



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Chimie-Biologie-Santé*

Présentée et soutenue par ***Benaïssa BOUGUERNE***
Le *16 Janvier 2012*

Titre :

Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose).

JURY

Pr. Françoise Nepveu	Professeur, IRD 152 PharmaDEV, UPS, Toulouse, Président du jury
Pr. Angel Messegueur	Professeur, Inst. Advanced Chemistry of Catalonia, Barcelone, Rapporteur
Dr. Denis Deffieux	Maitre de conférence, CNRS 5255 Inst. Sciences Moléculaires, Bordeaux I, Rapporteur
Dr. Mustapha Rouis	Directeur de Recherches, INSERM, UR4 UPMC, Paris 6, Examinateur
Dr. Michel Baltas	Directeur de Recherches, CNRS 5068 SPCMIB, UPS, Toulouse, directeur de thèse
Dr. Anne Nègre-Salvayre	Directeur de Recherches, INSERM 1048 I2MC, UPS, Toulouse, directrice de thèse

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière*

Unités de recherche : *Laboratoire de Synthèse et Propriétés physico-chimiques de Molécules d'Intérêt Biologique, CNRS 5068. Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM 1048.*

Directeurs de thèse : *Michel Baltas et Anne Nègre-Salvayre*

Je dédie ce travail à ma chère nièce Fatima

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Françoise Nepveu pour avoir présider mon jury, Denis Deffieux et Angel Messeguer pour avoir bien voulu rapporter mon manuscrit et Mustapha Rouis d'avoir participer à mon jury comme examinateur. Merci également pour l'échange scientifique qui a suivi mon exposé.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Michel Baltas et Anne Nègre-Salvayre pour leur accueil et d'avoir assuré la direction de ces travaux. Je leur suis reconnaissant de la confiance et de l'autonomie qu'ils m'ont accordées, ainsi que de leurs précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à Nathalie Augé, Cecile Vindis, Corinne Bernis, Marie-Hélène Grazides, Florence Bedos-Belval, Christiane André-Barrès et Corinne Bacqué pour leur participation à ce travail.

Merci aussi, à Prithwiraj De pour ses précieux conseils en chimie de synthèse, à Christian Lherbet pour son encouragement et aux étudiants que j'ai encadré (Leslie, Ferial et Alexandre) pour leur sérieuse participation à ce travail et aussi, pour leur patience avec moi ...

Je remercie sincèrement mes proches et mes amis qui m'ont soutenu ces trois années et plus particulièrement Andrea, Mohamed (Momo), Nasro, Khouloud, Jérémy ... pour leur amitié et leur soutien.

Je remercie également les personnes du service HPLC et particulièrement Chantal Zedde et les personne des services RMN et spectroscopie de masse. Je remercie également tous les permanents et non permanents des deux laboratoires (SPCMIB et I2MC).

Enfin, je remercie toute ma famille à Chabaat ou ailleurs et plus particulièrement mon père Mr. BOUGUERNE Dahri et ma mère Dahbia, car leur soutien était une véritable motivation pour moi et leur satisfaction un véritable but durant ce travail. Je remercie aussi ma sœur « lalla » Fatima, sa petite qui s'appelle aussi Fatima !!! et son mari Said, qui m'ont soutenu pour mener à terme ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Introduction générale.....	5
Chapitre I : Radicaux libres, stress oxydant et Athérosclérose	7
Introduction	7
1. Les radicaux libres	7
1.1. Un radical libre ?	7
1.2. Production des radicaux libres.....	7
1.1.1. Méthodes physiques	7
1.1.2. Méthodes chimiques	7
1.1.3. Méthodes électrochimiques	8
1.2. Radicaux libres en biologie	8
1.2.1. Radicaux libres oxygénés (ROS)	8
1.2.2. Radicaux libres azotés (RNS)	9
1.2.3. Radicaux libres soufrés	10
1.2.4. Radicaux libres à partir de flavines et quinones	11
2. Le stress oxydant	12
2.1. Définition du stress oxydant	13
2.2. Effets des ROS	13
2.3. Les systèmes antioxydants	14
2.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques	14
2.3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)	15
2.3.1.2. La catalase	15
2.3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPX)	15
2.3.1.4. L'hème oxygénase	15
2.3.1.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)	16
2.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	16
2.3.1.1. Les antioxydants endogènes	16
Glutathion	16
Acide Urique	17
Les protéines de stockage des métaux de transition	17
2.3.1.2. Les antioxydants exogènes	17

La vitamine E ou α -tocophérol	17
La vitamine C ou acide ascorbique	18
Les antioxydants exogènes phénoliques	19
<i>Les antioxydants exogènes phénoliques naturels</i>	19
<i>Les flavonoïdes</i>	19
<i>Les acides phénoliques</i>	20
<i>Le resveratrol</i>	20
<i>Les tannins</i>	21
<i>Les antioxydants exogènes phénoliques de synthèse</i>	22
3. L'Athérosclérose	25
3.1. Généralités	25
3.1.1. Historique	25
3.1.2. Définition	25
3.1.3. Manifestations cliniques	26
3.2. Genèse de la plaque d'athérome	27
3.2.1. Cellules de la paroi vasculaire	28
3.2.1.1. Les cellules endothéliales de l' <i>intima</i>	28
3.2.1.2. Les cellules musculaires lisses (CML)	29
3.2.1.3. Les monocytes	30
3.2.1.4. Les lymphocytes.....	30
3.2.2. Les lipoprotéines	31
3.2.2.1. Métabolisme des lipoprotéines	31
3.2.2.2. Différentes classes de lipoprotéines	32
Les chylomicrons	32
Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL)	32
Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)	32
Les lipoprotéines de faible densité (LDL)	32
Les lipoprotéines de haute densité (HDL)	32
La lipoprotéine (a) (Lp(a))	32
3.2.3. Oxydation des LDLs et théorie oxydative de l'athérosclérose	33
3.2.4. Formation et évolution de la plaque Athéroscléreuse	37
3.3. Traitements	40
3.3.1. Les traitements actuels	40

Les résines échangeuses d'ions	40
Les fibrates	41
Les inhibiteurs de l'HMG CoA reductase (ou statines)	42
Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol	45
Les huiles de poissons	45
3.3.2. Les traitements qui ciblent l'oxydation des LDLs ou antioxydants.....	45
Chapitre II : Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes	47
Introduction	47
1. La réaction d'oxydoréduction	47
2. Mécanismes antioxydants des systèmes phénoliques	48
2.1. Transfert d'atome d'hydrogène (<i>HAT, hydrogen atom transfer</i>)	48
2.2. Transfert monoélectronique (<i>SET, single electron transfer</i>)	48
2.3. La chélation des métaux de transition	49
3. Modélisation de l'activité antioxydante	49
4. Motifs cinnamoylés et benzaldéhydes phénoliques (travaux antérieurs)	52
4.1. Les cinnamiques phosphonates	54
4.2. Synthèse d'une famille de monomères hydrazones	55
1) Monomères syringiques	55
2) Monomères catécholiques	56
4.3. Les dérivés Bis-aryl (Bis-phénol)	57
4.3.1. Synthèse de la bisvanilline	58
4.3.2. Synthèse des Bisphosphonodiester	59
4.3.3. Synthèse des Bis-phénol dissymétriques (phosphonates-hydrazones)	61
4.3.4. Synthèse des Bis-phénol symétriques (hydrazones)	64
Conclusion	66
Chapitre III : Activités biologiques.....	67
Introduction	67
1. Monomères hydrazones syringiques	69
1.1. Effet des hydrazones syringiques sur l'oxydation des LDLs	69
1.2. Effet sur la génération de l'anion superoxyde	70
1.3. Effets cytoprotecteurs.....	71
1.4. Etudes comparatives entre monomères et leurs constituants	72

1.5. Effet piègeur de carbonyles	73
1.6. Conclusion	74
2. Monomères hydrazones catécholiques	75
3. BisvanillylHydralazone (BVH)	77
3.1. Effet de BVH sur l'oxydation des LDLs	78
3.1.1. Effet de BVH sur l'oxydation des LDLs par le cuivre et AAPH	78
3.1.2. Effet de BVH sur l'oxydation des LDLs par les HMEC-1	78
3.2. Effet de BVH sur la génération des ROS	81
3.2.1. ROS extracellulaires	81
3.2.2. ROS intracellulaires	84
3.3. Effet de BVH sur la signalisation pro-inflammatoire	85
3.4. Effet de BVH sur la formation des cellules spumeuses et le stress carbonyle	88
3.5. Effet de BVH sur la signalisation apoptotique	90
3.6. Effet de BVH sur le développement de l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-}	94
3.7. Discussion	97
4. Perspectives	101
Chapitre IV : Diaryl éthers hautement fonctionnalisés « nouveaux agents antiathérogènes ».....	
	102
Introduction.....	102
1. Diaryl éthers naturels	103
1.1. Acides aminés et peptides	103
1.1.1. Hormones thyroïdiennes.....	103
1.1.2. Isodityrosine	103
1.1.3. Glycopeptides	104
1.2. Lignans et néolignans	105
1.3. Diaryl éthers cycliques heptanoïdes	106
2. Diaryl éthers de synthèse	107
3. Formation de diaryl éther. Généralités et application à la synthèse des produits naturels	108
3.1. Couplages catalysés par un métal	109
3.1.1. Couplages catalysés par le cuivre ou condensation d'Ullmann	109
3.1.2. Couplages catalysés par le palladium	111

3.2. Réaction de substitution nucléophile aromatique	112
3.3. Le couplage oxydant	112
4. Aperçu bibliographique de la formation de diaryl éthers catalysée par un métal	113
4.1. Formation de diaryl éthers catalysés par le palladium	113
4.2. Formation de diaryl éthers catalysée par le cuivre	119
5. Synthèse de Diaryl éthers dérivés de la vanilline	126
5.1. Etude méthodologique de la réaction du couplage aryl aryl éther	126
5.2. Déprotection de la fonction benzyle du diaryl éther (24a)	135
5.3. Synthèse des hydrazones	138
5.4. Synthèse des phosphonates	139
5.5. Evaluation du pouvoir antioxydant et cytoprotecteur des diaryl éthers symétriques hydrazones et phosphonates	141
5.6. Comparaison avec les résultats antérieurs. Perspectives	144
Conclusion générale.....	148
Partie Expérimentale	150
Annexes : Structures, publications et congrès	198

Liste des abréviations

4-HNE	4-hydroxynonéal
AAPH	2,2'-azobis-2-méthyl-propanimidamide, dihydrochloride
ADP	adenosine diphosphate
AGPI	acides gras polyinsaturés
ALEs	advanced lipid peroxidation end products
BDE	bond dissociation enthalpy
BHT	2,6-ditertiobutyl-4-méthylphénol
BnBr	Bromure de benzyle
BSA	bovine serum albumin
BV	bisvanilline
BVH	bisvanillylhydralazone
CCM	chromatographie en couche mince
CM	chylomicrons
CML	cellules musculaires lisses
DCM	dichlorométhane
DHE	dihydroéthidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine
DPPH	2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
éq	équivalent(s)
Et ₂ O	acétate d'éthyle
GPX	glutathion peroxydase
GSH	glutathion
H2DCFDA-AM	dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)
HAT	hydrogen atom transfer
HDL	lipoprotéine à haute densité
Hdz	hydralazine

HMEC	cellules endothéliales microvasculaires humaines
HMGC _o A	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
HRP	horseradish peroxidase
IC	ionisation chimique
IDL	intermediate density lipoproteins
IR	infra rouge
LDA	diisopropylamidure de lithium
LDL	lipoprotéine de faible densité
MDA	malonaldéhyde
MPO	myéloperoxydase
MTT	bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné
N-BuLi	n-butyllithium
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
NOS	nitroso synthase
OMS	organisation mondiale de la santé
oxLDL	lipoprotéine de faible densité oxydée
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RCC	composés carbonylés réactifs
Rdt	rendement
Rf	rapport frontal
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNS	espèces réactives de l'azote
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RPE	résonance paramagnétique électronique
Rpm	tour par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SET	single electron transfer
SM	spectrométrie de masse
SOD	superoxyde dismutase
TA	température ambiante
TBARS	substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TBDMS	tertiobutyldiméthylsilane
TBS	tris Buffered Saline
TG	triglycéride
THF	tétrahydrofurane
UV	ultra violet
VLDL	lipoprotéine de très faible densité

Introduction générale

Introduction générale

Ce travail de thèse a été effectué en sein de deux équipes de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. i) l'équipe « Produits Naturels et Analogues : Synthèse et Applications » dans le Laboratoire de Synthèse et Propriétés physicochimiques de Molécules d'Intérêt Biologique, CNRS 5068 ; et ii) l'équipe « Athérosclérose et artériosclérose de greffe » dans l'Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, INSERM 1048.

L'athérosclérose est aujourd'hui une des causes majeures de mortalité au niveau mondial et est à l'origine de la plupart des maladies cardio-vasculaires. Le stress oxydant joue un rôle majeur dans l'athérogenèse et les maladies cardiovasculaires. Les modifications oxydatives des LDLs (oxLDLs) sont la première étape du processus athérogène. Par ailleurs, les oxLDLs exercent diverses propriétés biologiques (inflammation, prolifération et migration cellulaire, apoptose).

Ce travail de thèse se situe à l'interface entre la Chimie et la Biologie. Il concerne plus précisément, la synthèse d'antioxydants phénoliques et leur évaluation biologique vis-à-vis de l'athérosclérose.

La première partie de ce manuscrit porte sur une mise au point bibliographique du stress oxydant en relation avec l'athérosclérose. Nous rappellerons quelques généralités sur les radicaux libres qui sont la cause (entre autres facteurs) de cette pathologie. Puis, nous présenterons le stress oxydant et sa conséquence majeure : la peroxydation lipidique, les produits de cette peroxydation et leurs implications dans la pathologie. Ensuite nous allons présenter les systèmes naturels de défense contre le stress oxydant, et nous porterons une importance plus particulière sur les systèmes phénoliques qui vont être les antioxydants choisis dans ce travail. Et enfin nous allons présenter les processus athérogènes avec les traitements actuels de l'athérosclérose.

La deuxième partie sera consacrée à la présentation du mécanisme d'action des antioxydants phénoliques et à la présentation des travaux antérieurs (systèmes cinnamiques phosphonates monomères et dimères), ainsi que quelques résultats du travail de thèse actuel sur des familles de composés ciblées : i) monomères hydrazones fonctionnalisés avec des fragments syringiques et catécholiques et ii) dimères hydrazones issus de la 5,5'-bisvanilline. Une brève présentation de la relation structure/activité des antioxydants de ces familles est présentée.

La troisième partie sera consacrée à une étude biologique approfondie des meilleurs systèmes précédents à savoir les monomères syringiques hydrazone et le dimère symétrique appelé

Introduction générale

BVH (BisVanillylHydralazone) formé à partir de la 5,5'-bisvanilline et deux motifs hydralazines. Les études *in vitro* portent sur l'activité antioxydante dans des systèmes cellulaires et acellulaires, l'autotoxicité des agents étudiés et leur effet cytoprotecteur. Enfin le BVH a été évalué *in vivo*.

La quatrième partie sera consacrée à une nouvelle famille de composés que nous avons conçus et élaborés. Elle est basée sur la synthèse de systèmes phénoliques de type diaryl éthers hautement fonctionnalisés issus d'un couplage initial entre la 5-bromo(ou 5-iodo)vanilline et la 5-hydroxyvanilline. Cette partie se divise en quatre points : i) une étude bibliographique des diaryl éthers naturels et de leurs méthodes de synthèse ; ii) une étude méthodologique du couplage aryl aryl éther catalysé par un métal de transition (cuivre ou palladium) ; iii) la construction de motif diaryl éther d'intérêt à travers une étude extensive de méthodes de synthèse ; iv) l'élaboration de nouveaux composés cibles de type diaryl éther phosphonates ou hydrazones.

Dans ce chapitre nous rapportons également une étude préliminaire de l'activité antioxydante de ces nouveaux composés.

Chapitre I

Radicaux libres, stress oxydant et athérosclérose

Introduction

Les radicaux libres interviennent dans un grand nombre de domaines en chimie, aussi bien en chimie sous rayonnement ionisant, chimie des radioéléments, qu'en chimie organique, inorganique, photochimie... Généralement les réactions d'oxydoréduction font intervenir des intermédiaires radicalaires. Ces réactions sont omniprésentes dans le milieu vivant et gouvernent des processus aussi importants que la reproduction des espèces, la mutagenèse, la défense contre les maladies. Ces réactions interviennent dans le vieillissement et dans certaines pathologies.

1. Les radicaux libres

1.1. Un radical libre

Par définition, un radical libre est un composé possédant un électron célibataire. Dans une molécule les doublets électroniques sont localisés dans des orbitales liantes, non liantes ou anti-liantes. L'orbitale d'un électron célibataire peut, de même, être liante, non liante ou anti-liante, et ceci a des conséquences sur les propriétés chimiques et structurales du radical libre. Un radical libre est le plus souvent instable, donc réactif et sa durée de vie est très courte (de l'ordre d'une micro à nano-seconde).

1.2. Production des radicaux libres

La principale voie de production des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, les autres étant l'élimination ou l'addition d'un électron. Ces réactions sont endergoniques. Une fois produits, les radicaux sont souvent instables. Il faut donc des méthodes de détection adéquates.

Les méthodes utilisées pour produire des radicaux libres sont :

1.2.1. Méthodes physiques : Thermolyse, photolyse, radiolyse et sonochimie.

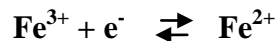
1.2.2. Méthodes chimiques : L'oxydoréduction : l'exemple le plus important est la réaction de Fenton. En 1876, H. J. H. Fenton décrit l'oxydation de l'acide tartrique par addition de fer (II).¹ Il mit en évidence l'action catalytique du fer en 1895. C'est une réaction qui permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal (Cu, Fe).

¹ Wardman P, and Candeias. Fenton centennial symposium. *Radiation research*. 145:523-531, 1996.



Réaction de Fenton.

1.2.3. Méthodes électrochimiques : La production du radical hydroxyle (HO^\bullet) s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électrochimiquement via des électrodes de mercure ou de graphite le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton.



1.3. Radicaux libres en biologie

La biochimie des radicaux libres est née en 1960, quand McCord et Fridovich montrent que l'anion superoxyde est sécrété en milieu vivant. En 1969, ces mêmes chercheurs découvrent la superoxyde dismutase (SOD). En 1970, Murad et Ignarro mettent en évidence les effets relaxants du monoxyde d'azote NO^\bullet , ce qui leur vaut le prix Nobel de médecine en 1998.²

1.3.1. Radicaux libres oxygénés (ROS)

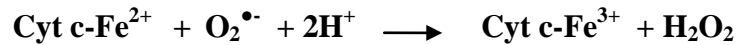
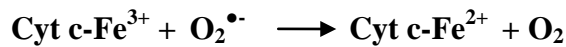
L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ et sa forme acide ont une faible réactivité. En revanche et en présence de cation métallique, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ donne naissance au radical hydroxyle HO^\bullet très réactif.

Lors de la respiration mitochondriale, le dioxygène se réduit en eau. Les étapes de la réduction sont de 1 ou 2 électrons, mais aucun intermédiaire moléculaire ou radicalaire ne devrait sortir. Or il se produit des fuites de radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui sortent dans le cytosol (1 à 2 % du dioxygène respiré). L'autre source de ce radical est la NADPH oxydase, qui est exprimée par la plupart des cellules et en particulier dans les neutrophiles.

Dans le cytosol (pH = 7.4) les radicaux superoxydes sont sous forme déprotonée, ce sont des oxydants ou des réducteurs doux, peu réactifs avec les bio-polymères qui ne contiennent pas

² Houée Levin C, Sicard Roselli C and Bergès J, "Chimie et Biochimie Radicalaires", Belin edition, 2005.

un cation métallique. A titre d'exemple, ces radicaux peuvent à la fois oxyder la forme réduite du cytochrome c (Cyt c) ou réduire sa forme oxydée.



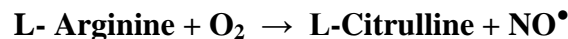
Oxydation et réduction du cytochrome C, Cyt c.

Dans les organites cellulaires acides tels que les lysosomes (pH ~ 5), l'anion superoxyde est sous sa forme acide appelée radical hydroperoxyde HO_2^{\bullet} qui est suffisamment oxydant pour initier une peroxydation lipidique.

Du fait de leur constante de vitesse réactionnelle très élevée ($> 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), les radicaux HO^{\bullet} peuvent oxyder les protéines, les acides nucléiques et peroxyder les acides gras.

1.3.2. Radicaux libres azotés (RNS)^{3,4,5}

L'oxyde azotique NO^{\bullet} est principalement produit par un système enzymatique, la NO-synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH (1.5 équivalent).



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide d'enzyme. Le NO^{\bullet} peut réagir avec les fonctions thiols en donnant naissance aux *S-nitroso thiols* (RS-NO), avec les métaux de transition (fer, cuivre) et avec l'anion superoxyde pour former le peroxydinitrite.

La forme acide du peroxydinitrite (ONOOH) est un oxydant fort, dont la rupture produit deux oxydants puissants (NO_2^{\bullet} , OH^{\bullet}). Il peut également s'ajouter au CO_2 pour donner un adduit instable, qui donne par la suite les radicaux NO_2^{\bullet} et $\text{CO}_3^{\bullet-}$. (Schéma. 1).

³ Eiserich J P, Patel R P, O'Donnel V B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects. Med.*, 19:222, 1998.

⁴ Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. USA.* 101:4003-4008, 2004.

⁵ De Mel A, Murad F, and Seifalian A M. Nitric Oxide: A Guardian for Vascular Grafts. *Chem. Rev.* 111(9):5742-5767, 2011.

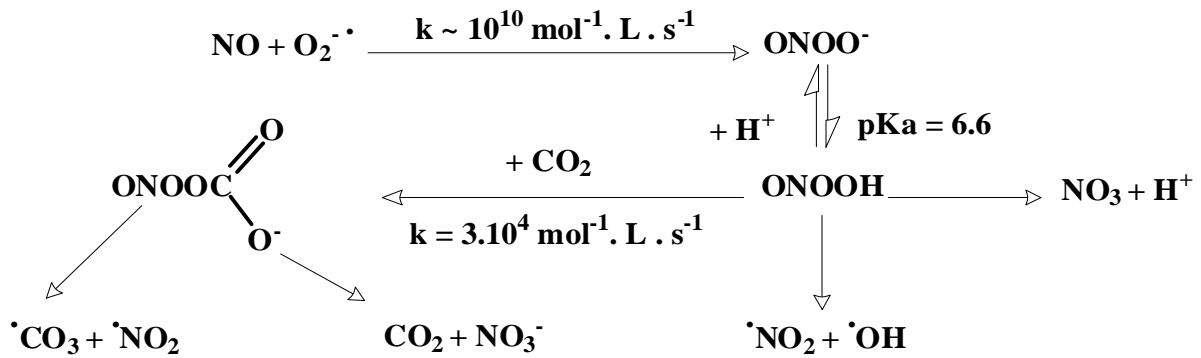


Schéma. 1. Formation et décomposition de l'ion peroxyinitrite.

1.3.3. Radicaux libres soufrés

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/ dithiol de protéines ou de petits peptides.² Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tripeptide dont la concentration dans le cytosol peut aller jusqu'au mM. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS[•]) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG^{••}) (Schéma 2).

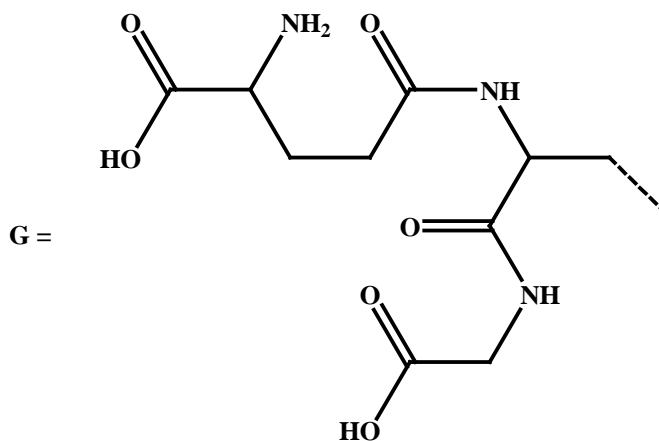


Schéma. 2.

1.3.4. Radicaux libres à partir de Flavines et Quinones

Les quinones et les flavines sont aptes à transférer les électrons un à un. Leurs formes radicalaires sont stabilisées par résonance (Schéma. 3). Ce sont des cofacteurs enzymatiques.

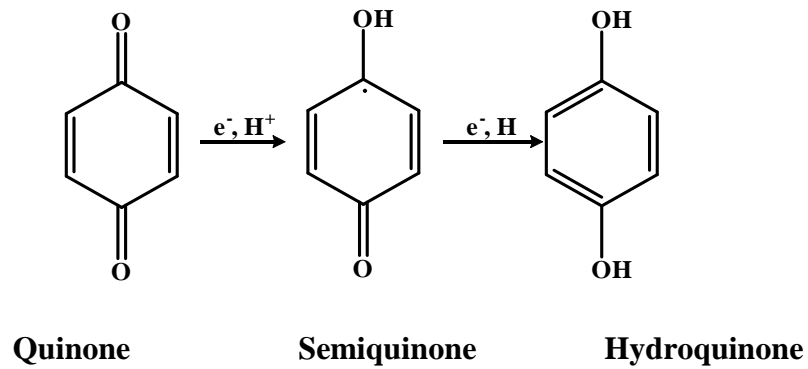


Schéma. 3. Résonance des quinones.

2. Stress oxydant

Les espèces oxygénées activées ou ROS sont produites en permanence dans l'organisme, et sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme, état redox physiologique pour l'expression de gènes).

Le plus souvent, les ROS-RNS formées subissent une transformation en une autre forme réactive (Figure 1). Ainsi, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peuvent interagir avec les métaux de transition (fer, cuivre) pour générer des radicaux hydroxyles $\bullet OH$ (Fenton). De même, $NO\bullet$ se combine aisément avec $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxyde nitrosé $ONOO^-$, agent non radicalaire à la fois oxydant et nitrosant.

Grâce à la présence d'antioxydants, il existe un équilibre physiologique subtil entre la production et l'élimination des ROS et RNS. Les cellules vasculaires sont dans un état redox basal. Cet équilibre peut être rompu sous l'effet de certains stimuli pathologiques endogènes (hyper-LDLémie, hypertension, diabète...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme...),⁶ conduisant à un stress oxydant.

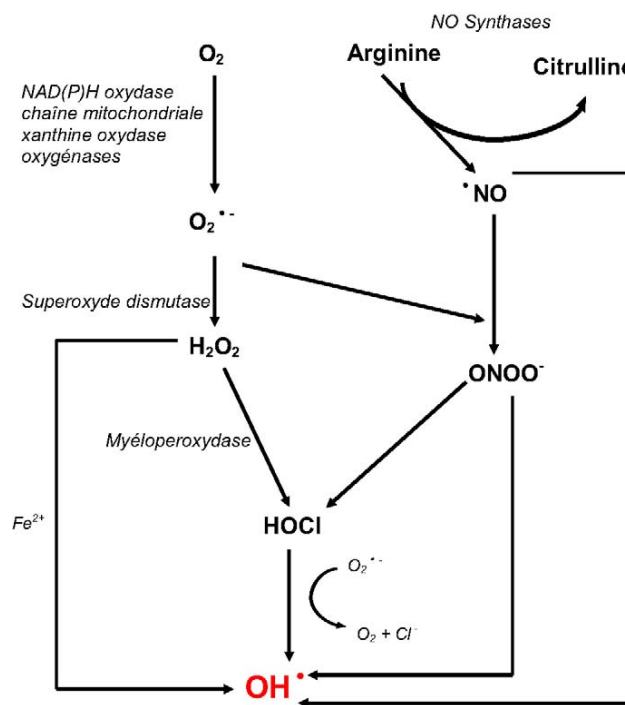


Figure 1. Sources cellulaires et interconversions des ROS et RNS.⁷

⁶ Peynet J, Beaudoux J L, Legrand A. Stress oxydant et athérosclérose. In: Delattre J, Beaudoux J L, Bonnefont D, Rousselot, editors. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Tec Doc Lavoisier Ed. 2005.

⁷ Beaudoux J L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, and Peynet J. Composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*. 2 :144–150, 2006.

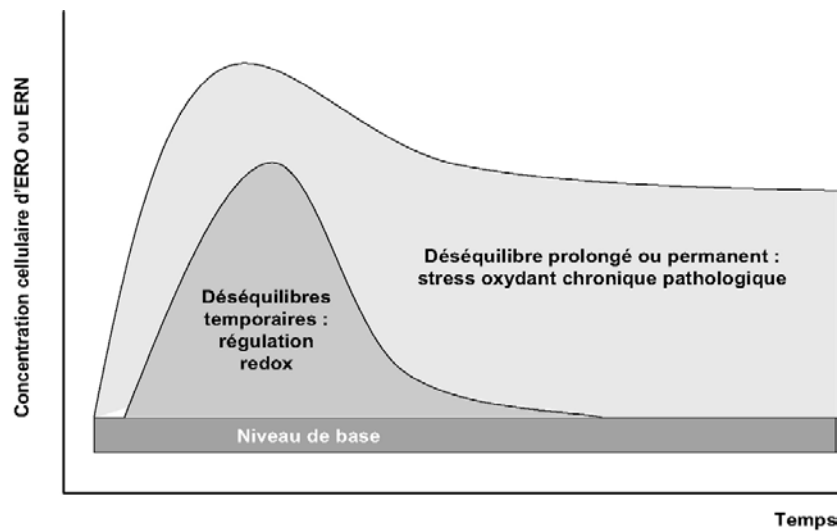


Figure. 2. Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aiguë et chronique des ROS et RNS.⁶

2.1. Définition du stress oxydant

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ROS, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ROS, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes.⁸ La pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des ROS. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique. Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus (Figure 2).

2.2. Effets des ROS

Les relations entre les causes du stress oxydant et les modifications cellulaires sont résumées dans la figure 3. Le stress oxydant active des voies de signalisation (protéine kinase C, kinases de stress) et des facteurs de transcription redox-sensibles tels que NF- κ B, avec des conséquences sur la croissance, la prolifération et l'apoptose cellulaires.

⁸ Sies H, Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91:31-38, 1991.

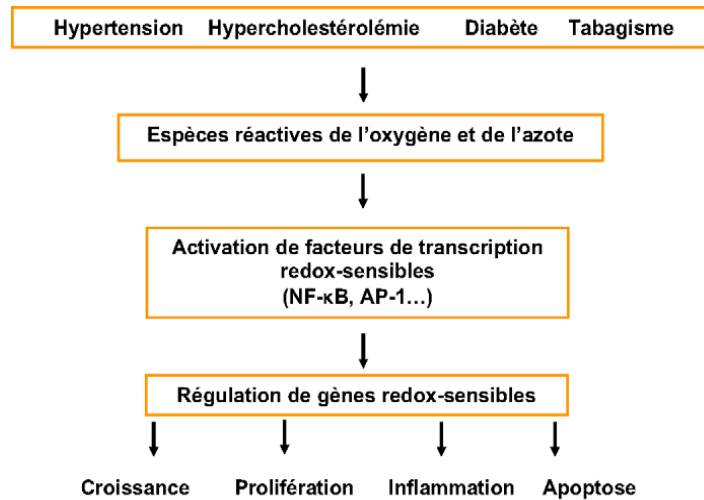


Figure. 3. Effets cellulaires du stress oxydant vasculaire.

Ces gènes sont également impliqués dans les processus inflammatoires, créant donc un lien direct entre le stress oxydant vasculaire et la réaction inflammatoire chronique, qui caractérise l'athérosclérose.

L'oxydation des LDLs (Low-density lipoproteins) est une conséquence de la génération de ROS dans la paroi vasculaire. Cette modification est le point d'initiation du processus athérogène selon la théorie oxydative de l'athérosclérose.

Pour lutter contre la génération de ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes antioxydants.

2.3. Les systèmes antioxydants

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

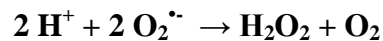
2.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Pour contrôler la production permanente des ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ROS. Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser.

2.3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)^{9,10}

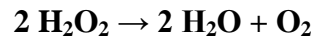
Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn-dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire.

La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante "anti-O₂^{•-}" la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale.



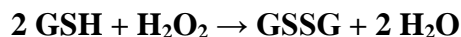
2.3.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie.



2.3.1.3. La glutathion peroxydase (GPX)

Les enzymes de cette famille sont Selenium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène.



2.3.1.4. L'hème oxygénase

L'hème oxygénase dégrade l'hème (prooxydant) en biliverdine, puis en bilirubine qui est un antioxydant, en CO et en fer, et peut prévenir l'oxydation des LDLs. On distingue l'hème

⁹ Salvayre R, Auge N, and Nègre-Salvayre A. Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, Eds. Masson: Paris, Vol. 14, pp 269-290, 2003.

¹⁰ Soulère L, Viodé C, Périé J. and Hoffmann P. Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50:578-582, 2002.

oxygénase constitutive et inductible. Cette dernière est induite par le stress oxydant et les oxLDLs, et possède un effet antiathérogène chez la souris.

2.3.1.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Elles jouent aussi un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.¹¹

2.3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

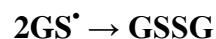
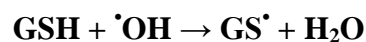
Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent (effet *scavenger*) avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation.¹² Pendant ces réactions, les antioxydants s'oxydent en dérivés stables, ou persistent pendant un certain temps sous forme radicalaire. Ces formes radicalaires peuvent devenir des prooxydants.

Comme évoqué précédemment, ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les exogènes (vitamines, oligo-éléments, ou antioxydants de synthèse).

2.3.2.1. Les antioxydants endogènes

a) Glutathion

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants. Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire.¹³



¹¹ Hattori I, Nakamura H, Masutai H et al. Thiorédoxin-dependent redox regulation – implication in aging and neurological diseases. Critical review of oxidative stress and aging. RG Cutler and H Rodriguez Eds. *World Scientific*. Vol II pp 87 – 101, 2003.

¹² Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125:288–306, 2011.

¹³ Baudin B. Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*. 2(1):43-52, 2006.

b) Acide Urique

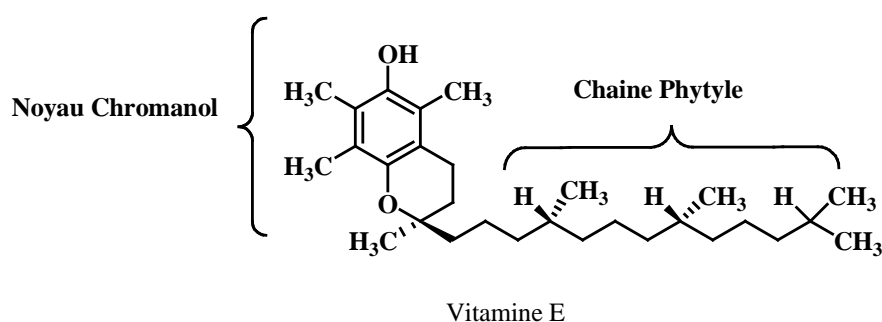
L'acide urique est un piègeur de $^1\text{O}_2$, des radicaux peroxydes et hydroxyles (RO_2^\bullet et HO^\bullet), de l'ozone et de HClO . La réaction de l'acide urique avec ces ROS génère des radicaux moins réactifs que HO^\bullet .

c) Les protéines de stockage des métaux de transition

Des protéines liant les métaux (transferrine, céruloplasmine, etc.), l'albumine ou l'haptoglobine diminuent le taux des ions métalliques libres en les complexant avec en conséquence, une diminution de leur pouvoir oxydant. A titre d'exemple, la réaction de Fenton entre le fer (cuivre) et l'eau oxygénée ne se fait pas en absence du métal.

