0, 31,9, 28,3, 28,0, 23,8, 22,9, 22,6, 21,1, 19,4, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, m/z) : 457,4 [(M-H) $^-$], 476,4 [(M+NH $_4$) $^+$], 481,3 [(M+Na) $^+$].

Synthèse de la 3-(cholesteryloxy)-N-(2-méthyl-2-nitropropyl)propanamide (32)



Dans un ballon monocol, 0,88 g ($2,30 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **29**, 0,36 g ($2,3 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 2-méthyl-2-nitro-propylamine **21**, 0,554 g ($2,69 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,4 eq) de DCC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est

ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 16 heures. La DCU formée est filtrée sur verre fritté et le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3) puis par recristallisation dans l'éther, pour conduire au composé **32** sous forme d'une poudre blanche (1,03 g, $1,84 \cdot 10^{-3}$ mol, 96%).

Formule brute : $C_{34}H_{58}N_2O_4$

MM : $558,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 7/3) = 0,63

$[\alpha]_D^{20}$: - 13 (c, 1, CH_2Cl_2)

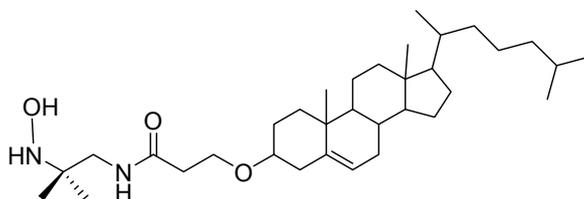
Point de fusion : 108,8-109,6°C

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) δ : 7,14 (1H, t, NH, $J = 6,91$ Hz) ; 5,38 (1H, m, Hc Chol) ; 3,77 (2H, d, $\underline{CH_2}$ -NH, $J = 6,55$ Hz) ; 3,71 (2H, t, CH_2 -O, $J = 6,05$ Hz) ; 3,21 (1H, m, Ha Chol) ; 2,51 (2H, t, CH_2 -CO, $J = 5,54$ Hz) ; 2,38 et 2,21 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,06-1,80 (5H, m, H Chol) ; 1,60 (6H, s, 2 CH_3 -C^{IV}) ; 1,56-0,87 (33H, m, H Chol) ; 0,7 (3H, s, CH_3 Chol).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,86 MHz) δ : 172,5 (CO) ; 140,5 (C₁ Chol) ; 122 (C₂ Chol) ; 88,7 (C^{IV}) ; 79,6 (C₃ Chol) ; 63,6 (CH_2 -O) ; 56,8, 56,1, 50,1 (C Chol) ; 45,8 (CH_2 -NH) ; 42,3, 39,8, 39,5, 38,8, 37,2, 37,1 (C Chol) ; 36,8 ($\underline{CH_2}$ -CO) ; 36,2, 35,8, 31,9, 28,3, 28,2, 28,0 (C Chol) ; 24,3 ($\underline{CH_3}$ -C^{IV}), 23,8, 22,9, 22,6, 21,1, 19,3, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, m/z) : 559,4 [(M+H)⁺], 576,5 [(M+NH₄)⁺], 581,4 [(M+Na)⁺], 597,4 [(M+K)⁺].

Synthèse de la 3-(cholesteryloxy)-N-(2-(hydroxyamino)-2-méthylpropyl)propanamide (**33**)



Dans un tricol placé sous atmosphère inerte, 1,2 g ($2,15 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **32** et 0,17 g ($3,22 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,5 eq) de NH_4Cl sont dissouts dans un mélange THF/ H_2O (3/1 : v/v). Le milieu est ensuite refroidi à 0°C et 0,56 g ($8,59 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 eq) de poussière de Zinc sont délicatement ajoutés en veillant à ne pas dépasser les 15°C. Une fois l'addition terminée, l'agitation est maintenue à température ambiante durant 30 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite puis concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) pour conduire au composé **33** sous forme d'une huile jaune pâle (0,6 g, $1,12 \cdot 10^{-3}$ mol, 52%).

Formule brute : $C_{34}H_{60}N_2O_3$

MM : $544,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 9,5/0,5) = 0,25

$[\alpha]_D^{20}$: - 27,1 (c, 1, CH_2Cl_2)

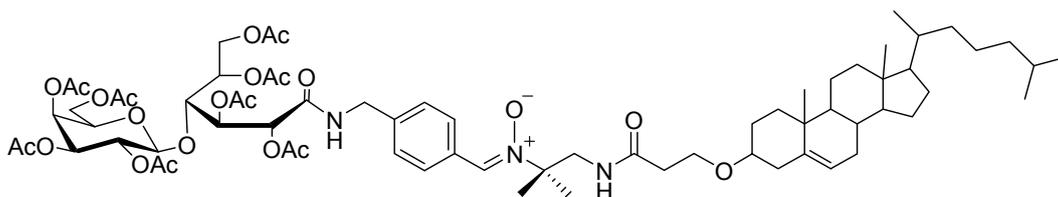
Point de fusion : 110,4-111,8°C

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) δ : 6,89 (1H, t, NH, $J = 6,26$ Hz) ; 5,37 (1H, m, Hc Chol) ; 3,76 (2H, t, CH_2 -O, $J = 5,66$ Hz) ; 3,27 (2H, d, $\underline{CH_2}$ -NH, $J = 6,62$ Hz) ; 3,21 (1H, m, Ha Chol) ;

2,53 (2H, t, CH₂-CO, $J = 5,64$ Hz) ; 2,38 et 2,21 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,08-1,76 (5H, m, H Chol) ; 1,62-0,87 (33H, m, H Chol) ; 1,09 (6H, s, 2 CH₃-C^{IV}) ; 0,7 (3H, s, CH₃ Chol).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 173,5 (CO) ; 140,5 (C₁ Chol) ; 122 (C₂ Chol) ; 79,4 (C₃ Chol) ; 64,0 (CH₂-O) ; 57,7 (C^{IV}) ; 56,7, 56,1, 50,1 (C Chol) ; 45,0 (CH₂-NH) ; 42,3, 39,7, 39,5, 37,1 (C Chol) ; 36,8 (CH₂-CO) ; 36,2, 35,8, 31,9, 28,4, 28,2, 28,0, 24,3, 23,8 (C Chol), 22,8 (CH₃-C^{IV}), 22,6, 21,1, 19,4, 18,7, 11,9 (C Chol).

Synthèse de la *N*-[1,1-Diméthyl-1-(3-cholesteryloxypropanamidométhyl)]- α -[4-(octa-O-acetyl-lactobionamidométhyl)phényl]nitronne (**37**)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 0,44 g ($0,54 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de *N*-(4-formylbenzyl)-octa-O-acetyllactobionamide **36** et 0,24 g ($0,43 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,8 eq) d'hydroxylamine **33** sont dissouts dans un mélange THF/AcOH (3/2 : v/v) en présence de tamis moléculaire 4 Å. Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C durant 30 heures, 0,2 eq d'hydroxylamine **33** étant rajouté à $t = 14$ et $t = 20$ heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur une fine couche de célite et concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) puis par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : méthanol/dichlorométhane 1/1) pour conduire au composé **37** sous forme d'une poudre blanche (0,37 g, $0,32 \cdot 10^{-3}$ mol, 58%).

Formule brute : C₇₀H₁₀₃N₃O₂₂

MM : 1337,7 g.mol⁻¹

R_f (acétate d'éthyle/méthanol : 9,5/0,5) = 0,33

[α]_D²⁰ : - 29,2 (c, 1, CH₂Cl₂)

Point de fusion : 110,4-111,8°C

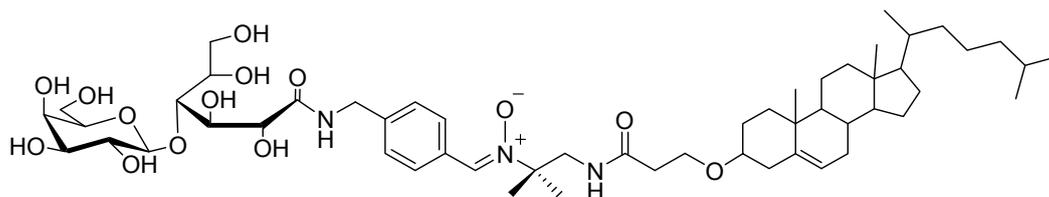
RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 8,27 (2H, d, H arom, $J = 8,2$ Hz) ; 7,5 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,31 (2H, d, H arom, $J = 8,2$ Hz) ; 7,0 (1H, t, NH-CH₂-C^{IV}, $J = 5,85$ Hz) ; 6,57 (1H, t, NH-CH₂-Ph, $J = 5,85$ Hz) ; 5,64 (2H, m, H-2 et H-3) ; 5,38 (1H, m, Hc Chol) ; 5,20 (1H, d, H-4', $J = 2,52$ Hz) ; 5,16 (1H, s, H-2') ; 5,08 (1H, m, H-5) ; 4,99 (1H, dd, H-3', $J = 3,42$ et $J = 10,4$ Hz) ; 4,64 (1H, d, H-1', $J = 7,95$ Hz) ; 4,58 à 4,48 (2H, m, H-6a et H-7a) ; 4,46 à 4,32 (2H, m, H-4 et H-7b) ; 4,24 à 4,0 (3H, m, H-6b, H-6' et H-6b) ; 3,88 (1H, t, H-5', $J = 6,83$ Hz) ; 3,73 (2H, t, CH₂-O, $J = 6,64$ Hz) ; 3,69 (2H, d, C^{IV}-CH₂-NH, $J = 6,01$ Hz) ; 3,13 (1H, m, Ha Chol) ; 2,45 (2H, t, CH₂-CO, $J = 5,73$ Hz) ; 2,34 et 2,28 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,21-1,98 (24H, m, CH₃-CO) ; 1,92-1,70 (5H, m, H Chol) ; 1,61 (6H, s, 2 CH₃-C^{IV}) ; 1,58-0,87 (33H, m, H Chol) ; 0,7 (3H, s, CH₃ Chol).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 171,8 (CO) ; 170,4, 170,2, 169,8, 169,7, 169,2 (8s, CO-CH₃) ; 167,8 (CO-NH) ; 142,5 (C^{IV} arom) ; 141,2 (C₁ Chol) ; 131,8 (CH=N(O)) ; 131,2 (C^{IV} arom) ; 129,4, 127,5 (CH arom) ; 122 (C₂ Chol) ; 101,9 (CH-1') ; 79,5 (C₃ Chol) ; 77,6 (CH-4) ; 73,4 (C^{IV}) ; 71,6 (CH-2) ; 71,0 (CH-5', CH-3') ; 69,7 (CH-5) ; 69,2 (CH-3) ; 69,0 (CH-

2') ; 66,8 (CH-4') ; 63,6 (CH₂-O) ; 61,6 (CH₂-6) ; 60,9 (CH₂-6') ; 56,7, 56,1, 50,1 (C Chol) ; 47,2, 43,2 (CH₂-NH) ; 42,3, 39,5 (C Chol) ; 36,8 (CH₂-CO) ; 37,2, 37,1, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 31,8, 28,3, 28,0 (C Chol) ; 25,2 (CH₃) ; 24,3 (CH₃-C^{IV}) ; 23,8, 22,9, 22,6 (C Chol) ; 20,9, 20,8, 20,7, 20,6, 20,5, 20,4 (8s, CH₃-CO) ; 19,4, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, *m/z*) : 1338,6 [(M+H)⁺], 1355,7 [(M+NH₄)⁺], 1360,6 [(M+Na)⁺], 1376,6 [(M+K)⁺].

Synthèse de la *N*-[1,1-Diméthyl-1-(3-cholesteryloxypropanamidométhyl)]- α -[4-(lactobionamidométhyl)phényl]nitronne (**38**).



Dans un ballon monocol, 0,37 g ($2,80 \cdot 10^{-4}$ mol) de composé **37** sont dissout dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 3 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec quelques gouttes d'HCl 1N et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Séphadex LH 20 (éluant : méthanol) pour conduire au composé **38** sous forme d'une poudre blanche (0,23 g, $2,30 \cdot 10^{-4}$ mol, 84%).

Formule brute : C₅₄H₈₇N₃O₁₄

MM : 1001,6188 g.mol⁻¹

Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) = 0,42

[α]_D²⁰ : - 5,8 (c, 1, MeOH)

Point de fusion : 136°C (décomposition/brunissement)

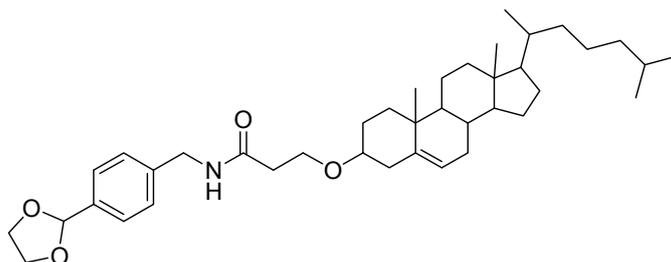
RMN ¹H (DMSO, 250 MHz) δ : 8,29 (2H, d, H arom, *J* = 8,2 Hz) ; 8,23 (1H, m, NH-CH₂-C^{IV}) ; 7,83 (1H, m, NH-CH₂-Ph) ; 7,74 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,32 (2H, d, H arom, *J* = 8,2 Hz) ; 5,35-5,22 (3H, m, Hc Chol et 2 OH) ; 4,87-4,55 (6H, m, 6 OH) ; 4,35-4,18 (5H, m, CH₂-NH, H-1', H-2 et H-3) ; 3,73-3,33 (14H, m, 1OH sucre, C^{IV}-CH₂-NH et CH₂-O) ; 3,08 (1H, m, Ha Chol) ; 2,31-2,26 (4H, m, CH₂-CO et 2 Hb Chol) ; 2,0-1,66 (5H, m, H Chol) ; 1,52 (6H, s, 2 CH₃-C^{IV}) ; 1,56-0,84 (33H, m, H Chol) ; 0,66 (3H, s, CH₃ Chol).

RMN ¹³C (DMSO, 62,86 MHz) δ : 173,0, 171,4 (CO-NH) ; 141,9 (C^{IV} arom) ; 140,9 (C₁ Chol) ; 130,6 (CH=N(O)) ; 130,3 (C^{IV} arom) ; 129,0, 127,2 (CH arom) ; 121,6 (C₂ Chol) ; 105,1 (CH-1') ; 83,5 (CH-4) ; 78,5 (C₃ Chol) ; 76,2 (CH-5') ; 73,7 (C^{IV}) ; 72,6 (CH₂-6 et CH₂-6') ; 71,9, 71,6, 71,0, 68,6 (CH-3', CH-2', CH-2, CH-5, CH-3 et CH-4') ; 64,2 (CH₂-O) ; 63,1, 62,8 (CH₂-6 et CH₂-6') ; 61,1, 56,6, 56,0, 50,0 (C Chol) ; 46,1, 42,2 (CH₂-NH) ; 39,1, 38,5 (C Chol) ; 37,1 (CH₂-CO) ; 36,1, 35,7, 31,9, 31,8, 28,5, 28,3, 27,9 (C Chol) ; 24,3 (CH₃-C^{IV}) ; 23,8, 22,9, 22,6, 19,4, 18,7, 11,9 (C Chol).

UV (MeOH) : λ_{\max} = 299 nm

HR-MS (ESI+, *m/z*) : 1002,6262 [(M+H)⁺].

Synthèse de la 3-(cholesteryloxy)-N-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)benzyl)propanamide (41)



Dans un ballon monocol, 1 g ($2,18 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **29**, 0,47 g ($2,62 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de 4-[1,3]dioxolan-2-ylbenzylamine **34**, 0,63 g ($3,05 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,4 eq) de DCC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 16 heures. La DCU formée est filtrée sur verre fritté et le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) pour conduire au composé **41** sous forme d'une poudre blanche ($0,96$ g, $1,55 \cdot 10^{-3}$ mol, 72%).

Formule brute : $C_{40}H_{61}NO_4$

MM : $619,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 5/5) = 0,23

$[\alpha]_D^{20}$: - 27,1 (c, 1, CH_2Cl_2)

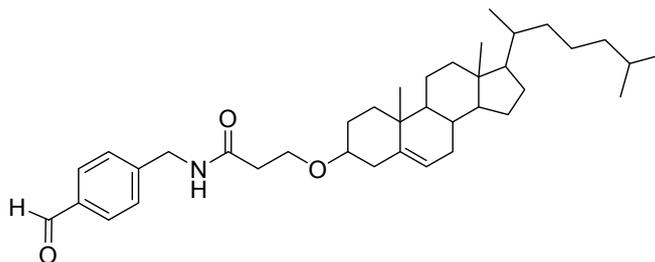
Point de fusion : 52,4-53,8 °C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,47 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,33 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 6,77 (1H, m, NH) ; 5,83 (1H, s, CH-O) ; 5,33 (1H, m, Hc Chol) ; 4,48 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,65$ Hz) ; 4,1 (4H, m, 2 $\text{CH}_2\text{-O}$ acétal) ; 3,75 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-O-Chol}$, $J = 5,70$ Hz) ; 3,21 (1H, m, Ha Chol) ; 2,52 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 5,64$ Hz) ; 2,30 et 2,16 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,12-1,68 (5H, m, H Chol) ; 1,66-0,88 (33H, m, H Chol) ; 0,70 (3H, s, CH_3 Chol).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 171,7 (CO) ; 140,4 (C_1 Chol) ; 139,4, 137,2 (C^{IV} arom) ; 127,7, 126,8 (CH arom) ; 122 (C_2 Chol) ; 103,5 (CH-O) ; 79,5 (C_3 Chol) ; 65,3 (2 $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 64,0 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 56,7, 56,1, 50,1 (C Chol) ; 43,2 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 42,3, 39,8, 39,5 (C Chol) ; 39,0 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 37,3, 37,1, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 28,3, 28,0, 23,8, 22,9, 22,6, 21,1, 19,3, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, m/z) : 620,5 [$(\text{M}+\text{H})^+$], 637,5 [$(\text{M}+\text{NH}_4)^+$], 624,5 [$(\text{M}+\text{Na})^+$], 658,5 [$(\text{M}+\text{K})^+$]

Synthèse de la 3-(cholesteryloxy)-N-(4-formylbenzyl)propanamide (42)



Dans un ballon monocol, 0,94 g ($1,52 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **41** sont dissouts dans un mélange AcOH/H₂O (7/3 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante pendant toute une nuit puis le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et repris dans de l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée 2 fois avec une solution de NaHCO₃ saturée puis 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 5/5) pour conduire au composé **42** sous forme d'une poudre blanche (0,81 g, $1,41 \cdot 10^{-3}$ mol, 92%).

Formule brute : C₃₈H₅₇NO₃

MM : 575,4 g.mol⁻¹

Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 7/3) = 0,30

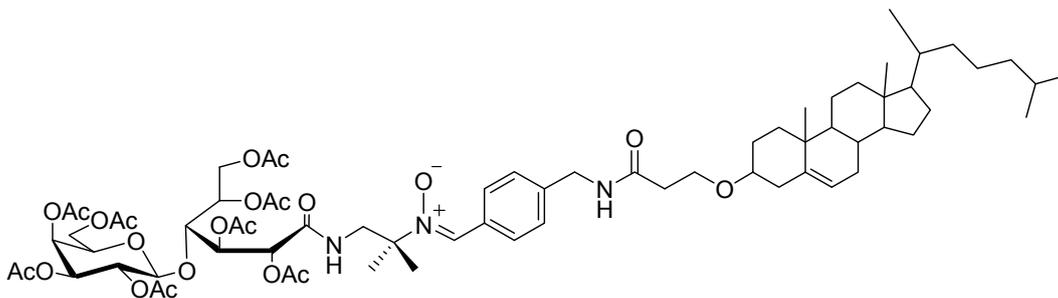
Point de fusion : 85,5-86,7°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 10,02 (1H, s, CHO) ; 7,87 (2H, d, H arom, *J* = 8,1 Hz) ; 7,48 (2H, d, H arom, *J* = 8,1 Hz) ; 6,92 (1H, m, NH) ; 5,33 (1H, m, Hc Chol) ; 4,57 (2H, d, CH₂-NH, *J* = 5,87 Hz) ; 3,78 (2H, t, CH₂-O, *J* = 5,61 Hz) ; 3,19 (1H, m, Ha Chol) ; 2,56 (2H, t, CH₂-CO, *J* = 5,59 Hz) ; 2,31-2,15 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,06-1,82 (5H, m, H Chol) ; 1,66-0,86 (33H, m, H Chol) ; 0,70 (3H, s, CH₃ Chol).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 191,8 (CHO) ; 172,0 (CO) ; 145,6 (C^{IV} arom) ; 140,2 (C₁ Chol) ; 135,6 (C^{IV} arom) ; 130,1, 128,0 (CH arom) ; 122,1 (C₂ Chol) ; 79,5 (C₃ Chol) ; 63,9 (CH₂-O) ; 56,7, 56,1, 50,1 (C Chol) ; 43,1 (CH₂-NH) ; 42,3, 39,5, 39,0, 37,3, 37,1 (C Chol) ; 36,8 (CH₂-CO) ; 36,2, 35,8, 31,9, 31,8, 28,2, 28,0, 23,8, 22,9, 22,6, 19,3, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, *m/z*) : 576,5 [(M+H)⁺], 598,5 [(M+Na)⁺].

Synthèse de la *N*-[1,1-Diméthyl-1-(octa-*O*-acetyl-lactobionamidométhyl)]- α -[4-(3-cholesteryloxypropanamidométhyl)phényl]nitrone (**43**)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 0,5 g ($0,87 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **42** et 0,54 g ($0,69 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,8 eq) de *N*-(octa-*O*-acetyl-lactobionyl)-2-méthyl-2-hydroxylaminopropanamide **40** sont dissouts dans un mélange THF/AcOH (3/2 : v/v) en présence de tamis moléculaire 4 Å. Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C durant 10 heures, 0,2 eq d'hydroxylmine **40** étant rajouté à *t* = 4 et *t* = 7 heures. Le milieu réactionnel est alors filtré sur une fine couche de célite et concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) puis par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : méthanol/dichlorométhane 1/1) pour conduire au composé **43** sous forme d'une poudre blanche (0,96 g, $7,14 \cdot 10^{-3}$ mol, 82%).