2.3.2.2. Les antioxydants exogènes

a) La vitamine E ou α -tocophérol



La vitamine E ou α -tocophérol (α -TocH) est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile, correspondant au noyau chromanol et une extrémité hydrophobe (chaîne phytyle). L' α -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDLs. Chaque particule LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules d' α -tocophérol. L' α -tocophérol est incorporé dans les particules de LDLs au cours de leur métabolisme, grâce à une protéine appelée (*α -tocophérol transfer protein*).¹⁴

Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -TocH, qui est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2^\bullet , et constitue par ce biais le seul antioxydant

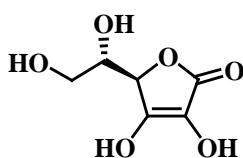
¹⁴ Lopez G V, Batthyany C, Blanco F, Botti H, Trostchansky A, Migliaro E, Radi R, Gonzalez M, Cerecetto H, and Rubbo H. Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13:5787–5796, 2005.

liposoluble assurant cette protection. L' α -TocH, en cédant son hydrogène, se transforme lui-même en produit radicalaire mais de faible réactivité.

L' α -TocH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), inhibant ainsi la formation du radical $\text{RO}_2\cdot$. La réaction de la vitamine E avec l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ est très lente et par conséquent peu probable.

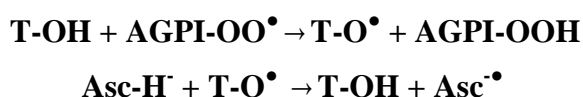
L' α -TocH peut aussi réguler à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NAD(P)H réductase. L' α -TocH n'est pas biosynthétisée. Elle est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive. Elle se trouve aussi en moindre quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine, les poissons gras.

a) La vitamine C ou acide ascorbique



Acide ascorbique AscHH

L'anion ascorbate (forme présente dans le milieu physiologique) agit principalement en piégeant directement les ROS et/ou RNS (majoritairement l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et le $\text{ONOO}\cdot$). Il est aussi capable de recycler l' α -tocophérol de façon à agir en synergie avec ce dernier dans la prévention de la peroxydation lipidique :



La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extra-cellulaires (compartiments hydrophiles).¹⁵ Ses activités biologiques antioxydantes viennent de son potentiel réducteur puissant ($E^\circ = -0,29 \text{ V}$).

Remarque : Par interaction avec un radical lipidique $\text{R}\cdot$, la vitamine E (T-OH) se transforme en un radical tocophéryle ($\text{T-O}\cdot$). Ce dernier est régénéré en T-OH sous l'action de la

¹⁵ Vertuani S, Angusti A, and Manfredini S. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* 10:1677-1694, 2004.

vitamine C (Asc-H[•]) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Asc[•]). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la vitamine C en se transformant en un radical thyle (GS[•]) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG).

b) Les antioxydants exogènes phénoliques

Les phénols sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (OH). Ils peuvent être extraits à partir de plantes ou synthétiques.

Les antioxydants exogènes phénoliques naturels

Une grande partie de ces molécules est présente dans l'alimentation. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes, et les tanins. Les stilbènes et le lignan sont moins connus (Tableau 1).¹⁶

Les flavonoïdes¹⁷

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanines. La figure 4 illustre quelques structures de flavonoïdes. Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes. Des études chez l'homme ont permis de montrer que les flavonoïdes, et notamment les isoflavones contenus dans le soja, permettent de réduire le taux de cholestérol (LDL).¹⁸

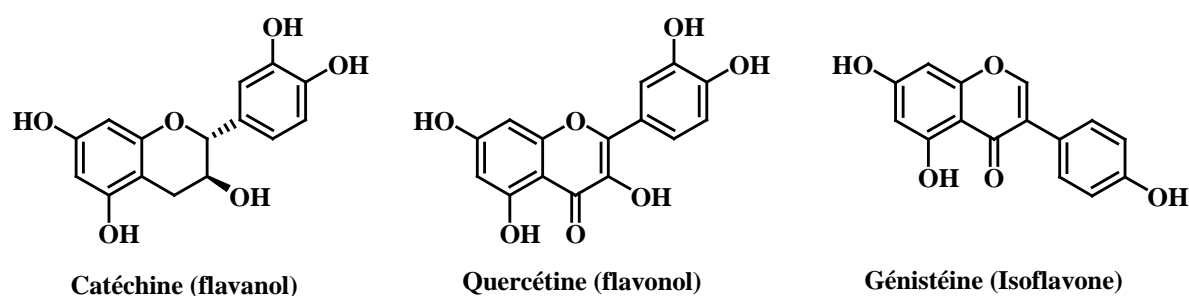


Figure. 4. Quelques Flavonoïdes.

¹⁶ Dai J, and Mumper R J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15 :7313-7352, 2010.

¹⁷ Alan C, Indu B J, and Michael N C. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26:1001-1043, 2009.

¹⁸ Anderson J W, Johnstone B M, and Cook-Newell M E. Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N. Engl. J. Med.* 333:276-282, 1995.

Chapitre I. Radicaux libres, stress oxydant et athérosclérose

Tableau. 1. Les grandes familles de polyphénols.¹⁹

Famille	Principaux composés	Origine
Acide hydroxy- benzoïques	Acide vanillique Acide gallique	Vanille Feuilles de thé
Acides hydro- cinnamiques	Acide caféique Acide férulique Acide chlorogénique	Café Riz, blé, asperges Pelure de pomme de terre, pomme, artichaut
Stilbène	Resvératrol	Raisin, vin
Flavanoïdes - Flavonols - Flavones - Flavanones - Flavones-3-ols - Isoflavones - Anthocyanidines	Quercétine, kaempférol Luéoline, apigénine Naringénine Catéchine, épicatechine Génistéine, daidzéine Cyanidine	Oignon, brocoli Céleri Agrumes Raisin, thé vert, chocolat, Soja Fruits rouges, raisin
Tannins hydrosolubles ou non	Polyphénols de haut poids moléculaire	Plantes supérieures
Lignines	Lignane	Bois

Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante.²⁰

Le resvératrol²¹

C'est un polyphénols naturel présent dans de nombreuses familles de plantes supérieures. Le

¹⁹ Defraigne J O, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*. 63:10-19, 2008.

²⁰ Kochetova M V, ESemenistaya E N, Larionov O G, Revina A A. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. *Russian Chemical Reviews*. 76(1):79-90, 2007.

²¹ Wu J M, and Hsieh T C. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1215:16–21, 2011.

resvératrol est un bon antioxydant contre l'oxydation des LDLs.

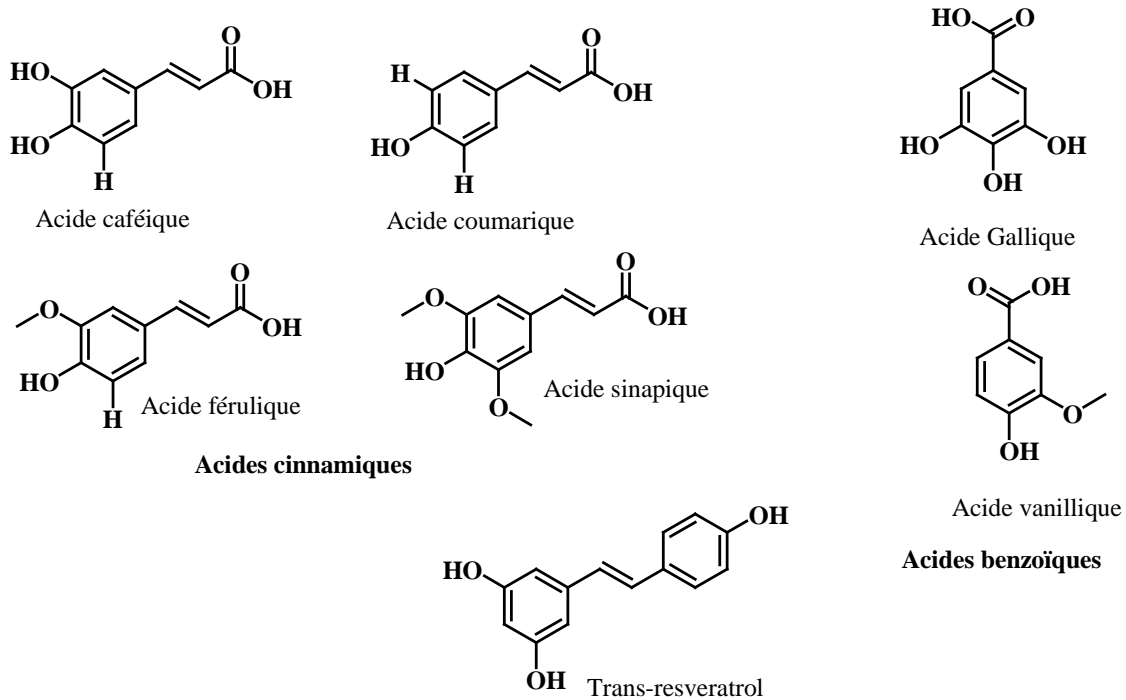


Figure. 5. les acides phénoliques et le trans-resvératrol.

Les tannins

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage de $O_2^{\bullet-}$ grâce aux différents groupes phénoliques. Les deux familles les plus importantes sont les gallotanins et les ellagitannins (Figure 6).¹⁸

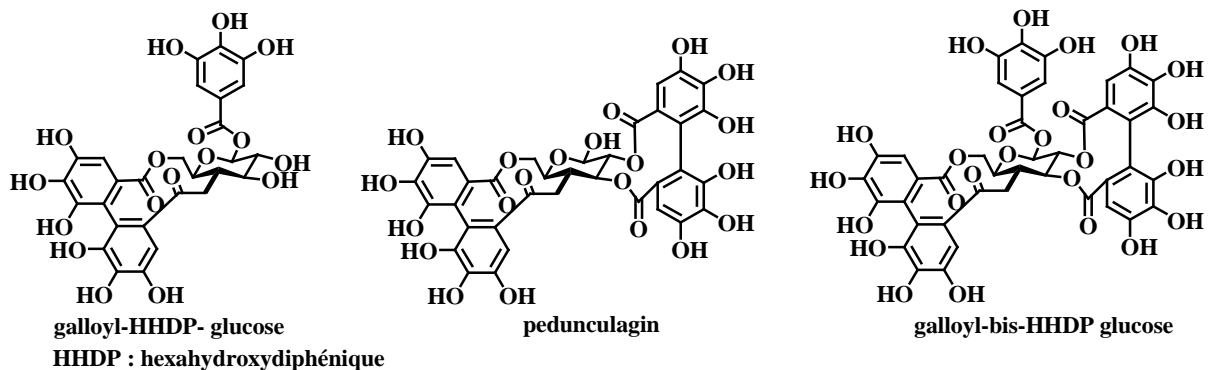


Figure. 6 : Unités monomères de base pour les Ellagitannins.

Les antioxydants exogènes phénoliques de synthèse

Il existe aussi de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (hémisynthèse ou mimes de structures naturelles). Le but de ces synthèses est l'amélioration de l'activité antioxydante, la biodisponibilité et le coût des molécules. Les principaux composés sont :

- Trolox[®] ou l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique est l'exemple classique d'antioxydant synthétique dérivé de la vitamine E, cette molécule est souvent utilisée comme antioxydant de référence (Figure 7a).²²
- Probucol, un hypolipidémiant. Ses propriétés antioxydantes et antiathérogènes ont été étudiées *in vivo*, il inhibe la formation de la plaque d'athérome chez le lapin (Figure 7b).²³
- Le 2,3-dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-ditertiobutyl-benzofurane ou BO-653, un composé dont l'activité antioxydante est meilleure que celle de l' α -tocophérol et du probucol (Figure 7c).²⁴

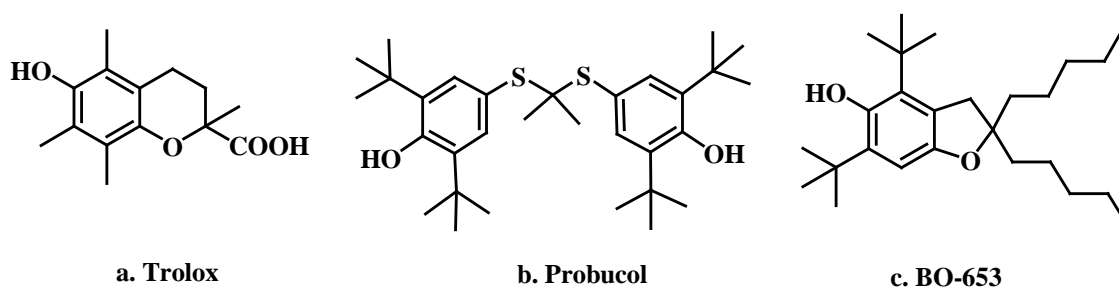


Figure. 7.

- Une équipe indienne²⁵ a montré qu'un analogue synthétique du curcumine (Figure 8 a et b) était plus efficace que la curcumine qui avait déjà un rôle protecteur sur l'inhibition du stress oxydant provoqué par la nicotine.

²² Vacaresse N, Vieira O, Robbesyn F, Jürgens G, Salvayre R, and Negre-Salvayre A. Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *Br J Pharmacol.* 132(8): 1777-1788, 2001.

²³ Witting P K, Pettersson K, Letters J, and Stocker R. Site-Specific Antiatherogenic Effect of Probucol in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 :26-33, 2000.

²⁴ Noguchi N and Nikie E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine.* 28, No. 10:1538-1546, 2000.

²⁵ Kalpana C, Sudheer A R, Rajasekharan K N and Menon V P. Comparative effects of curcumin and its synthetic analogue on tissue lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Singapore Med. J.* 48(2):124-130, 2007.

- D'autres molécules phénoliques dérivées d'alkylthiosulfonate (Figure 8c) ont été synthétisées et testées, en particulier sur leur capacité à empêcher le métabolisme oxydant des polynucléaires et piéger les radicaux libres tels que le NO[•].²⁶
- Une équipe espagnole a synthétisé des acides gras phénoliques qui auraient une activité antiradicalaire importante (Figure 8d).²⁷
- Un nouveau polyphénol dendritique (Figure 8e) a été synthétisé, et a montré une forte capacité antioxydante et protectrice des LDLs *in vitro* contre les attaques des radicaux libres.²⁸
- Très récemment, un groupe grec a publié un ensemble de molécules antioxydantes dont un phénol dérivé de benzodiazepine (Figure 8f). Cette molécule a montré une bonne inhibition de la peroxydation lipidique.²⁹

²⁶ Zenkov N K, Menshchikova E B, Kandalintseva N V, Oleynik A S, Prosenko A E, Gusachenko O N, Shklyayeva O A, Vavilin V A, and Lyakhovich V V, *Biochemistry (Moscow)*. 72:644-651, 2007.

²⁷ Torres de Pinedo A, Penalver P, Perez-Victoria I, Rondon D, and Morales J C. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food. Chemistry*. 105: 657-665, 2007.

²⁸ Lee C Y, Sharma A, Cheong J E, and Nelson J L. Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* 19:6326-6330, 2009.

²⁹ Tsoleridis C G, Stephanidou-Stephanatou J, Kontogiorgis C A, and Hadjipavlou-Litina D J. 1,5-Benzoxazepines vs 1,5-Benzodiazepines. One-Pot Microwave-Assisted Synthesis and Evaluation for Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation Inhibition. *J. Med. Chem.* 53:8409–8420, 2010.

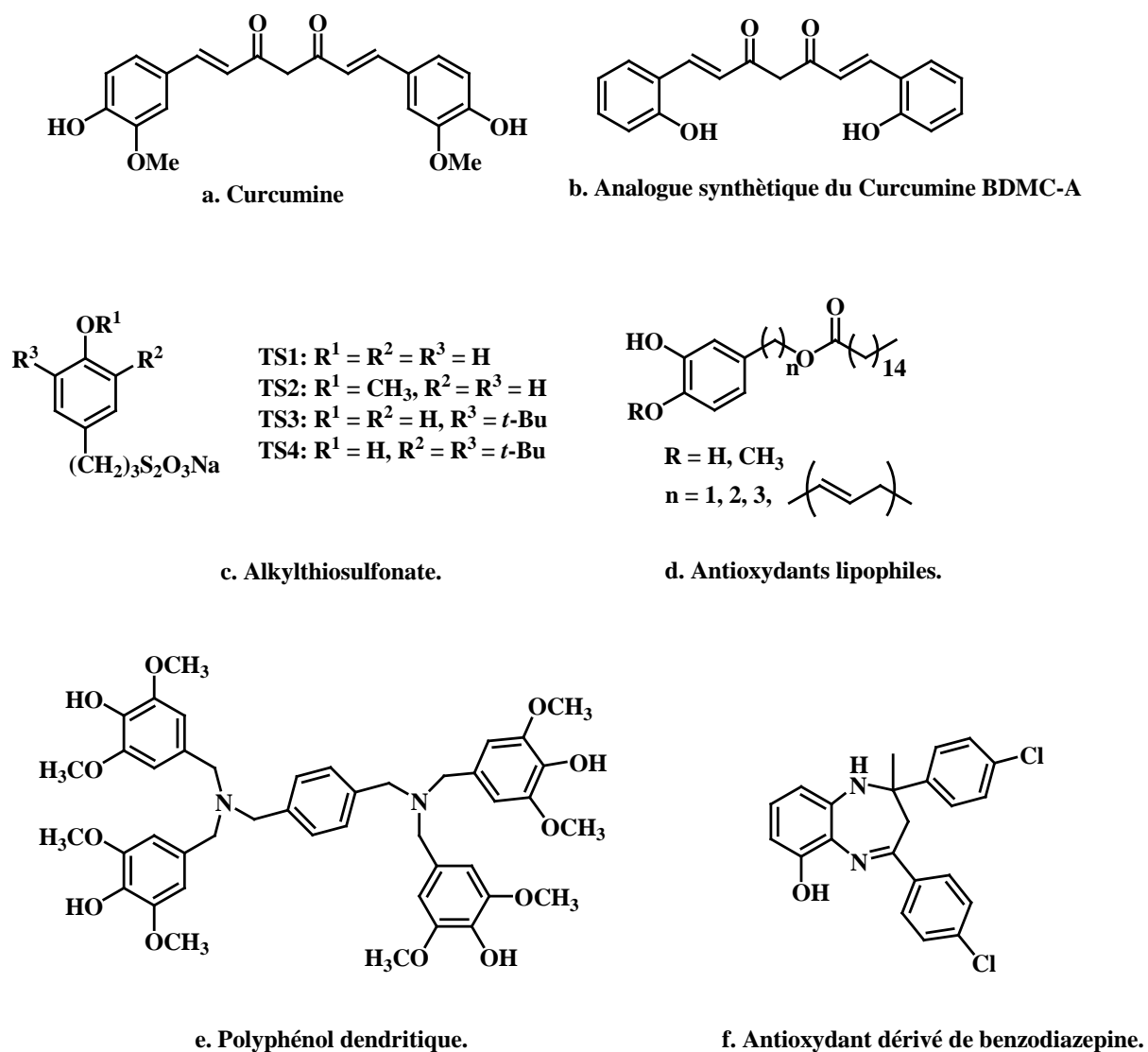


Figure. 8. Structures de quelques antioxydants de synthèse cités dans la littérature.

Comme nous l'avons précisé, la rupture de la balance entre la génération de ROS et les systèmes de défense est à l'origine du stress oxydant, qui intervient dans de nombreuses pathologies dont l'athérosclérose. Le chapitre suivant rappelle brièvement la physiopathologie de l'athérosclérose.

3. L'Athérosclérose

3.1. Généralités

3.1.1. Historique

En 1740, le médecin allemand Johann Friedrich KRELL observe des concrétions calciques au niveau de la paroi vasculaire, il les appelle « plaque osseuse ».³⁰ Une dizaine d'années plus tard le terme « athérome » est proposé pour la première fois par Albrecht von HALLER. Il vient du grec athara qui signifie « bouillie de farine ou de gruau » qui caractérise un kyste blanchâtre graisseux.³¹

Le terme « Artériosclérose » est utilisé en 1833 à Strasbourg par Jean Frédéric Martin LOBSTEIN qui définit les altérations artérielles considérant qu'elles ne sont pas d'origine inflammatoire et conduisent à un durcissement et un épaissement de la paroi des artères.³² Aujourd'hui l'artériosclérose est associée au vieillissement vasculaire.

En 1904, le terme "Athérosclérose" est proposé par Felix MARCHAND, ce qui reflète la dualité lésionnelle, athéromateuse et scléreuse, de la maladie. L'athérosclérose serait la forme la plus grave de l'artériosclérose.³³

L'athérosclérose est une des causes majeures de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés, et représente un enjeu important en santé publique.

3.1.2. Définition

L'OMS définit l'athérosclérose comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires.

Des remaniements de la média sont également observés, en relation avec le processus inflammatoire chronique qui sous-tend la formation et la progression des lésions artérielles d'athérosclérose. Une classification détaillée a été proposée qui précise les six stades d'évolution de la lésion vasculaire, depuis son initiation (quasiment à partir de la naissance)

³⁰ Cowdry E V, Blumenthal H T. *Cowdry's Arteriosclerosis: A Survey of the Problem*. 2nd ed. Springfield, IL: Thomas; 1967

³¹ Schwartz C J, Mitchell J R. The morphology, terminology and pathogenesis of arterial plaques. *Postgrad Med J*. 38:25–34, 1962.

³² Lobstein JGCFM. *Traites d'Anatomie Pathologique*. Paris France, Chez F. G. Levrault 533–534, 1833.

³³ Marchand F. Über arteriosklerose. *Verhandlung des Congresses fur innere Medizin*. 21:23–59, 1904.

jusqu'à sa transformation en plaque athéroscléreuse compliquée et prête à se rompre pour déclencher des événements cliniques cérébro- ou cardiovasculaires.⁷

Les facteurs de risques de cette pathologie sont l'âge, les dyslipidémies familiales héréditaires, les phénomènes d'insulino-résistance, d'hyperhomocystéinémie³⁴ et les anomalies des facteurs hémostatiques, mais également des facteurs de risques environnementaux (la sédentarité, l'obésité, le tabagisme).³³ Ces facteurs de risques sont à l'origine du stress oxydant.

Il est à noter que l'alimentation joue un rôle majeur dans l'incidence de l'athérosclérose. Une alimentation riche en lipides, et pauvre en légumes et fruits favorise l'installation de la pathologie. Il existe un gradient Nord-Sud de l'athérosclérose qui montre une forte incidence des maladies cardiovasculaires dans les pays du nord à cause de leur nourriture pauvre en fruits et légumes.³⁵ En France, le régime alimentaire est peu différent de celui des autres pays du nord de l'Europe. Cependant l'incidence des maladies cardiovasculaires est plus faible. Ces résultats encore mal expliqués, pourraient résulter de la consommation du vin et du jus de raisin (*The French paradox*).³⁶

3.1.3. Manifestations cliniques

Les conséquences de l'athérosclérose dépendent de l'endroit où se forme la plaque d'athérome. Elles sont responsables d'affections aiguës :

- Coronaropathies de type ischémique dues à l'athérosclérose des artères coronaires.
- Accidents vasculaires cérébraux (AVC)
- Artérites dues, dans 90% des cas, à l'athérosclérose des membres inférieurs.
- Ischémie aiguë des membres.

Outre ces pathologies, les accidents vasculaires, lorsqu'ils ne sont pas fatals, peuvent être à l'origine de séquelles fonctionnelles sévères : paralysie, troubles sensitifs, troubles du langage

³⁴ Ambrosi P, Rolland P, Garçon D. Homocysteine, a risk factor of atherosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 89(12):1667-71, 1996.

³⁵ Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation.* 105(3):310-5, 2002.

³⁶ Obrenovich M E, Nair N G, Beyaz A, Aliev G, and Reddy V P. The Role of Polyphenolic Antioxidants in Health, Disease, and Aging. *Rejuvenation research.* 13(6):631-643, 2010.

dans le cas des AVC, apparition d'une insuffisance cardiaque, troubles du rythme dans le cas d'un infarctus du myocarde (IDM).

3.2. Genèse de la plaque d'athérome

La plaque d'athérome se caractérise par un remodelage vasculaire impliquant de multiples processus tels que la dysfonction endothéliale, l'inflammation et la prolifération cellulaire. Ces modifications vasculaires contribuent à la croissance de la plaque d'athérome.⁷

Les artères de moyen et gros calibre (0.5 à 3 cm de diamètre externe) sont sensibles au développement des lésions athéroscléreuseuses. Cependant il existe parmi ces artères des variations de structure, de propriétés mécaniques et de susceptibilité à développer de l'athérome. Elles répondent à un modèle commun d'organisation, composé de 3 tuniques superposées dénommées de la lumière vers la périphérie de l'artère : l'*intima*, la *média* et l'*adventice* (Figure 9).³⁷

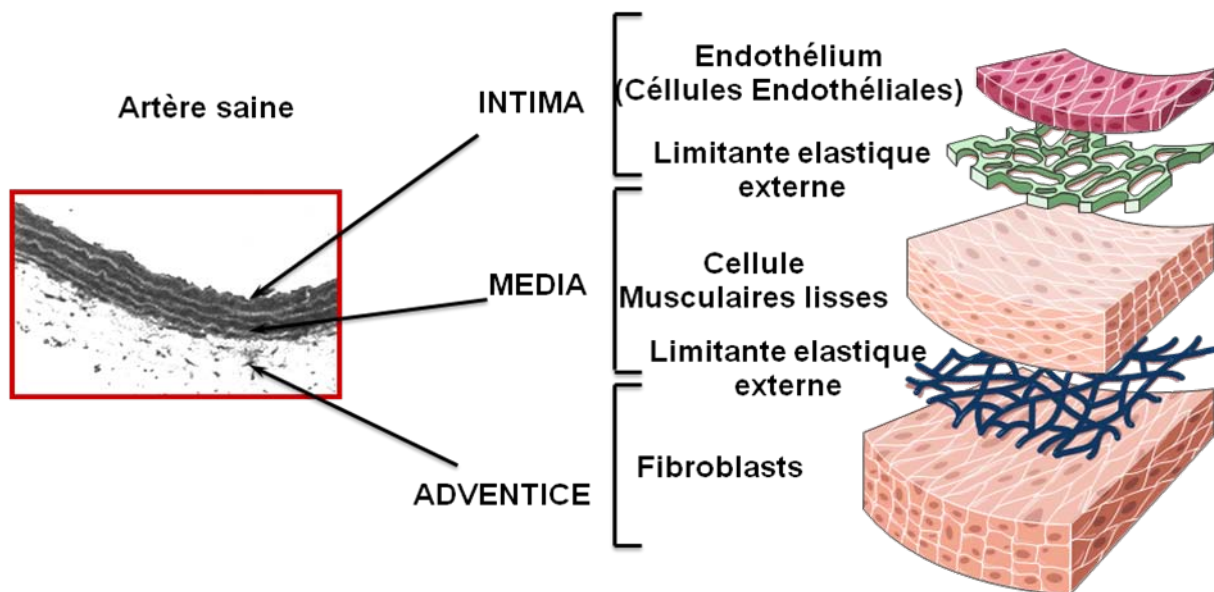


Figure. 9. Structure d'une artère saine.

- **L'Intima** : Elle constitue la première couche et le lieu de formation de la plaque d'athérome. Elle est constituée d'une couche de cellules endothéliales directement en contact avec le sang circulant, d'une couche sous-endothéliale ou membrane basale

³⁷ Bruneval P. Structure de la paroi artérielle normale : notions pratiques. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, Eds. Masson: Paris, Vol. 1, pp 5-11, 2003.

sur laquelle reposent les cellules endothéliales et de la limitante élastique interne qui permet de séparer l'intima de la média. Au cours du vieillissement, l'intima s'épaissit du fait de l'accumulation de matrice extracellulaire et de la colonisation sous-endothéliale par les cellules musculaires lisses provenant de la média. La couche sous-endothéliale est le site de développement des lésions d'athérosclérose, où s'accumulent les lipoprotéines et les monocytes, macrophages provenant du sang.

- **La Média :** Elle est composée principalement de cellules musculaires lisses (CML) entourées de fibres élastiques et de fibres de collagène, qu'elles synthétisent. La média est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.
- **L'Adventice :** Cette tunique ancre le vaisseau dans les tissus voisins. C'est un tissu lâche, composé de fibres de collagène, de fibres élastiques, de CML et de fibroblastes, dans lequel vont cheminer les *vasa vasorum* irrigant la partie externe de la média (qui sont présents uniquement sur les grosses artères). Elle est parfois parcourue par des fibres musculaires longitudinales.

3.2.1. Cellules de la paroi vasculaire

3.2.1.1. Les cellules endothéliales de l'intima : L'endothélium joue un rôle actif de barrière entre le sang circulant et la paroi vasculaire, avec plusieurs fonctions vitales telles que la transduction du signal, les processus inflammatoires, l'homéostasie... qui lorsqu'elles sont perturbées favorisent la dysfonction endothéliale, l'augmentation de la perméabilité aux lipoprotéines et la formation de lésions d'athérosclérose.³⁸

Le transport de substances à travers l'endothélium s'effectue dans les deux sens par des mécanismes d'endocytose et de passage entre les espaces intercellulaires selon la taille et la charge électrique des molécules. En cas de lésion endothéliale, l'espace intercellulaire est accru. Les macromolécules et les monocytes circulants peuvent ainsi atteindre le sous-endothélium.³⁷

De plus les cellules endothéliales possèdent des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs aux LDLs (LDLr), permettant l'internalisation des lipoprotéines au sein du cytoplasme cellulaire. Les cellules endothéliales produisent des ROS qui participent à l'oxydation des LDLs et à leur déviation métabolique vers le récepteur *scavenger* des

³⁸ Sima A V, Stancu C S, and Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 335(1):191-203, 2009.

macrophages. Ce mécanisme est déterminant dans la formation des lésions primaires d'athérosclérose.³⁹

L'endothélium module le tonus vasculaire en synthétisant et en sécrétant des substances vasoactives qui conduisent à la vasodilatation des artères (monoxyde d'azote)⁵ ou à la vasoconstriction (endothéline-1, angiotensine II)⁴⁰ En cas de déséquilibre de la production des substances vasoactives en faveur de la vasoconstriction, la dysfonction endothéliale conduit à des pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle et l'athérosclérose.

Les cellules endothéliales activées en réponse à un stimulus inflammatoire, expriment à leur surface des molécules d'adhésion comme ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), E-selectine, qui favorisent l'adhésion de monocytes et de lymphocytes sur l'endothélium.⁴¹ De plus les cellules endothéliales facilitent le recrutement des leucocytes dans la paroi vasculaire en sécrétant des chémokines telles que MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) qui favorisent le passage des cellules mononucléées dans l'intima.⁴² On note également une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance qui stimulent la prolifération des CML dans l'intima vasculaire.⁴³

Les cellules endothéliales participent également au maintien d'un équilibre anti-thrombotique en favorisant l'expression de facteurs anti-thrombotiques tel que les anti-fibrinolytiques (PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1)).⁴⁴

3.2.1.2. Les cellules musculaires lisses (CML) : Les CML peuvent exister dans la paroi vasculaire sous deux phénotypes différents, contractile et sécrétoire.⁴⁵

Dans la paroi saine, les CML de phénotype contractile sont localisées dans la média artérielle et constituent la population majoritaire de l'artère. Ces CML sont enrichies en filaments

³⁹ Boullier A. Scavenger Receptors, Oxidized LDL, and Atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 947:214-223, 2006.

⁴⁰ Cosentino F, and Luscher T F. Maintenance of vascular integrity : role of nitric oxide and other bradykinin mediators. *Eur Heart J*. 16(K):4-12, 1995.

⁴¹ Mestas J, and Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 18(6):228-32, 2008.

⁴² Bhaskar V, Yin J, Mirza A M, Phan D, Vanegas S, Issafras H, Michelson K, Hunter J, Katak S S. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis *in vitro* and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 216(2):313-320, 2011.

⁴³ Russo-Marie F, Peltier A, and Polla B S. "L'inflammation" *P* :126, 1998.

⁴⁴ Rodgers G M. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J*. 2(2):116-23, 1988.

⁴⁵ Holifield B, Helgason T, Jemelka S, Taylor A, Navran S, Allen J, and Seidel C. Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation?. *J Clin Invest*. 97(3):814-25, 1996.

d'actine et de myosine et leur principale fonction est d'assurer le maintien du tonus vasculaire.

En réponse à des stimuli extérieurs comme les oxLDLs, les CML peuvent changer de phénotype. Elles reprennent alors un phénotype embryonnaire (phénotype sécrétoire ou synthétique). La structure cellulaire est modifiée avec un appauvrissement en filaments d'actine et de myosine et l'apparition du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi. Ces changements structuraux témoignent de changement de fonction. Les CML de phénotype sécrétoire ont une forte activité proliférative.⁴⁶

Dans la plaque d'athérome ces CML (sécrétoires) sont localisées dans l'intima artérielle et participent à l'élaboration de la chape fibreuse où elles jouent un rôle dans la croissance et la stabilité de la plaque d'athérome. De plus, ces cellules au sein de l'intima peuvent accumuler des lipides au niveau cytoplasmique et se différencier en cellules spumeuses, participant alors à la formation du cœur lipidique de la plaque d'athérome.⁴⁷

3.2.1.3. Les monocytes : Les monocytes jouent un rôle fondamental dans les défenses de l'organisme. L'intima saine ne contient pas de macrophage. La présence de facteurs inflammatoires tels que les oxLDLs, induit l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ou ICAM-1 à la surface de l'endothélium. En conséquence, les monocytes vont adhérer à la surface de l'endothélium, le traversent et se transforment en macrophages puis en cellules spumeuses, au contact des oxLDLs.⁴⁸

3.2.1.4. Les lymphocytes : Les lymphocytes présents dans les plaques d'athérome sont de type T (thymo-dépendants, mécanisme cellulaire de la défense immunitaire). Les lymphocytes de la circulation sont recrutés dans la paroi vasculaire, de la même manière que les monocytes, attirés par l'expression des molécules d'adhésion et par des chémokines. Dans l'intima, les lymphocytes T reconnaissent une chaîne peptidique de l'antigène (comme celle des oxLDLs), associée au complexe majeur d'histocompatibilité exprimé à la surface des

⁴⁶ Owens G K, Kumar M S, and Wamhoff B R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 84:767– 801, 2004.

⁴⁷ Raines E W, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J.* 69(1):30-37, 1993.