Formule brute : C₇₀H₁₀₃N₃O₂₂MM : 1337,7 g.mol⁻¹

Rf (acétate d'éthyle/méthanol: 9,75/0,25) = 0,27

[α]_D²⁰ : - 17,5 (c, 1, CH₂Cl₂)

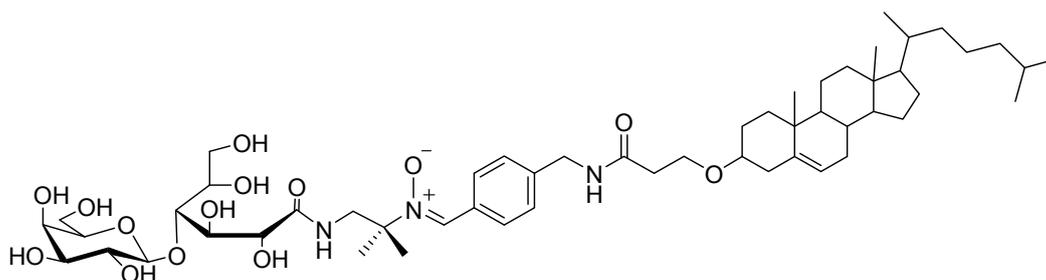
Point de fusion : 106,8-107,4°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 8,27 (2H, d, H arom, *J* = 8,2 Hz) ; 7,48 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,37 (2H, d, H arom, *J* = 8,2 Hz) ; 7,18 (1H, m, NH-CH₂-C^{IV}) ; 6,85 (1H, m, NH-CH₂-Ph) ; 5,53 (2H, m, H-2 et H-2') ; 5,37 (1H, m, Hc Chol) ; 5,29 (1H, m, H-4') ; 5,16 (1H, m, H-5) ; 5,01 (2H, m, H-3 et H-3') ; 4,66 (1H, d, H-1', *J* = 8 Hz) ; 4,51 (2H, d, CH₂-NH, *J* = 5,87 Hz) ; 4,48 (1H, m, H-6) ; 4,32 (1H, m, H-4) ; 4,28 à 3,92 (4H, m, H-6'a, H-6b, H-6b' et H-5') ; 3,76 (3H, m, CH₂-O et 1 CH₂-NH-C^{IV}) ; 3,60 (1H, m, 1 CH₂-NH-C^{IV}) ; 3,22 (1H, m, Ha Chol) ; 2,54 (2H, t, CH₂-CO, *J* = 5,76 Hz) ; 2,36-2,28 (2H, m, 2 Hb Chol) ; 2,24-1,78 (29H, m, 8 CH₃-CO et 5H Chol) ; 1,59 (6H, s, 2 CH₃-C^{IV}) ; 1,56-0,87 (33H, m, H Chol) ; 0,7 (3H, s, CH₃ Chol).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 171,8 (CO) ; 170,4, 170,2, 169,8, 169,7, 169,2 (8s, CO-CH₃) ; 167,8 (CO-NH) ; 141,5, 140,4 (C^{IV} arom) ; 140,2 (C₁ Chol) ; 131,8 (CH=N(O)) ; 129,4, 127,5 (CH arom) ; 122 (C₂ Chol) ; 101,9 (CH-1') ; 79,5 (C₃ Chol) ; 77,7 (CH-4) ; 73,4 (C^{IV}) ; 72,1 (CH-2) ; 71,1 (CH-5') ; 70,9 (CH-3') ; 69,8 (CH-5) ; 69,0 (CH-3 et CH-2') ; 66,8 (CH-4') ; 64,0 (CH₂-O) ; 61,6 (CH₂-6) ; 60,9 (CH₂-6') ; 56,7, 56,1, 50,1 (C Chol) ; 47,1, 43,2 (CH₂-NH) ; 42,3, 39,5 (C Chol) ; 36,8 (CH₂-CO) ; 35,8, 31,9, 28,2, 28,0 (C Chol) ; 25,1, 24,1 (CH₃) ; 23,8, 22,8, 22,6 (C Chol) ; 20,9, 20,8, 20,7, 20,6, 20,4 (8s, CH₃-CO) ; 19,4, 18,7, 11,9 (C Chol).

MS (ESI+, *m/z*) 1338,6 [(M+H)⁺], 1355,7 [(M+NH₄)⁺], 1360,6 [(M+Na)⁺], 1376,6 [(M+K)⁺].

Synthèse de la *N*-[1,1-Diméthyl-1-(lactobionamidométhyl)-α-[4-(3-cholesteryloxypropa namidométhyl)phényl]nitro]ne (44)



Dans un ballon monocol, 0,5 g (3,7.10⁻⁴ mol) de composé **43** sont dissouts dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 4 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec quelques gouttes d'HCl 1N et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Séphadex LH 20 (éluant : méthanol/dichlorométhane 1/1) pour conduire au composé **44** sous forme d'une poudre blanche (0,4 g, 4,0.10⁻⁴ mol, 84%).

Formule brute : C₅₄H₈₇N₃O₁₄MM : 1001,6188 g.mol⁻¹

Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) = 0,38

$[\alpha]_D^{20}$: - 6,3 (c, 1, MeOH)

Point de fusion : 152°C (décomposition/brunissement)

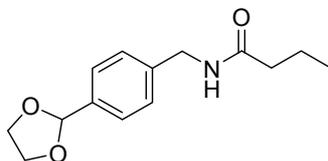
RMN ^1H (DMSO, 250 MHz) δ : 8,47 (1H, m, $\underline{\text{NH}}\text{-CH}_2\text{-C}^{\text{IV}}$) ; 8,32 (2H, d, H arom, $J = 8,2$ Hz) ; 7,82 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}(\text{O})$) ; 7,58 (1H, m, $\underline{\text{NH}}\text{-CH}_2\text{-Ph}$) ; 7,31 (2H, d, H arom, $J = 8,2$ Hz) ; 5,33 (1H, m, Hc Chol) ; 5,15-5,0 (2H, m, 2 OH) ; 4,77-4,52 (6H, m, 6 OH) ; 4,31 (2H, d, $\underline{\text{CH}_2}\text{-NH}$, $J = 5,13$ Hz) ; 4,23 (1H, d, H-1', $J = 7,34$ Hz) ; 4,14 et 3,99 (2H, m, 2 H sucre) ; 3,68-3,28 (15H, m, 10H sucre, $\text{C}^{\text{IV}}\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-O}$ et Ha Chol) ; 2,39-2,34 (3H, m, $\text{CH}_2\text{-CO}$ et Hb Chol) ; 2,12-1,74 (6H, m, 5 H Chol et Hb Chol) ; 1,48 (6H, s, 2 $\text{CH}_3\text{-C}^{\text{IV}}$) ; 1,62-0,84 (33H, m, H Chol) ; 0,66 (3H, s, CH_3 Chol).

RMN ^{13}C (DMSO, 62,86 MHz) δ : 173,0, 170,9 (CO-NH) ; 142,0 (C^{IV} arom) ; 141,0 (C_1 Chol) ; 131,1 ($\text{CH}=\text{N}(\text{O})$) ; 130,2 (C^{IV} arom) ; 129,1, 127,3 (CH arom) ; 121,8 (C_2 Chol) ; 105,1 ($\text{CH-1}'$) ; 83,5 (CH-4) ; 78,6 (C_3 Chol) ; 76,1 (CH-2) ; 73,8 (C^{IV}) ; 73,7, 72,4, 71,7, 71,6, 71,0, 68,6 ($\text{CH-3}'$, $\text{CH-2}'$, CH-5 , $\text{CH-5}'$, CH-3 et $\text{CH-4}'$) ; 64,1 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 62,7, 61,0 ($\text{CH}_2\text{-6}$ et $\text{CH}_2\text{-6}'$) ; 56,6, 56,0, 50,1 (C Chol) ; 45,8, 42,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 41,0, 39,0 (C Chol) ; 36,8 ($\underline{\text{CH}_2}\text{-CO}$) ; 35,7, 31,9, 28,2, 27,9 (C Chol) ; 24,8, 23,7 (CH_3) ; 23,2, 22,9, 19,6, 19,0, 12,2 (C Chol).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 299$ nm

HR-MS (ESI+, m/z) : 1002,6263 [(M+H) $^+$].

Synthèse de la N-[4-(1,3-dioxacyclopent-2-yl)benzyl]-butanamide (45)



Dans un ballon monocol, 1,33 g ($15,16 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'acide butanoïque, 3,74 g ($18,19 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de DCC et 2,09 g ($18,19 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de HO-Su sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 6 heures. La DCU formée est ensuite filtrée sur verre fritté et le brut réactionnel, contenant l'ester actif, est directement mis en réaction avec 1,8 g ($10,11 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 4-[1,3]dioxolan-2-ylbenzylamine (Ouari *et al.*, 1998) dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 20 heures. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2), pour conduire au composé **45** sous forme d'une poudre blanche (1,4 g, $3,76 \cdot 10^{-3}$ mol, 58%).

Formule brute : $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$

MM : 249,1 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,32

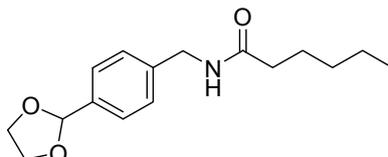
Point de fusion : 86,4-87,6°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,47 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,31 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 5,81 (2H, m, CH-O et NH) ; 4,46 (2H, d, $\underline{\text{CH}_2}\text{-NH}$, $J = 5,72$ Hz) ; 4,10 (4H, m, 2

CH₂-O) ; 2,20 (2H, t, CH₂-CO, $J = 7,49$ Hz) ; 1,70 (2H, sex, $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_3$, $J = 7,41$ Hz) ; 0,97 (3H, t, CH₃, $J = 7,36$ Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 172,8 (CO) ; 139,5, 137,2 (C^{IV} arom) ; 127,9, 126,8 (CH arom) ; 103,5 (CH-O) ; 65,3 (2 CH₂-O) ; 43,3 (CH₂-NH) ; 38,7 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CO}$) ; 19,2 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_3$) ; 13,8 (CH₃).

Synthèse de la N-[4-(1,3-dioxacyclopent-2-yl)benzyl]-hexanamide (46)



Dans un ballon monocol, 2 g ($17,21 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'acide hexanoïque, 4,25 g ($20,65 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de DCC et 2,37 g ($20,65 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de HO-Su sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 4 heures. La DCU formée est ensuite filtrée sur verre fritté et le brut réactionnel, contenant l'ester actif, est directement mis en réaction avec 1,6 g ($8,99 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 4-[1,3]dioxolan-2-ylbenzylamine (Ouari *et al.*, 1998) dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 16 heures. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2), pour conduire au composé **46** sous forme d'une poudre blanche (1,6 g, $4,34 \cdot 10^{-3}$ mol, 64%).

Formule brute : C₁₆H₂₃NO₃

MM : 277,2 g.mol⁻¹

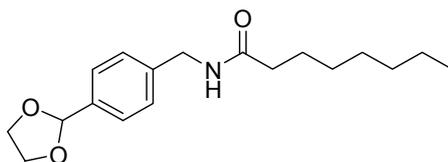
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,44

Point de fusion : 73,5-74,3°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 7,48 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,31 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 5,82 (2H, m, CH-O et NH) ; 4,46 (2H, d, $\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$, $J = 5,72$ Hz) ; 4,11 (4H, m, 2 CH₂-O) ; 2,22 (2H, t, CH₂-CO, $J = 7,62$ Hz) ; 1,69 (2H, m, $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ; 1,32 (4H, m, $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ; 0,91 (3H, t, CH₃, $J = 6,75$ Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 172,9 (CO) ; 139,5, 137,2 (C^{IV} arom) ; 127,9, 126,8 (CH arom) ; 103,5 (CH-O) ; 65,3 (2 CH₂-O) ; 43,3 (CH₂-NH) ; 36,8 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CO}$) ; 31,8 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ; 25,4 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 22,4 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_3$) ; 14,0 (CH₃).

Synthèse de la N-[4-(1,3-dioxacyclopent-2-yl)benzyl]-octanamide (47)



Dans un ballon monocol, 2,18 g ($15,13 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'acide octanoïque, 3,74 g ($18,16 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de DCC et 2,09 g ($18,16 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de HO-Su sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 6 heures. La DCU formée est ensuite filtrée sur verre fritté et le brut réactionnel, contenant l'ester actif, est directement mis en réaction avec 1,8 g ($10,11 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 4-[1,3]dioxolan-2-ylbenzylamine (Ouari *et al.*, 1998) dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 18 heures. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2), pour conduire au composé **47** sous forme d'une poudre blanche (2,19 g, $7,18 \cdot 10^{-3}$ mol, 70%).

Formule brute : $C_{18}H_{27}NO_3$

MM : $305,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

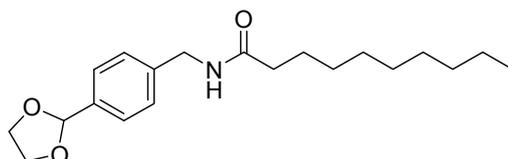
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,48

Point de fusion : 77,2-78,4°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,47 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,31 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 5,82 (2H, m, CH-O et NH) ; 4,46 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,72$ Hz) ; 4,09 (4H, m, 2 $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 2,22 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,6$ Hz) ; 1,66 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 1,30 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ; 0,90 (3H, m, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 173,0 (CO) ; 139,8, 137,1 (C^{IV} arom) ; 127,8, 126,6 (CH arom) ; 103,5 (CH-O) ; 65,3 (2 $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 43,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 36,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 31,8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) ; 29,4, 29,0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) ; 25,8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 22,6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ; 13,8 (CH_3).

Synthèse de la N-[4-1,3-dioxacyclopent-2-yl]benzyl]-decanamide (**48**)



Dans un ballon monocol, 5 g ($29,02 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'acide decanoïque, 7,17 g ($34,82 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de DCC et 4 g ($38,82 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de HO-Su sont dissouts dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 6 heures. La DCU formée est ensuite filtrée sur verre fritté et le brut réactionnel, contenant l'ester actif, est directement mis en réaction avec 3 g ($16,85 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 4-[1,3]dioxolan-2-ylbenzylamine (Ouari *et al.*, 1998) dans du dichlorométhane anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante pendant 16 heures. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3), pour conduire au composé **48** sous forme d'une poudre blanche (3,4 g, $10,2 \cdot 10^{-3}$ mol, 62%).

Formule brute : $C_{20}H_{31}NO_3$

MM : $333,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

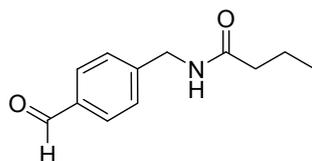
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 5/5) = 0,42

Point de fusion : 80,1-80,9°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,47 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,31 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 5,82 (2H, m, CH-O et NH) ; 4,46 (2H, d, $\underline{\text{CH}_2}$ -NH, $J = 5,72$ Hz) ; 4,10 (4H, m, 2 CH_2 -O) ; 2,22 (2H, t, CH_2 -CO, $J = 7,91$ Hz) ; 1,66 (2H, m, $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -CO) ; 1,28 (12H, m, CH_2 - $(\underline{\text{CH}_2})_6$ - CH_3) ; 0,90 (3H, m, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 173,0 (CO) ; 139,5, 137,2 (C^{IV} arom) ; 127,9, 126,9 (CH arom) ; 103,5 (CH-O) ; 65,3 (2 CH_2 -O) ; 43,3 (CH_2 -NH) ; 36,8 ($\underline{\text{CH}_2}$ -CO) ; 31,9 ($\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_3) ; 29,5, 29,4, 29,3, 25,8, 25,6 (CH_2 - $(\underline{\text{CH}_2})_5$ - CH_2) ; 22,7 ($\underline{\text{CH}_2}$ - CH_3) ; 14,1 (CH_3).

Synthèse de la N-(4-formylbenzyl)-butanamide (49)



Dans un ballon monocol, 0,9 g ($3,63 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **45** sont dissouts dans un mélange AcOH/ H_2O (7/3 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante pendant toute une nuit puis le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et repris dans de l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est alors lavée 2 fois avec une solution de NaHCO_3 saturée puis 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 6/4), pour conduire au composé **49** sous forme d'une poudre blanche (0,72 g, $3,51 \cdot 10^{-3}$ mol, 96%).

Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2$

MM : $205,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

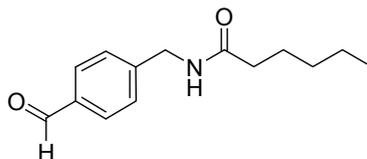
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,29

Point de fusion : $72,2\text{-}73,0^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 9,97 (1H, s, CHO) ; 7,84 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,43 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 6,31 (1H, m, NH) ; 4,51 (2H, d, $\underline{\text{CH}_2}$ -NH, $J = 6$ Hz) ; 2,25 (2H, t, CH_2 -CO, $J = 7,47$ Hz) ; 1,70 (2H, m, $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_3) ; 0,96 (3H, t, CH_3 , $J = 7,36$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 191,9 (CHO) ; 173,4 (CO) ; 145,6, 135,6 (C^{IV} arom) ; 130,1, 128,1 (CH arom) ; 43,2 (CH_2 -NH) ; 38,5 ($\underline{\text{CH}_2}$ -CO) ; 19,2 ($\underline{\text{CH}_2}$ - CH_3) ; 13,8 (CH_3).

Synthèse de la N-(4-formylbenzyl)-hexanamide (50)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour l'aldéhyde **49** et conduit, à partir de 1,12 g ($4,08 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **46**, au composé **50** sous forme d'une poudre blanche (0,9 g, $3,86 \cdot 10^{-3}$ mol, 94%).

Formule brute : C₁₄H₁₉NO₂

MM : 233,1 g.mol⁻¹

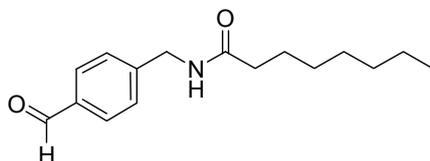
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,34

Point de fusion : 59,2-59,8°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 9,99 (1H, s, CHO) ; 7,84 (2H, d, H arom, *J* = 8,1 Hz) ; 7,43 (2H, d, H arom, *J* = 8,1 Hz) ; 6,18 (1H, m, NH) ; 4,52 (2H, d, CH₂-NH, *J* = 6 Hz) ; 2,26 (2H, t, CH₂-CO, *J* = 7,61 Hz) ; 1,68 (2H, m, CH₂-CH₂-CO) ; 1,34 (4H, m, CH₂-(CH₂)₂-CH₃) ; 0,91 (3H, t, CH₃, *J* = 6,75 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 192,1 (CHO) ; 174,0 (CO) ; 145,7, 135,4 (C^{IV} arom) ; 130,1, 128,0 (CH arom) ; 43,1 (CH₂-NH) ; 36,5 (CH₂-CO) ; 31,4, 25,4, 22,3 (CH₂-(CH₂)₃-CH₃) ; 13,9 (CH₃).

Synthèse de la N-(4-formylbenzyl)-octanamide (51)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour l'aldéhyde **49** et conduit, à partir de 2,18 g (7,14.10⁻³ mol) de composé **47**, au composé **51** sous forme d'une poudre blanche (1,82 g, 6,97.10⁻³ mol, 98%).

Formule brute : C₁₆H₂₃NO₂

MM : 261,2 g.mol⁻¹

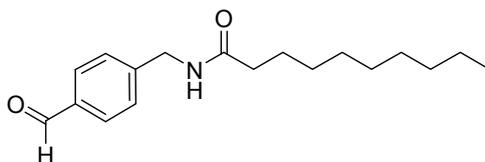
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,40

Point de fusion : 62,8-63,8°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 10,0 (1H, s, CHO) ; 7,86 (2H, d, H arom, *J* = 8,1 Hz) ; 7,45 (2H, d, H arom, *J* = 8,1 Hz) ; 6,06 (1H, m, NH) ; 4,54 (2H, d, CH₂-NH, *J* = 6 Hz) ; 2,27 (2H, t, CH₂-CO, *J* = 7,6 Hz) ; 1,68 (2H, m, CH₂-CH₂-CO) ; 1,30 (8H, m, CH₂-(CH₂)₄-CH₃) ; 0,89 (3H, m, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 192,9 (CHO) ; 173,0 (CO) ; 139,7, 137,0 (C^{IV} arom) ; 127,9, 126,8 (CH arom) ; 43,3 (CH₂-NH) ; 36,8 (CH₂-CO) ; 31,7, 29,3, 29,0, 25,8, 22,6 (CH₂-(CH₂)₅-CH₃) ; 14,1 (CH₃).

Synthèse de la N-(4-formylbenzyl)-decanamide (52)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour l'aldéhyde **49** et conduit, à partir de 1,78 g ($5,34 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **48**, au composé **52** sous forme d'une poudre blanche (1,49 g, $5,15 \cdot 10^{-3}$ mol, 97%).

Formule brute : $C_{18}H_{27}NO_2$

MM : $289,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

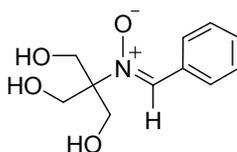
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 6/4) = 0,46

Point de fusion : 69,0-69,8°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 10,0 (1H, s, CHO) ; 7,85 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 7,45 (2H, d, H arom, $J = 8,1$ Hz) ; 6,08 (1H, m, NH) ; 4,54 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 6$ Hz) ; 2,27 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,6$ Hz) ; 1,68 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 1,28 (12H, m, $\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3$) ; 0,90 (3H, m, CH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 191,9 (CHO) ; 173,3 (CO) ; 145,6, 135,6 (C^{IV} arom) ; 130,1, 128,1 (CH arom) ; 43,2 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 36,7 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 31,9, 29,5, 29,4, 29,3, 25,8, 25,6, 22,7 ($\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$) ; 14,1 (CH_3).

Synthèse de la (Tri-hydroxyméthyl)- α -phényl nitrone (**55**)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 1 g ($9,42 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de benzaldéhyde, 2,84 g ($18,85 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de Tris-(hydroxyméthyl)-nitrométhane et 3,23 mL d'AcOH ($56,52 \cdot 10^{-3}$ mol, 6 eq) sont dissouts dans de l'éthanol anhydre en présence de tamis moléculaire 4 Å. Le milieu est ensuite refroidi à 0°C, afin que 0,56 g ($8,59 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 eq) de poussière de Zinc soit délicatement ajoutés en veillant à ne pas dépasser les 15°C. Une fois l'addition terminée, l'agitation est maintenue à température ambiante durant 30 minutes avant d'être placé à 60°C pour 10 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) puis par deux recristallisations successives dans un mélange acétate d'éthyle/n-hexane, pour conduire au composé **55** sous forme de cristaux blancs (1,52 g, $6,75 \cdot 10^{-3}$ mol, 72%).