⁴⁸ Borazjani A, Edelmann MJ, Hardin KL, Herring KL, Allen Crow J, Ross MK. Catabolism of 4-hydroxy-2-trans-nonanal by THP1 monocytes/macrophages and inactivation of carboxylesterases by this lipid electrophile. *Chemico-Biological Interactions.* 15,194(1):1-12, 2011

cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques) ce qui provoque leur activation qui est impliquée dans la croissance de la plaque.⁴⁹

3.2.2. Les lipoprotéines

Les lipides plasmatiques (cholestérol non estérifié, esters de cholestérol, triglycérides et phospholipides) sont véhiculés à travers les divers compartiments extracellulaires de l'organisme (plasma, lymphe et liquide interstitiel) associés à des protéines spécifiques ou lipoprotéines. Elles permettent ainsi le transport des lipides d'origine exogène ou endogène, vers les sites tissulaires d'absorption, de production, de stockage ou de transformation.

Les triglycérides et les esters de cholestérol forment le cœur (non polaire) des lipoprotéines, tandis que les phospholipides et le cholestérol libre forment la couche extérieure (polaire) dans laquelle s'insèrent les apolipoprotéines. Cette monocouche périphérique permet la solubilisation des lipoprotéines dans le plasma grâce aux propriétés amphiphiles des phospholipides (Figure 10). Les lipoprotéines sont subdivisées en plusieurs sous-groupes d'une structure identique mais distincte sur la base des caractéristiques physico-chimiques.⁵⁰

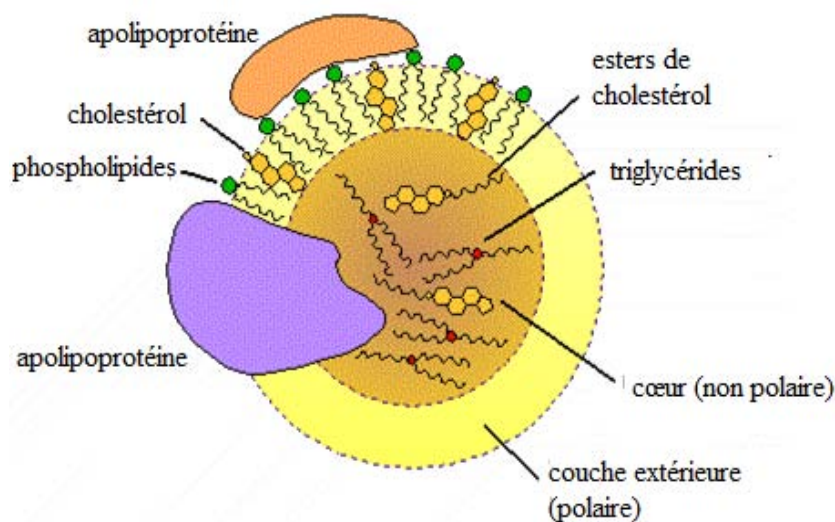


Figure 10. Structure générale d'une lipoprotéine.

⁴⁹ Frostegard J, Ulfgren A K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, and Hansson GK. "Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of proinflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines" *Atherosclerosis*. 145(1):33- 43, 1999.

⁵⁰ Spector A A. Plasma lipid transport. *Clin Physiol Biochem*. 2(2-3):123-34, 1984.

3.2.2.1. Métabolisme des lipoprotéines : ⁵¹

Les lipoprotéines transportent et distribuent les lipides dans l'organisme.

- **L'intestin** permet l'absorption des lipides alimentaires et leur intégration dans des lipoprotéines de grande taille riches en triglycérides, les chylomicrons. Ces chylomicrons participent au transport entéro-hépatique des lipides, voie métabolique au cours de laquelle leurs triglycérides seront hydrolysés par la LPL (lipoprotéine lipase) et les acides gras libérés, captés par les tissus périphériques pour y être stockés (tissu adipeux), ou dégradés à des fins énergétiques (muscle strié). Finalement, les particules résiduelles non captées, ayant perdu une large part de leurs triglycérides et de leurs apoprotéines, sont catabolisées dans les hépatocytes.

- **Le foie** : constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides dans l'organisme. Il prend en charge les lipides résiduels d'origine intestinale et les intègre dans de nouvelles lipoprotéines (VLDL) afin de les redistribuer aux tissus périphériques, c'est la voie endogène d'apport. De plus, le foie possède la capacité de dégrader les lipoprotéines grâce à la lipase hépatique (HL) et via la LPL, de générer des particules plus petites et plus denses, les IDLs et des LDLs.

- **Les tissus périphériques** : captent les lipoprotéines par la voie de récepteurs spécifiques. L'hydrolyse des lipoprotéines de type LDLs se fait dans les lysosomes et libère des lipides (principalement cholestérol et acides gras libres non estérifiés), qui sont utilisés par la cellule. L'excès de cholestérol va être ramené vers le foie via les HDLs (transport inverse du cholestérol).

3.2.2.2. Différentes classes de lipoprotéines⁵⁰

Il existe six classes de lipoprotéines qui diffèrent par leur densité, leur taille et par la composition lipidique du cœur hydrophobe.

Les chylomicrons (CM) sont les lipoprotéines les plus grosses (0,1 à 1 µm de diamètre ; <0,95 g.cm⁻³) et les moins denses de par leur teneur élevée en triglycérides (TG). Ils sont responsables du transport des lipides alimentaires de l'intestin aux tissus. Ils sont composés principalement de triglycérides et contiennent de l'apoprotéine A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III et E.

⁵¹ Muray R, Granner D, Mayes P, and Rodwell V. "Harper's Illustrated Biochemistry" Twenty-Sixth Edition by The McGraw-Hill Companies. (25) 205-217, 2003.

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL, very-low-density lipoprotein ; 30 à 70 nm de diamètre ; $0,95$ à $1,00 \text{ g.cm}^{-3}$) sont fabriquées et sécrétées par le foie. Elles participent à la voie endogène des lipoprotéines, allant du foie vers les tissus périphériques. Ces particules sont principalement composées de TG synthétisés au niveau du foie et de l'apoprotéine B-100, E, C-I, C-II et C-III.

Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDLs, Intermediate-density lipoproteins) sont issues de l'hydrolyse des VLDLs par les lipases. Elles sont de taille et de densité intermédiaire aux VLDLs et aux LDLs. Elles contiennent des triglycérides (TG), du cholestérol et de l'apoprotéine B-100 et E.

Les lipoprotéines de faible densité (LDLs, Low-density lipoprotein ; 15 à 25 nm de diamètre ; $1,02$ à $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$) sont issues des IDLs sous l'action de lipase hépatique et enrichies en esters de cholestérol. Elles sont composées de l'apoprotéine B-100 nécessaire au maintien de l'intégrité structurelle de la particule. Ces lipoprotéines, sous leur forme oxydée (oxLDLs), sont très athérogènes.

La lipoprotéine (a) ou Lp(a) est une particule de LDL modifiée composée de cholestérol et d'une molécule d'apoprotéine (a) fixée par un lien disulfure sur la molécule d'apo B-100. La Lp(a) est très athérogène.

Les lipoprotéines de haute densité (HDLs, High-density lipoprotein ; 6 à 14 nm de diamètre ; $1,06$ à $1,21 \text{ g.cm}^{-3}$) sont sécrétées par le foie et l'intestin et sont dérivées des résidus d'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG (CM et VLDLs). Elles sont principalement constituées de phospholipides et présentent principalement à leur surface les apoprotéines A-I, C-II, C-III et E. Elles ont pour fonction de transporter le cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il pourra être éliminé. Les HDLs sont antiathérogènes, en partie grâce à leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires dues à la présence d'enzymes telles que la paraoxonase, capables de neutraliser les lipides oxydés pro-inflammatoires.⁷

3.2.3. Oxydation des LDLs et théorie oxydative de l'athérosclérose

Les oxLDLs jouent un rôle important dans l'athérogenèse. De nombreux travaux montrent leur présence *in vivo* dans la paroi vasculaire, au niveau des plaques d'athérosclérose.⁵² Les oxLDLs ont des propriétés proinflammatoires et proathérogènes.⁵³ Les LDLs sont oxydées dans la paroi artérielle par les cellules de l'espace sous-endothélial, et deviennent bioréactives et proinflammatoires, car elles sont capables de stimuler l'expression de cytokines et des facteurs de croissance responsables du recrutement de cellules mononucléées dans l'intima. Par ailleurs, les modifications oxydatives des LDLs sont responsables de leur captation par les macrophages et la formation de cellules spumeuses et de stries lipidiques.⁵⁴

L'oxydation des LDLs est induite par les ROS générés par les cellules de la paroi vasculaire. C'est la peroxydation lipidique qui concerne essentiellement les acides gras polyinsaturés (AGPI) et elle se fait en trois étapes :

- a) **L'initiation** : consiste en l'arrachement par le radical libre d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène (-CH₂-) adjacent à deux doubles liaisons.^{55,56} Le radical formé est stabilisé par résonance.
- b) **La propagation** : débute lorsqu'une molécule d'O₂ attaque le radical acide gras polyinsaturé (AGPI[•]) pour former un radical peroxy (AGPI-OO[•]) qui peut arracher un H[•] à un autre donneur RH et créer un nouveau radical, qui s'oxydera et ainsi de suite.
- c) **La terminaison** : consiste en la recombinaison de deux radicaux pour former des composés plus ou moins stables (Schéma 4).

⁵² Vindis C, Escargueil-Blanc I, Uchida K, Elbaz M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis. *Redox Rep.* 12(1):96-100, 2007.

⁵³ Abdelouahed Kh. Mécanisme moléculaire de l'effet protecteur de la vitamine E dans l'athérosclérose. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:662-669, 2002.

⁵⁴ Steinberg D, and Witztum J L. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *J. Am. Med. Assoc.* 264: 3047- 3052, 1990.

⁵⁵ Porter N A, Caldwell, S E, Mills K A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids *Lipids.* 30:277-290, 1995.

⁵⁶ Girotti, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid. Res.* 39:1529-1542, 1998.

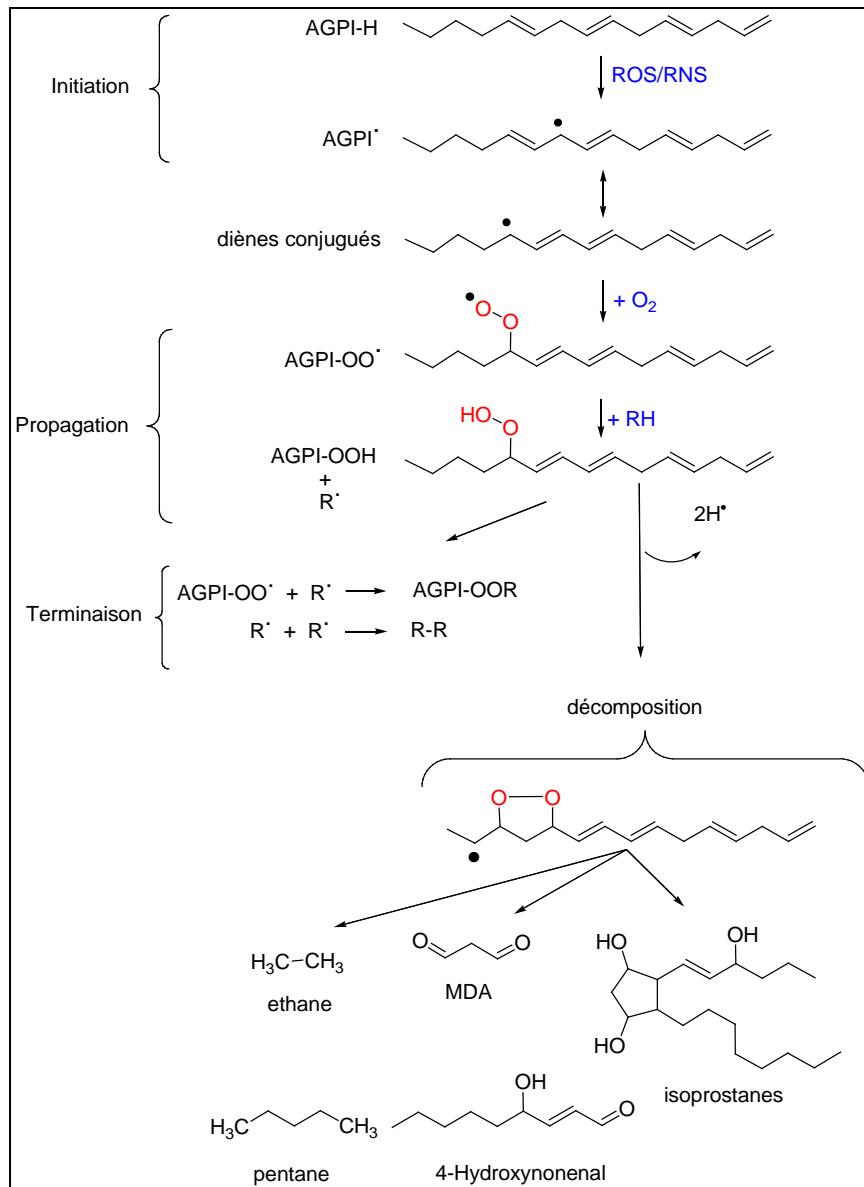


Schéma. 4. Peroxydation des (AGPI).^{57,58}

Cette oxydation génère de nombreuses modifications au niveau des lipides et de la partie protéique (apolipoprotéine B, apo B) de la lipoparticule (Tableau 2).⁷

Parmi les produits de décomposition de cette peroxydation lipidique, les groupements carbonyles réactifs (RCCs, *reactive carbonyl compounds*) réagissent avec les protéines cellulaires et tissulaires pour former des adduits appelés (ALEs, *Advanced lipid peroxidation*

⁵⁷ Vindis C. Etude de l'effet prolifératif du peroxyde d'hydrogène produit par les monoamine oxydase rénales. Université Paul Sabatier, Toulouse, 2000.

⁵⁸ Lagarde, M., Lafont, H., Impacts des facteurs nutritionnels et environnementaux l'athérosclérose. *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, Toussaint, J.F., Jacob, M.P., Lagrost, L., Chapman, J., Eds. Masson: Paris, 2003, 30, 537-546.

end products) ce qui entraîne un dysfonctionnement des protéines, appelé stress carbonyle, qui contribue à l'apoptose des cellules vasculaires.^{59,60}

Tableau. 2. Modifications oxydatives des lipoprotéines de basse densité

Apolipoprotéine B	Carbonylation, fragmentation, oxydation
	Formation d'adduits entre les fonctions amines et des produits de décomposition (MDA, HNE...)
Partie lipidique	Consommation des antioxydants
	Consommation des acides gras polyinsaturés
	Formation de diènes conjugués
	Formation de produits d'oxydation lipidique
	hydroperoxydes de phospholipides et d'esters de cholestérol
	isoprostanes
	oxystérols
	lysophosphosphatidylcholines
phospholipides oxydés à courte chaîne	
Formation de produits de décomposition (aldéhydes)	

La formation d'adduits est un processus long qui affecte les protéines à demi-vie longue, et joue un rôle dans le vieillissement tissulaire.⁶¹

Parmi les aldéhydes les plus réactifs présents dans les plaques d'athérosclérose, nous retrouvons le 4-hydroxynonéal (4-HNE), le malonaldéhyde (MDA), et l'acroléine. Ces aldéhydes ont des propriétés cytotoxiques qui interviennent dans la toxicité des oxLDLs.⁶²

Le 4-HNE peut réagir avec les résidus histidine, cystéine et lysine des protéines. Avec les amines primaires (lysine), le 4-HNE forme des bases de Schiff.⁶³ Le 4-HNE peut aussi former des adduits de Michael en structure hémiacétalique avec les amines et les thiols.⁶⁴

⁵⁹ Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, and Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 153:6–20, 2008.

⁶⁰ Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med*. 24:281–291, 2003.

⁶¹ Lyons T J, Silvestri G, Dunn J A, Dyer D G, and Baynes J W. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes*. 40:1010–1015, 1991.

⁶² Zarkovic N, Ilic Z, Jurin M, Schaur R J, Puhl H, Esterbauer H. Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal. *Cell Biochem Funct*. 11:279–286, 1993.

⁶³ Petersen D R, and Doorn J A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*. 37:937–945, 2004.

⁶⁴ Schaur R J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*. 24:149–159, 2003.

Le MDA est l'un des aldéhydes les plus abondants produits au cours de la peroxydation lipidique. Le MDA réagit avec les résidus lysine par la formation de bases de Schiff, et il joue un rôle majeur dans la modification des LDLs et leur déviation métabolique vers les macrophages.⁶⁵ Les modifications protéiques par des dialdéhydes peuvent donner lieu à des réticulations intramoléculaires ou intermoléculaires.

L'acroléine est un électrophile fort qui peut réagir facilement avec des nucléophiles tels que la lysine, l'histidine et la cystéine.⁶⁶

3.2.4. Formation et évolution de la plaque d'athérosclérose

Les étapes de la formation et de l'évolution athéromateuse sont illustrées dans la figure 11.

Ces étapes sont résumées ainsi: 1) rétention des lipoprotéines athérogènes dans l'intima artérielle, 2) modification oxydative des lipoprotéines, 3) recrutement des monocytes circulants, 4) transformation en cellules spumeuses, 5) migration et prolifération des CMLs, 6) formation du cœur lipidique et nécrotique, 7) isolement de la lésion par la chape fibromusculaire et la calcification de la lésion (Figure 11).

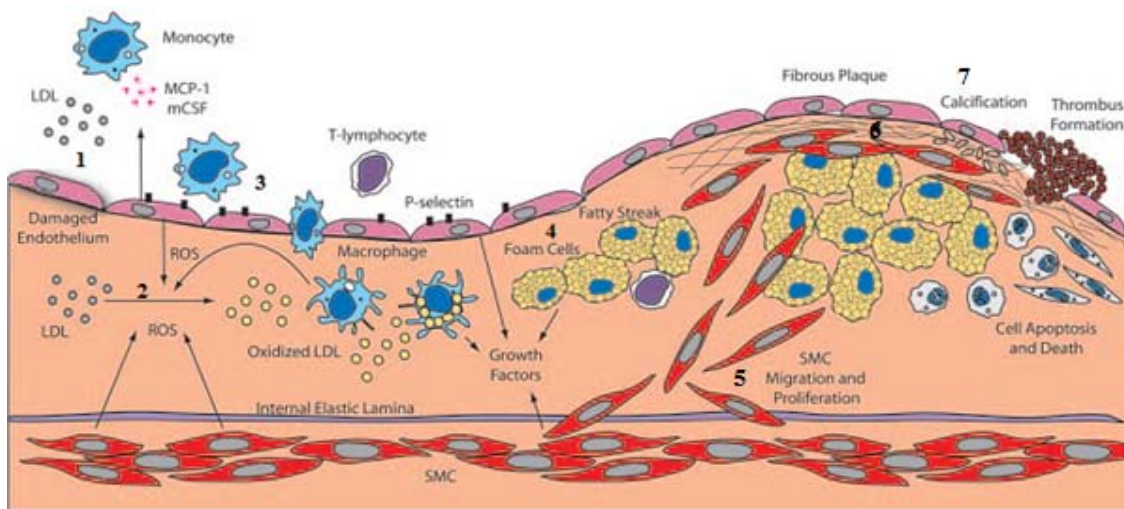


Figure. 11. Développement de l'athérosclérose. Les ROS produits par les cellules endothéliales, les CMLs et les macrophages oxydent les LDLs dans l'espace sous-endothélial près des zones endothéliales endommagées, ceci va déclencher une chaîne d'événements menant à la formation de la plaque fibreuse, d'après Nageswara et al.⁶⁷

⁶⁵ Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 272:20963–20966, 1997.

⁶⁶ Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, and Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 273:16058–16066, 1998.

⁶⁷ Madamanchi N R, Vendrov A, and Runge M S. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:29-38, 2005.

La première étape de ce processus est le dysfonctionnement de l'endothélium, en particulier dans les zones de bifurcation artérielle ou dans la crosse aortique. La perte de perméabilité de l'endothélium favorise le passage des LDLs dans la paroi artérielle, en particulier lorsque la concentration plasmatique en LDLs est trop élevée (étape 1, Figure 11). Les LDLs sont oxydées dans l'intima, au contact des radicaux générés par les cellules vasculaires, soit via des réactions radicalaires, soit enzymatiques (étape 2, Figure 11).

La cytotoxicité des oxLDLs peut être prévenue par l'addition d'antioxydants. Elle serait due en partie aux produits d'oxydation lipidique formés au cours de la réaction oxydative. Elle aboutit à une lyse cellulaire et à la libération de radicaux libres par les cellules nécrosées. Un cycle auto catalytique apparaît constituant un véritable cercle vicieux (Figure 12).

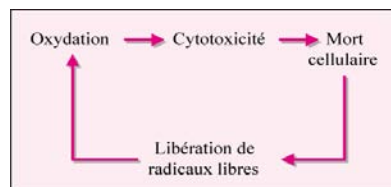


Figure. 12.

L'oxydation des LDLs génère une réaction inflammatoire au niveau de l'endothélium, déclenchant ainsi le recrutement et l'infiltration de monocytes (en réponse à des stimuli chimiotactiques, MCP1) dans l'intima ce qui favorise la formation des stries lipidiques, à la surface luminale (Etape 3, Figure 11).⁴¹

A l'état normal, les LDLs sont captées par l'intermédiaire des récepteurs B/E spécifiques aux LDLs auxquels elles se lient via un site de liaison situé sur l'apo B100. Le métabolisme physiologique des LDLs permet la diminution de la synthèse intracellulaire du cholestérol. Cette internalisation est régulée par un rétrocontrôle de l'expression de récepteurs B/E.⁶⁸ Quand les LDLs sont oxydées, l'apo B100 est modifiée, ce qui entraîne la reconnaissance de ces oxLDLs par les récepteurs "éboueurs" (ou *scavenger receptors*) des macrophages. La voie des récepteurs " *scavenger* " n'a pas de rétrocontrôle métabolique. Cette voie génère une accumulation de cholestérol dans le cytosol des macrophages, et la formation de cellules spumeuses (étape4, Figure 11).⁶⁹

⁶⁸ Johnson L A, Arbones-Mainar J M, Fox R G, Pendse A A, Altenburg M K, Kim H S, and Maeda N. Apolipoprotein E4 Exaggerates Diabetic Dyslipidemia and Atherosclerosis in Mice Lacking the LDL Receptor. *Diabetes*. 60:2285-2294, 2011.

⁶⁹ Bobryshev Y V. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*. 37:208–222, 2006.

A faible concentration, les oxLDLs présentes dans la paroi vasculaire stimulent des voies de signalisation proinflammatoires qui participent à l'activation de l'endothélium ainsi qu'à la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (CML), à partir de la média à travers la limitante élastique interne vers l'intima. De même ces CML sécrètent de la matrice extracellulaire, ce qui forme la chape fibreuse.^{70,71}

La lésion évolue vers la formation du centre nécrotique entouré de la chape fibreuse. A ce stade, la prolifération de CML et la synthèse de collagène sont encore plus développées.⁹

Il s'agit, probablement, d'une étape critique séparant l'état de strie lipidique potentiellement réversible d'une lésion athéroscléreuse plus avancée (plaque fibreuse), dont la réversibilité est moins évidente (étape 6, Figure 11).

Le noyau lipidique est composé par une accumulation de lipides au sein d'un noyau nécrotique au centre de la lésion, et par une matrice extracellulaire fibreuse à la périphérie.

Au niveau de cette chape fibro-musculaire, les oxLDLs pourraient participer à l'apoptose des CML et des macrophages et donc à la fragilisation de la plaque (étape 7, Figure 11).⁶⁸

Les oxLDLs participeraient à la fois à la genèse de la plaque et aux événements thrombotiques, en déstabilisant la plaque, soit superficiellement (érosion), soit profondément (rupture).⁷²

Lorsque les plaques présentent un noyau lipidique occupant plus de 40 % du volume total de la plaque, et une chape fibreuse fine riche en macrophage et pauvre en CML, la conséquence directe est la rupture de la plaque. Elle est le résultat du déséquilibre entre les contraintes circonférentielles auxquelles sont soumises la chape fibreuse et la solidité intrinsèque de la chape qui détermine sa résistance à la fracture.⁹

⁷⁰ Albiero M, Menegazzo L, Fadini G P. Circulating Smooth Muscle Progenitors and Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 20(4):133-140, 2010.

⁷¹ Auger n, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-Induced Smooth Muscle Cell Proliferation Involves the EGF Receptor/PI-3 Kinase/Akt and the Sphingolipid Signaling Pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:1990-1995, 2002.

⁷² Mallat Z, Hugel B. and Freyssinet J M. Déstabilisation de la plaque. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. Chapman, Eds. Masson: Paris, Vol. 21, pp 369-389, 2003.

3.3. Traitements de l'athérosclérose

On peut subdiviser les traitements en deux catégories :

- 1 - Les traitements actuels ou classiques.
- 2 – Les traitements qui ciblent l'oxydation des LDLs ou antioxydants.

3.3.1. Les traitements actuels

Les études épidémiologiques ont mis en évidence une étroite relation entre le niveau du cholestérol sanguin et la fréquence de survenue des complications cardiovasculaires. Les substances hypolipémiantes principales sont les résines échangeuses d'ions, les fibrates, les inhibiteurs de l'HMGCoA réductase, les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol et les huiles de poissons.

Les résines échangeuses d'ions

La seule résine commercialisée en France est la cholestyramine (Questran®). C'est une résine échangeuse d'anions qui abaisse indirectement le taux du cholestérol sanguin par adsorption.

La cholestyramine est un polymère de poids moléculaire élevé, comportant des groupes ammonium quaternaire reliés à un copolymère styrène-divinylbenzénique (Figure 13), absorbé *per os* mais non résorbable. En supprimant le cycle entéro-hépatique des acides biliaires par échange d'anions, elle diminue la concentration d'acides biliaires dans les cellules hépatiques, ce qui entraîne l'activation de la 7- α -hydroxylase responsable de la transformation du cholestérol en acides biliaires.

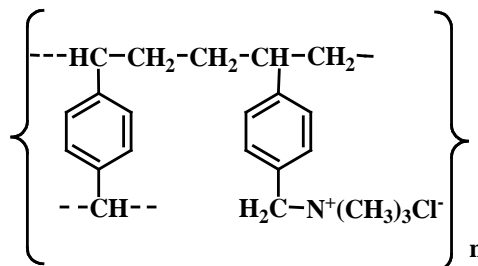


Figure. 13. Cholestyramine (Questran®).

En accélérant le catabolisme du cholestérol, elle provoque indirectement une augmentation des récepteurs LDLs au niveau hépatique et donc une captation accélérée des LDLs circulantes et une diminution du cholestérol.⁷³

La cholestyramine entraîne, au bout d'une dizaine de jours de traitement, une chute du cholestérol d'environ 20% par abaissement du taux des LDLs et l'association cholestyramine et inhibiteur de l'HMG-CoA réductase est d'une très grande efficacité pour faire chuter le cholestérol en cas d'hypercholestérolémie sévère.⁷⁴

Les fibrates

Les fibrates sont des hypolipémiants anciens mais dont le mécanisme d'action a été découvert récemment. Les principaux effets métaboliques sont une diminution de la production hépatique des triglycérides, une augmentation de la production des HDLs avec stimulation du transport inverse du cholestérol et une augmentation du catabolisme des LDLs.⁷⁵

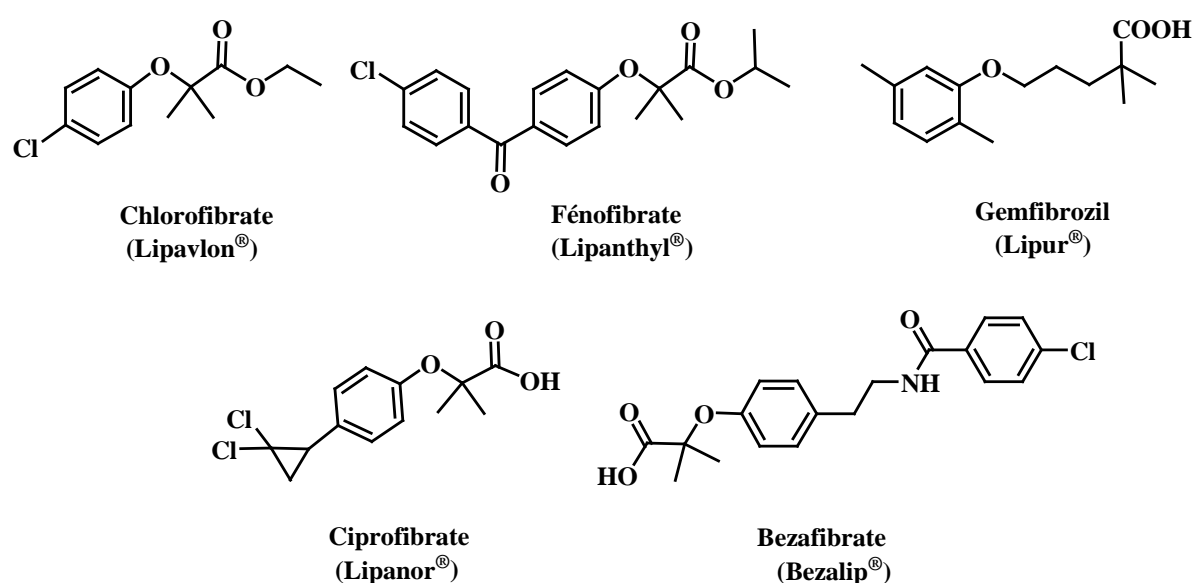


Figure. 14. Structure de quelques Fibrates.

Le chlorofibrate (Figure 14), chef de file des fibrates, est commercialisé en France depuis 1965 mais il a une faible activité thérapeutique (diminution du cholestérol total de 5 à 15 %). Le fénofibrate (commercialisé en France en 1974) permet de diminuer le cholestérol total

⁷³ Luc G. Mécanismes d'action des hypolipémiants. *Thérapie*. 55:661-668, 2000.

⁷⁴ Scaldaferrri F, Pizzoferrato M, Ponziani FR, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Use and indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. *Intern Emerg Med*. DOI 10.1007/s11739-011-0653-0, 2011.

⁷⁵ Abourbih S, Filion K B, Joseph L, Schiffrin E L, Rinfret S, Poirier P, Pilote L, Genest J, and Eisenberg M J. Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Am J Med* .122(10): 962–962, 2009.

d'environ 20 % chez les hypercholestérolémiques. Les autres fibrates commercialisés par la suite en France, comme le gemfibrozil ont une efficacité comparable ou légèrement inférieure.

Les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase (ou statines)⁷⁶

Les statines, principale classe des hypolipémiants, sont des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, enzyme clé de la synthèse du cholestérol régulant la conversion de la HMG-CoA en acide mévalonique (Figure 15).

L'inhibition compétitive de la HMG-CoA réductase provoque une diminution de la concentration du cholestérol libre intracellulaire. Le mécanisme de l'activation des gènes impliqués lors d'un traitement par les statines est décrit par ailleurs et l'effet principal est une augmentation de la transcription du gène du LDL récepteur. L'augmentation du nombre de récepteurs de LDL génère une captation plus importante des LDLs plasmatiques, donc une diminution de leur concentration.⁷⁷

Ces inhibiteurs, désignés sous le nom de statines, ont été découverts au Japon vers 1975 dans des cultures de *pénicillium*. La découverte de la mévastatine (Figure 16) commercialisée sous le nom de (Mevacor[®]) comme premier inhibiteur efficace a été suivie d'un développement spectaculaire de cette nouvelle classe thérapeutique et plusieurs statines sont actuellement disponibles : la mévastatine qui n'est pas commercialisée en France, la cerivastatine (arrêt de commercialisation en Août 2001 car serait responsable de 30 décès). La simvastatine, la pravastatine, la fluvastatine, l'atorvastatine, et la rosuvastatine (Crestor[®]) sont les statines commercialisées en France.

⁷⁶ Saito Y, Yoshida S, Nakaya N, Hata Y, and Goto Y. Comparison between morning and evening doses of simvastatin in hyperlipidemic subjects. A double-blind comparative study. *Arterioscler Thromb.* 11(4):816–26, 1991.

⁷⁷ Al-Shaer M H, Choueiri N E, and Suleiman E S. The pivotal role of cholesterol absorption inhibitors in the management of dyslipidemia. *Lipids in Health and Disease.* 3:22-28, 2004.