Formule brute : $C_{11}H_{15}NO_4$

MM : $225,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 9.5/0.5) = 0,28

Point de fusion : 111,6-112,4°C

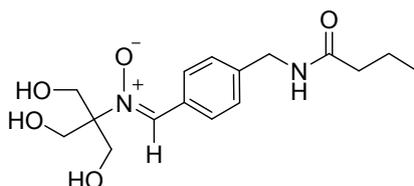
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,36 (2H, m, H arom) ; 7,60 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}(\text{O})$) ; 7,43 (3H, m, H arom) ; 4,94 (3H, t, 3 OH, $J = 5,34$ Hz) ; 3,82 (6H, d, 3 $\text{CH}_2\text{-OH}$, $J = 5,03$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 133,7 (C^{IV} arom) ; 131,7 ($\text{CH}=\text{N}(\text{O})$) ; 130,2, 129,3, 128,6 (CH arom) ; 80,4 (C^{IV}) ; 60,4 (3 CH_2).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 295 \text{ nm}$

MS (ESI+, m/z) : 226,1 [(M+H)⁺], 248,1 [(M+Na)⁺].

Synthèse de la Tris-(hydroxyméthyl)- α -[4-(butanamidométhyl)phényl]nitronne (56)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour la nitronne **55** et conduit, à partir de 0,8 g ($3,89 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'aldéhyde **49** et de 1,17 g ($7,78 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de Tris-(hydroxyméthyl)-nitromethane, au composé **56** sous forme de cristaux blancs (0,9 g, $2,78 \cdot 10^{-3}$ mol, 72%).

Formule brute : $C_{16}H_{24}N_2O_5$

MM : $324,1685 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 8/2) = 0,40

Point de fusion : 151,4-152,2°C

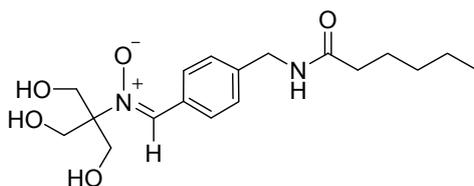
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,35 (1H, m, NH) ; 8,30 (2H, d, H arom, $J = 8,4$ Hz) ; 7,57 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}(\text{O})$) ; 7,29 (2H, d, H arom, $J = 8,4$ Hz) ; 4,94 (3H, s, 3 OH) ; 4,30 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,74$ Hz) ; 3,81 (6H, s, 3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 2,14 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,24$ Hz) ; 1,56 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ; 0,87 (3H, t, CH_3 , $J = 7,31$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,5 (CO) ; 142,1 (C^{IV} arom) ; 133,6 ($\text{CH}=\text{N}(\text{O})$) ; 130,2 (C^{IV} arom) ; 129,3, 127,2 (CH arom) ; 80,3 (C^{IV}) ; 60,4 (3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 42,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 37,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 19,2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ; 14,1 (CH_3).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 299 \text{ nm}$

HR-MS (ESI+, m/z) : 325,1760 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse de la Tris-(hydroxyméthyl)- α -[4-(hexanamidométhyl)phényl]nitronne (57)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour la nitronne **55** et conduit, à partir de 0,6 g ($2,57 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'aldéhyde **50** et de 0,78 g ($5,14 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de Tris-(hydroxyméthyl)-nitromethane, au composé **57** sous forme de cristaux blancs (0,58 g, $1,65 \cdot 10^{-3}$ mol, 64%).

Formule brute : $C_{18}H_{28}N_2O_5$

MM : $352,1998 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 8/2) = 0,44

Point de fusion : 118,2-119,2°C

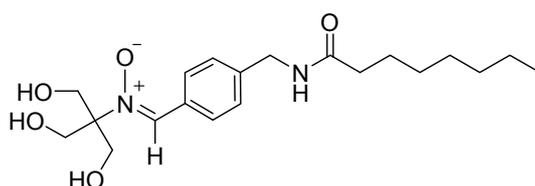
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,38 (1H, m, NH) ; 8,30 (2H, d, H arom, $J = 8,4$ Hz) ; 7,57 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,28 (2H, d, H arom, $J = 8,4$ Hz) ; 4,94 (3H, s, 3 OH) ; 4,30 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,74$ Hz) ; 3,80 (6H, s, 3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 2,15 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,36$ Hz) ; 1,52 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 1,25 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$) ; 0,87 (3H, t, CH_3 , $J = 6,82$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,8 (CO) ; 142,1 (C^{IV} arom) ; 133,6 (CH=N(O)) ; 130,2 (C^{IV} arom) ; 129,3, 127,2 (CH arom) ; 80,3 (C^{IV}) ; 60,4 (3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 42,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 35,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 31,3, 25,5, 22,3 ($\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}_3$) ; 14,4 (CH_3).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 299$ nm

HR-MS (ESI+, m/z) : 353,2057 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse de la Tris-(hydroxyméthyl)- α -[4-(octanamidométhyl)phényl]nitrone (58)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour la nitrone **55** et conduit, à partir de 0,8 g ($3,06 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'aldéhyde **51** et de 0,92 g ($6,12 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de Tris-(hydroxyméthyl)-nitrométhane, au composé **58** sous forme de cristaux blancs (0,78 g, $2,05 \cdot 10^{-3}$ mol, 68%).

Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$

MM : 380,2311 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 8/2) = 0,36

Point de fusion : 134,6-135,4°C

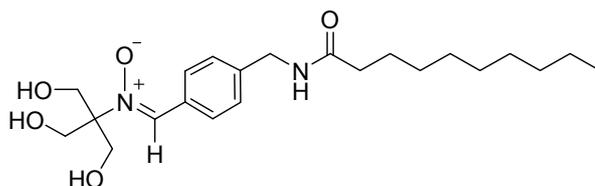
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,38 (1H, m, NH) ; 8,29 (2H, d, H arom, $J = 8,4$ Hz) ; 7,58 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,28 (2H, d, H arom, $J = 8,4$ Hz) ; 4,96 (3H, s, 3 OH) ; 4,29 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,89$ Hz) ; 3,81 (6H, s, 3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 2,15 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,31$ Hz) ; 1,52 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 1,25 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3$) ; 0,87 (3H, t, CH_3 , $J = 7,06$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,8 (CO) ; 142,1 (C^{IV} arom) ; 133,6 (CH=N(O)) ; 130,2 (C^{IV} arom) ; 129,3, 127,2 (CH arom) ; 80,2 (C^{IV}) ; 60,4 (3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 42,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 35,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 31,7, 29,1, 28,9, 25,8, 22,5 ($\text{CH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_5\text{-CH}_3$) ; 14,4 (CH_3).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 299$ nm

HR-MS (ESI+, m/z) : 381,2384 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse de la Tris-(hydroxyméthyl)- α -[4-(decanamidométhyl)phényl]nitronne (59)



Le protocole opératoire est identique à celui utilisé pour la nitronne **55** et conduit, à partir de 1,2 g ($4,16 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'aldéhyde **52** et de 1,26 g ($8,32 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de Tris-(hydroxyméthyl)-nitromethane, au composé **59** sous forme de cristaux blancs (1,16 g, $2,84 \cdot 10^{-3}$ mol, 68%).

Formule brute : $C_{22}H_{36}N_2O_5$

MM : $408,2624 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 9/1) = 0,40

Point de fusion : $138,4\text{-}139,2^\circ\text{C}$

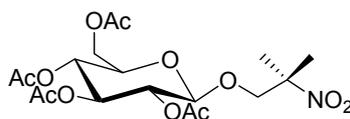
RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,38 (1H, m, NH) ; 8,30 (2H, d, H arom, $J = 8,3$ Hz) ; 7,57 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,28 (2H, d, H arom, $J = 8,3$ Hz) ; 4,97 (3H, s, 3 OH) ; 4,29 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,88$ Hz) ; 3,80 (6H, s, 3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 2,15 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,30$ Hz) ; 1,54 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$) ; 1,25 (12H, m, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH}_3$) ; 0,87 (3H, t, CH_3 , $J = 6,84$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,7 (CO) ; 142,0 (C^{IV} arom) ; 133,5 (CH=N(O)) ; 130,2 (C^{IV} arom) ; 129,3, 127,2 (CH arom) ; 80,3 (C^{IV}) ; 60,4 (3 $\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 42,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 35,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 31,8, 29,4, 29,2, 29,1, 25,8, 22,6 ($\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH}_3$) ; 14,5 (CH_3).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 299 \text{ nm}$

HR-MS (ESI+, m/z) : 409,2690 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse du 1-(tetra-O-acétyl-glucosoxy)-2-méthyl-2-nitropropane (60)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 0,5 g ($4,24 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 2-méthyl-2-nitropropanol et 1,6 g ($6,35 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,5 eq) d' $\text{Hg}(\text{CN})_2$ sont dissouts dans de l'acétonitrile anhydre. Après 30 min d'agitation, 2,6 g ($6,35 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,5 eq) d'acétobromoglucose sont rajoutés au milieu et l'agitation est maintenue à température ambiante durant encore 6 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite, évaporé sous pression réduite et repris dans de l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est alors lavée 3 fois avec NaHCO_3 , 3 fois avec KI, 3 fois avec Na_2SO_3 , séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3) pour conduire au composé **60** sous forme d'une poudre blanche (1,64 g, $2,05 \cdot 10^{-3}$ mol, 87%).

Formule brute : $C_{18}H_{27}NO_{12}$

MM : $449,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

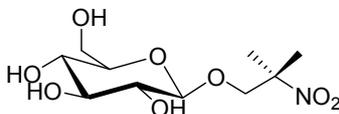
Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle : 5/5) = 0,48
 Point de fusion : 40,2-40,8°C

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 5,31-4,93 (3H, m, H-2, H-3 et H-4) ; 4,49 (1H, d, H-1, *J* = 7,9 Hz) ; 4,28 (1H, m, H-6) ; 4,14 (1H, m, H-6') ; 4,0 (2H, s, CH₂-O) ; 3,73 (1H, m, H-5) ; (12H, m, 4 CH₃-CO) ; 1,59 (3H, s, CH₃) ; 1,54 (3H, s, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 170,7, 170,2, 169,4, 169,2 (4 CO) ; 101,4 (CH-1) ; 96,5 (C^{IV}) ; 86,9 (CH-5) ; 74,9 (CH-3) ; 72,3 (CH-2) ; 71,9 (CH-4) ; 70,6, 68,3 (CH₂ 6 et 6') ; 61,7 (CH₂-O) ; 23,7 (CH₃-C^{IV}) ; 20,8, 20,7, 20,6, 20,5 (CH₃-CO).

MS (ESI+, *m/z*) : 450,1 [(M+H)⁺], 467,3 [(M+NH₄)⁺], 472,3 [(M+Na)⁺], 488,4 [(M+K)⁺].

Synthèse du 1-glucosoxy-2-méthyl-2-nitropropane (**61**)



Dans un ballon monocol, 1,14 g ($2,55 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **60** sont dissouts dans 10 mL de méthanol distillé et une quantité catalytique de méthanolate de sodium (pH = 9) est ajoutée. L'agitation est alors maintenue à température ambiante durant 4 heures puis le milieu réactionnel est neutralisé avec de la résine IRC-50, filtré sur verre fritté et évaporé sous pression réduite, pour conduire au composé **61** sous forme d'une poudre blanche (0,7 g, $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol, 98%).

Formule brute : C₁₀H₁₉NO₈

MM : 281,2 g.mol⁻¹

Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) = 0,62

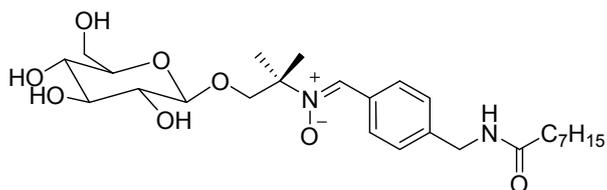
Point de fusion : 66,4-67,2°C

RMN ¹H (MeOD, 250 MHz) δ : 4,28 (1H, m, H-1) ; 3,88 (1H, m, H-6) ; 3,68 (1H, m, H-6') ; 3,35-3,16 (5H, m, H-5, H-4, H-3, H-2 et CH₂-O) ; 1,63 (6H, s, CH₃).

RMN ¹³C (MeOD, 62,86 MHz) δ : 103,3 (CH-1) ; 94,8 (C^{IV}) ; 79,6 (CH-3) ; 76,6 (CH-2) ; 73,7 (CH-5) ; 73,2 (CH-4) ; 72,0, 70,4 (CH₂ 6 et 6') ; 62,6 (CH₂-O) ; 24,3 (CH₃-C^{IV}).

MS (ESI+, *m/z*) : 282,2 [(M+H)⁺], 299,2 [(M+NH₄)⁺], 304,2 [(M+Na)⁺], 320,1 [(M+K)⁺].

Synthèse de la N-[1,1-diméthyl-1-(glucosoxyméthyl)]- α -[4-(octanamidométhyl)phényl] nitrone (**62**)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 0,23 g ($0,89 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'aldéhyde **51**, 0,5 g ($1,78 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 eq) de nitro **61** et 306 μL d'AcOH ($5,34 \cdot 10^{-3}$ mol, 6 eq) sont dissouts dans de l'éthanol anhydre en présence de tamis moléculaire 4 Å. Le milieu est ensuite refroidi à 0°C et 0,23 g ($3,56 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 eq) de poussière de Zinc sont délicatement ajoutés en veillant à ne pas dépasser les 15°C . Une fois l'addition terminée, l'agitation est maintenue à température ambiante durant 30 minutes avant d'être chauffée à 60°C pendant 20 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur couche de célite et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/méthanol 9/1) puis par chromatographie d'exclusion de taille sur résine Sephadex LH 20 (éluant : méthanol) pour conduire au composé **62** sous forme de poudre blanche (0,36 g, $7,15 \cdot 10^{-3}$ mol, 80%).

Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_8$

MM : $510,2941 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (acétate d'éthyle/méthanol : 8/2) = 0,22

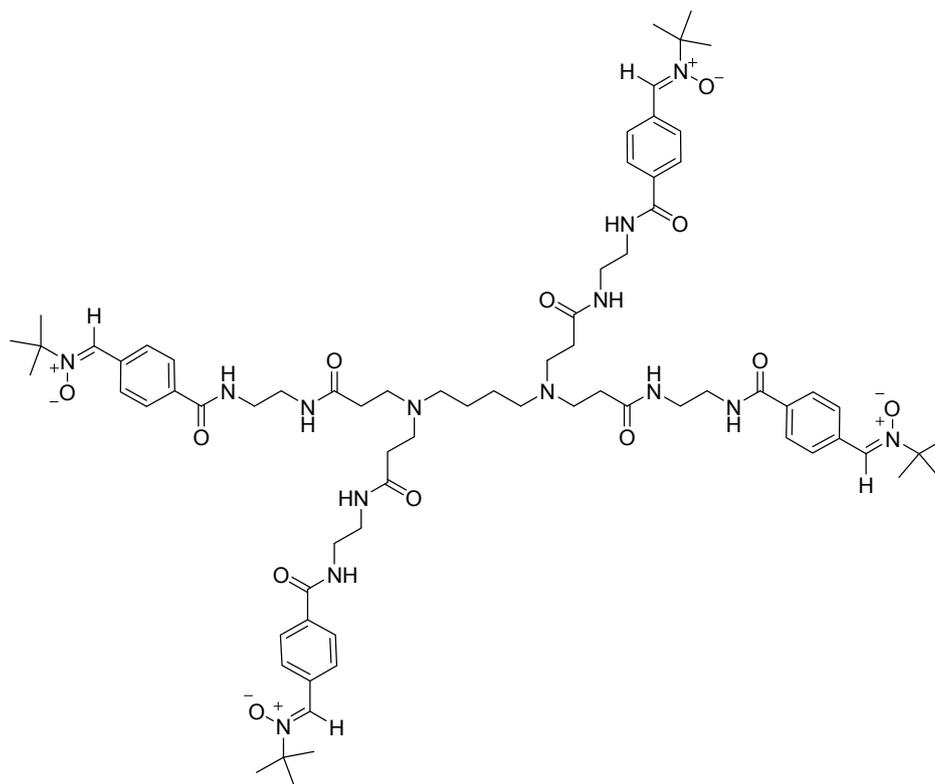
Point de fusion : 128°C (décomposition/brunissement)

RMN ^1H (DMSO, 250 MHz) δ : 8,37 (1H, m, NH) ; 8,29 (2H, d, H arom, $J = 7,6$ Hz) ; 7,82 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,28 (2H, d, H arom, $J = 7,6$ Hz) ; 4,96 (4H, m, OH) ; 4,54 (1H, m, H-1) ; 4,29 (2H, d, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $J = 5,84$ Hz) ; 4,10 (1H, m, H-6) ; 3,70 (1H, m, H-6') ; 3,37 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 3,11-2,97 (4H, m, H-5, H-4, H-3, H-2) ; 2,15 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,25$ Hz) ; 1,51 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$ et 2 $\text{CH}_3\text{-C}^{\text{IV}}$) ; 1,26 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_3$) ; 0,87 (3H, m, CH_3).

RMN ^{13}C (DMSO, 62,86 MHz) δ : 171,8 (CO) ; 141,1 (C^{IV} arom) ; 132,6 (CH=N(O)) ; 130,0 (C^{IV} arom) ; 129,1, 127,4 (CH arom) ; 103,3 (CH-1) ; 80,2 (C^{IV}) ; 76,6 (CH-3) ; 73,6 (CH-2) ; 71,7 (CH-5) ; 70,2 (CH-4) ; 61,7, 61,3 (CH_2 6 et 6') ; 60,9 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 42,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 35,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$) ; 31,7, 29,1, 28,9, 25,8 (CH_2) ; 24,1 ($\text{CH}_3\text{-C}^{\text{IV}}$) ; 22,5 (CH_2) ; 14,4 (CH_3).

UV (MeOH) : $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$

HR-MS (ESI+, m/z) : 511,3010 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse du dendrimère PAMAM 1,4-di(*N-tert*-butyl- α -carboxyphenylnitrone)butane (**67**)

Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 0,1 g ($1,83 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) de dendrimère PAMAM 1,4-diaminobutane (G0) et 0,28 g ($8,81 \cdot 10^{-4}$ mol, 4,8 eq) d'ester actif **64** sont dissouts dans du DMF anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 2 heures. Le solvant est ensuite évaporé par distillation sous vide et le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1), pour conduire au composé **67** sous forme d'une poudre blanche (0,19 g, $1,37 \cdot 10^{-4}$ mol, 75%).

Formule brute : $C_{72}H_{104}N_{14}O_{12}$

MM : 1356,7958 g.mol⁻¹

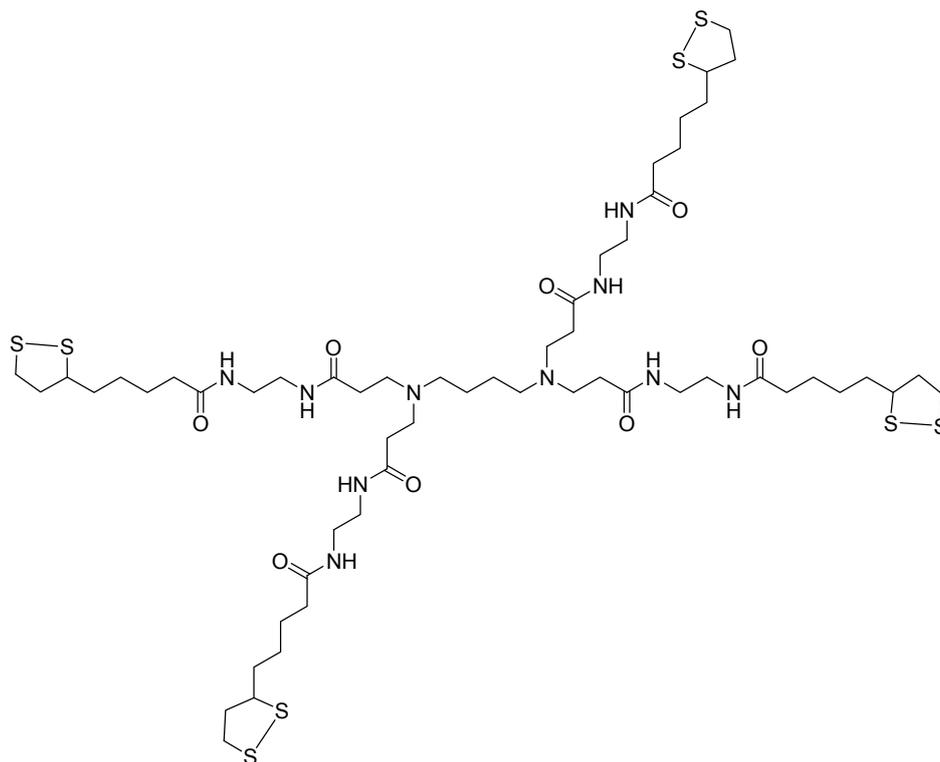
Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) = 0

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) δ : 8,31 (8H, d, H arom, $J = 8,5$ Hz) ; 8,15 (4H, m, NH-CO-PBN) ; 7,92 (12H, m, H arom et NH) ; 7,63 (4H, s, CH=N(O)) ; 3,50 (16H, m, $\underline{CH_2}$ -NH-CO) ; 2,62-2,04 (20H, m, CH₂-N et CH₂-CO) ; 1,63 (36H, s, tBu) ; 1,28-1,17 (4H, m, N-CH₂- $\underline{(CH_2)_2}$ -CH₂-N).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,86 MHz) δ : 174,0, 167,5 (CO) ; 134,8 (C^{IV} arom) ; 133,7 (CH=N(O)) ; 129,3 (C^{IV} arom) ; 128,7, 127,3 (CH arom) ; 71,5 (C^{IV} tBu) ; 53,0, 50,1, 41,1, 39,1, 34,0 (CH₂) ; 28,3 (CH₃ tBu) ; 24,9 (CH₂).