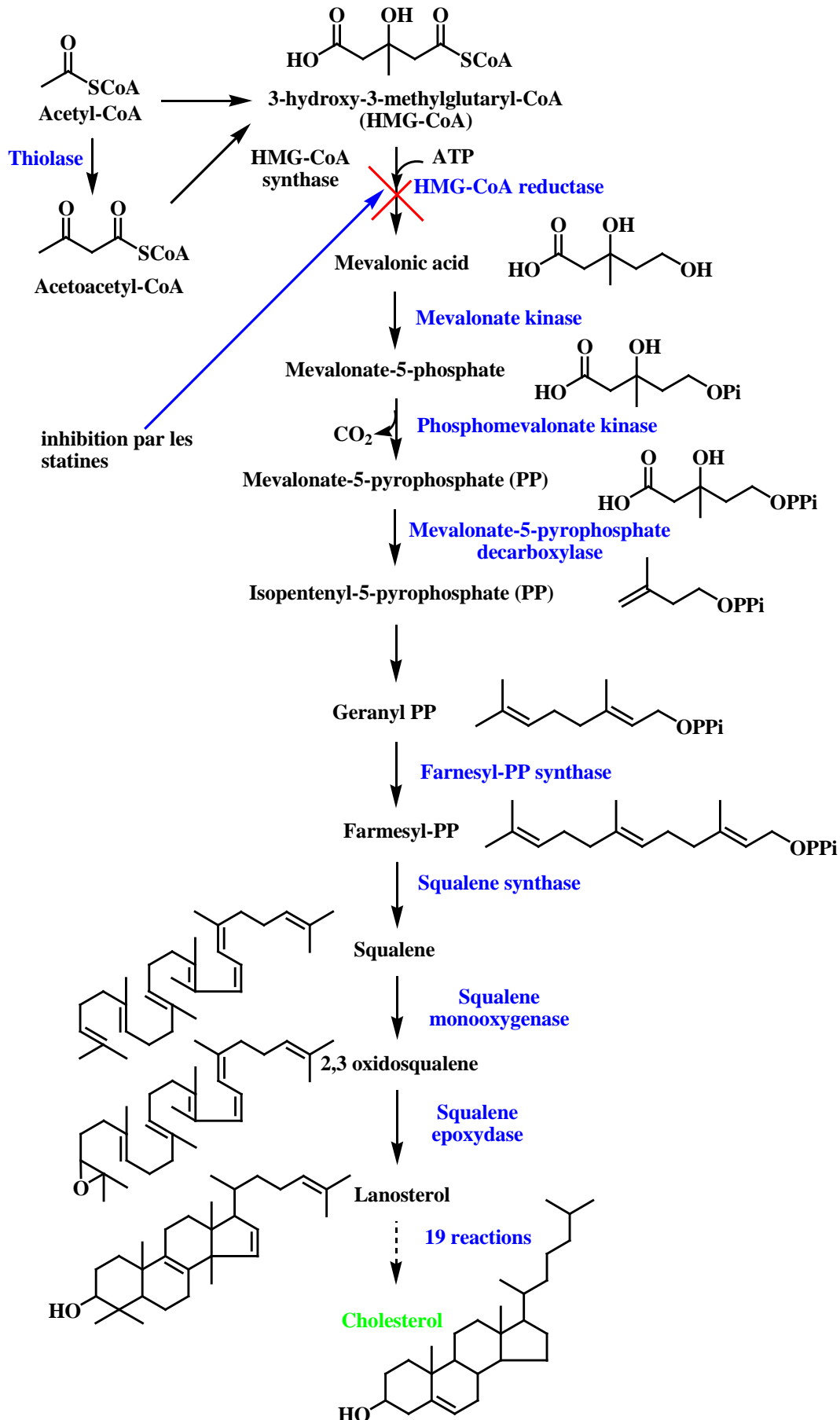


Figure. 15. Biosynthèse du cholestérol, et action des statines

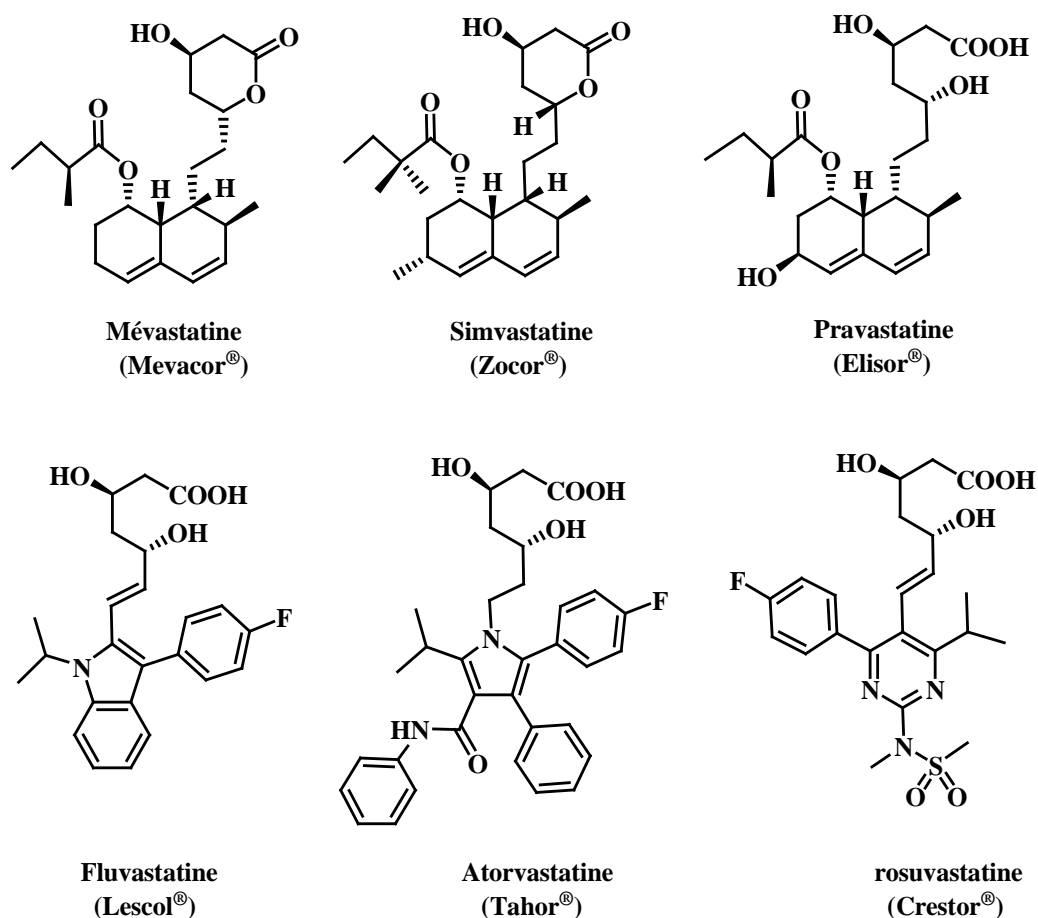


Figure. 16. Classification et structures chimiques de quelques statines commerciales.

Les statines peuvent être très efficacement associées à la cholestyramine, la baisse du cholestérol peut atteindre alors 40 à 50%. De plus, l'association entre une statine à dose usuelle et un fibrate permet d'obtenir des réductions du taux de LDL-Cholestérol de plus de 40% et des triglycérides (TG) jusqu'à 50%, et une augmentation du HDL-Cholestérol de plus de 20%.⁷⁵ Toutefois, peu d'études ont évalué de façon précise l'effet additionnel d'un fibrate chez des patients avec hyperlipidémie mixte traitée par statine. L'étude la plus importante a montré que l'addition de fénofibrate 160 mg à la simvastatine 20 mg permet d'abaisser en complément le LDL-Cholestérol de 5,4%, les TG de 23%, et d'augmenter le HDL-Cholestérol d'environ 9%.⁷⁸ Les données récentes de la littérature sont surtout disponibles avec le fénofibrate, seul fibrate mentionné dans les recommandations françaises comme pouvant être associé à une statine après avis spécialisé.

⁷⁸ Grundy S M, Vega G L, Yuan Z, Battisti W P, Brady W E, and Palmisano J. Effectiveness and tolerability of *simvastatin* plus *fenofibrate* for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). *Am. J. Cardiol.* 95:462-468, 2005.

Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol

L'ézétimibe (Figure 17) inhibe de façon sélective l'absorption intestinale du cholestérol et des phytostérols apparentés. Dans l'hypercholestérolémie primaire, l'ézétimibe significativement réduit, comparativement au placebo, le cholestérol total (13%), le LDL- Cholestérol (19%), l'apolipoprotéine B (14%) et les TG (8%) et augmentent le HDL- Cholestérol (3%).⁷⁹

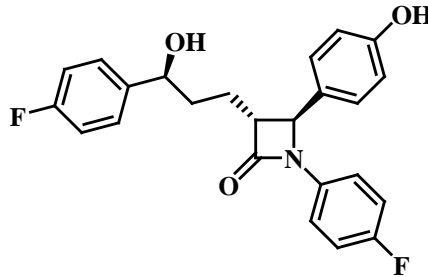


Figure. 17. Structure de l'ézétimibe (Ezetrol®).

Les huiles de poissons

Les huiles de poissons (Maxepa®) sont riches en acides gras polyinsaturés de la série oméga-3. Elles ont une action hypotriglycéridémiant lorsqu'elles sont consommées de façon élevée, le mode d'action de ces acides gras est encore mal connu, mais il a été constaté qu'ils provoquent une baisse des triglycérides dans le sang.⁸⁰

3.3.2. Les traitements qui ciblent l'oxydation des LDLs ou antioxydants

Plusieurs stratégies permettent de prévenir la formation des oxLDLs : diminution de la quantité des LDLs circulantes, diminution du taux d'acides gras polyinsaturés (AGPI) au profit des mono-insaturés (AGMI) dans les LDLs en modifiant l'alimentation, augmentation des antioxydants liposolubles (vitamine E, probucol) et hydrosolubles circulants (vitamine C). Il faut également noter que les HDLs bloquent les modifications oxydatives des LDLs.

L'utilisation des antioxydants a été essayée dans le traitement de l'athérosclérose. A l'heure actuelle, aucun antioxydant ne s'est révélé efficace, à l'exception du *Probucol* (Figure 7). L'effet antiathérogène de cette molécule ne serait pas dû à ses propriétés antioxydantes, mais

⁷⁹ Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull H G, Hawes B E, Burnett D A, and Braun M P. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(23):8132-7, 2005.

⁸⁰ Farnier M. Dyslipidémies athérogènes. *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.F., Toussaint, M.P., Jacob, L., Lagrost, J., Chapman, Eds., Masson: Paris, 33 :571-598, 2003.

à une diminution du taux de cholestérol total et de cholestérol LDL de 10 à 15%.⁸¹ Cependant, le Probucol ferait baisser le taux d' HDL cholestérol et son utilisation a été supprimée en France.⁸²

L'efficacité des antioxydants dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires est débattue. De nombreuses études portant sur plusieurs milliers de sujets ont mis en évidence l'impact positif de la supplémentation en antioxydant (Vit E, C, ...) dans la réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires.⁸³ En revanche d'autres études montrent que cet apport est inefficace, et même augmenterait l'incidence de la pathologie.⁸⁴ De plus l'administration de grandes quantités d'antioxydants peut avoir comme conséquence un effet prooxydant, donc aggravant. En effet, lorsque la vitamine E réagit sur un radical, elle devient le radical tocophéroxyl, qui lui-même peut participer à des événements prooxydatifs.¹⁹

Notre objectif est de concevoir et synthétiser des antioxydants actifs à faible concentration, et évaluer leur effet antiathérogène.

⁸¹ Holvoet P, and Collen D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 137 Suppl :S33–S38, 1998.

⁸² James R W. L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). *Med. Hyg.* 51:2894- 2896, 1993.

⁸³ Heineke J W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*. 141:1-15, 1998.

⁸⁴ Badimon L, Vilahur G, Padro T. Nutraceuticals and Atherosclerosis: Human Trials. *Cardiovascular Therapeutics*. 28:202–215, 2010.

Chapitre II

Systemes phénoliques antioxydants et antiathérogènes

Introduction

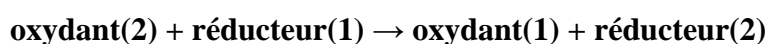
Les phénols et polyphénols à activité antioxydante sont un véritable espoir pour la mise au point de nouvelles molécules antiathérogènes. Les progrès en chimie organique nous ouvrent de multiples voies afin de synthétiser et fonctionnaliser des systèmes phénoliques ou polyphénoliques.

1. La réaction d'oxydoréduction

Une réaction d'oxydo-réduction est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un transfert d'électrons pouvant s'accompagner par un transfert de protons. L'espèce chimique qui capte les électrons est appelée « oxydant » ; celle qui les cède, « réducteur ».

Donc, le réducteur s'oxyde (réaction d'oxydation), l'oxydant se réduit (réaction de réduction). L'oxydo-réduction se compose donc de deux demi-réactions : une oxydation et une réduction.

Un réducteur oxydé (=forme oxydée) est un oxydant, et un oxydant réduit (=forme réduite) est un réducteur. On définit ainsi le couple oxydant-réducteur (aussi appelé « couple redox ») qui se compose de l'oxydant et du réducteur conjugué (l'oxydant réduit). On le note sous la forme : *oxydant/réducteur*.



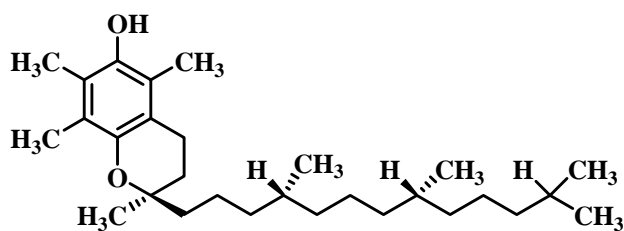
Ces notions sont d'une importance majeure, un antioxydant phénolique est un réducteur par définition, cela signifie que si sa forme oxydée n'est pas stabilisée, elle pourra engendrer une oxydation par la suite (prooxydant).¹

Des études ont montré qu'une association d'une faible concentration d'AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino propane) hydrochloride) et d'une forte concentration de tocophérol (α -TocH, dont la vitamine E) en absence d'un autre antioxydant va stimuler la formation du radical α -TocH[•].

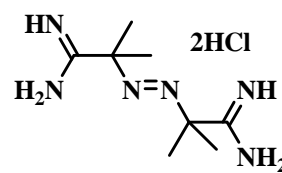
Le dernier initiera une propagation additionnelle de l'oxydation des LDLs, appelée *tocopherol-mediated peroxidation, TMP*.²

¹ Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L, Plant Polyphenols: Definitions, Physico Chemical Properties, Biological Activities and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50:586-621, 2011.

² Zai-Qun L. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. *Chem. Rev.* 110:5675-5691, 2010.



Vitamine E



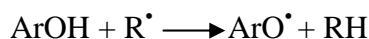
AAPH

2. Mécanismes antioxydants des systèmes phénoliques³

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les polyphénols désactivent les radicaux libres *via* trois mécanismes :

2.1. Transfert d'atome d'hydrogène (*HAT, hydrogen atom transfer*)

L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène *via* la rupture homolytique de la liaison O-H.



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical ArO[•] (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif.

2.2. Transfert mono-électronique d'électron (*SET, single electron transfer*)

Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre R[•]. L'anion R⁻ et le cation radical ArOH^{•+} ainsi formés sont généralement des entités stables.



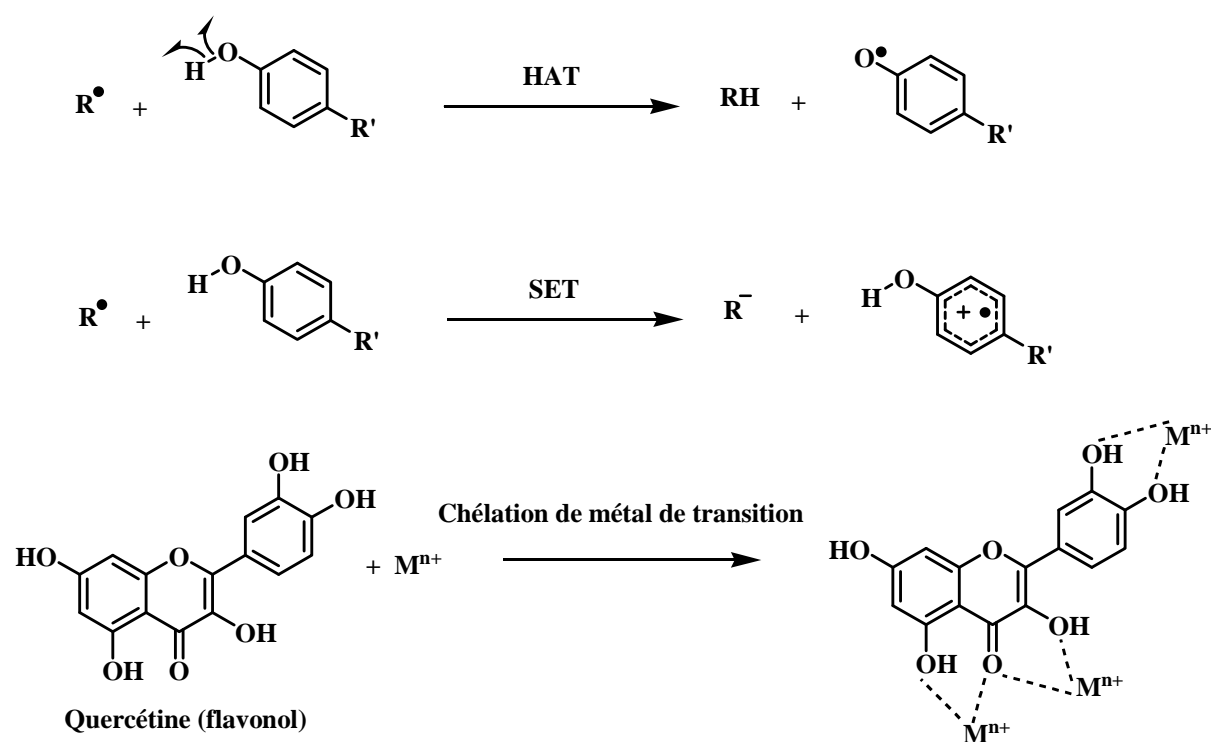
Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre.

³ Leopoldini M, Russo N, Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125 :288–306, 2011.

2.3. La chélation des métaux de transition

C'est un mécanisme indirect. Il consiste à la chélation des métaux de transition tels que le fer ou le cuivre. Cette chélation sert à empêcher la réaction de Fenton dans les milieux biologiques (Chapitre I, paragraphe 1.2.2).

Ainsi, en résumé, le schéma 5 illustre les trois mécanismes possibles pouvant intervenir pour expliquer les activités antioxydantes des systèmes phénoliques.



3. Modélisation de l'activité antioxydante^{4,5}

Lors de la conception des antioxydants de synthèse, il est utile d'examiner quel type de structure moléculaire pourrait être potentiellement optimal. De manière générale, les composés contenant des liaisons C-H faibles qui peuvent conduire à des radicaux centrés sur le carbone R^\bullet sont indésirables, car ils sont généralement très réactifs avec l'oxygène moléculaire conduisant à des radicaux peroxy ROO^\bullet .⁶

⁴ Hussain H H, Babic G, Durst T, Wright J S, Flueraru M, Chichirau A, and Chepelev L L. Development of Novel Antioxidants: Design, Synthesis, and Reactivity. *J. Org. Chem.* 68:7023-7032, 2003.

⁵ Natella F, Nardini M, Di Felice M, and Scaccini C. Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants : Structure-Activity Relation. *J. Agric. Food Chem.* 47(4):1453-1459, 1999.

⁶ Scaiano J C, Martin A, Yap G P A, Ingold K U A. Carbon-Centered Radical Unreactive Toward Oxygen: Unusual Radical Stabilization by a Lactone Ring. *Org. Lett.* 2:899-901, 2000.

Chapitre II. Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes

Les radicaux centrés sur l'atome de soufre sont d'intérêt et jouent un rôle important en biochimie, mais ils sont aussi capables de former des radicaux peroxydes $\text{RSO}_2\cdot$ par réaction avec l'oxygène O_2 .⁷

Aussi, les radicaux peuvent être centrés sur un atome d'azote, qui peut être stable en présence d'oxygène.

Néanmoins les molécules les plus étudiées impliquent des radicaux centrés sur l'atome d'oxygène, les plus fréquentes étant les phénols (ArOH). L'avantage de ces structures radicalaires ($\text{ArO}\cdot$) est qu'elles ne réagissent pas avec l'oxygène pour former des systèmes trioxyl $\text{ArOOO}\cdot$ puisque cette étape est endergonique d'environ 20 kcal / mol.

Le deuxième point sur la conception de ces structures phénoliques réside en leur capacité à réagir rapidement avec les radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$. La transformation ($\text{ROO}\cdot$ en ROOH) se fait avec une enthalpie de dissociation (BDE, *bond dissociation enthalpy*) d'environ 88 Kcal/mol. Ceci implique l'utilisation des systèmes phénoliques ayant une BDE inférieure à 88 kcal/mol. Cette propriété conduit à une réaction exergonique et rapide de piégeage de radical peroxyde $\text{ROO}\cdot$. C'est ainsi que α -ToCH est un bon antioxydant (BDE : 77 kcal/mol). Il faut également tenir compte de la génération du radical formé à partir de l'antioxydant α -ToCH. Cette régénération se fait en général en milieu physiologique par l'anion ascorbate (BDE : 68.5 kcal/mol).

En conclusion, les valeurs de BDE qu'un bon antioxydant de synthèse doit posséder devraient être comprises entre 68.5-77 kcal/mol.

Wright et al⁸ ont rapporté en 2001 la variation de l'enthalpie de dissociation de la liaison O-H (BDE) en fonction de la nature des substituants sur le noyau phénolique dans la prédiction ou la détermination du potentiel antioxydant d'un phénol donné.

Une substitution par un groupe électro-donneur en position ortho ou para du OH phénolique conduit à une diminution de la BDE de la liaison O-H. En revanche une substitution par un

⁷ Halliwell B, and Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: Oxford, UK, 1999.

⁸ Wright J S, Johnson E R, and DiLabio G A. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1173-1183, 2001.

groupement électro-attracteur augmente la valeur de la BDE.⁹ Les effets de différents substituants du cycle aromatique sur la BDE sont montrés dans le tableau 3.

Groupe	Position du substituant		
	Ortho	Méta	Para
NH ₂	-11.5	-0.2	-9.4
OCH ₃	-1.4	-0.6	-6.1
OH	-9.2	-0.4	-5.9
CHCH ₂	-4.0	-0.2	-4.7
CH ₃	-2.7	-0.6	-2.5
<i>tert</i> -butyl	-2.0	-0.4	-2.5
Cl	+1.0	+1.2	-1.4
CN	+3.6	+2.7	+2.2
CHO	+8.0	+2.2	+2.4
COOH	+8.1	+2.5	+2.6
CF ₃	+4.0	+2.1	+3.2
NO ₂	+10.0	+3.4	+4.6

Tableau. 3. Effets du substituant en (ortho, méta ou para) sur la variation de l'enthalpie de dissociation de la liaison O-H (BDE).

Les valeurs du tableau 3 sont arbitraires. Une valeur négative montre que le substituant diminue cette énergie et par conséquent l'efficacité antioxydante est augmentée. Comme remarque générale, un groupe électro-donneur tel qu'une amine (NH₂) favorise l'activité antioxydante et vice versa avec un groupe électro-attracteur (comme un nitro NO₂).

Le troisième point est que le radical *néo* formé devrait être relativement non réactif avec les lipides, les protéines ou d'autres substrats biologiques.

Le quatrième point est que, les antioxydants ou leurs radicaux formés suite à une réaction de réduction ne devraient pas réagir avec l'oxygène moléculaire à un taux élevé pour produire l'anion superoxyde ou son acide conjugué ou le radical hydroperoxyde (autoxydation).

Enfin, en chimie médicinale, les règles de Lipinski¹⁰ ont une importance majeure. Le respect de ces règles donnera plus de chance aux agents de devenir un candidat médicament. Ces règles sont

⁹ Lucarini M, Pedulli G F, Valgimigli L, and Amorati R. Thermochemical and Kinetic Studies of a bisphenol antioxidant. *J. Org. Chem.* 66:5456-5462, 2001.

¹⁰ Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, and Feeney P J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 :3-25, 1997.

- Nombre de donneurs de liaison hydrogène < 5 (groupements NH ou OH)
- Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène < 10 (atomes N ou O)
- Masse moléculaire < 500
- $C \log P < 5$

4. Motifs cinnamoylés et benzaldehydes phénoliques (travaux antérieurs et actuels)

Un programme de recherche consistant à développer des familles de composés possédant des activités antioxydantes a été initié au laboratoire en 2003. Ce programme s'appuie sur les compétences du laboratoire autour des systèmes phénoliques et plus particulièrement des dérivés cinnamiques, monomères de base d'un polymère végétal appelé lignine.

La lignine, second polymère le plus abondant de la biomasse après la cellulose est formée par polymérisation oxydante radicalaire de trois principales unités de type phénylpropanoïde que sont les alcools coumarique, férulique et sinapique (Schéma 6). Certains dérivés d'acides cinnamiques et lignanes ont démontré des activités intéressantes contre l'action des oxLDLs.¹¹

Ainsi dans ses premiers travaux, l'équipe a développé la synthèse de dérivés analogues de ces acides à savoir les dérivés phosphocinnamiques. Ces dérivés sont obtenus par couplage du cinnamaldéhyde correspondant avec des dérivés phosphonates.

Puis en s'inspirant de systèmes dimères de type aryl-aryl présents dans la lignine, l'équipe a conçu et synthétisé des composés issus de la bisvanilline fonctionnalisée de façon symétrique ou dissymétrique (Figure 18).

Enfin d'autres antioxydants ont été synthétisés à partir de la vanilline ou du syringaldéhyde. Pour ces derniers, la fonctionnalisation est sous forme d'hydrazones.

Je rappellerai ici brièvement les synthèses de ces familles et de certaines de leurs propriétés antioxydantes. Au cours de ma thèse, j'ai repris certaines de ces synthèses (avant de développer d'autres) pour approfondir davantage l'activité biologique des composés choisis. Ces synthèses sont développées également dans ce chapitre.

¹¹ Andreasen M F, Lanbdo A K, Christensen L P, Hansen A, and Meyer A S. Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 49:4090-4096, 2001.

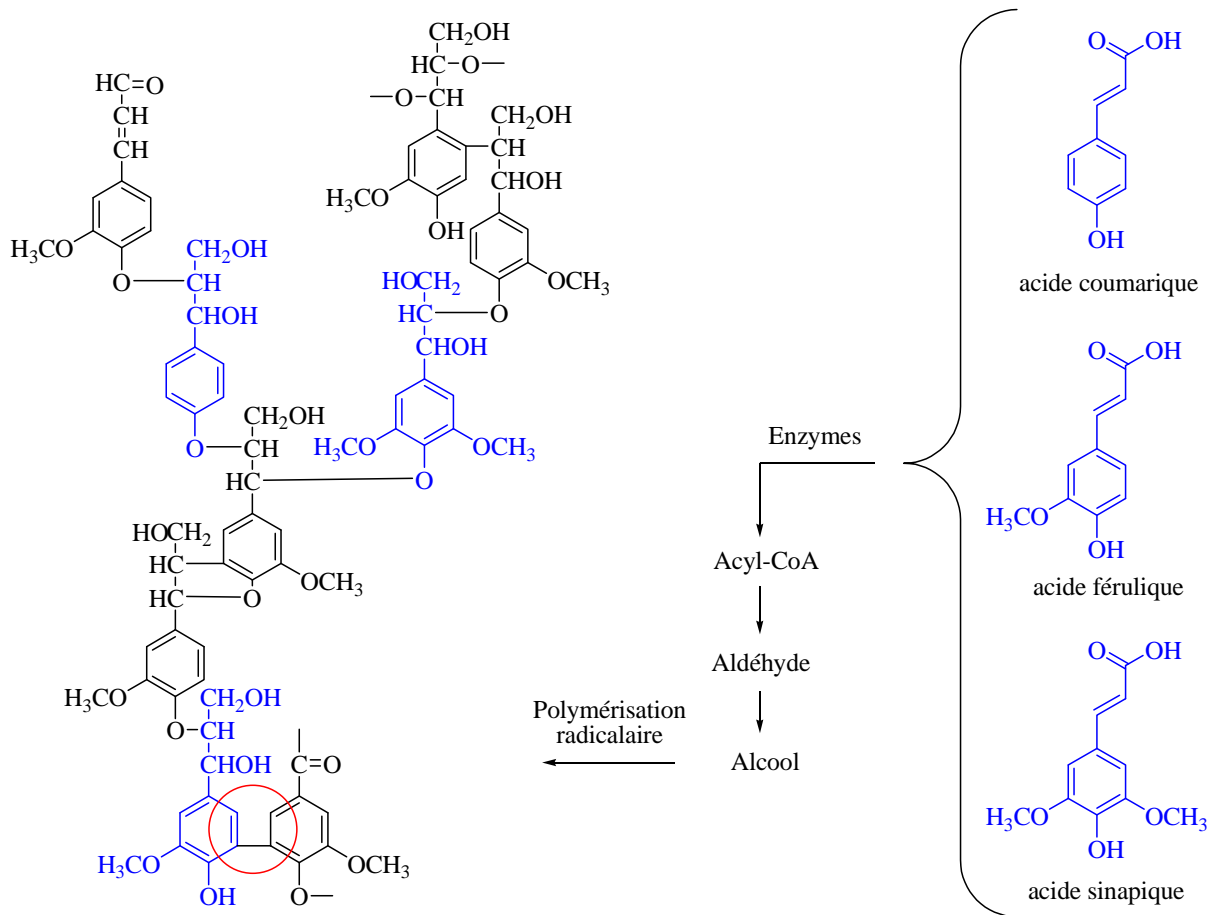


Schéma. 6. Biosynthèse de la lignine.

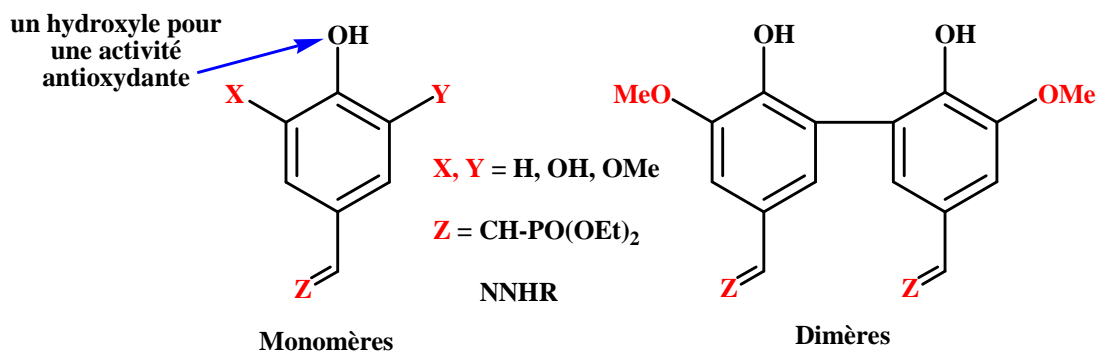


Figure. 18.

4.1. Les cinnamiques phosphonates¹² :

En 1999, le laboratoire a développé une méthode de synthèse de dérivés phosphocinnamiques (**1**)¹³ par condensation de Wadsworth-Emmons entre un benzaldéhyde substitué et le méthylènediphosphonate de tétraéthyle (Schéma 7).

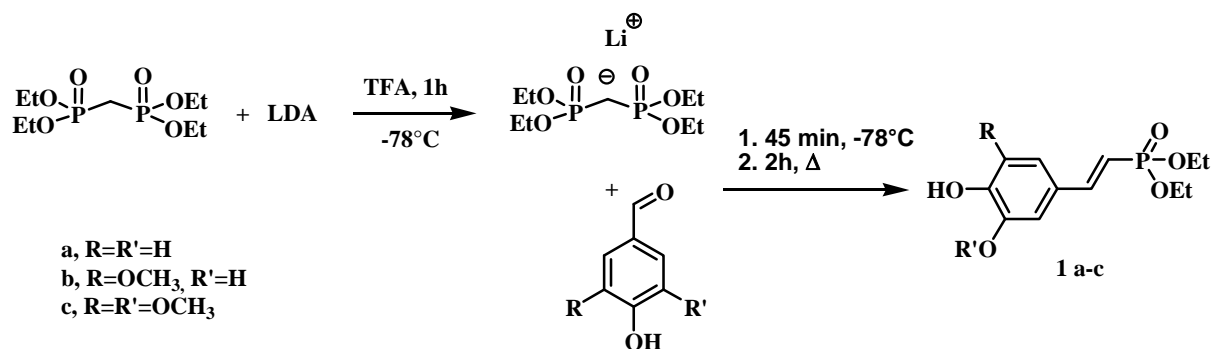
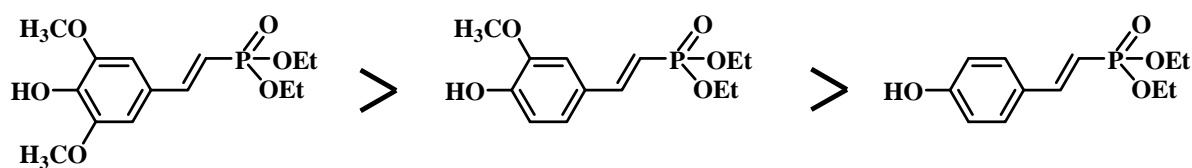


Schéma. 7.

Ces synthèses ont été réalisées à partir de la vanilline, du *p*-hydroxybenzaldéhyde ou du syringaldéhyde pour obtenir les dérivés phosphorés correspondants et vérifier le rôle de la substitution du noyau aromatique sur l'activité antioxydante. Ainsi l'équipe a mis en évidence que la présence de deux groupements méthoxy en *ortho* de l'hydroxyle phénolique (analogue syringique) améliore les propriétés antioxydantes. Ceci peut s'expliquer par le fait que le radical phénoxy formé lors de l'oxydation, est stabilisé par les deux groupements méthoxy adjacents.



Des dérivés fluorés des phosphonates (**1c**) ont été par la suite synthétisés. Le produit fluoré a été obtenu en quatre étapes. Dans un premier temps l'hydroxyle phénolique en position 4 est protégé par réaction avec le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilane TBDPSCl en milieu basique (imidazole, *N,N*-diméthylaminopyridine DMAP) dans le DMF, dans un deuxième temps le

¹² Lapeyre C, Delomenede M, Bedos-Belval F, Duran H, Negre-Salvayre A, and Baltas M. Design, Synthesis, and Evaluation of Pharmacological Properties of Cinnamic Derivatives as Antiatherogenic Agents. *J. Med. Chem.*48:8115-8124, 2005.

¹³ Kennedy K, Baltas M, Douglas K T, Duran H, Embrey K J, Giraudon J G, McKie J H, Grima-Pettenati J, Gorrichon L. Rational inhibitor design, synthesis and NMR spectroscopic study by transferred nuclear overhauser spectroscopy of novel inhibitors of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a critical enzyme in lignification. *J. Enzyme Inhibition.* 14:217-237, 1999.

phosphonodiester est activé sous forme de chlorure par traitement avec du chlorure d'oxalyle pur. Enfin, le complexe $\text{Et}_3\text{N}^+\text{HF}$ synthétisé *in situ* et utilisé dans le THF anhydre permet d'obtenir le dérivé fluorophosphonocinnamique correspondant **4** avec un très bon rendement (Schéma 8). Ainsi, une nouvelle méthode de fluoration douce par utilisation du complexe $\text{Et}_3\text{N}^+\text{HF}$ a été mise au point et brevetée.¹⁴

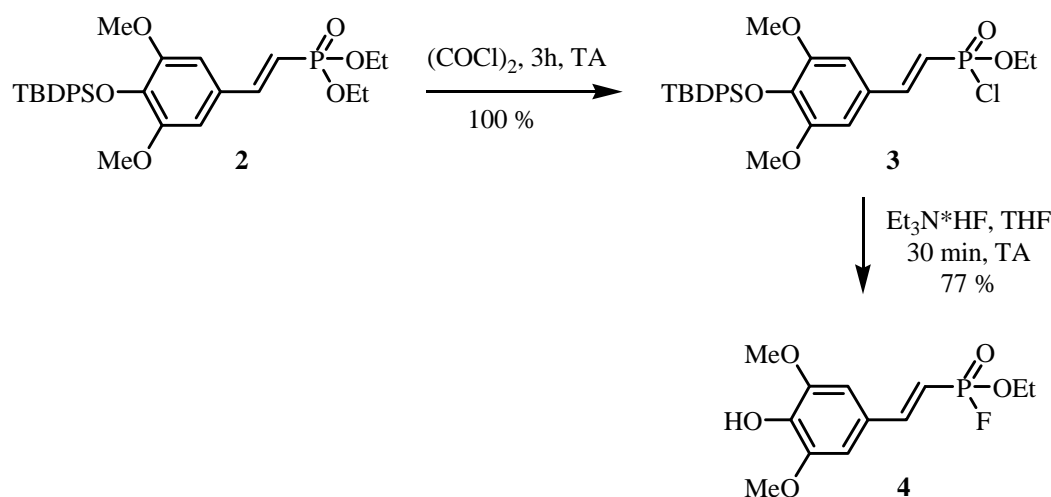


Schéma. 8. Obtention du dérivé " fluorophosphonosinapique " B.

Le dérivé fluorophosphonosinapique **4** obtenu a été testé pour sa capacité à inhiber l'oxydation des LDLs et son effet protecteur contre de la toxicité des oxLDLs sur les cellules endothéliales. *In vitro*, il a présenté les propriétés duales antioxydantes et cytoprotectrices recherchées très intéressantes.¹² *In vivo*, les résultats obtenus sont encourageants, une dose de 10 mg/kg/jour donnée à des souris apoE^{-/-} dans l'eau de boisson pendant 4 semaines a permis une réduction de 35% de la formation de la plaque athéroscléreuse.

4.2. Synthèse d'une famille de monomères hydrazones¹⁵ (présente thèse)

i) Monomères syringiques

La synthèse des mono-hydrazones syringiques a été effectuée par couplage du syringaldéhyde avec un équivalent strict des différentes hydrazines (Schéma 9). Les rendements sont reportés dans le tableau 4.

¹⁴ Baltas M, Bedos-Belval F, Duran H, Negre-Salvayre A, Lapeyre C, PCT/WO 2006/037869 (13/04/06).

¹⁵ Belkeri N. Dérivés phénoliques à activité antiathérogène. Septembre 2010.

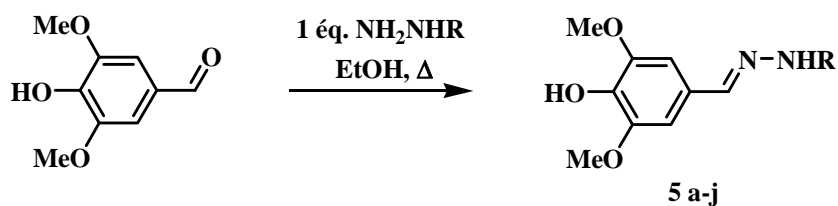


Schéma. 9. Synthèse des mono-hydrazones.

Tableau. 4. Conditions expérimentales pour l'obtention des mono-hydrazones syringiques.

composé	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i	5j
R										
temps	4h	24h	3j	nuit	7h	7h	6h	nuit	24h	5j
Rdt%	48	82	47	86	97	75	97	89	64	90

J'ai repris la synthèse de ces molécules suivant le même mode opératoire afin d'étudier de manière plus approfondie leurs activités biologiques. Elles seront décrites dans le chapitre III.

ii) Monomères catécholiques

J'ai également réalisé la synthèse d'une autre famille de composés monomères possédant le motif catéchol. Comme nous l'avons décrit pour les monomères syringiques, les aldéhydes (pyrocatechol ou dihydroxyméthoxybenzaldéhyde) sont mis en réaction dans l'éthanol à reflux avec un équivalent strict d'hydrazine. (Schéma 10). Les rendements sont présentés dans le tableau 5.

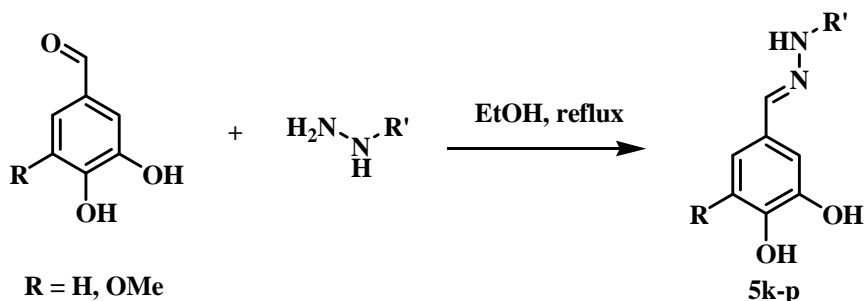
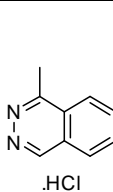
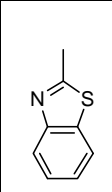
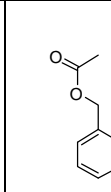
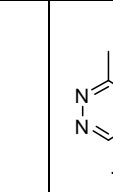
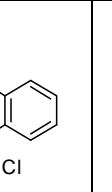
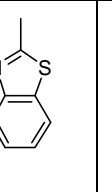


Schéma. 10. Synthèse d'hydrazones dérivées pyrocatechol ou dihydroxyméthoxybenzaldéhyde

Les études biologiques de cette famille de catéchols seront présentées dans les chapitre III.

Tableau. 5. Conditions expérimentales pour l'obtention des mono-hydrzones syringiques.

composé	R = H			R = OMe		
	5k	5l	5m	5n	5o	5p
R'	 .HCl			 .HCl		
temps	12h	24h	12h	12h	24h	12h
Rdt%	81	74	99	84	91	99

4.3. Les dérivés bis-aryl (Bis-phénol)

Des systèmes contenant une brique moléculaire de type aryl-aryl possédant des groupements méthoxy en position *ortho* des OH phénoliques ont été également préparés (Figure 19).

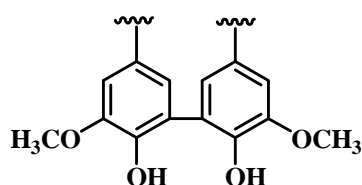


Figure. 19. Brique moléculaire de type aryl-aryl.

Le motif de base qui a été utilisé par le laboratoire fut celui de la bisvanilline. Cette brique moléculaire devrait permettre de conserver une activité antioxydante par la présence des groupements phénols et les méthoxy en *ortho* de ces derniers. D'autre part, les deux fonctions aldéhydes présentes ont été fonctionnalisées (Schéma 11) pour construire des systèmes symétriques et/ou dissymétriques α,β -insaturés. Des conditions de fonctionnalisations simples et efficaces ont été recherchées.

En se basant sur les résultats positifs en terme d'activité antioxydante des composés monomères phosphonates et hydrazones, l'équipe a développé la synthèse des dérivés symétriques et dissymétriques possédant ces deux groupes.

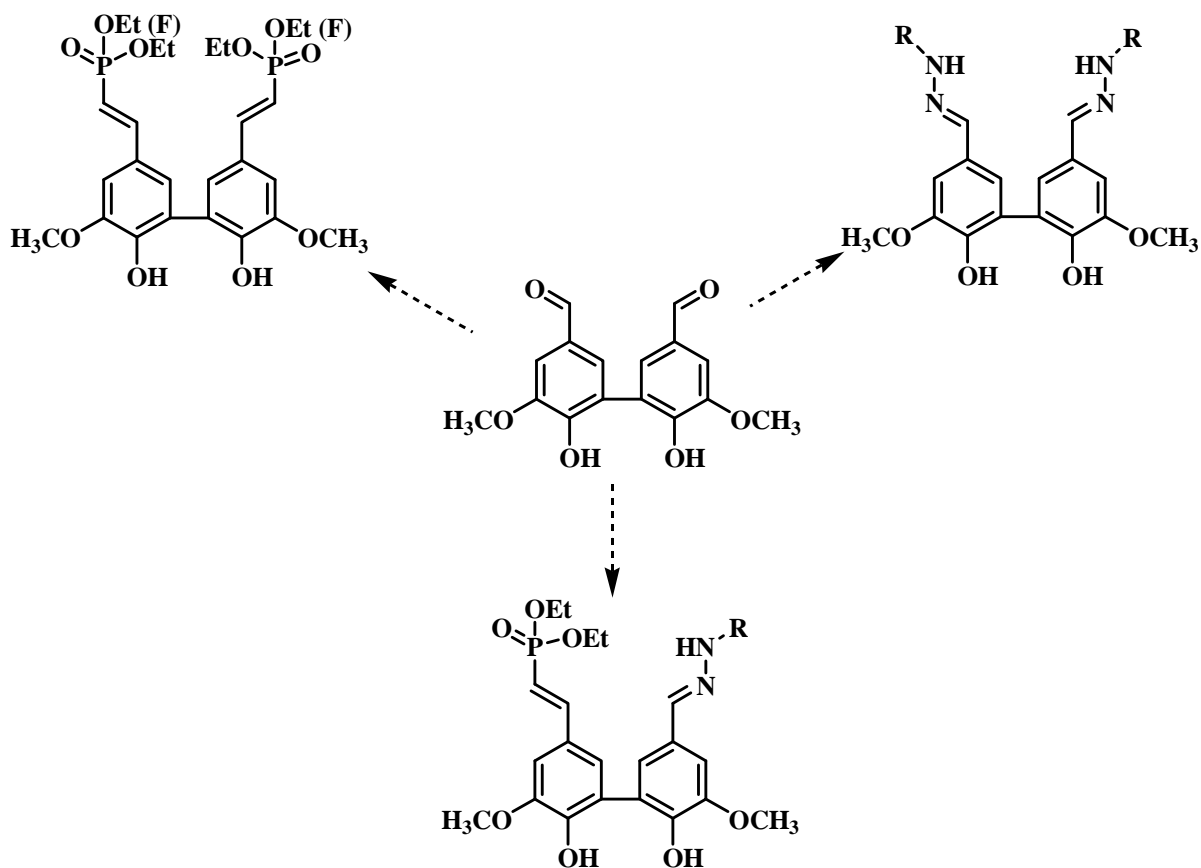


Schéma. 11. Fonctionnalisation des bis-aryl.

4.3.1. Synthèse de la bisvanilline¹⁶ (présente thèse)

La bisvanilline (**7**) est synthétisée par couplage oxydant. Ainsi, l'utilisation du persulfate de sodium en présence d'une quantité catalytique de sulfate de fer en milieu aqueux, permet de dimériser la vanilline en position ortho par rapport à l'hydroxyle phénolique (Schéma 12).

La vanilline est mise en réaction dans l'eau puis chauffée à 50 °C pendant 5 jours.

L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince jusqu'à la disparition totale de la vanilline. Après une étape de purification par solubilisation en milieu basique suivi d'une précipitation en milieu acide, nous obtenons la bisvanilline (**7**) pure avec un rendement de 95 %.

J'ai repris la synthèse de ce motif pour l'obtention de BVH (bisvanillylhydralazone, 16f) afin d'étudier ses propriétés biologiques d'une façon approfondie (voir chapitre III).

¹⁶ Delomenede M, Bedos-Belval F, Duran H, Vindis C, Baltas M, and Negre-Salvayre. Development of Novel Antiatherogenic Biaryls: Design, Synthesis, and Reactivity. *J. Med. Chem.* 51:3171–3181, 2008.

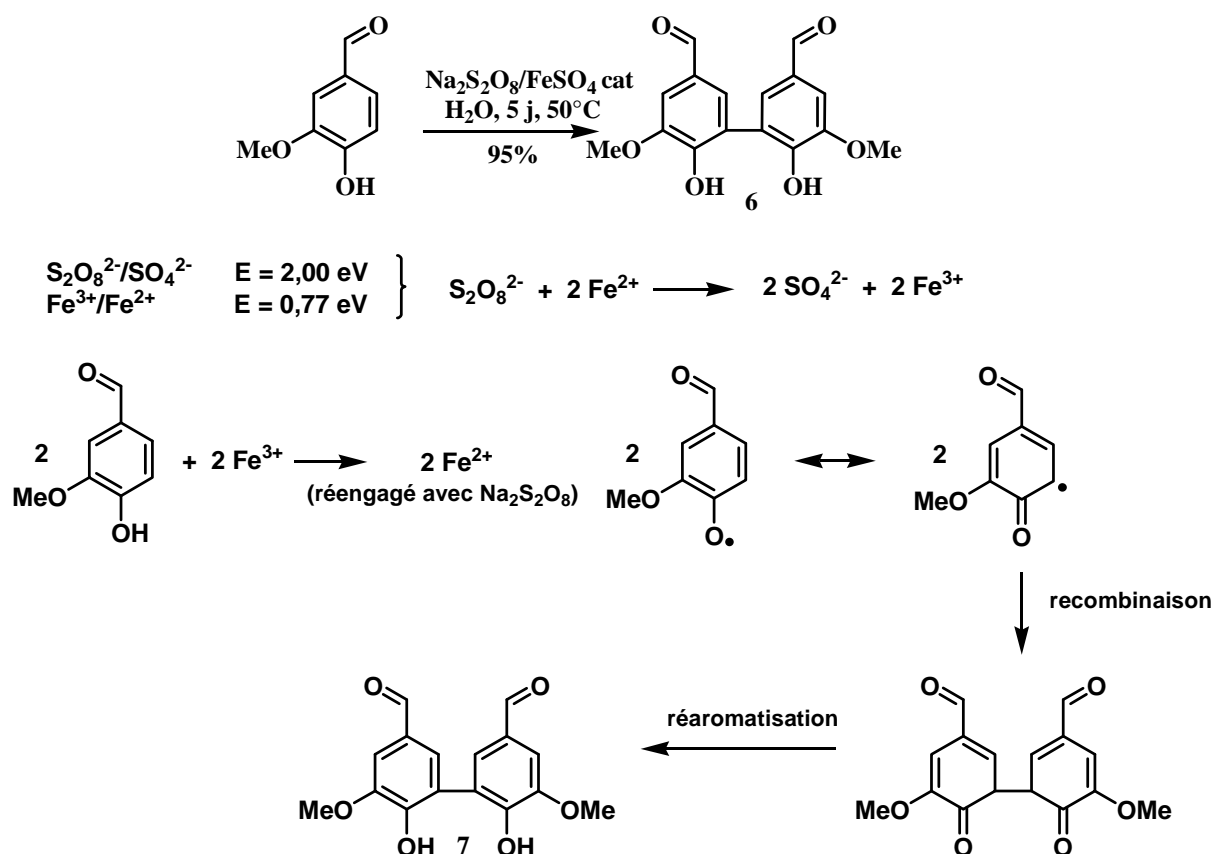


Schéma. 12. Synthèse de la bisvanilline 7 avec le mécanisme réactionnel proposé.

4.3.2. Synthèse des Bisphosphonodiesters

Afin d'introduire les phosphonates, une protection préalable des fonctions hydroxyles par le *ter*-butyldiméthylsilyle TBDMS est nécessaire. Cette réaction se fait dans le DMF en présence d'imidazole. Le rendement est de 70%.

Après obtention de la bisvanilline protégée (**8**), une double condensation de Wadsworth-Emmons a été envisagée selon les conditions mises au point pour les monomères. Dans ce cas 4,5 équivalents de dérivé lithié de méthylènediphosphonate de tétraéthyle sont nécessaires.

La déprotection des fonctions hydroxyles phénoliques du composé **9** a été réalisée par l'utilisation du complexe $\text{Et}_3\text{N}^+\text{HF}$ dans le THF anhydre pendant 1 h à température ambiante. Après purification sur gel de silice, le composé **10** est obtenu avec 57 % de rendement.

La fluoruration des deux fonctions phosphonodiesters a été réalisée dans les mêmes conditions que pour l'obtention de **10**, après une activation par chloration en présence de chlorure d'oxalyle (6 équivalents) dans le dichlorométhane pour donner le composé **12** avec un

Chapitre II. Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes

rendement global de 52%. La synthèse du "phosphonodiester-phosphonofluoridoate" **11** a nécessité l'optimisation de la réaction de chloration. Ainsi 4,5 équivalents de chlorure d'oxalyle sont nécessaires pour fluorer de manière optimale un seul phosphonodiester et obtenir le composé **11** avec un rendement global de 35% (Schéma 13).

Les trois molécules testées (**10**, **11**, et **12**) n'ont montré malheureusement aucune activité antioxydante (perte de l'activité par rapport aux analogues monomères).¹⁷

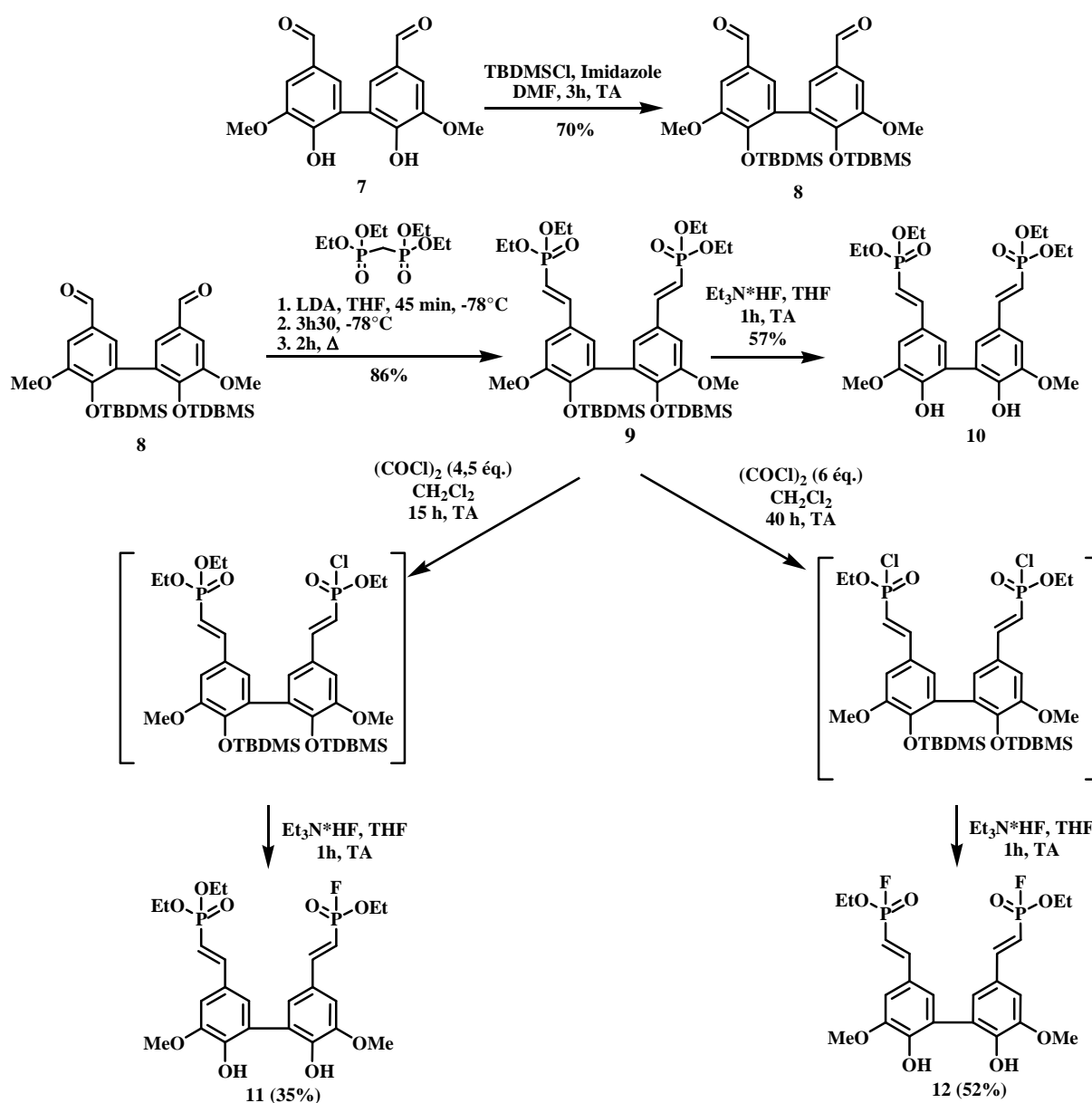


Schéma. 13. Synthèse des dérivés "bisphosphorés" symétriques et dissymétriques.

¹⁷ Delomende M. conception, synthèse de nouveaux agents antiathérogènes. Juin 2007.

4.3.3. Synthèse des bis-phénol dissymétriques (phosphonates-hydrzones)

La première étape consiste en l'introduction d'un seul fragment phosphonate par l'action d'un équivalent strict d'un dérivé lithié de méthylènediphosphonate de tétraéthyle (**13**) sur la bisvanilline protégée **8** pour conduire au composé mono-fonctionnalisé avec un rendement de 54 % (Schéma 14).

La déprotection des hydroxyles phénoliques du monophosphonate **13** (Schéma 14) a été réalisée par réaction avec le complexe $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HF}$.

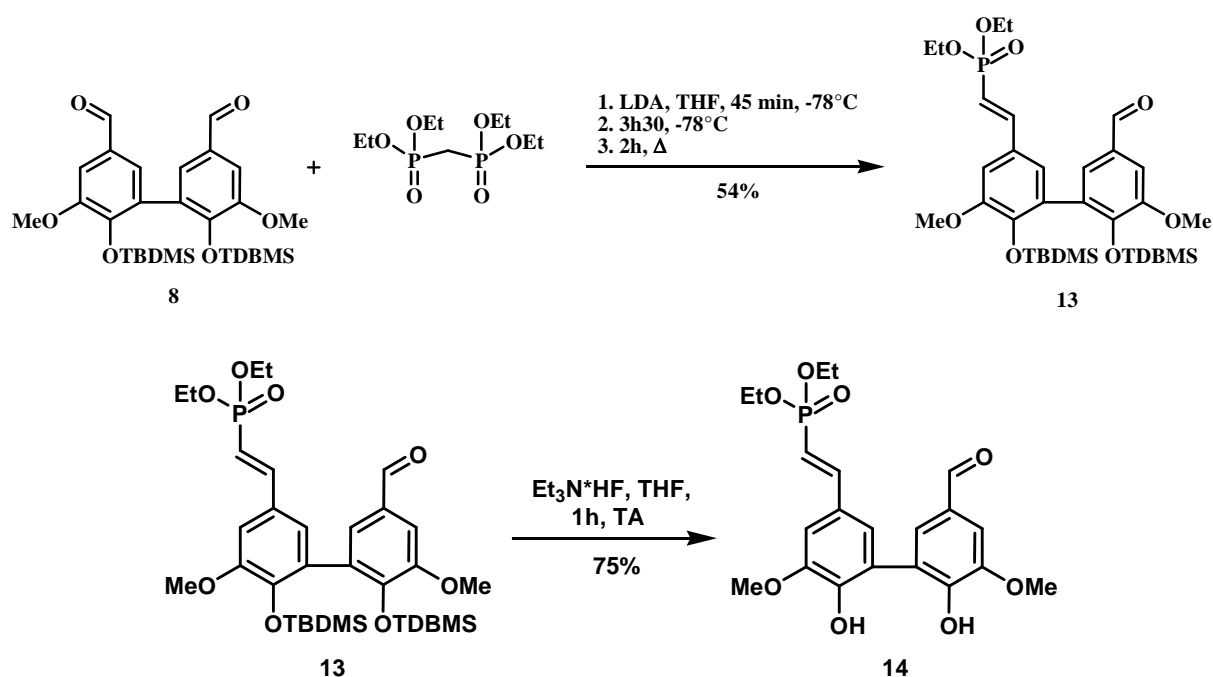


Schéma. 14. Synthèse du "phosphonate-aldéhyde" **14**.

Ensuite le "phosphonate-aldéhyde, **14**" est mis en réaction en présence des hydrazines/hydrzides dans l'éthanol à reflux (Schéma 15, Tableau 6). Les "phosphonates-hydrzones" sont obtenus purs par une simple filtration après retour du milieu réactionnel à température ambiante ou par purification sur gel de silice.¹²

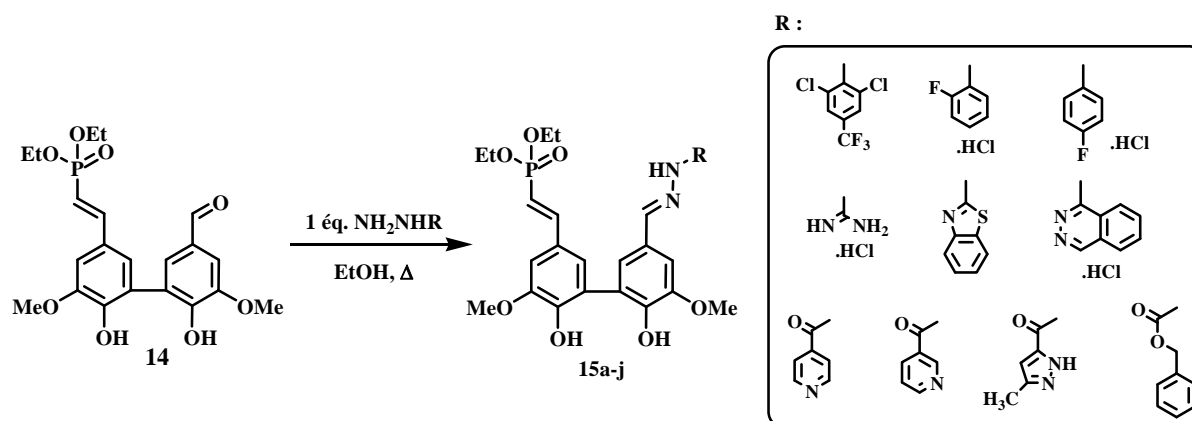


Schéma. 15. Synthèse de "phosphonate-hydrzones".

Tableau. 6. Dimères dissymétriques

composés	15a	15b	15c	15d	15e	15f	15g	15h	15i	15j
NH ₂ NHR										
Rdt %	68	97	60	98	82	98	81	87	78	79

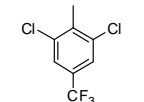
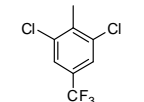
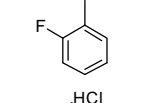
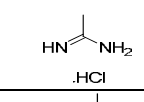
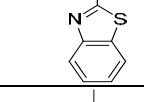
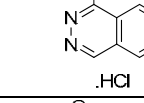
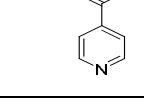
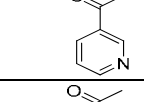
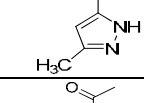
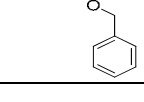
L'activité antioxydante de ces molécules a été déterminée par le dosage des TBARS. L'effet cytoprotecteur a été déterminé par le dosage MTT (voir chapitre III et partie expérimentale). Les résultats sont montrés dans le tableau 7.^{12,13}

En ce qui concerne les "phosphonates-hydrzones" halogénés (**15a-c**), les résultats sont globalement comparables, le meilleur étant le composé **15a** (seulement 18% de TBARS formés). Cette valeur comparée à celle du probucol et de l' α -tocophérol indique qu'on est en présence d'un bon antioxydant. D'autre part, la viabilité cellulaire est évaluée à 75% (test MTT), valeur inférieure à celle du probucol mais bien supérieure à celle de l' α -tocophérol. Elle est donc considérée comme bonne.

Le deuxième groupe de "phosphonates-hydrzones" (**15d-f**) de structure chimique plus variable montre que seul le composé **15f** présente des propriétés intéressantes. En effet, il possède une activité antioxydante très puissante (4% d'oxydation) et la viabilité cellulaire (61%) reste convenable même si elle est inférieure à celle du probucol.

Chapitre II. Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes

Tableau. 7. Activités antioxydantes et cytotoxicité résiduelle des "phosphonates-hydrazones" à 10 μ M.

		Effet antioxydant (TBARS %)	Viabilité cellulaire (MTT %)	ClogP	R
Contrôle négatif, sans LDLs		0 \pm 5	100 \pm 5	7.31	
Contrôle positif, sans agents		100 \pm 5	15 \pm 5		
dimères dissymétriques hydrazones	15a	18 \pm 1	75 \pm 2	7.31	
	15b	20 \pm 2	60 \pm 5	4.78	
	15d	50 \pm 1	75 \pm 3	1.88	
	15e	30 \pm 1	70 \pm 2	5.32	
	15f	4 \pm 0.1	61 \pm 1	4.09	
	15g	67 \pm 4	31 \pm 1	2.45	
	15h	56 \pm 1	50 \pm 2	2.45	
	15i	80 \pm 5	50 \pm 3	2.72	
	15j	36 \pm 2	65 \pm 7	3.93	
	Probucol		10 \pm 1	92 \pm 11	
α -tocophérol		55 \pm 2	29 \pm 3		

Enfin, les molécules du dernier groupe (**15g-j**), possédant dans leur structure une fonction carbonyle hydrazone présentent dans leur ensemble des activités antioxydantes faibles. La viabilité cellulaire est également très moyenne (31 à 65%).

Le meilleur de cette série est le composé **15j** avec 36% d'oxydation et une viabilité cellulaire de 65%. Ces activités biologiques moyennes sont malgré tout supérieures à celle de l' α -tocophérol.

Parmi tous ces "phosphonates-hydrazones, le composé **15f** qui possède un motif hydralazine, affiche les meilleurs résultats. Le motif hydralazine apparait donc important pour l'activité recherchée.

4.3.4. Synthèse des Bis-phénol symétriques (hydrazones)^{12,15}

La synthèse des hydrazones **16a-j** est effectuée à partir de la bisvanilline **7** et l'hydrazine/hydrazide correspondants.

Dans cette série, j'ai repris la synthèse du dimère **16f** (BVH).

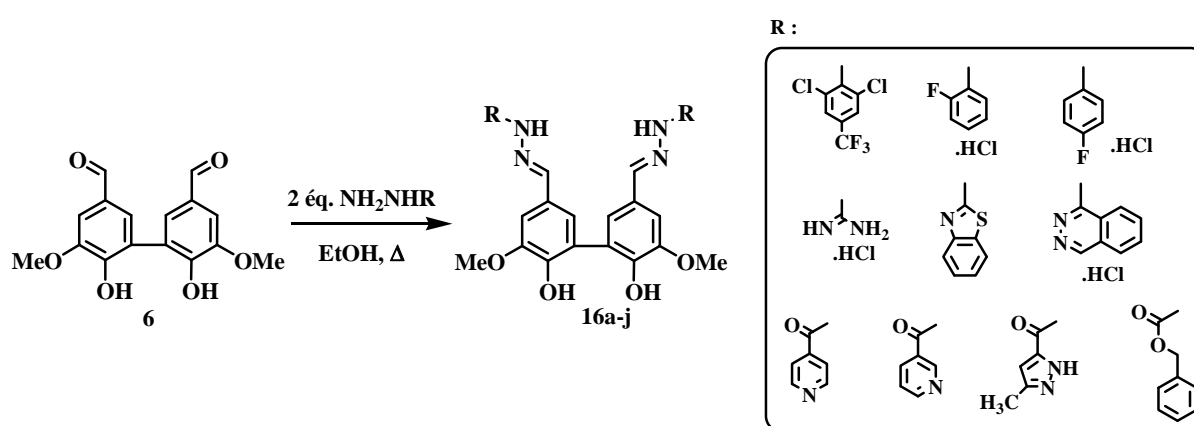


Schéma. 16. Synthèse des "bis-hydrazones".

Les "bis-hydrazones" sont obtenues avec des rendements variables selon l'hydrazine/hydrazide utilisée (Tableau 8).

Tableau. 8. Rendements des "bis-hydrazones".

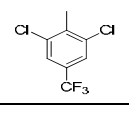
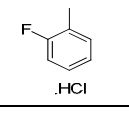
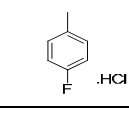
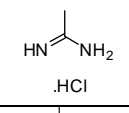
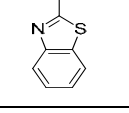
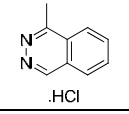
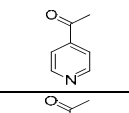
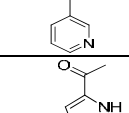
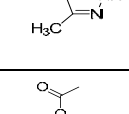
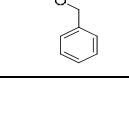
composés	16a	16b	16c	16d	16e	16f	16g	16h	16i	16j
NH ₂ NHR										
Rdt %	61	12	50	91	77	72	77	97	97	95

Les dimères symétriques d'hydrazones présentent des activités biologiques très différentes. Ces activités sont présentées dans le tableau 8.

Parmi les "bis-hydrazones" halogénées (**16a-c**), seul le dérivé **16c** portant un groupement *para*-fluorophényle présente une forte activité antioxydante (5% d'oxydation) et la viabilité cellulaire est excellente (93%), les deux autres ne présentant pas d'activité.

Chapitre II. Systèmes phénoliques antioxydants et antiathérogènes

Tableau. 9. Activités antioxydantes et cytotoxicité résiduelle des "bis-hydrazones" à 10 μ M.

		Effet antioxydant (%TBARS)	Viabilité cellulaire (% MTT)	ClogP	R
Contrôle négatif, sans LDLs		0 \pm 5	100 \pm 5		
Contrôle positif, sans agents		100 \pm 5	15 \pm 5		
dimères symétriques bis-hydrazones	16a	85 \pm 2	45 \pm 5	10.91	
	16b	90 \pm 3	25 \pm 3	5.85	
	16c	5 \pm 0.2	93 \pm 2	5.85	
	16d	55 \pm 2	50 \pm 4	0.05	
	16e	10 \pm 2	100 \pm 18	6.92	
	16f (BVH)	3 \pm 0.2	82 \pm 8	4.47	
	16g	117 \pm 20	17 \pm 1	1.18	
	16h	80 \pm 3	20 \pm 2	1.18	
	16i	60 \pm 1	25 \pm 2	1.73	
	16j	3 \pm 0.2	82 \pm 8	4.16	
	Probucol	10 \pm 1	92 \pm 11		
	α -tocophérol	55 \pm 2	29 \pm 3		

Dans le groupe de composés de structure "pseudohydrazone" (**16d-f**), définis comme tels car présentant un lien proche du lien hydrazone, les dérivés **16e** et **16f** présentent des propriétés intéressantes. En effet, **16e** et **16f** ont une activité antioxydante très puissante (10 et 3 % d'oxydation respectivement) et la viabilité cellulaire est à hauteur de celle du probucol de référence.

Enfin, le troisième groupe possédant une fonction carbonylhydrazone montre des résultats très médiocres excepté pour le composé **16j** porteur d'un groupement benzyloxycarbonyle. En effet, l'agent **16j** montre des effets antioxydants du même ordre de grandeur que les agents **16e** et **16f**, la viabilité cellulaire étant toujours très bonne.

Ainsi dans cette famille de dix "bis-hydrzones", nous relevons quatre composés possédant des effets antioxydants très marqués :

- **16c** portant un groupement *para*-fluorophényle
- **16e** comportant un groupement benzothiazole
- **16f** possédant un greffon hydralazine
- **16j** portant un groupement benzyloxycarbonyle

Conclusion

Les résultats précédents de l'équipe ont validé que des structures possédant à la fois un motif phénolique judicieusement fonctionnalisé sur le noyau aromatique et un motif hydrazone pouvaient présenter des activités intéressantes à la fois antioxydantes et cytoprotectrices.

Néanmoins au niveau biologique plusieurs informations manquaient encore ; ceci est aussi vrai en ce qui concerne les propriétés physico-chimiques de ces composés.

Enfin, sur un autre point concernant la structure intrinsèque des ces composés, nous nous sommes interrogés pour savoir si des composés possédant les mêmes motifs que précédemment pouvaient être conçus avec des activités comparables ou meilleures.

Aussi mes travaux de recherche que je présenterai par la suite sont axés autour de ces deux objectifs à savoir :

- i) Re-synthèse et évaluation biologique approfondie des molécules issues des travaux antérieurs.
- ii) Synthèse de nouveaux agents pour mieux comprendre quels sont les substituants du cycle aromatique nécessaires afin d'améliorer l'activité antioxydante, et aussi pour conférer à nos molécules d'autres activités antiathérogènes, telles que l'amélioration de l'activité *carbonyle scavenger*.