MS (ESI+, m/z) : 679,4052 [(M+2H)²⁺] car ces dérivés PAMAM sont chargés deux fois, d'où la coupure équivalente à $m/2$.

Synthèse du dendrimère PAMAM 1,4-di(5-[1,2]dithiolan-3-yl-pentanoyl)butane (68)



Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 0,1 g ($1,83 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) de dendrimère PAMAM 1,4-diaminobutane (G0) et 0,27 g ($8,78 \cdot 10^{-4}$ mol, 4,8 eq) d'ester actif **65** sont dissouts dans du DMF anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 2 heures. Le solvant est ensuite évaporé par distillation sous vide et le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1), pour conduire au composé **68** sous forme d'une poudre blanche (0,19 g, $1,37 \cdot 10^{-4}$ mol, 75%).

Formule brute : $C_{56}H_{100}N_{10}O_8S_8$

MM : $1296,5491 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

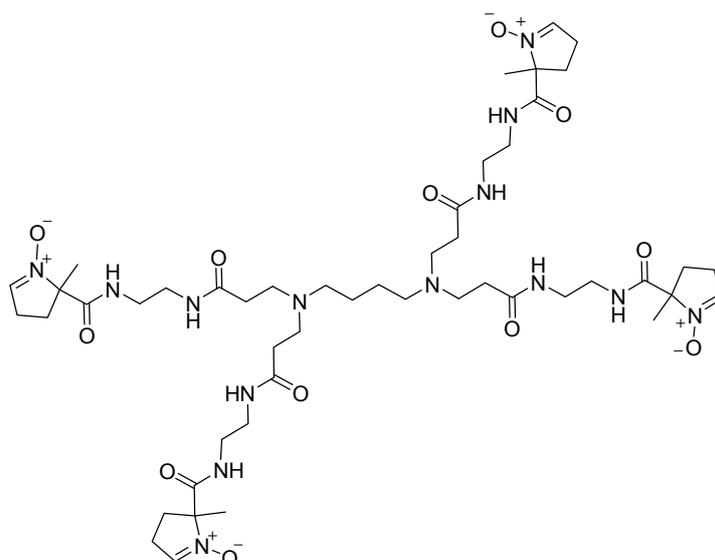
Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) = 0

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7,86 (4H, m, NH) ; 7,08 (4H, m, NH) ; 3,59 (4H, m, CH-S) ; 3,37 (16H, m, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$) ; 3,18 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-S}$) ; 2,69 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-N}$) ; 2,56-2,28 (16H, m, CH_2 lipoate et $\text{CH}_2\text{-CO}$ pamam) ; 2,23 (8H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$ lipoate, $J = 7,41 \text{ Hz}$) ; 2,02-1,24 (40H, m, 4 CH_2 lipoate et $\text{N-(CH}_2)_4\text{-N}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 174,0, 173,6 (CO) ; 56,5 (CH-S) ; 53,2, 50,2, 40,3, 40,0, 39,2, 38,5, 36,4, 34,7, 34,0, 29,7, 29,0, 25,5 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 649,2819 [$(\text{M}+2\text{H})^{2+}$]

Synthèse du dendrimère PAMAM 1,4-di(5-carboxy-5-méthylpyrrolidine-N-oxyle)butane (69)



Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 0,17 g ($3,19 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 eq) de dendrimère PAMAM 1,4-diaminobutane (G0), 0,06 g ($3,51 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,1 eq) de composé **66**, 0,073 g ($3,82 \cdot 10^{-4}$ mol, 1,2 eq) de EDC et une quantité catalytique d'HOBt sont dissouts dans du diméthylformamide anhydre. Le pH est ensuite ajusté à 8-9 avec de la DIEA et l'agitation est maintenue à température ambiante durant 6 heures. Le solvant est ensuite évaporé par distillation sous vide et le brut est purifié par chromatographie d'exclusion de taille (éluant : dichlorométhane/méthanol 1/1), pour conduire au composé **69** sous forme d'une poudre blanche (0,21 g, $2,04 \cdot 10^{-4}$ mol, 64%).

Formule brute : $C_{48}H_{80}N_{14}O_{12}$

MM : $1044,6080 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

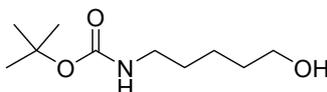
Rf (acétate d'éthyle/méthanol/eau : 7/2/1) = 0

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,06 (4H, m, NH-CO-PBN) ; 7,86 (4H, m, NH) ; 7,14 (1H, m, CH=N(O)) ; 3,38 (16H, m, CH_2 -NH-CO) ; 2,74 (8H, m, CH_2 -CH=N(O)) ; 2,58-2,00 (28H, m, CH_2 -N et CH_2 -CO) ; 1,70 (12H, s, CH_3) ; 1,24-1,12 (4H, m, N- CH_2 -(CH_2)₂- CH_2 -N).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 174,6, 169,4 (CO) ; 134,7 (CH=N(O)) ; 78,5 (C^{IV}) ; 53,0, 50,1, 41,1, 39,1, 34,0, 31,8, 25,4 (CH_2) ; 28,8 (CH_3) ; 24,9 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 523,3051 [(M+2H)²⁺].

Synthèse du 5-hydroxypentylcarbamate de *tert*-butyle (70)



Dans un ballon monocol, 1,5 mL ($13,74 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de 5-aminopentanol et 2,1 mL ($15,11 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,1 eq) de TEA sont dissouts dans 5 mL de dioxane. Le milieu est ensuite refroidi à 0°C et 3,6 g ($16,5 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de Boc_2O , dissout dans 15 mL de dioxane, sont ajoutés au milieu goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. Une fois l'addition terminée, on laisse le milieu réactionnel revenir doucement à température ambiante puis l'agitation est poursuivie durant 14 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et repris dans de l'acétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée 3 fois avec HCl 1N puis 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 7/3) pour conduire au composé **70** sous forme d'une poudre blanche (1,73 g, $8,53 \cdot 10^{-3}$ mol, 62%).

Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_3$

MM : $203,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

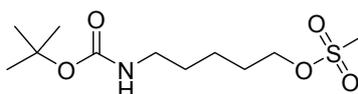
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 4/6) = 0,3

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 4,66 (1H, m, NH) ; 3,64 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-OH}$, $J = 6,12$ Hz) ; 3,13 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 2,07 (1H, s, OH) ; 1,64-1,36 (6H, m, 3 CH_2) ; 1,44 (9H, s, tBu).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 156,1 (CO) ; 79,1 (C^{IV}) ; 62,5 ($\text{CH}_2\text{-OH}$) ; 40,4 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 32,2, 29,8 (CH_2) ; 28,4 (CH_3) ; 22,9 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 204 [(M+H) $^+$], 221 [(M+ NH_4) $^+$], 226 [(M+Na) $^+$], 242 [(M+K) $^+$].

Synthèse du 5-(methanesulfonyloxy)-pentylcarbamate de *tert*-butyle (71)



Dans un ballon monocol, 733 μL ($9,45 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,2 eq) de chlorure de mésyle sont dissouts dans 5 mL de pyridine. Le milieu est ensuite refroidi à 0°C et 1,6 g ($7,88 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **70**, dissout dans 20 mL de dichlorométhane, sont ajoutés au milieu goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. Une fois l'addition terminée, on laisse le milieu réactionnel revenir doucement à température ambiante puis l'agitation est poursuivie durant 7 heures, 1,2 eq de chlorure de mésyle étant rajouté à $t = 4$ heures. Le milieu réactionnel est ensuite jeté dans de l'HCl 1N et extrait 3 fois au dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée 2 fois avec de la saumure, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Le brut est recristallisé à deux reprises successives dans un mélange acétate d'éthyle/n-hexane, pour conduire au composé **71** sous forme d'une poudre blanche (2 g, $7,11 \cdot 10^{-3}$ mol, 90%).

Formule brute : $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{S}$

MM : $281,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

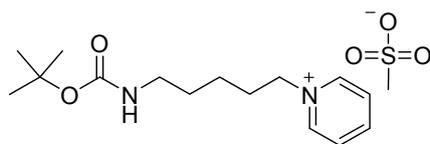
Rf (acétate d'éthyle/cyclohexane : 5/5) = 0,45

RMN ^1H (DMSO, 250 MHz) δ : 4,60 (1H, m, NH) ; 4,24 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-O-S}$, $J = 6,40$ Hz) ; 3,13 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 3,04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-S}$) ; 1,79 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-S}$) ; 1,57-1,41 (4H, m, 2 CH_2) ; 1,46 (3H, s, CH_3 tBu).

RMN ^{13}C (DMSO, 62,86 MHz) δ : 156,0 (CO) ; 79,2 (C^{IV}) ; 69,8 ($\text{CH}_2\text{-O-S}$) ; 40,2 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 37,4 ($\text{CH}_3\text{-S}$) ; 29,5, 28,8 (CH_2) ; 28,4 (CH_3 tBu) ; 22,8 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 282 [(M+H) $^+$], 299 [(M+NH $_4$) $^+$], 304 [(M+Na) $^+$], 320 [(M+K) $^+$].

Synthèse du 5-(pyridinium)-pentylcarbamate de *tert*-butyle (72)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 1 g ($3,56 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **71** sont dissouts dans de la pyridine et le milieu est chauffé sous agitation à 110 °C durant 6 heures. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et séché à l'aide d'une pompe à palette. Le brut est recristallisé à deux reprises successives dans un mélange acétonitrile/acétate d'éthyle, pour conduire au composé **72** sous forme d'une poudre blanche (1,26 g, $3,5 \cdot 10^{-3}$ mol, 98%).

Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

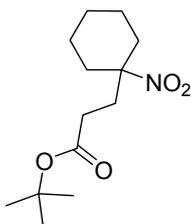
MM : $360,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

RMN ^1H (DMSO, 250 MHz) δ : 9,11 (2H, d, H arom ortho, $J = 5,52$ Hz) ; 8,63 (1H, t, H arom para, $J = 7,79$ Hz) ; 8,18 (2H, t, H arom meta, $J = 7,07$ Hz) ; 6,83 (1H, m, NH) ; 4,61 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-N}^+$, $J = 7,37$ Hz) ; 2,91 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 2,31 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-S}$) ; 1,92 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+$) ; 1,44-1,21 (4H, m, 2 CH_2) ; 1,37 (3H, s, CH_3 tBu).

RMN ^{13}C (DMSO, 62,86 MHz) δ : 156,1 (CO) ; 146,0, 145,2 (H arom) ; 128,6 (H arom) ; 77,9 (C^{IV}) ; 61,2 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$) ; 42,4 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) ; 39,0 ($\text{CH}_3\text{-S}$) ; 30,8, 29,3 (CH_2) ; 28,4 (CH_3) ; 23,2 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 265 [(M+C $_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$) $^+$].

Synthèse du 3-(1-nitro-cyclohexyl)-propionate de *tert*-butyle (74)



Dans un ballon bicol placé sous atmosphère inerte, 5 g ($38,7 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de nitrocyclohexane sont dissouts dans 8 mL d'éther anhydre. Le milieu est ensuite refroidi à 0°C, ainsi 0,44 mL ($1,11 \cdot 10^{-3}$ mol, 1/35 eq) d'une solution de KOH/MeOH à 15% (en masse) et 4,9 mL ($38,7 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) d'acrylate de *tert*-butyle sont ajoutés au milieu goutte à goutte. Une fois l'addition terminée, on laisse le milieu réactionnel revenir doucement à température ambiante puis l'agitation est poursuivie durant 16 heures. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé avec quelques gouttes d'AcOH (pH ~5) et évaporé sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/éther 95/5) pour conduire au composé **74** sous forme d'une huile jaune pâle (6,24 g, $25,93 \cdot 10^{-3}$ mol, 67%).