Chapitre III

Activités biologiques

Introduction

Les données de la littérature font état d'un consensus concernant l'implication des oxLDLs dans les étapes précoces de l'athérogenèse. Parmi les conséquences liées à l'oxydation des LDLs et la génération des ROS, la formation secondaire de produits d'oxydation lipidique stables dans les oxLDLs, contribue aux propriétés proinflammatoires de ces LDLs, et à leur rôle dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Les aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ou l'acroléine, sont des produits de peroxydation lipidique formés lors de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des LDLs. Ce sont des RCCs (reactive carbonyl compounds), qui ont la capacité de réagir sur les groupements amines libres en formant des bases de Schiff, ou sur des groupements thiols des protéines. L'accumulation de ces adduits génère le stress carbonyle, caractérisé par une perte de fonction et une accumulation des protéines modifiées. Une des conséquences de la formation d'adduits est la modification de l'apoB par le MDA. L'affinité des LDLs modifiées pour le récepteur des apoB/E diminue et les oxLDLs sont déviées vers la voie des récepteurs *scavengers* des macrophages, qui accumulent les esters de cholestérol dans le cytosol et se transforment en cellules spumeuses¹

Les antioxydants sont efficaces pour prévenir l'oxydation des LDLs et la formation des lésions précoces d'athérosclérose, de même que la génération des ROS et les événements inflammatoires impliqués dans l'évolution des lésions vers des stades plus avancés. Les antioxydants inhibent la formation des RCCs qui sont formés lors de l'attaque des LDLs par les ROS. Cependant ils n'ont pas la propriété de neutraliser les RCCs néoformés, ni la formation d'adduits sur les protéines.² A l'inverse les piègeurs de groupement carbonyle (*carbonyl scavengers*), peuvent neutraliser les RCCs, mais n'ont pas ou peu d'activité antioxydante. Certains agents tels que les dérivés d'hydrazine en particulier l'hydralazine, présentent une activité anti-athérogène résultant entre autre de leur effet '*carbonyl scavenger*' alors que leurs propriétés antioxydantes sont faibles.

¹ Brown M S, Goldstein J L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 52:223–261, 1983.

² Brigelius-Flohe R, Kluth D and Banning A. Is there a future for antioxidants in atherogenesis?. *Mol. Nutr. Food. Res* 49:1083-1089, 2005.

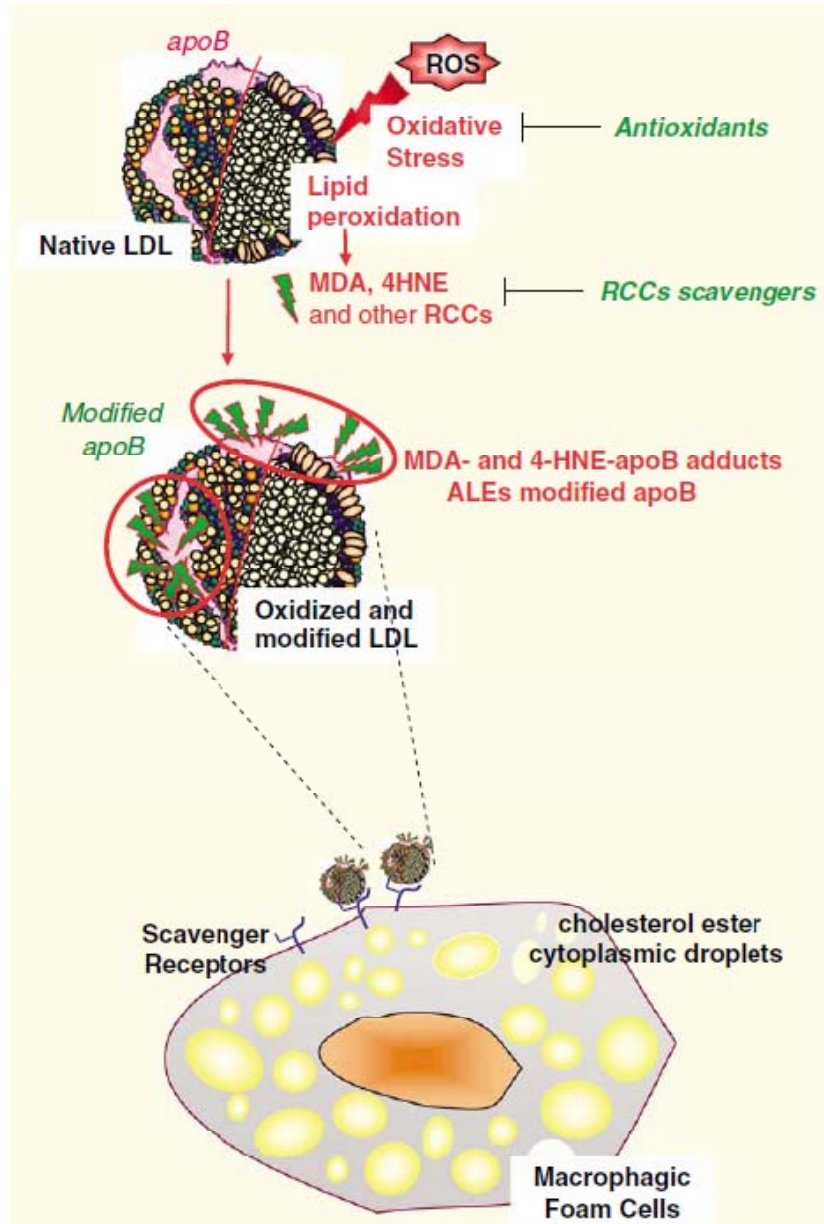


Figure. 20. Les Modifications oxydatives des LDLs et la formation de cellules spumeuses.³

Théoriquement les agents présentant des propriétés à la fois antioxydantes et carbonyl scavengers, devraient être plus efficaces pour limiter la progression des lésions d'athérosclérose, y compris l'oxydation des LDLs, le stress oxydant proinflammatoire et le stress carbonyle (Figure 20).

Au cours de mon travail de thèse, nous avons étudié les propriétés antioxydantes et carbonyl scavengers d'une famille de monomères ou de dimères synthétisés à partir de dérivés

³ Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, and Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 153:6–20, 2008.

hydraziniques. Nous avons par ailleurs approfondi et caractérisé les propriétés potentiellement antiathérogènes d'un dimère dérivé de l'hydralazine.

1. Monomères hydrazones syringique⁴

Les monomères synthétisés sont présentés dans la figure 21.

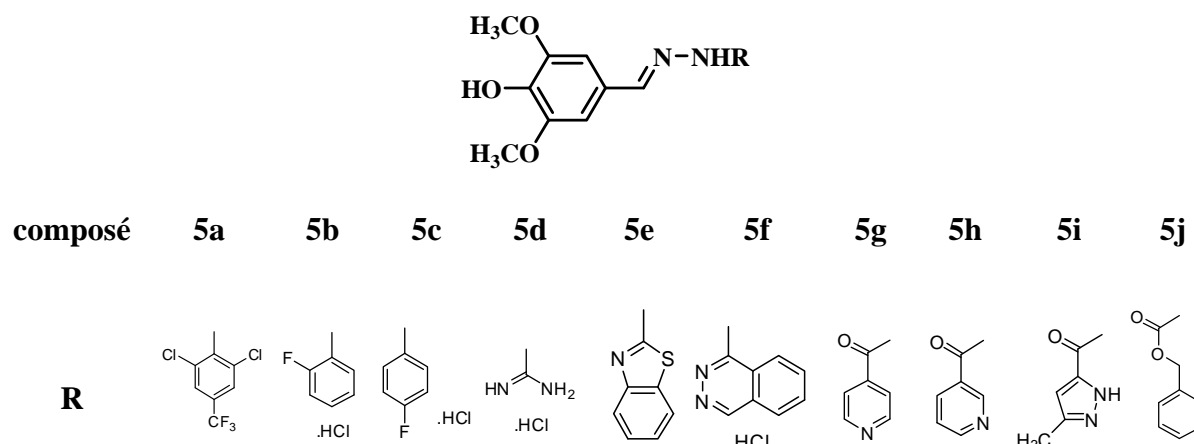


Figure. 21. Rappel des structures chimiques des monomères (Voir chapitre II).

1.1. Effet des hydrazones syringiques sur l'oxydation des LDLs

L'effet protecteur des hydrazones syringiques contre l'oxydation des LDLs est déterminé par le dosage des TBARS⁵. Deux approches sont utilisées :

- **Oxydation par les cellules vasculaires :** Les cellules vasculaires (ici des cellules endothéliales humaines de type HMEC-1) oxydent les LDLs natives en présence de sulfate de cuivre qui catalyse la réaction. Ce système permet d'imiter les événements physiopathologiques qui se produisent dans la paroi vasculaire.⁶

⁴ Belkheiri N, Bouguerne B, Bedos-Belval F, Duran H, Bernis C, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Baltas M. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45:3019-3026, 2010.

⁵ Yagi K. Lipides peroxydes and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 45:337-351, 1987.

⁶ Heinecke J W, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J. Lipid Res*. 34:2051-2061, 1993.

- Oxydation en système acellulaire :

i) Le cuivre (Cu^{2+} , $5\mu\text{M}$) stimule l'oxydation des LDLs à $37\text{ }^\circ\text{C}$, en induisant une réaction radicalaire en chaîne avec les lipoperoxydes préformés dans les LDLs, générant ainsi des radicaux peroxy, des hydroxydes, des hydroperoxydes et des aldéhydes.⁷

ii) L'oxydation des LDLs par irradiation UV à 254 nm , génère des hydroperoxydes, ainsi que des oxystérols et des aldéhydes.⁸

L'oxydation des LDLs (quelque soit le système cellulaire ou acellulaire), est mesurée par la détection des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui permet de quantifier la peroxydation des LDLs. L'effet protecteur des différents agents sur l'oxydation des LDLs a été étudié et comparé à celui du Trolox⁹ utilisé à une concentration fixe de $10\mu\text{M}$ (Tableau 10). Les résultats sont exprimés en pourcentage de TBARS formés dans le contrôle positif c'est-à-dire les LDLs oxydées par les cellules (aussi, par le cuivre ou les UV) en l'absence d'agents antioxydants, soit 100 % d'oxydation (voir *section expérimentale*).

Les données présentées dans le tableau 10, indiquent que tous les monomères, sauf les hydrazones **5h** et **5g** inhibent l'oxydation des LDLs induite par les cellules, les UV, et le cuivre de façon comparable à l'effet du Trolox. Les composés **5h** et **5g** sont inefficaces sur l'oxydation induite par le cuivre.

1.2. Effet sur la génération de l'anion superoxyde

L'oxydation des LDLs par les cellules vasculaires résulte de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), par les systèmes enzymatiques intracellulaires ou situés à la membrane plasmique.¹⁰ Les données de la littérature indiquent que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) joue un rôle majeur dans l'oxydation des LDLs par les cellules endothéliales.¹¹ Nous avons mesuré la génération de $\text{O}_2^{\cdot-}$ par les HMEC-1, en présence ou en absence des hydrazones monomériques, par une technique colorimétrique utilisant la réduction du cytochrome C, et

⁷ Ziouzenkova O, Sevanian A, Abuja P M, Ramos P, Esterbauer H. Copper Can Promote Oxidation of LDL by Markedly Different Mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 24:607-623, 1998.

⁸ Pinchuk I, Lichtenberg D. Continuous Monitoring of Intermediates and Final Products of Oxidation of Low Density Lipoprotein by Means of UV-Spectroscopy. *Free Radic. Res.* 24:351-360, 1996.

⁹ Albertini R, Abuja P M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic. Res.* 30:181-178, 1999.

¹⁰ Morel D W, DiCorleto P E, and Chisolm G M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis.* 4:357-364, 1984.

¹¹ Cathcart M K. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:23-28, 2004.

Chapitre III. Activités biologiques

l'inhibition de cette réduction par la superoxyde dismutase (SOD).¹² Ces hydrazones inhibent de 30 à 50% la génération de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par les HMEC-1. L'effet inhibiteur des syringique hydrazones semble inférieur à celui du Trolox sur la génération de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ (Tableau 10), ce qui suggère que d'autres ROS sont impliqués dans l'oxydation cellulaire des LDLs, bien que $O_2^{\bullet-}$ joue un rôle essentiel dans ce mécanisme.¹³

Tableau. 10. Détermination des propriétés antioxydantes et cytoprotectrices des monomères hydrazones.

Composés	Oxydation des	Oxydation	Oxydation des	MTT	$O_2^{\bullet-}$
	LDL	des LDL	LDL		
	<i>In vitro</i> : Cu	<i>In vitro</i> : UV	<i>HMEC-1</i>		
5a	3 ± 0.1	15 ± 3.5	4 ± 0.3	74 ± 4	42 ± 3
5b	4 ± 0.1	16 ± 3.5	13 ± 9	79 ± 1	33 ± 2
5c	6 ± 0.3	18 ± 2.5	5 ± 0.3	58 ± 6	57 ± 6
5d	6 ± 0.2	24 ± 1.5	10 ± 6	70 ± 1	36 ± 3
5e	2 ± 0.3	17 ± 0.3	3 ± 0.2	55 ± 1	56 ± 4
5f	5 ± 1.5	18 ± 2.5	4 ± 0.2	66 ± 5	30 ± 3
5g	85 ± 7	18 ± 1.5	7 ± 0.2	65 ± 7	22 ± 2
5h	77 ± 6	20 ± 1.5	5 ± 0.1	60 ± 10	44 ± 3
5i	4 ± 0.3	17 ± 1.5	3 ± 0.1	69 ± 0.2	50 ± 3
5j	6 ± 0.5	18 ± 3.5	3 ± 0.2	69 ± 9	50 ± 4
Trolox	6 ± 0.2	18 ± 4.5	3 ± 0.1	57 ± 0.1	5 ± 2

1.3. Effets cytoprotecteurs

Les oxLDLs sont hautement cytotoxiques pour les cellules vasculaires. L'effet toxique résulte en partie de la génération d'un stress oxydant induit par les oxLDLs, et de la présence dans ces oxLDLs, de produits d'oxydation lipidique toxiques. Nous avons étudié l'effet protecteur des antioxydants de synthèse, sur l'effet cytotoxique des oxLDL, mesuré par le test de réduction du MTT.¹⁴

¹² McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol. Chem.* 244:6049-6055, 1969.

¹³ Augusto C. Montezano and Rhian M. Touyz. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function – Role of NOS Uncoupling and Nox Family NADPH Oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x, 2011.

¹⁴ Mosmann . Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63, 1983.

Le tableau 10 montre que les LDLs oxydées par les cellules vasculaires sont fortement cytotoxiques vis-à-vis des HMEC-1. Les LDLs en contact avec les hydrazones et les HMEC-1 ne sont pas oxydées, et donc ne sont pas toxiques (ce qui démontre par ailleurs que la toxicité est bien liée à l'oxydation des LDLs). Les résultats des hydrazones sont comparables à ceux obtenus avec le Trolox.

Par ailleurs, l'effet cytoprotecteur des hydrazones a été testé sur la toxicité directe des LDLs oxydées par irradiation UV-C^{15,16}, en l'absence d'antioxydant. L'effet toxique de ces oxLDLs est étudié en présence de concentrations variables d'hydrazones (1, 10, et 100 μ M), et déterminé par test MTT. La figure 22 montre l'efficacité de ces molécules à différentes concentrations (1, 10, 100 μ M). La totalité des tests suivants est réalisée à une concentration de 10 μ M pour chaque molécule. Ces résultats montrent que les hydrazones présentent un effet cytoprotecteur qui s'ajoute à leurs propriétés antioxydantes.

Les résultats de viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes résiduelles par rapport au contrôle positif (cellules endothéliales seules, soit 100 % de viabilité), « voir section expérimentale ».

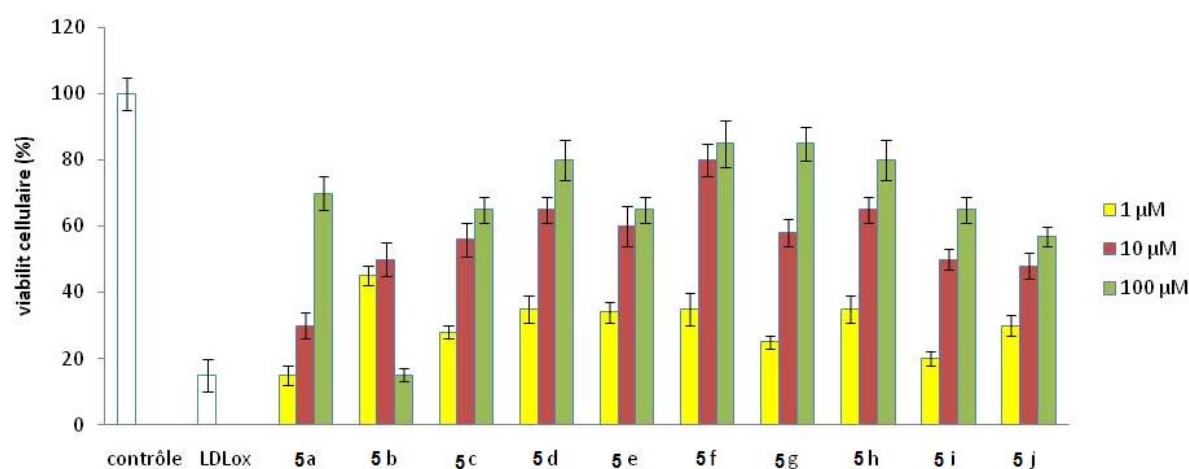


Figure. 22. Cytoprotection des "hydrazones syringiques" contre la toxicité des oxLDLs.

1.4. Etudes comparatives entre monomères et leurs constituants

Nous avons ensuite comparé les effets antioxydants et cytoprotecteurs de trois agents possédant des liens hydrazone différents sur une base constitutive (figure 23): le composé **5f**, syringaldéhyde avec l'hydralazine (lien hydrazone), le composé **5d**, syringaldéhyde avec une

¹⁵ Mabile L, Fitoussi G, Periquet B, Schmitt A, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. α -tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 19(2):177-187, 1995.

fraction d'aminoguanidine (NH libre), et le composé **5g** syringaldéhyde avec un l'isoniazide (lien hydrazide).

Le syringaldéhyde, l'aminoguanidine ou isoniazide (10 μ M) ne bloquent pas l'oxydation des LDLs induite par les HMEC-1, tandis que les syringiques isoniazide hydrazone **5g**, et aminoguanidine hydrazone **5d** ont été très efficaces (Figure 23A).

Il est à noter que l'hydralazine et son monomère lié inhibent de façon comparable l'oxydation des LDLs, en accord avec les résultats antérieurs montrant le fort pouvoir antioxydant et cytoprotecteur de l'hydralazine (Figure 23B).¹⁶

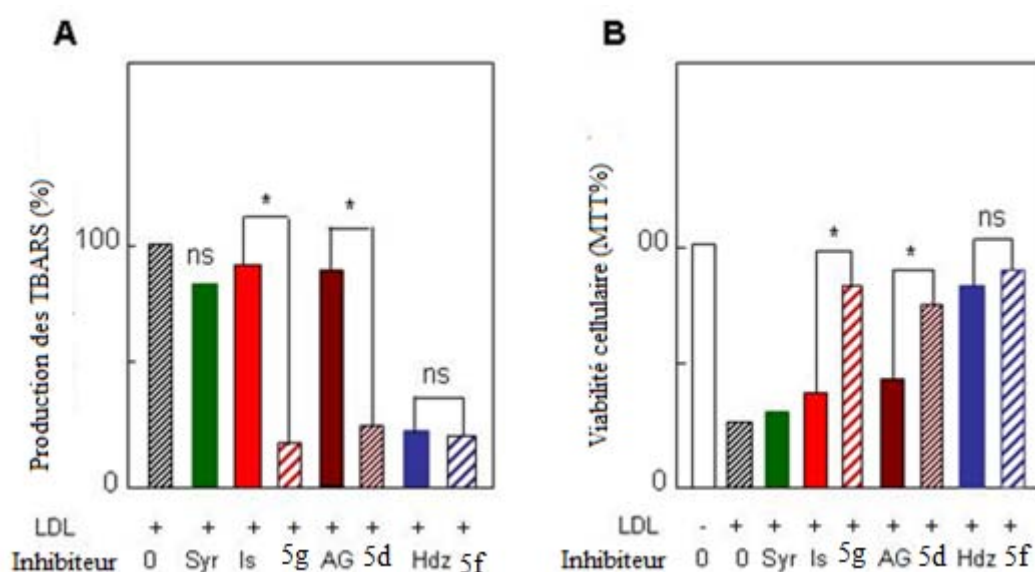


Figure. 23. Effet des monomères syringiques de l'hydralazine **5f**, l'aminoguanidine **5d**, et l'isoniazide **5g** sur l'oxydation des LDLs et la toxicité résiduelle. Comparaison avec leurs constituants (syringaldéhyde et hydrazine correspondante). Syr, syringaldéhyde; Is, isoniazide; AG, aminoguanidine; Hdz, hydralazine. *: différence significative, ns : différence non significative.

1.5. Effet piègeur de carbonyles

Le stress carbonyle est caractérisé par la formation et l'accumulation des adduits formés sur les protéines par des aldéhydes générés lors de l'oxydation des acides gras polyinsaturés.^{17,18}

La formation d'adduits sur les protéines conduit à un dysfonctionnement progressif des protéines aboutissant finalement à l'apoptose.⁶ Le 4-hydroxynonéal (4-HNE) est un aldéhyde

¹⁶ Galvani S, Coatrieux C, Elbaz M, Graziade MH, Thiers JC, Parini A, Uchida K, Kamar N, Rostaing L, Baltas M, Salvayre R and Nègre-Salvayre A. Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives. *Free. Radic. Biol. Med* 45:1457-67, 2008

¹⁷ Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free. Radic. Biol. Med.* 28:1685-1696, 2000.

¹⁸ Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 928:22-38, 2001.

majeur généré pendant le processus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans les LDLs. 4-HNE est impliqué dans le stress carbonyle car il forme des adduits sur les protéines, ce qui entraîne progressivement leur perte de fonction et contribue à l'apoptose. L'effet protecteur des hydrazones syringiques contre le stress carbonyle, a été évalué sur leur capacité à bloquer la cytotoxicité induite par 4-HNE (25 μ M) dans les HMEC-1.

La figure 24 montre que les trois agents testés (**5f**, **5d**, et **5g**) ont complètement inhibé la mort des cellules induite par le 4-HNE. Ces agents sont plus efficaces que leurs dérivés d'hydrazine (motif hydrazine avant le couplage avec le syringaldéhyde) utilisés seuls. Le syringaldéhyde est inefficace contre la toxicité induite par le 4-HNE.

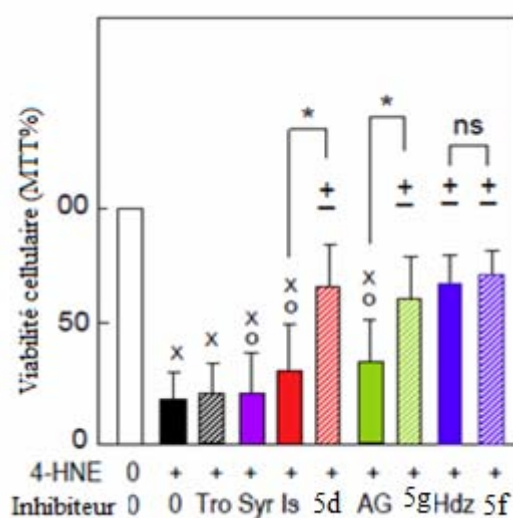


Figure. 24. Effet cytoprotecteur des hydrazones syringiques contre la toxicité de 4-HNE. Comparaison avec leurs constituants (syringaldéhyde et hydrazine correspondante). Syr, syringaldéhyde; Is, isoniazide; AG, aminoguanidine; Hdz, hydralazine; Tro, Trolox. * : différence significative, ns : différence non significative.

1.6. Conclusion

Dans ce travail, nous avons évalué les propriétés antioxydantes et piégeuses de carbonyle d'une nouvelle classe d'antioxydants synthétiques, les hydrazones syringiques. Ces propriétés sont testées sur l'oxydation des LDLs induite par les HMEC-1.

Nos résultats montrent que les trois agents bloquent l'oxydation des LDLs évaluée par le dosage des TBARS, avec une efficacité équivalente ou supérieure à celle du Trolox.

Ces agents protègent contre l'effet toxique des oxLDLs (effet antioxydant) et du 4-HNE, (effet piègeur de carbonyle). En effet, la toxicité du 4-HNE n'est pas due au stress oxydant, mais à sa réactivité sur les protéines cellulaires, qui génère de la toxicité.

Il est à noter que le Trolox, quoique fortement antioxydant, est incapable de piéger et de neutraliser les composés carbonylés et les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique une fois formés, contrairement aux hydrazones syringiques qui partagent à la fois des propriétés antioxydantes et piègeuses de carbonyles. Ces molécules pourraient constituer une nouvelle classe d'agents antioxydants et piègeurs de carbonyles, avec des applications potentielles dans les pathologies associées au stress oxydant, et en particulier l'athérosclérose.

2. Monomères hydrazones catécholiques

Nous avons déjà détaillé l'expérience MTT/TBARS sur des cellules HMEC-1 pour les monomères syringiques. Nous allons donc évaluer l'activité de nos nouveaux monomères catécholiques (figure 25) comme antioxydants et cytoprotecteurs (Tableau 11). Par défaut de temps, nous avons testé ces molécules directement à 10 μ M sans les avoir passé par des évaluations dose-activité. Ce tableau présente aussi le MTT directe qui illustre les toxicités intrinsèques des ces molécules.

L'ensemble des ces molécules sont de très bons antioxydants, ainsi que cytoprotecteurs contre la toxicité des LDLs une fois oxydées.

L'intérêt maintenant est de passer à des concentrations moins élevées pour optimiser la dose minimale antioxydante. Il sera nécessaire à l'avenir de tester les propriétés antiathérogène de ces molécules pour affiner ces résultats.

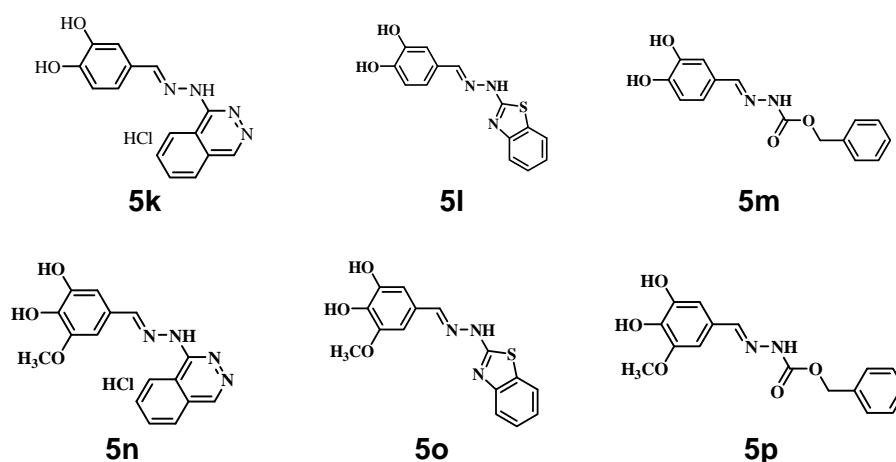


Figure. 25. série des catéchols

Tableau. 11. MTT/TBARS et MTT direct

composés	MTT	TBARS	Autotoxicité
5k	78 ± 2,3	3 ± 0,9	95 ± 2,3
5l	77 ± 4,4	3 ± 1,2	83 ± 1,7
5m	70 ± 5,7	3 ± 1,5	77 ± 3,8
5n	76 ± 2,1	3 ± 1,9	96 ± 9,8
5o	62 ± 1,9	3 ± 1,5	66 ± 2,7
5p	78 ± 4,8	3 ± 1,6	94 ± 15,3

3. BisVanillylHydralazone ou (BVH)

Le BVH résulte de la combinaison entre deux hydralazines et une bisvanilline (Figure 6). L'hydralazine est un agent antihypertenseur qui a également des propriétés 'piégeuses de carbonyle' et un faible pouvoir antioxydant.¹⁶ Son administration à la souris apoE^{-/-} (10mg/kg/jour dans l'eau de boisson pendant 16 semaines), résulte en une diminution notable de la taille des lésions (-45% par rapport aux souris non-traitées).¹⁶ L'hydralazine présente des propriétés antioxydantes modérées, et des concentrations élevées (50-100 μ M) sont nécessaires pour inhiber l'oxydation des LDLs.¹⁶

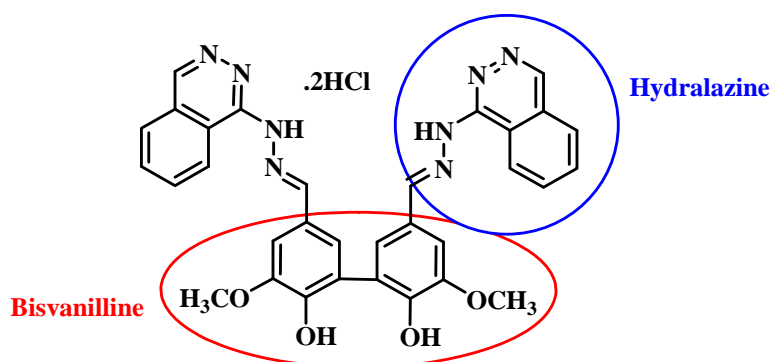


Figure. 26. BisvanillylHydralazone (BVH, 16f)

Le bisvanillyl-hydralazone (BVH) est un dimère hydrazone dont nous avons caractérisé les propriétés antioxydantes, piégeuses de carbonyle, et anti-athérogènes, et plus précisément la capacité de la BVH à :

- i / bloquer le stress oxydant, l'oxydation des LDLs, le stress carbonyle et la formation des cellules spumeuses.
- ii / inhiber la signalisation inflammatoire des oxLDLs.
- iii / neutraliser l'effet apoptotique des oxLDLs sur des cellules vasculaires en culture.
- iv / ralentir ou inhiber la formation de lésions athéroscléreuse dans les souris apoE^{-/-}.

L'effet antioxydant de BVH a été comparé à celui des antioxydants de référence, tels que le trolox et le probucol.¹⁹ De plus, l'effet du BVH est comparé à celui de ses deux constituants : l'hydralazine et la bisvanilline.

¹⁹ Delomenede M, Bedos-Belval F, Duran H, Vindis C, Baltas M, and Negre-Salvayre. Development of Novel Antiatherogenic Biaryls: Design, Synthesis, and Reactivity. *J. Med. Chem.* 51:3171–3181, 2008.

3.1. Effet de BVH sur l'oxydation des LDLs

Les propriétés antioxydantes de BVH ont été évaluées sur sa capacité à bloquer l'oxydation des LDLs induite *in vitro* par deux systèmes d'oxydation, métal-dépendant (cuivre), et métal-indépendant (AAPH). Pour mimer les conditions physiologiques, les propriétés antioxydantes du BVH sont évaluées sur l'oxydation des LDLs induite par les cellules HMEC-1 (Figure 27).

3.1.1. Effet de BVH sur l'oxydation des LDLs par le cuivre et AAPH

De faibles concentrations de BVH (1 à 5 μM) bloquent l'oxydation des LDLs induite par le cuivre contrairement à l'hydralazine et la bisvanilline, qui n'ont aucun effet (ou très peu) à ces concentrations (Figure 27A).

BVH inhibe efficacement l'oxydation des LDLs induite par AAPH (100 et 300 μM), indiquant qu'il présente également des propriétés piègeur de radicaux libres dans des systèmes d'oxydation métal-indépendants (Figure 27B).

3.1.2. Effet de BVH sur l'oxydation induite par les HMEC-1

BVH inhibe l'oxydation des LDLs induite par les HMEC-1, ainsi que leur cytotoxicité résultante (l'oxydation des LDLs les rend toxiques pour les cellules), alors que l'hydralazine et bisvanilline n'ont aucun effet (Figure 28A et B).

Afin de vérifier si l'effet de BVH est dû à sa structure, ou résulte des effets additifs des molécules (hydralazine et bisvanilline) qui le composent, nous avons étudié l'effet antioxydant et cytoprotecteur d'un mélange de bisvanilline et d'hydralazine équivalent en mol à BVH. La figure 29 montre l'action de la Bisvanilline seule (BV1 [5 μM], ou BV2 [10 μM]), l'hydralazine seule (Hdz1 [2.5 μM], ou Hdz2 [5 μM]), et les co-incubations (BV1/Hdz1, ou BV2/Hdz2). Comme le montrent les résultats, les constituants de BVH utilisés seuls (BV et Hdz), ou en co-incubation, n'ont pas d'effet antioxydant et/ou cytoprotecteur, contrairement à BVH. La différence d'efficacité de BVH pourrait résulter d'une part, d'un changement conformationnel de structure de la molécule, lui permettant une meilleure chélation des métaux et d'autre part, d'une augmentation de la résonance par le lien hydrazone ce qui implique la stabilité du radical formé.

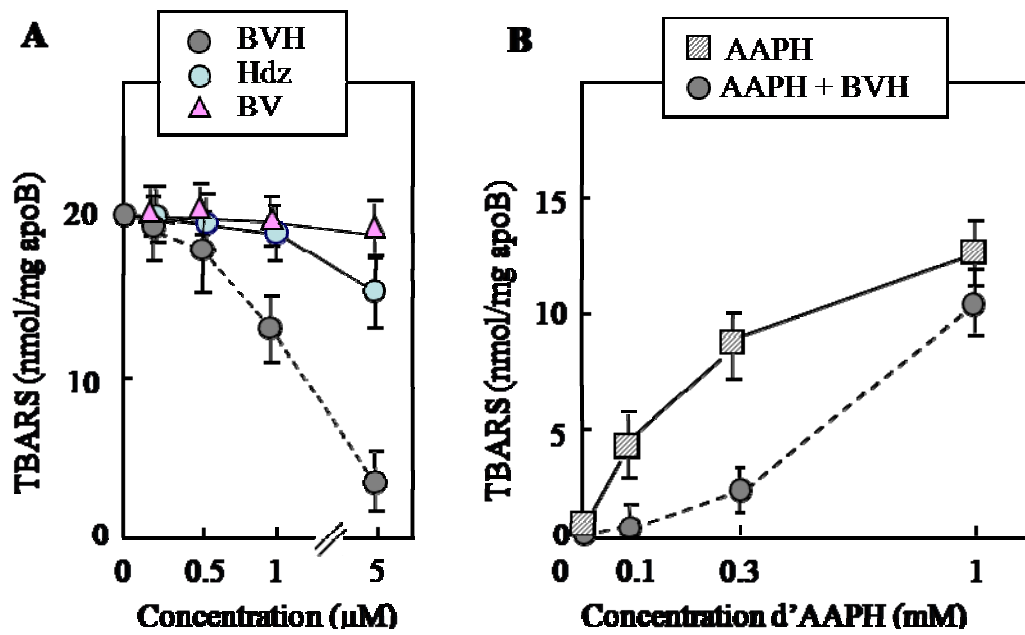


Figure. 27. A. Relation dose-effet de BVH, hydralazine (Hdz), et bisvanilline (BV) sur l'oxydation des LDLs (1 mg d'apoB/ml dans le PBS) induite par CuSO_4 (5 μM , 2 h d'incubation à 37 °C). B. Effet du BVH (5 μM) sur l'oxydation des LDLs (1 mg/ml) incubés pendant 2 h à 37 °C avec des concentrations variables d'AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino propane) hydrochloride) (de 0,1-1mM).²⁰ Dans les deux cas, l'oxydation est évaluée par le dosage de TBARS.

²⁰ Seccia M, Albano E, Bellomo G. Suitability of chemical in vitro models to investigate LDL oxidation: study with different initiating conditions in native and alpha-tocopherol-supplemented LDL. *Clin Chem.* 43:1436-41, 1997.