Formule brute : $C_{13}H_{23}NO_4$

MM : $257,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Rf (cyclohexane/éther : 9/1) = 0,37

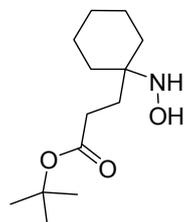
Point de fusion :

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 2,46-2,41 (2H, m) ; 2,22-2,14 (4H, m) ; 1,64-1,34 (8H, m) ; 1,46 (3H, s, tBu).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 171,4 (CO) ; 91,3 ($\text{C}^{\text{IV}}\text{-NO}_2$) ; 80,6 (C^{IV} tBu) ; 35,0, 33,4, 29,5 (CH_2) ; 28,1 (CH_3 tBu) ; 24,5, 22,4 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 258 [$(\text{M}+\text{H})^+$], 275 [$(\text{M}+\text{NH}_4)^+$], 280 [$(\text{M}+\text{Na})^+$], 296 [$(\text{M}+\text{K})^+$].

Synthèse du 3-(1-hydroxyamino-cyclohexyl)-propionate de *tert*-butyle (**76**)



Dans un tricol placé sous atmosphère inerte, 1 g ($4,14 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de composé **74** et 0,33 g ($6,21 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,5 eq) de NH_4Cl sont dissouts dans un mélange THF/ H_2O (3/1 : v/v). Le milieu est ensuite refroidi à 0°C et 1,07 g ($16,56 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 eq) de poussière de Zinc sont délicatement ajoutés en veillant à ne pas dépasser les 15°C puis, une fois l'addition terminée, l'agitation est maintenue à température ambiante durant 2 heures. Le milieu réactionnel est alors filtré sur couche de célite puis concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2) pour conduire au composé **76** sous forme d'une poudre blanche (0,6 g, $2,47 \cdot 10^{-3}$ mol, 60%).

Formule brute : $C_{13}H_{25}NO_3$

MM : $243,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

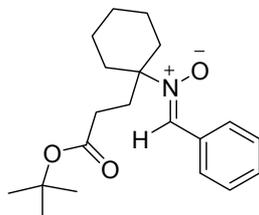
Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2) = 0,22

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 2,25 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,30$ Hz) ; 1,76 (2H, t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $J = 7,30$ Hz) ; 1,57-1,27 (10H, m, H cycle) ; 1,46 (3H, s, CH_3 tBu).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 171,4 (CO) ; 80,4 (C^{IV} tBu) ; 62,4 (C^{IV} cyclohexyl) ; 34,2, 32,8, 29,3 (CH_2) ; 28,1 (CH_3 tBu) ; 23,9, 22,2 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 244 [(M+H) $^+$], 266 [(M+Na) $^+$], 282 [(M+K) $^+$].

Synthèse de la N-(1-cyclohexyl-1-propionate de *tert*-butyle)- α -phényl nitrone (75)



Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et placé sous atmosphère inerte, 0,21 g ($2,03 \cdot 10^{-3}$ mol, 1 eq) de benzaldéhyde et 0,37 g ($1,62 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,8 eq) d'hydroxylamine **76** sont dissouts dans un mélange THF/AcOH (3/2 : v/v), en présence de tamis moléculaire 4 Å. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 60°C durant 18 heures, 0,2 eq d'hydroxylamine **76** étant rajouté à $t = 3$ et $t = 14$ heures. Le milieu réactionnel est alors filtré sur une fine couche de célite et concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2) pour conduire au composé **75** sous forme d'une poudre blanche (0,57 g, $1,73 \cdot 10^{-3}$ mol, 85%).

Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_3$

MM : 331,2 g.mol $^{-1}$

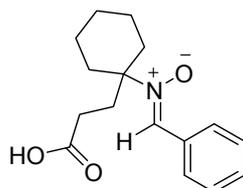
Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2) = 0,43

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,33 (2H, m, H arom) ; 7,47 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,45 (3H, m, H arom) ; 2,25-2,17 (6H, m) ; 1,88-1,72 (2H, m) ; 1,64-1,28 (6H, m) ; 1,42 (3H, s, tBu).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 172,4 (CO) ; 131,6 (C^{IV} arom) ; 130,2 (CH=N(O)) ; 128,9, 128,5 (CH arom) ; 80,5 (C^{IV} tBu) ; 75,2 (C^{IV} cyclohexyl) ; 34,3, 33,4, 29,6 (CH_2) ; 28,1 (CH_3 tBu) ; 25,4, 22,3 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 332 [(M+H) $^+$], 354 [(M+Na) $^+$], 370 [(M+K) $^+$].

Synthèse de la N-(acide 1-cyclohexyl-1-propionique)- α -phényl nitrone (77)



Dans un ballon monocol, 0,5 g ($1,51 \cdot 10^{-3}$ mol) de composé **75** sont dissouts dans un mélange TFA/ CH_2Cl_2 (2/8 : v/v). L'agitation est maintenue à température ambiante durant 4 heures puis le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le brut est purifié par

chromatographie flash sur colonne de gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 6/4) pour conduire au composé **77** sous forme d'une poudre blanche (0,38 g, $1,39 \cdot 10^{-3}$ mol, 92%).

Formule brute : $C_{16}H_{21}NO_3$

MM : $275,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf (cyclohexane/acétate d'éthyle : 4/6) = 0,12

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8,31 (2H, m, H arom) ; 7,53 (1H, s, CH=N(O)) ; 7,46 (3H, m, H arom) ; 2,32-2,20 (6H, m) ; 1,96-1,82 (2H, m) ; 1,64-1,28 (6H, m).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,86 MHz) δ : 176,7 (COOH) ; 134,1 (C^{IV} arom) ; 130,9 (CH=N(O)) ; 129,5, 128,6 (CH arom) ; 75,3 (C^{IV} cyclohexyl) ; 34,2, 32,4, 28,3, 25,3, 22,3 (CH_2).

MS (ESI+, m/z) : 276 [(M+H) $^+$], 298 [(M+NH $_4$) $^+$], 314 [(M+K) $^+$].

2. Détermination des coefficients de partage ($\log k'_w$) par CLHP-UV

Les mesures ont été réalisées sur un appareil VARIAN Prostar composé d'une colonne analytique (Microsorb C18 - 4.6 mm/250 mm) et à une température stable de 25°C.

Protocole expérimental

- Les composés sont tout d'abord dissouts dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL.
- Les temps de rétention sont ensuite mesurés par injection des différentes solutions avec au moins trois phases mobiles de polarité différente, généralement constituées d'eau et de méthanol. Le temps de rétention de la phase mobile (méthanol) est également mesuré pour chaque éluant. Les injections sont répétées au minimum trois fois par éluant et sont étalées sur plusieurs jours.
- La moyenne des temps de rétention propres à chaque composé et pour chaque éluant est alors calculée afin d'être utilisée pour déterminer le paramètre k' défini par la relation suivante :

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

t_R = temps de rétention moyen du composé élué

t_0 = temps d'élution moyen de la phase mobile

- La variation du $\log k'$ en fonction de la proportion en méthanol présente dans chaque éluant [$\log k' = f(\text{fraction méthanol})$] est alors tracée, et ainsi la régression linéaire obtenue nous permet d'établir une droite d'équation :

$$y = ax + b$$

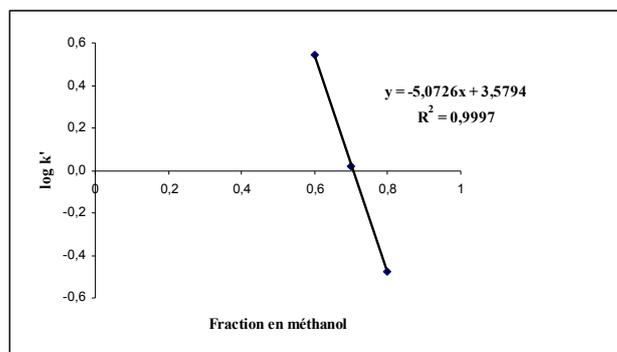
avec $y = \log k'$

x = la fraction en méthanol

a = la pente de la droite

et b = le coefficient de partition ($\log k'_w$)

L'exemple ci-dessous présente les résultats obtenus avec le LLH-4-AT :



Temps de rétention, $\log k'$ et régressions linéaires obtenus pour l'ensemble des nouvelles nitrones dérivées de la PBN présentées au Chapitre 3, après élution des échantillons dans différents éluants composés de méthanol et d'eau :

Composés	t_R									$\log k'$									R^2
	MeOH/H ₂ O									MeOH/H ₂ O									
Eluants	98/2	95/5	90/10	80/20	70/30	60/40	50/50	40/60	30/70	98/2	95/5	90/10	80/20	70/30	60/40	50/50	40/60	30/70	
LPBNChol	11,76	17,89	43,06							0,39	0,63	1,07							0,999
CholPBNL	12,26	19,06	46,49							0,41	0,66	1,11							0,999
T-PBN							4,27	5,09	6,27							-0,52	-0,27	-0,06	0,997
TC ₃ -PBN							4,19	5,01	6,36							-0,56	-0,29	-0,05	0,999
TC ₅ -PBN					4,19	5,08	7,06	11,36						-0,50	-0,25	0,06	0,39		0,997
TC ₇ -PBN				4,27	5,54	8,57	19,28						-0,47	-0,13	0,21	0,69			0,992
TC ₉ -PBN			4,14	5,43	10,11	21,27						-0,57	-0,15	0,34	0,74				0,999
GluPBNH15				4,55	7,24	14,45	39,11						-0,40	0,08	0,53	1,03			0,999

3. Détermination de la taille de particules par DLS

Les mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été effectuées à l'aide d'un granulomètre MALVERN modèle ZETASIZER Nano-S modèle 1600 ((Malvern Instruments Ltd., UK) équipé d'un laser He-Ne pour produire la source lumineuse ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 4.0 mW). Le dispositif de diffusion de la lumière enregistre le signal en rétrodiffusion à un angle de $\theta = 173^\circ$ avec un photomultiplicateur relié à un corrélateur.

Protocole expérimental

- Les composés sont tout d'abord dissouts dans de l'eau milli-Q à une concentration de 20 mM , puis cette solution est stockée à température ambiante toute une nuit avant le jour de la mesure.
- Le lendemain, la solution est filtrée sur un filtre de $0,45 \mu\text{m}$ puis $60 \mu\text{L}$ de cette dernière sont prélevés et placés dans une cuve en quartz que l'on dispose ensuite dans la fenêtre de détection du granulomètre.
- L'expérience est alors lancée une heure plus tard, à une température de 25°C . Le temps d'acquisition est de 20 min environ et chaque donnée expérimentale finale correspond à une moyenne de 10 valeurs, elles mêmes issues à chaque fois d'une moyenne de 10 mesures.
- Cette solution mère est ensuite diluée successivement, par un principe de dilutions en chaîne, et chaque nouvelle concentration est analysée en DLS suivant le même protocole que précédemment.