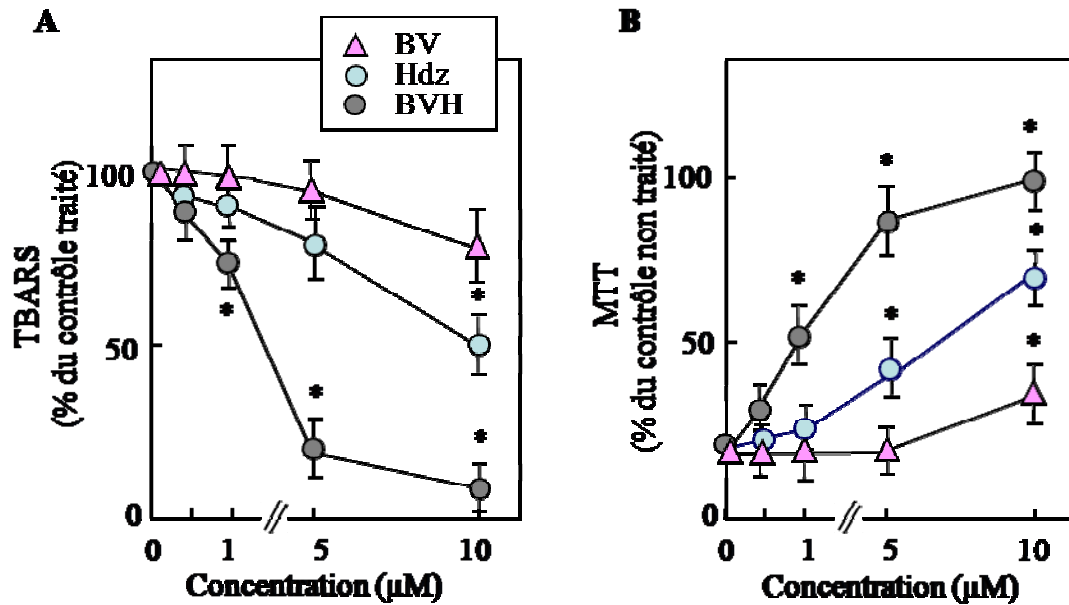


Figure. 28. A. L'oxydation des LDLs induite par les cellules été évaluée sur des HMEC-1 ensemencées dans plaques multipuits. Le milieu de culture standard a été enlevé et remplacé par le RPMI-1640 sans sérum de veau foetal ajouté. Ce milieu (RPMI) contient des LDLs natives (100 µg apoB/mL), le cuivre (CuSO₄, 1µM), et les agents protecteurs (BVH, hydralazine, et bisvanilline) aux concentrations indiquées. Après 14 h d'incubation à 37 °C, les TBARS sont déterminés.⁵ Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle incubé avec les LDLs en l'absence des agents protecteurs. B. La viabilité des HMEC-1 est mesurée après 14h d'incubation en présence des LDLs natives et du cuivre comme indiqué en (A), par le test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non traité. * valeur de l'activité antioxydante ou cytoprotectrice significative.

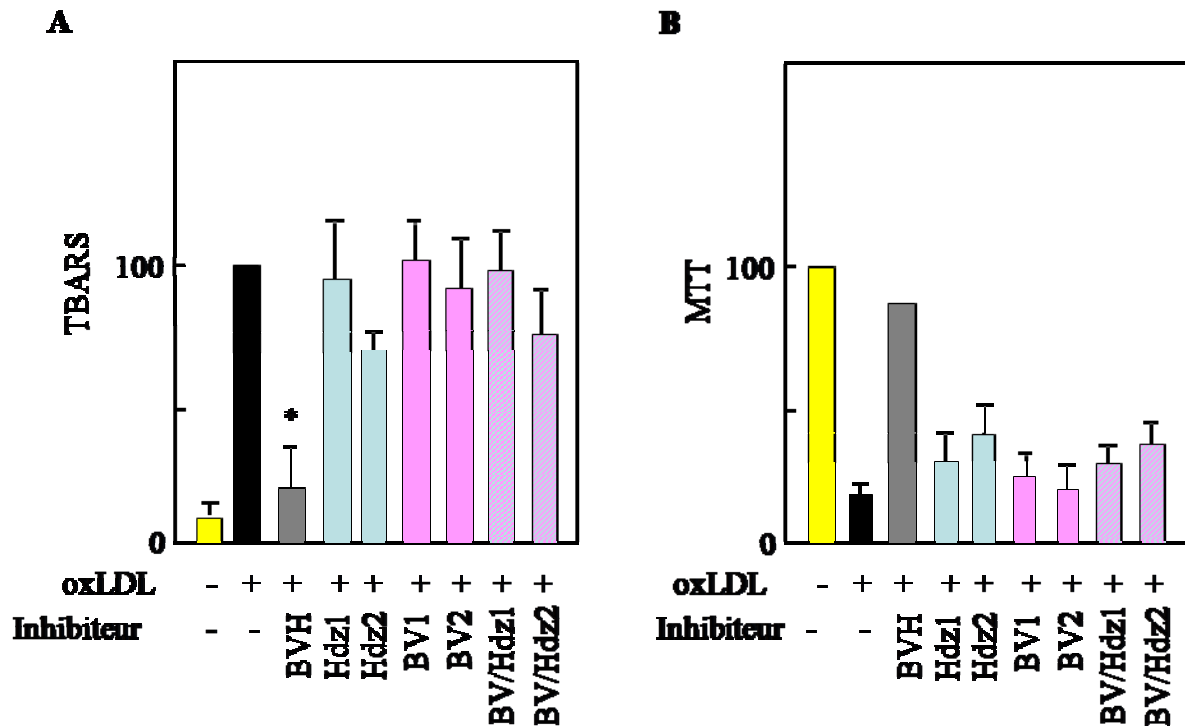


Figure. 29.

3.2. Effet de BVH sur la génération des ROS

3.2.1. ROS extracellulaires

L'oxydation des LDLs dépend de la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le milieu extracellulaire, en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), dont la génération à la membrane plasmique par la NAD(P)H oxydase (Nox), joue un rôle majeur dans ce mécanisme.¹¹ Sous l'effet des superoxyde dismutases (SODs), $O_2^{\bullet-}$ peut être dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui participe également à l'oxydation des LDLs, et peut par ailleurs être sécrété dans le milieu extracellulaire, à partir d'autres sources cellulaires (mitochondries, peroxysomes...).²¹ Nous avons évalué l'effet de BVH sur la génération d' $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 dans les HMEC-1.

La génération de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est déterminée par la réduction du cytochrome C mesurée en présence et en absence de SOD¹². Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est mesuré par

²¹ Carter W O, Narayanan P K, and Robinson J P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 55(2):253-258, 1994.

l'évaluation de l'extinction de fluorescence de la scopoletine par HRP (horseradish peroxidase).²²

BVH (1 et 5 μM) réduit la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 (Figure 30), ce qui est en accord avec son effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et la toxicité des LDLs (Figure 27). L'hydralazine est moins efficace que BVH, et la bisvanilline n'a aucun effet protecteur.

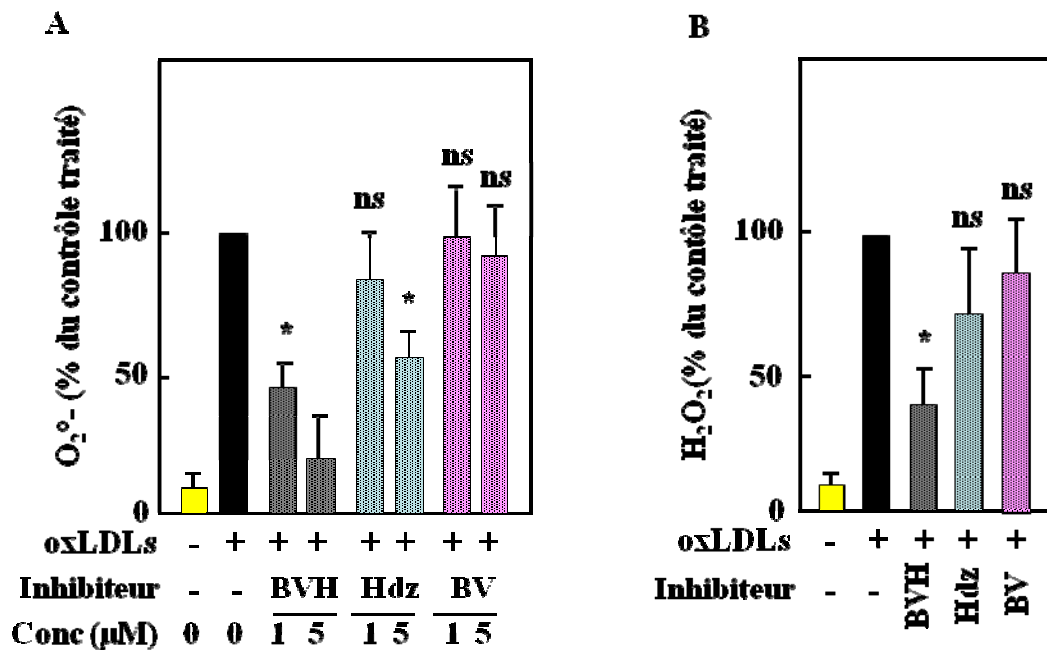


Figure 30. **A.** Détermination de la génération de $\text{O}_2^{\cdot-}$ par HMEC-1 incubées pendant 1 h avec les oxLDLs (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm les agents testés aux concentrations indiquées (1 et 5 μM). La génération de $\text{O}_2^{\cdot-}$ est mesurée par la réduction du cytochrome-C avec et sans SOD. **B.** Détermination de la génération de H_2O_2 dans le milieu extracellulaire par les cellules HMEC-1 incubées pendant 30 min avec des oxLDLs (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm les agents indiqués (5 μM). H_2O_2 a été évaluée par l'extinction de fluorescence de la scopolétine HRP-dépendante (ex / em 358/448 nm). Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin traité avec oxLDLs. * : diminution de ROS significative, ns : diminution de ROS non significative.

La génération de $\text{O}_2^{\cdot-}$ à la membrane plasmique dépend de l'activation de NOX ou NAD(P)H oxydase, qui est un complexe protéique associant des protéines membranaires (gp91^{phox} et p22^{phox}, nécessaires pour la prolifération et la migration cellulaires.²³) et cytosolubles (p67^{phox}, p47^{phox}, Rac, p40^{phox}). La NAD(P)H oxydase est rapidement activée en réponse à divers stimuli exogènes (bactéries, virus, agents chimiques), mais également endogènes (stress oxydant, cytokines, hyperlipémie). L'activation de la NAD(P)H oxydase dépend de plusieurs

²² Loschen G, Azzi A and Flobe A. Mitochondrial H_2O_2 formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett.* 33:84–87, 1973.

²³ Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86:494–501, 2000.

voies de signalisation, qui favorisent la translocation des sous-unités cytosoliques à la membrane et la formation du complexe actif.²⁴ Le rôle de la NAD(P)H oxydase dans la génération de $O_2^{\cdot-}$ impliqué dans l'oxydation des LDLs a été rapporté,²⁵ de même que l'effet inhibiteur d'antioxydants ou de modulateurs de signalisation, connus pour bloquer la production de $O_2^{\cdot-}$ et l'expression des sous-unités de NAD(P)H oxydase. En effet, l'expression de gp91^{phox} est augmentée et régulée par le stress oxydant,²⁶ et est bloquée par les antioxydants comme le resveratrol.²⁷ Comme montré dans la figure 30, BVH bloque la production de $O_2^{\cdot-}$ par les HMEC-1, ce qui pourrait résulter d'un effet direct (en relation avec la chélation du cuivre), et/ou indirect, *via* une inhibition des voies de signalisation conduisant à une augmentation de l'expression des sous-unités membranaires ou cytosoliques. Nous avons dans un premier temps, étudié l'expression de la sous-unité gp91^{phox} de NAD(P)H oxydase sous l'effet des oxLDLs avec ou sans BVH. (Figure 31).

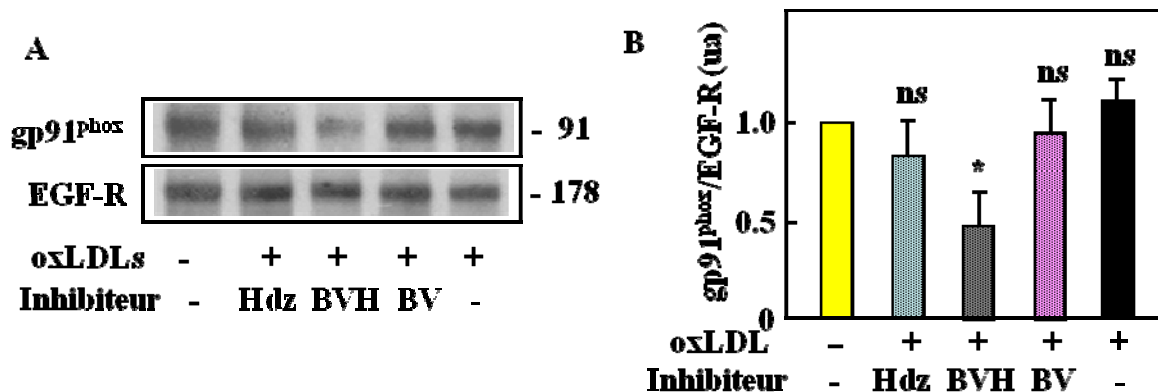


Figure. 31. A. Expression de la sous-unité gp91^{phox} de NAD(P)H oxydase évaluée par western-blot. Des cellules HMEC-1 sont incubées pendant 5h avec des oxLDLs (100 µg/ml) en présence ou absence des agents protecteurs (BVH, Hdz, et BV). Les blots sont révélés par un anticorps anti gp91^{phox} et un anti-récepteur d'EGF (EGF-R) (Santa-Cruz) comme contrôle. B. analyse densitométrique des westerns blot par le logiciel « Image J ». Le ratio Gp91^{phox}/EGF-R a été calculé et exprimé en unités arbitraire (UA). * : diminution de l'expression de gp91^{phox} est significative, ns : diminution de l'expression de gp91^{phox} non significative.

²⁴ Rueckschloss U, Duerrschmidt N, Morawietz H. NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 5:171-80, 2003.

²⁵ Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 87:26-32, 2000.

²⁶ Rueckschloss U, Duerrschmidt N, Morawietz H. NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 5:171-80, 2003.

²⁷ Chow SE, Hshu YC, Wang JS, Chen JK. Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol*. 102:1520-7, 2007.

La figure 31 montre que BVH diminue en partie l'expression de gp91^{phox}, alors que l'hydralazine et la bisvanilline n'ont pas d'effet. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que le BVH inhibe la génération des ROS extracellulaire à la fois directement via ses propriétés de piègeur de radicaux, et indirectement via l'inhibition de l'expression de la gp91^{phox}. La diminution d'expression de gp91^{phox} par BVH pourrait résulter d'une inhibition de la génération de ROS intracellulaires et l'activation de facteurs de transcription redox-sensibles tels que NF-κB, connu pour induire l'expression de gp91^{phox}.²⁸ Nous avons par la suite, étudié l'effet de BVH sur les ROS intracellulaires, et l'activation de NF-κB.

3.2.2. ROS intracellulaires

L'augmentation intracellulaire de ROS générés par les oxLDLs est impliquée dans la réponse inflammatoire et la cytotoxicité induites par ces molécules, et pourrait contribuer au dysfonctionnement vasculaire.^{29,30,31}

La génération des ROS intracellulaires est déterminée après marquage des cellules avec des sondes perméantes ROS-sensibles, telles que la sonde H2DCFDA-AM, qui réagit avec les hydroperoxydes, ou la DHE (dihydroethidine) qui réagit plus spécifiquement avec O₂^{•-}.³² L'oxydation de ces sondes par les hydroperoxydes ou par O₂^{•-} les rend fluorescentes, alors qu'elles ne le sont pas à l'état basal. L'augmentation de la fluorescence des cellules est proportionnelle à la quantité de ROS générés.³³ Nous avons étudié l'effet de BVH sur la formation des ROS intracellulaires générés par le contact avec les oxLDLs.

Les oxLDLs (200 µg/mL) induisent rapidement une augmentation des hydroperoxydes et d'O₂^{•-}, (mesurée ici après 3h), et qui est complètement inhibée par BVH (1-5 µM) (Figure 32), alors que peu ou pas d'effets sont observés à des concentrations similaires avec l'hydralazine et la BV.

²⁸ Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91^{phox}. *J Biol Chem*. 281:5657-67, 2006.

²⁹ Andalibi A, Liao F, Imes S, Fogelman AM, Lusis AJ. Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NF-kappa B. *Biochem Soc Trans*. 21:(3):651-5, 1993.

³⁰ Robbesyn F, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. *Free Radic Res*. 38:541-51, 2004.

³¹ Rollas S and Küçükgülzel SG. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules* 12:1910-39, 2007.

³² Georgiou CD, Papapostolo I, Patsoukis N, Tseggenidis T and Sideris T. An ultrasensitive fluorescent assay for the in vivo quantification of superoxide radical in organisms. *Analytical Biochemistry* 347: 144-151, 2005.

³³ Duval C, Cantero AV, Auge N, Mabile L, Thiers JC, Negre-Salvayre A and Salvayre R. Proliferation and wound healing of vascular cells trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. *Free. Radic. Biol. Med* 35:1589-98, 2003.

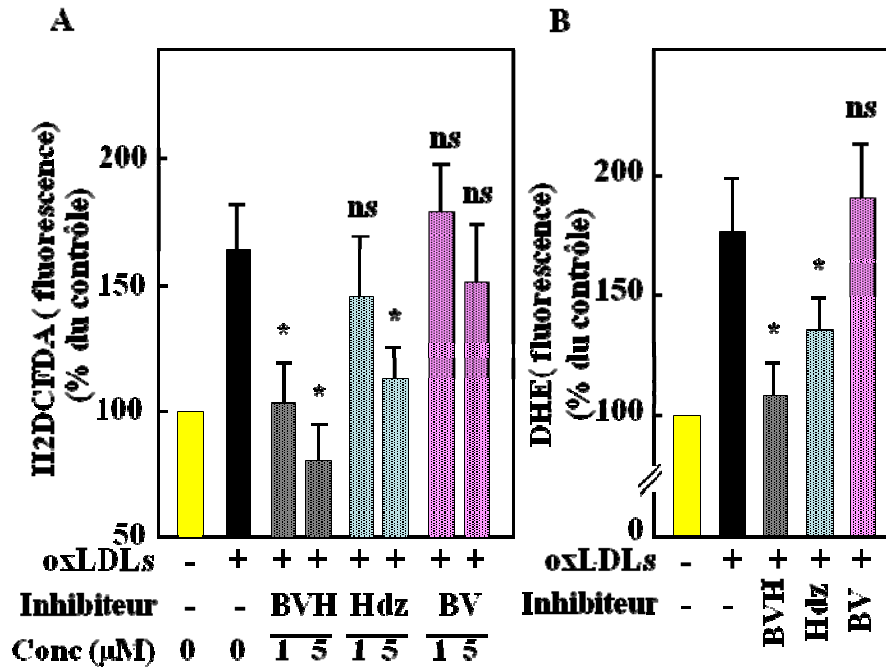


Figure. 32. A. Les cellules HMEC-1 sont incubées pendant 3h avec les oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en présence ou absence des agents protecteurs (BVH, Hdz, et BV), à 1 et 5 μM . 30 min avant la fin de l'expérience, les cellules sont incubées avec la sonde fluorescente sensible aux ROS (H2-DCFDA), qui détecte la formation des hydroperoxydes et de H_2O_2 . B. Mêmes conditions que A, mais les agents sont testés à une seule concentration (5 μM) et la sonde fluorescente sensible aux ROS est la DHE qui détecte $\text{O}_2^{\cdot-}$. A la fin de l'incubation, la fluorescence des cellules est mesurée comme indiqué dans la partie expérimentale. * : résultat significatif, ns : résultat non significatif.

3.3. Effet de BVH sur la signalisation pro-inflammatoire induite par les oxLDLs

Le stress oxydant et les oxLDLs déclenchent une signalisation pro-inflammatoire, via en partie l'activation du facteur de transcription redox-sensible NF- κB ³¹. A l'état basal, NF- κB est présent dans le cytosol sous forme d'un complexe avec son inhibiteur naturel I $\kappa\text{B}\alpha$. Sous l'effet de divers inducteurs générant des ROS, I $\kappa\text{B}\alpha$ est phosphorylé ce qui permet sa dégradation par le protéasome³¹. NF- κB libéré est phosphorylé et transloque dans le noyau où il induit l'expression de gènes proinflammatoires.³¹

Nous avons mesuré l'effet de BVH sur l'activation enzymatique du protéasome qui intervient dans la dégradation de I $\kappa\text{B}\alpha$, et sur la phosphorylation de NF- κB . Les résultats présentés dans la figure 14, montrent que les oxLDLs stimulent l'activation du protéasome qui est mesurée *in vitro* par l'hydrolyse du sLLVY-MCA (un substrat peptidique synthétique fluorogénique spécifique du protéasome 20S), (Figure 33A). De même les oxLDLs induisent la

phosphorylation de NF- κ B (Figure 33B).³⁴ Ces réponses sont complètement inhibées par BVH tandis que l'hydralazine et la bisvanilline n'ont pas d'effet.

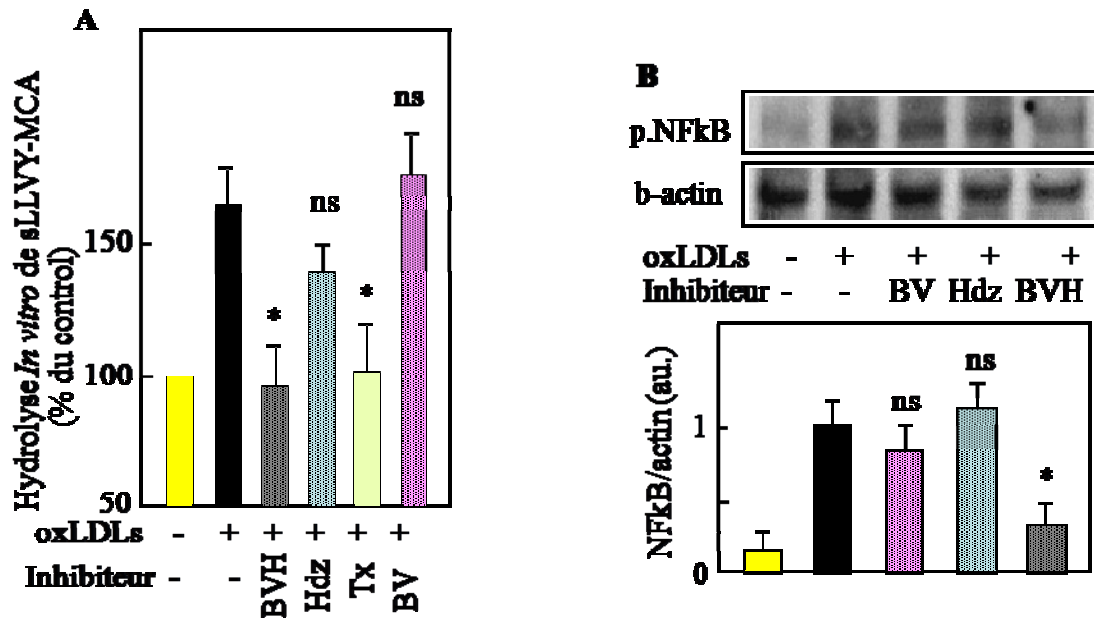


Figure 33. **A.** L'activation du protéasome 20S est déterminée en mesurant l'hydrolyse du substrat sLLVY-MCA, dans des lysats de cellules incubées pendant 2h avec 200 μ g/ml de oxLDLs (comme décrit dans la section expérimentale), avec ou sans les agents protecteurs (BVH, Hdz, BV) à 5 μ M ou le trolox (Tx) utilisé comme contrôle à 10 μ M. **B.** Western blot montrant la phosphorylation de NF- κ B après une stimulation de 2h des HMEC-1 par des oxLDLs (200 μ g/ml) en présence et en absence des agents (BVH, Hdz, BV) à 5 μ M. L'analyse densitométrique des westerns blots par le logiciel « Image J » permet de déterminer le ratio Phospho-NF κ B/ β actin qui est exprimé en unités arbitraire (UA). * : résultat significatif, ns : non significatif.

La signalisation pro-inflammatoire résultant de l'activation de NF- κ B, est impliquée dans l'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1, L- et P- sélectines, qui favorisent l'adhésion des cellules mononucléées sur l'endothélium activé.^{35,36,37} Nous avons

³⁴ Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *Faseb. J.* 14:532-542, 2000.

³⁵ Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Contessi GB, Pastorino AM, Lo Cascio V. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 22(1-2):117-27, 1997.

³⁶ Srinivasan S, Hatley ME, Reilly KB, Danziger EC, Hedrick CC. Modulation of PPARalpha expression and inflammatory interleukin-6 production by chronic glucose increases monocyte/endothelial adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:851-7, 2004.

³⁷ Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 86:515-581, 2006.

étudié l'effet de BVH sur la signalisation pro-inflammatoire induite par les oxLDLs, particulièrement sa capacité à inhiber le recrutement des monocytes sur l'endothélium stimulé par des oxLDLs. Une augmentation significative de l'adhésion des monocytes sur l'endothélium est observée après incubation des cellules HMEC-1 avec les oxLDLs (Figure 34A). Cet effet est inhibé par BVH, mais pas par l'hydralazine, ni la bisvanilline.

Lors du processus inflammatoire, les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes sécrètent une chemokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), qui induit un effet chemoattractant sur les monocytes³⁸. Cet effet est inhibé par BVH, mais pas ou seulement partiellement par la bisvanilline ou l'hydralazine (Figure 34B).

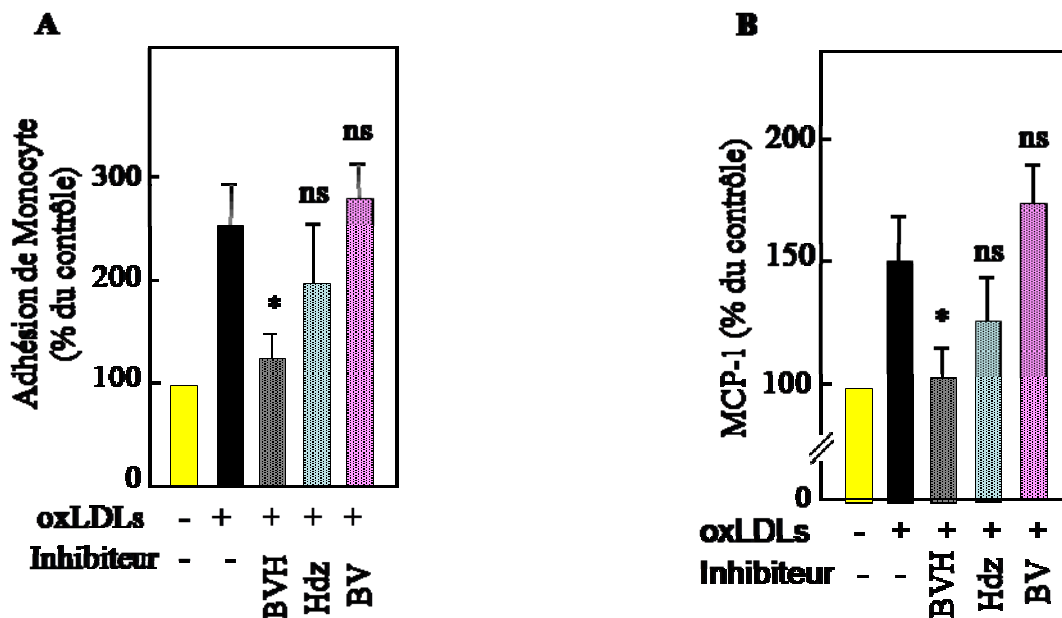


Figure. 34. A. Les HMEC-1 sont stimulées par les oxLDLs pendant 1-4h. Le test d'adhésion est réalisé avec des macrophages (Raw-267.4) précédemment marqués par une sonde fluorescente, la calcéïne (5 μ M) pendant 10 min puis lavées 3 fois avec du PBS tiède. Les macrophages fluorescents sont co-incubés avec les HMEC-1 (50 000 cellules /puits), pendant 30 min, puis les cellules sont soigneusement lavées avec du PBS tiède, lysées dans l'eau et la fluorescence du mélange est immédiatement mesurée (ex/em 490/525). Les résultats sont exprimés en % du contrôle non stimulé. B. Les HMEC-1 sont incubées avec les oxLDLs (200 μ g/mL) pendant 1 à 5 h et le MCP-1 sécrété dans le milieu de culture est mesuré par test ELISA (www.thermo.com/pierce). Les données sont exprimées en % du contrôle non stimulé. * : résultats significatifs, ns : non significatif.

Ces résultats indiquent que BVH bloque la génération des ROS extra-et intracellulaires induits par les oxLDLs, ainsi que leur signalisation inflammatoire en particulier la

³⁸ Sakamoto T, Ishibashi T, and Maruyama Y, Role of Ca²⁺ Influx in Tissue Factor Expression in Monocyte Adhesion to Endothelial Cells. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 14(3):109-115, 2007.

phosphorylation de NF- κ B, la réduction de l'expression de gp91^{phox}, la réduction de la sécrétion des molécules d'adhésion et les facteurs chimiotactiques.

3.4. Effet de BVH sur la formation des cellules spumeuses et le stress carbonyle

La formation des cellules spumeuses résulte de la captation des oxLDLs par les macrophages, via les récepteurs scavengers (Figure 20).^{3,39} La formation des cellules spumeuses a été évaluée sur des macrophages murins (RAW 264.7) incubés pendant 14 h avec 100 μ g/mL d'oxLDLs en présence ou en absence des différents agents (5 μ M).

La formation des cellules spumeuses est fortement inhibée par BVH, alors qu'aucun effet n'est observé en présence de bisvanilline et un effet partiel avec l'hydralazine (Figure 36). Il est à noter que des concentrations plus élevées d'hydralazine sont capables d'inhiber la formation des cellules spumeuses.¹⁶

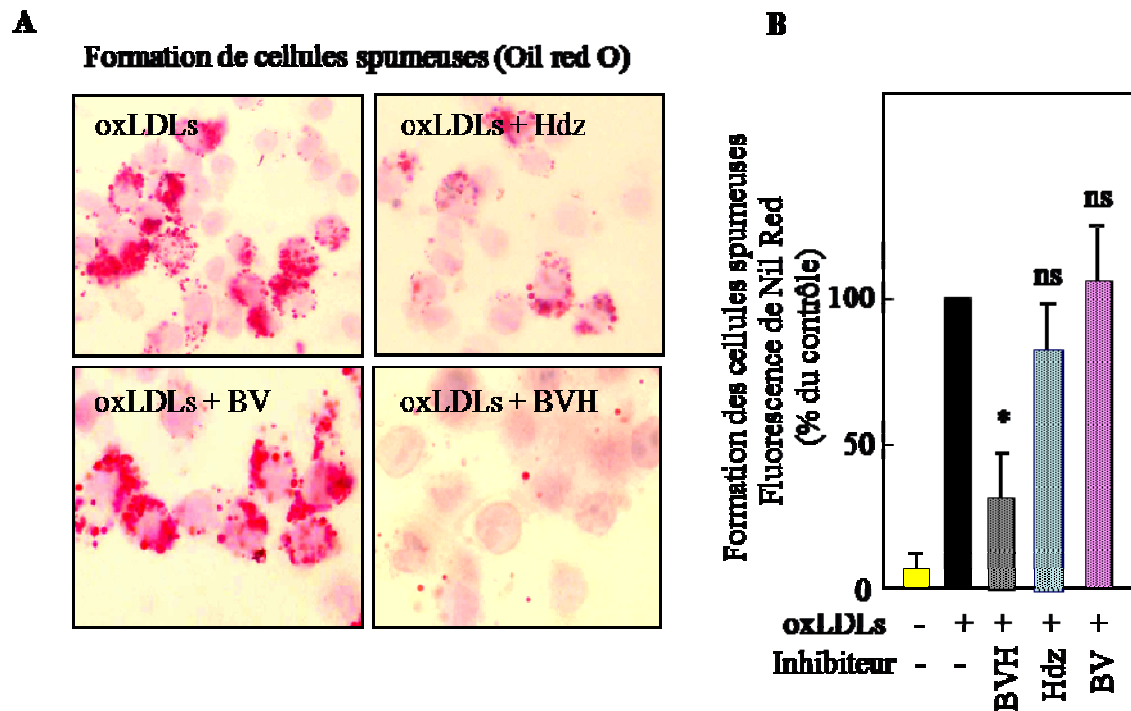


Figure. 36. A, B. Effet de BVH sur la formation des cellules spumeuses. Les macrophages murins (RAW264.7) sont incubés pendant 14 h avec les oxLDLs (100 μ g/mL) et les agents (BVH, hydralazine ou bisvanilline) [5 μ M]. En **A**, les cellules ont été lavées deux fois, fixées par du paraformaldéhyde 4% et colorées avec *oil red O*, puis observées au microscope. En **B**, les cellules sont marquées au *Nile red*, lysées et la fluorescence des cellules est mesurée comme indiqué dans la partie expérimentale. Les résultats sont exprimés en % du contrôle traité par oxLDLs (sans agents protecteurs). * : Résultats significatifs, ns : Résultats non significatifs.

³⁹ Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436:279-298, 1999.

L'accumulation des lipides est montrée par coloration avec de l'huile rouge O « *oil red O* » et peut être quantifiée par fluorométrie après marquage au « *Nile red* », qui est spécifique des lipides neutres.¹⁶

Nous avons étudié l'effet de BVH sur la carbonylation des protéines cellulaires.⁴⁰ Comme indiqué dans Figure 37A, BVH inhibe l'augmentation des protéines carbonylées induite par les oxLDLs (200 µg/ml, incubation de 14h), tandis que l'hydralazine et la bisvanilline sont inefficaces à la concentration utilisée (5µM).

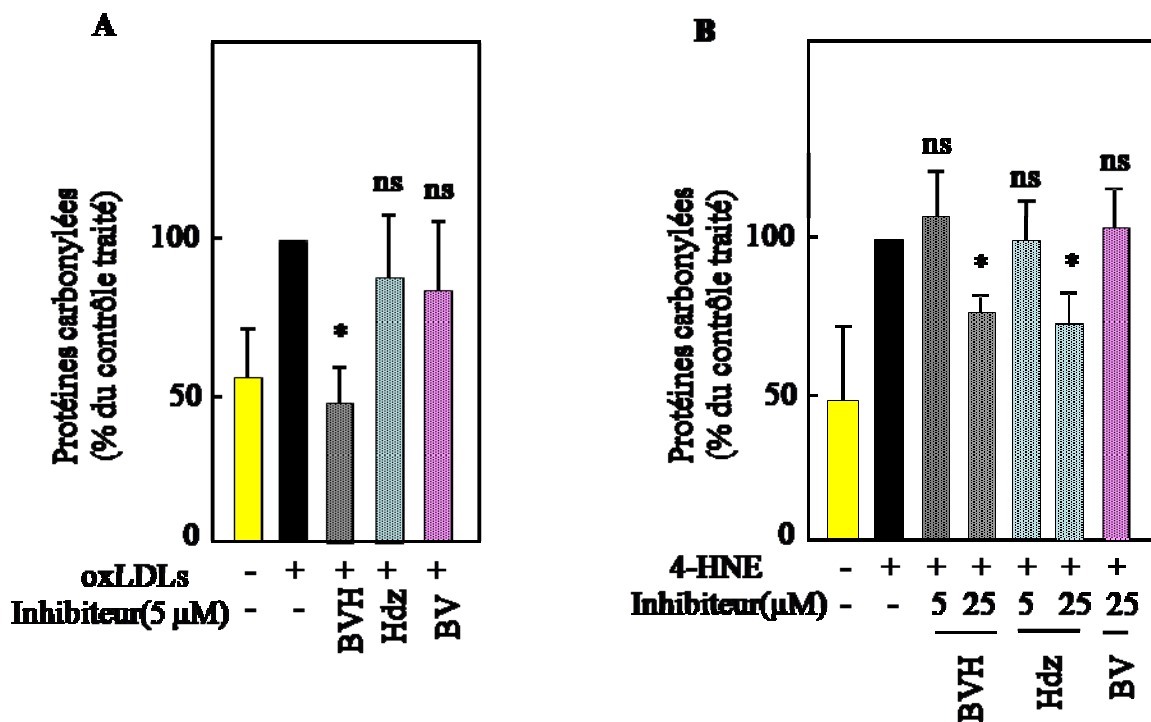


Figure. 37. Le taux de protéines carbonylées est mesuré sur des extraits cellulaires (HMEC-1) après incubation de 14h avec les oxLDLs (200 µg/mL) (A) ou le 4-HNE (10 µM) (B) en présence ou en absence de BVH, hydralazine et bisvanilline (5 µM). Les protéines carbonylées sont mesurées par spectrophotométrie en utilisant le DNPH⁴¹ comme indiqué dans la section expérimentale. Les résultats sont exprimés en % du contrôle traité par les oxLDLs en l'absence d'agents protecteurs. * : Résultats significatifs, ns : Résultats non significatifs.

Le 4-HNE (10 µM) directement incorporé au milieu de culture des cellules HMEC-1, induit une augmentation des protéines carbonylées, qui est bloquée par BVH et l'hydralazine, mais pas par la bisvanilline. Il est à noter que l'effet piègeur de carbonyle de BVH n'est pas

⁴⁰ Steffen Y, Jung T, Klotz LO, Schewe T, Grune T, Sies H. Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin. *Free Radic Biol Med.* 42:955-70, 2007.

⁴¹ Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S and Uchida K. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: implications for oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276:23903-23913, 2001.

supérieur à celui de l'hydralazine, des concentrations similaires des deux molécules (25 μ M) étant nécessaires pour neutraliser l'effet toxique du 4-HNE. Par comparaison, l'effet antioxydant de BVH est observé à des concentrations beaucoup plus faibles (1-5 μ M), pour lesquelles l'hydralazine n'a pas d'effet. Ces résultats indiquent que l'effet antioxydant de BVH est très supérieur à celui de l'hydralazine alors que son effet piègeur de carbonyle est comparable (Figure 37B).

3.5. Effet de BVH sur la signalisation apoptotique

Les propriétés anti-apoptotiques de BVH, hydralazine et bisvanilline ont été évaluées sur des HMEC-1 incubées avec des concentrations toxiques de oxLDLs (200 μ g/ml). Après une incubation de 24h, la viabilité résiduelle (évaluée par le test MTT) est inférieure à 20% du contrôle (cellules incubées seulement avec des oxLDLs) (Figure 38). Des études en dose-réponse des différents agents montrent que BVH est très efficace pour bloquer l'effet toxique des oxLDLs même à faible concentration (1 μ M) alors que l'hydralazine et la bisvanilline ne présentent aucun effet protecteur (Figure 38).

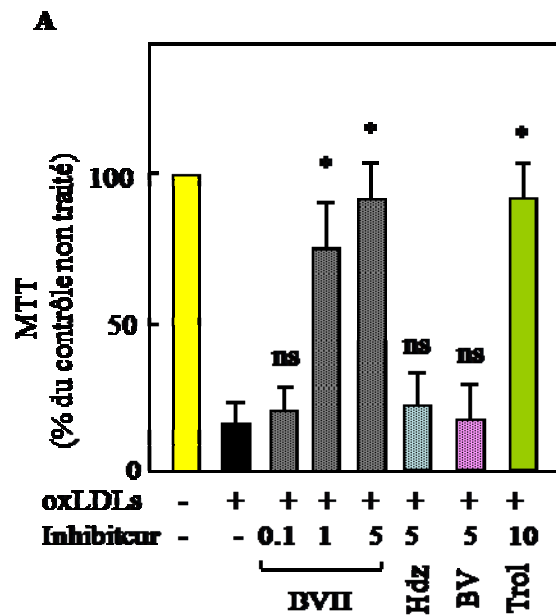


Figure. 38. Les cellules HMEC-1 sont incubées pendant 24h avec les oxLDLs (200 μ g/ml) et les agents protecteurs (concentrations indiquées en μ M). La viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT. Les résultats sont exprimés en % du contrôle non traité. * : résultats significatifs, ns : résultats non significatifs.

La mort cellulaire est caractérisée par le comptage des cellules apoptotiques après une double coloration par deux sondes fluorescentes qui marquent l'ADN, le SYTO-13 qui est une sonde perméante marquant en vert les noyaux de toutes les cellules, et l'iodure de propidium (PI) qui

colore en rouge les cellules dont la membrane est altérée ce qui laisse passer la sonde (cellules en nécrose primaire ou cellules en nécrose post-apoptotique).^{42,43} Les figures 39 A et B montrent que les oxLDLs induisent une augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Le BVH (1-5 µM) bloque l'apoptose des cellules HMEC-1, tandis que l'hydralazine et la bisvanilline (1-5 µM) sont sans effet.

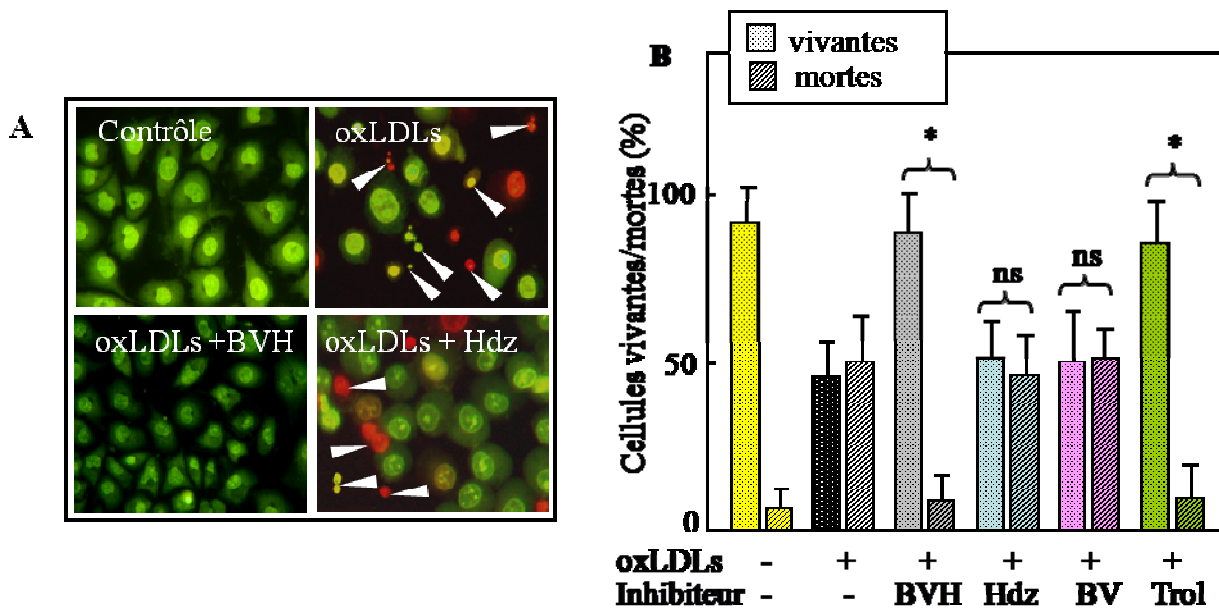


Figure. 39. Identification de la mort cellulaire induite par les oxLDLs. Les cellules sont incubées pendant 16 h avec des oxLDLs (200 µg/mL) et les agents protecteurs, BVH (5 µM), hydralazine (Hdz, 5 µM), bisvanilline (BV, 5 µM) et Trolox (Trol, 10 µM). Les cellules sont marquées avec des sondes fluorescentes intercalantes de l'ADN, le Syto-13 (perméant, vert) et l'iodure de propidium (non perméant, rouge) et examinées en microscopie à fluorescence qui révèle des cellules vivantes vertes avec un noyau normal, des cellules mortes avec un noyau apoptotique soit vert (apoptose primaire) ou rouge (nécrose post-apoptotique), comme indiqué par les flèches, ou des cellules en nécrose primaire avec un noyau rouge (sans caractéristique apoptotique) (A). En B, comptage des cellules vivantes, en apoptose primaire, et en nécrose primaire ou post-apoptotique après marquage avec les sondes fluorescentes comme rapporté en A. Les résultats sont exprimés en % du nombre de cellules comptées. * : résultats significatifs, ns : résultats non significatifs.

La signalisation de l'apoptose implique soit une voie dite « extrinsèque » faisant intervenir des récepteurs de mort cellulaires (TNFα, système Fas/Fas ligand..) et la voie des caspases

⁴² Salvayre R, Auge N, Benoist H, and Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585: 213-221, 2002.

⁴³ Vindis C, Escargueil-Blanc I, Elbaz M, Marcheix B, Grazide MH, Uchida K, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ. Res.* 98:785-792, 2006.

initiatrices et effectrices (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*)⁴⁴, soit une voie dite « intrinsèque » qui fait intervenir la mitochondrie et les caspases effectrices (Figure 40).⁴⁵

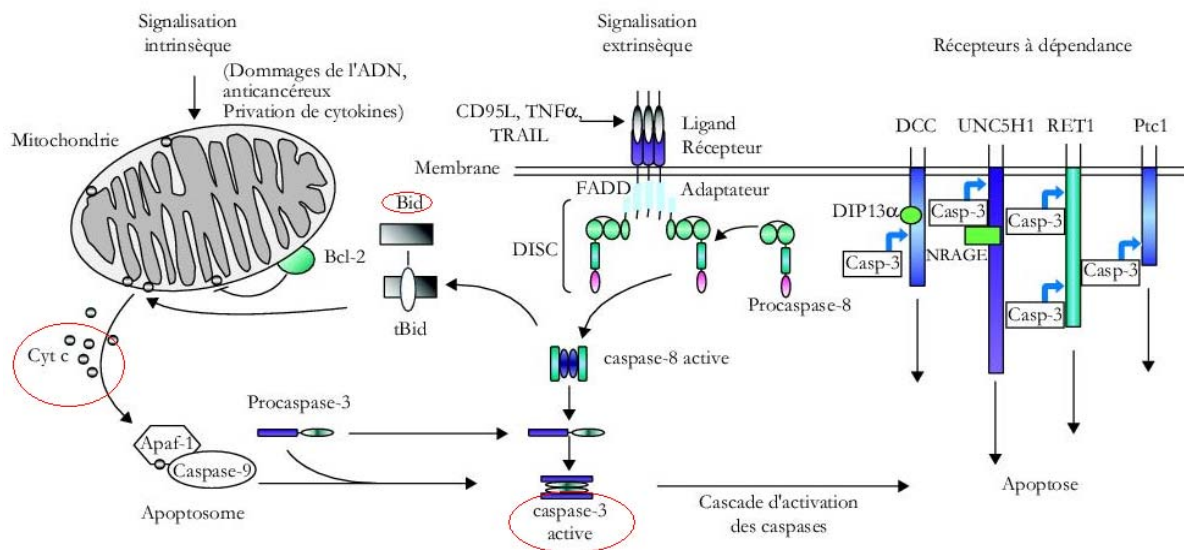


Figure. 40. La signalisation apoptotique, d'après Ségal-Bendirdjian.⁴⁶

La voie intrinsèque mitochondriale fait intervenir les membres de la famille Bcl-2 tel que Bid. Cette famille de protéines comprend des membres antiapoptotiques tels que Bcl2 ou BclXI, et des membres proapoptotiques tels que Bid, Bad, Bax. Ces derniers peuvent être clivés par les calpaines ou les caspases lors de stimuli apoptotiques, et pénètrent dans les mitochondries dont ils altèrent le fonctionnement. Ceci entraîne une libération du cytochrome-C mitochondrial, et active les caspases effectrices 9 et 3.⁴⁶ BVH (5 μM) bloque la signalisation apoptotique induite par les oxLDLs en inhibant le clivage de la protéine Bid et la libération cytosolique du cytochrome-C mitochondrial de même que l'activation de DEVDase (caspase 3) (Figure 41 A et B).

⁴⁴ Thornberry N A, and Lazebnik Y. Caspases : enemies within. *Science*. 281:1312-6, 1998.

⁴⁵ Ségal-Bendirdjian E, Dudognon C, Mathieu J, Hillion J, and Besançon F. Les multiples voies de signalisation de la mort cellulaire : avancées récentes et exploitation thérapeutique. *Bulletin du Cancer*. 92(1) :23-35, 2005.

⁴⁶ Sanson M. Implication du stress du reticulum endoplasmique dans l'apoptose des cellules vasculaires induite par les LDL oxydées et rôle protecteur de ORP150. Avril 2008.

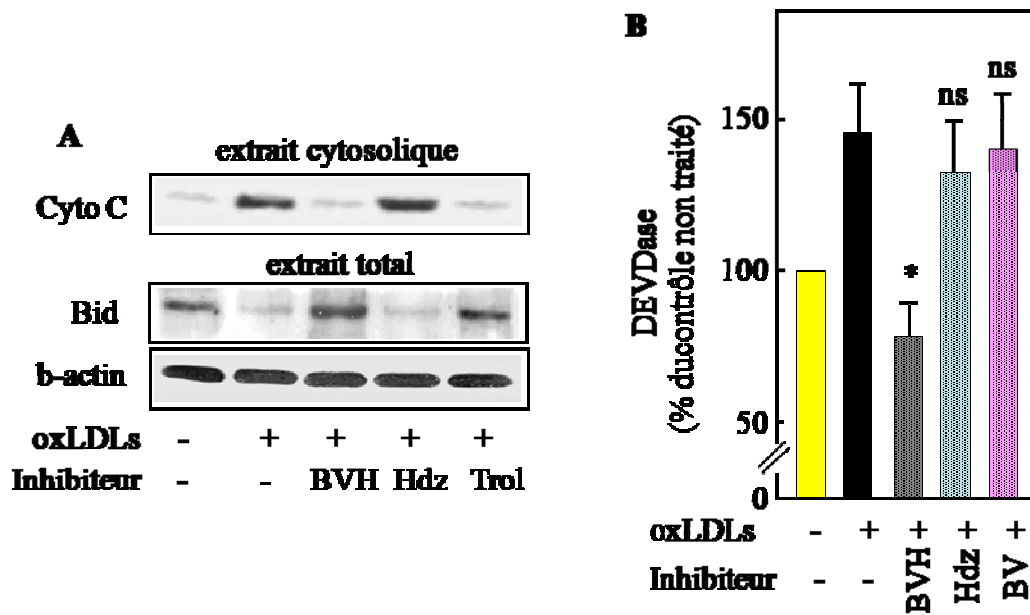


Figure. 41. BVH bloque la cascade pro-apoptotique induites par les oxLDLs dans les HMEC-1 (les conditions expérimentales sont similaires à celles de la figure 20). **A.** Des westerns blots réalisés dans le cytosol montrent une augmentation de l'expression du cytochrome-C en présence des oxLDLs. De même on note une diminution de l'expression de Bid dans l'extrait cellulaire total, démontrant son clivage en présence de oxLDLs. Ces réponses sont inhibées par le BVH et le Trolox, mais pas par l'hydralazine (5 μ M). **B.** L'activité DEVDase (caspase 3) est mesurée sur des extraits cellulaires d'HMEC-1 préalablement incubés avec les oxLDLs et les différents agents, avec le substrat fluorogénique Ac-DEVD-AMC, spécifique de cette enzyme, comme indiqué dans la section expérimentale. Les résultats sont exprimés en % du contrôle non traités. * : résultats significatifs, ns : résultats non significatifs.

Comme observé avec les cellules spumeuses, l'inhibition de la toxicité induite par le 4-HNE (10 μ M) nécessite des doses plus élevées de BVH et comparables avec celles de l'hydralazine (25 μ M) (Figure 42).

Le trolox bloque l'apoptose induite par les oxLDLs en accord avec la littérature,⁴⁷ mais n'a pas d'effet sur la cytotoxicité induite par le 4-HNE.

⁴⁷ Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 407:233-241, 2000.

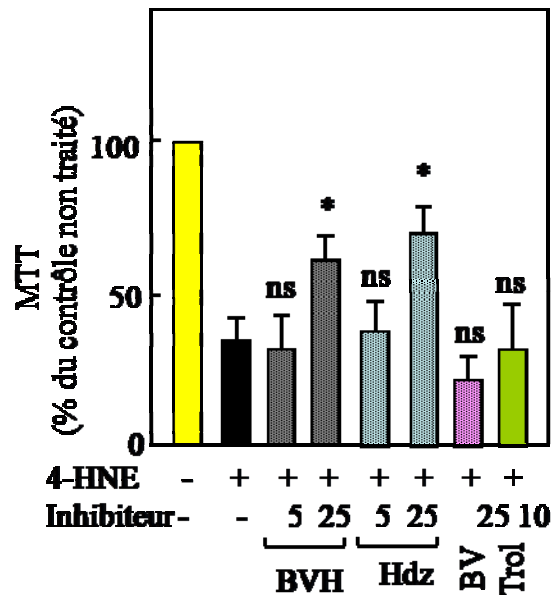


Figure. 42. Effet cytoprotecteur de BVH, de l'hydralazine et de BV (5 et 25 μ M) contre la toxicité du 4-HNE (10 μ M, 14h d'incubation avec des HMEC-1). La toxicité est évaluée par le test MTT et exprimée en % du contrôle non traité. * : résultats significatifs, ns : résultats non significatifs.

3.6. Effet de BVH sur le développement de l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-}

La délétion du gène apoE chez les souris ApoE^{-/-}, conduit à une hypercholestérolémie sévère et une athérosclérose spontanée, même en l'absence de supplémentation en lipides (alimentation de type standard).⁴⁸

Trois groupes de 20 souris (mâles) ApoE^{-/-} nourries avec une alimentation de type standard ont été soit non traitées (témoins) soit traitées pendant 16 semaines avec BVH ou avec l'hydralazine ajoutées à l'eau de boisson. La pression artérielle, les taux plasmatiques de cholestérol total, de triglycérides et de glucose sont mesurés à la fin de l'étude et sont comparables entre les animaux traités et non traités (Tableau 12), indiquant que le BVH et l'hydralazine n'ont pas d'effet sur le taux sanguin de lipides circulants.

⁴⁸ Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1706-21, 2007.

Tableau. 12.

Traitement des Souris ApoE ^{-/-}	Glucose mmol/l	Cholestérol Total mmol/l	Triglycérides mmol/l	Pression artérielle
Non traitées	8.6±0.4*	13.8±1.6*	1.58±0.4*	108±5
BVH	8.2±0.3*	13.4±1.4*	1.76±0.3*	110±6
Hydralazine	8.5±0.3*	13.7±1.5*	1.45±0.3*	107±4

Après 16 semaines, les animaux sont sacrifiés et la surface des lésions athéromateuses est mesurée au niveau des sinus aortiques après coloration à l'huile rouge. Les lésions sont numérisées et quantifiées avec le logiciel (Biocom morphometry system). Chez les souris témoins non traitées, la moyenne des surfaces au niveau de la lésion athéroscléreuse du sinus était de $24550 \pm 6340 \mu\text{m}^2$, en accord avec les travaux précédents.¹⁶ L'administration de BVH induit une réduction marquée de la surface de la lésion (plus de 55% de réduction) (Figure 43). De même l'administration d'hydralazine réduit la taille de cette lésion d'environ 40%, comme décrit précédemment.¹⁶

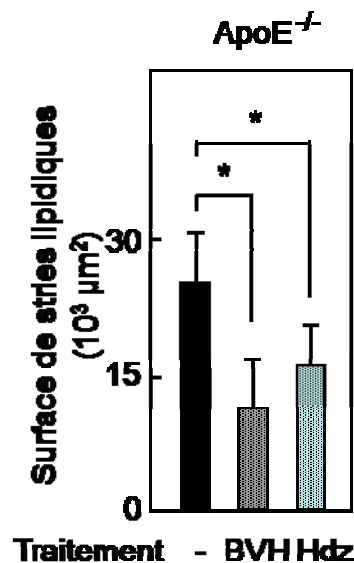


Figure. 43. Quantification de la surface des stries lipidiques dans le sinus aortique des souris. Des souris mâles ApoE^{-/-} âgées de 4 semaines (20 dans chaque groupe) ont été nourries avec une alimentation régulière de type standard et traitées ou non par BVH ou l'hydralazine (Hdz) (30 mg/L, soit 10 mg/kg/jour ajouté à l'eau de boisson) pendant 16 semaines. Après sacrifice, les cœurs sont inclus dans de l'OCT (Tissue-Tek) et les sinus aortiques sont coupés en sections de 10μm, colorés avec *Red Oil O*, et contre colorés avec l'hématoxyline-éosine. Une quantification morphométrique de la taille de la lésion a été réalisée, comme indiqué dans la section expérimentale. * : résultats significatifs, ns : résultats non significatifs.

La nature des lésions est caractérisée par le marquage des macrophages et des cellules musculaires lisses (CML), et par la présence de facteurs inflammatoires et de produits d'oxydation lipidique. Comme le montre la Figure 44, l'administration de BVH se traduit par une diminution de l'expression de MCP-1 des CML (α -actine-positives), et des macrophages (cellules CD68-positives).

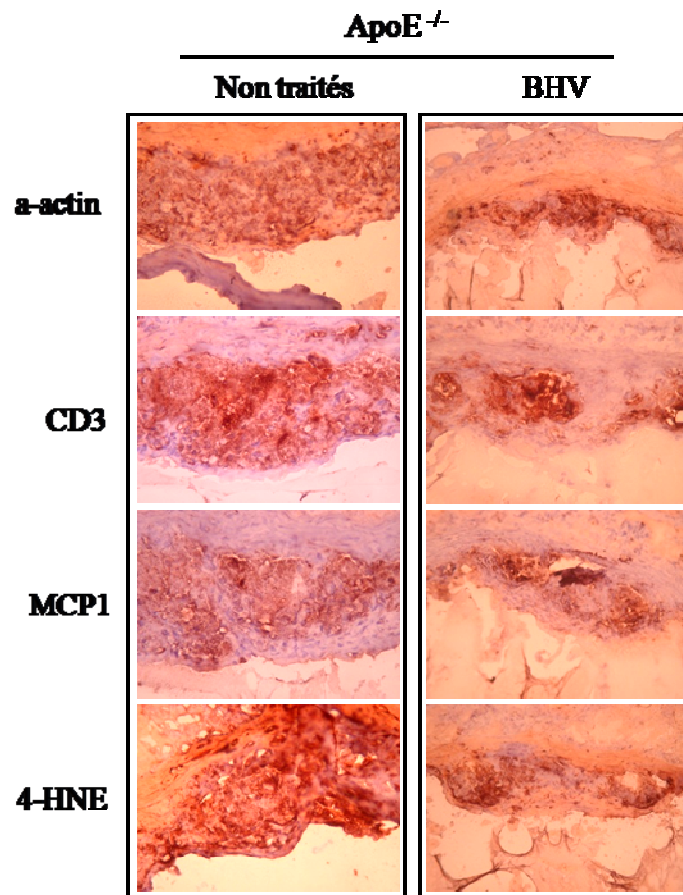


Figure. 44. Immunohistochimie des plaques d'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} non traitées (à gauche) et traitées avec BVH (à droite). De haut en bas, α -actine (SMC), CD3 (lymphocytes T), MCP-1, et les 4-HNE-adduits.

BVH réduit également l'infiltration lymphocytaire, (évaluée par le marquage des cellules T CD3 positives), et inhibe l'accumulation des adduits de 4-HNE sur les protéines tissulaires (stress carbonyle) dans le sinus aortique des souris apoE^{-/-} (Figure 44).

Le dosage des protéines carbonylées dans les sinus aortiques des souris traitées et non traitées, montre que BVH inhibe la formation des protéines carbonylées. Il est à noter que l'hydralazine a quasiment le même effet que BVH dans cette inhibition.

Le 4-HNE peut induire des modifications et un dysfonctionnement des récepteurs de la tyrosine Kinase (TKRs), tels que le PDGF-R (Platelet-derived growth factor receptor) ou l'EGF-R (epidermal growth factor receptor). *In vitro* le 4-HNE peut former des adduits avec le PDGF-R, avec pour conséquence un dysfonctionnement de la migration et de la prolifération cellulaire induite par le PDGF.⁴⁹ Les adduits 4-HNE-PDGF-R sont présents dans les plaques d'athérosclérose et leur formation est inhibée par l'hydralazine.¹⁶ BVH inhibe fortement l'accumulation des adduits 4-HNE-PDGF-R chez les souris apoE^{-/-}, en corrélation avec un effet protecteur sur la formation de protéines carbonylées (Figure 45 B).⁵⁰

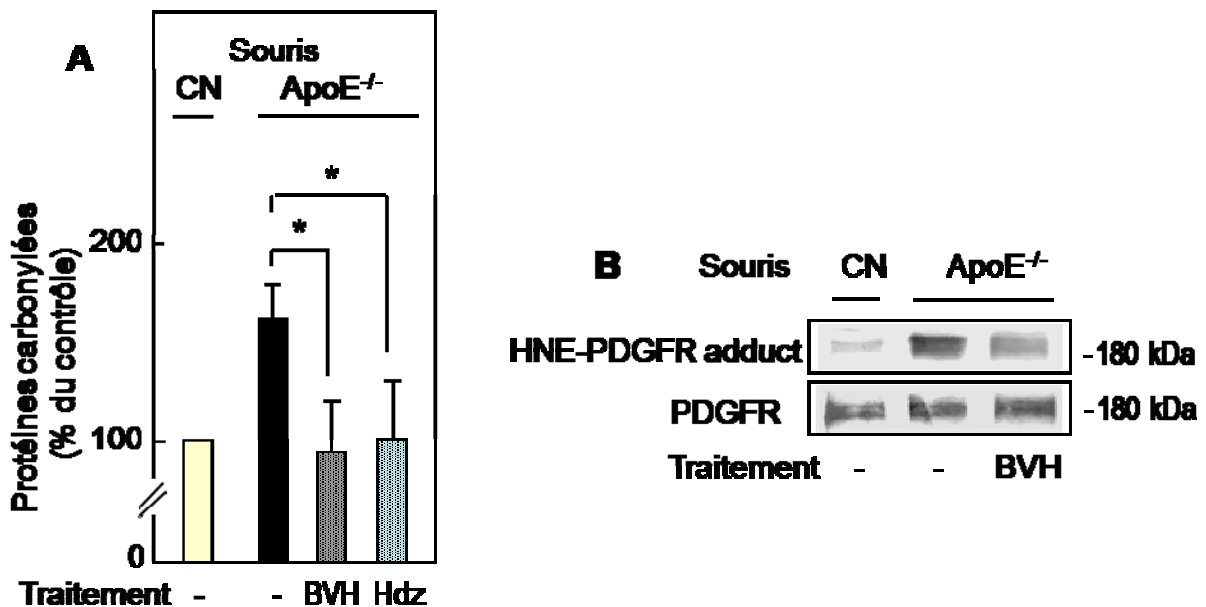


Figure. 45. A. Détection des protéines carbonylées dans les sinus aortiques des souris traitées et non traitées ; CN contrôle négatif. B. Western blot montrant l'accumulation d'adduits HNE-PDGF-R dans les aortes de souris apoE^{-/-}, et l'effet protecteur de BVH. * : résultats significatifs, ns : résultats non significatifs.

3.7. Discussion

BVH est un dérivé de l'hydralazine, présentant à la fois une activité antioxydante (présence de deux OH phénolique), et une activité piègeur de carbonyle (présence de deux entités hydralazine). La liaison entre la bis-vanilline et l'hydralazine est sous forme d'hydrazone

⁴⁹ Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Vacaresse N, Jürgens G, Darblade B, Arnal JF, Parthasarathy S and Nègre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation* 104:1814-1821, 2001.

⁵⁰ Vindis C, Escargueil-Blanc I, Elbaz M, Marcheix B, Grazide M H, Uchida K et al. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res.* 98:785-792, 2006.

acidolabile conçu pour subir une hydrolyse afin de libérer les hydralazines dans des conditions physiologiques.⁵¹

BVH est un puissant antioxydant, associant à la fois un effet inhibiteur de l'oxydation induit par les métaux, et piègeur de radicaux libres. Le BVH (même à faible concentration) bloque de manière significative l'oxydation des LDLs induite par le cuivre. De même cette molécule est capable de bloquer les radicaux libres comme le montre son effet inhibiteur sur l'oxydation des LDLs induite par l'AAPH (métal-indépendant). Enfin il bloque l'oxydation des LDLs par les cellules vasculaires (HMEC-1), qui dépend des ROS générés par les cellules et de la présence de métaux de transition. Ce système mime l'oxydation des LDLs telle qu'elle se produit *in vivo* dans la paroi vasculaire, puisque les ions cuivriques sont présents dans les vaisseaux, et contribuent à la production des oxLDLs athérogènes.^{52,53,54}

Les propriétés de BVH en tant que capteur de radicaux lui permettent de bloquer la génération des ROS extracellulaires qui sont impliqués dans l'oxydation cellulaire des LDLs (O_2^{\bullet} provoque la génération de H_2O_2 et HO^{\bullet} , formés par la réaction de Fenton en présence de fer ou le cuivre).⁵⁵ Les propriétés de BVH comme chélateur du cuivre contribuent à inhiber la réaction de Fenton qui est impliquée dans l'oxydation des LDLs. A côté des effets directs sur les ROS ou le cuivre, BVH induit une diminution de l'expression de la sous-unité gp91^{phox} de la NADPH-oxydase, qui participe à la génération extracellulaire de ROS, et donc à l'oxydation des LDLs et au stress oxydant.⁵⁶ L'effet inhibiteur sur l'expression gp91^{phox} résulte de l'effet antioxydant de BVH, qui prévient l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire redox-sensible NF- κ B. En effet, NF- κ B est connu pour réguler l'expression de NAD(P)H oxydase,^{57,58} et il est activé par les oxLDLs.³⁰ De plus, NF- κ B est en partie

⁵¹ Kalia J and Raines RT. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chem.* 120:7633-36, 2008.

⁵² Aviram M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free. Radic. Res.* 33:85-97, 2001.

⁵³ Holvoet P and Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *Faseb. J.* 8:1279-1284, 1994.

⁵⁴ Witztum JL, and Steinberg D. Role of oxidized LDL in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88:1785-1792, 1991.

⁵⁵ Kritharides L, Jessup W, Dean RT. Macrophages require both iron and copper to oxidize LDL in Hanks' balanced salt solution. *Arch Biochem. Biophys.* 323:127-36, 1995.

⁵⁶ Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86: 494-501, 2000.

⁵⁷ Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem.* 281:5657-67, 2006.

⁵⁸ Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, DeLeo FR, Quinn MT. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol.* 82:729-41, 2007.

responsable de la signalisation pro-inflammatoire induite par les oxLDLs,^{31,59} en particulier l'adhésion des monocytes sur des HMEC-1, et la sécrétion du facteur chimiotactique (MCP-1) impliqué dans le recrutement des cellules mononucléées.^{31,36} L'effet inhibiteur de BVH sur ces paramètres est donc corrélé à son effet inhibiteur sur l'activation de NF- κ B, et en amont, l'inhibition de la génération de ROS.

Le BVH bloque la cytotoxicité des oxLDLs, en inhibant la cascade apoptotique intrinsèque mitochondriale (caractérisée par le clivage du facteur pro-apoptotique (Bid), la libération du cytochrome C et l'activation de la caspase 3).⁴⁶ Ces données sont en accord avec les effets d'autres agents cytoprotecteurs et/ou antioxydants (vitamine E, Trolox, probucol, acides phénoliques, et flavonoïdes).^{60,61,62}

Il est à noter que l'effet antioxydant du BVH n'est pas reproduit par un mélange extemporané de bisvanilline et de l'hydralazine, ce qui suggère que l'effet protecteur de BVH est spécifique de la structure chimique de la molécule. Il est possible que la synthèse induise un changement conformationnel de la structure chimique de BVH, par rapport à ses constituants testés seuls, Il semble que BVH ait un meilleur accès aux ROS ou au cuivre. En revanche, les propriétés cytoprotectrices sont liées à la structure de BVH et ne découlent pas seulement de ses propriétés antioxydantes. Ce résultat découle du fait que la molécule résultante d'une méthylation chimique des deux fonctions OH de BVH (figure 46) perd son activité antioxydante mais préserve bien son activité cytoprotectrice.

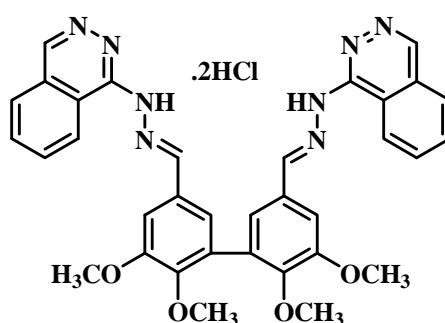


Figure. 46

⁵⁹ Salvayre R, Auge N, Benoist H, and Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585: 213-221, 2002.

⁶⁰ Mabile L, Fitoussi G, Periquet B, Schmitt A, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Alpha-tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 19:177-87, 1995.

⁶¹ Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B, and Frolich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 99:1733-9, 1999.

⁶² Traber MG, and Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free. Radic. Biol. Med.* 43:4-15, 2007.

BVH présente des propriétés carbonyl-scavenger comparables à celles de l'hydralazine. En effet le BVH inhibe la carbonylation des protéines et la toxicité induite par le 4-HNE directement ajouté au milieu de culture des HMEC-1. Il est à noter que l'effet piègeur de carbonyle du BVH nécessite des doses plus élevées et n'est pas supérieur à celui de l'hydralazine. Une hypothèse est que le BVH subit une hydrolyse de son hydrazone acide-labile, libérant ainsi l'hydralazine à pH acide.⁶³ Il semble cependant que le BVH soit meilleur comme antioxydant que comme piègeur de carbonyle, et donc son effet inhibiteur sur la formation des protéines carbonylées et l'accumulation des cellules spumeuses induites par les oxLDLs, est probablement attribuable à ses propriétés antioxydantes. De même l'effet cytoprotecteur du BVH serait dû à son effet inhibiteur sur le stress oxydant, l'inflammation et l'apoptose induits par les oxLDLs. L'effet antiathérogène du BVH chez la souris apoE^{-/-}, pourrait cependant résulter de la conjonction de ses propriétés antioxydantes et carbonyl scavenger, qui contribuent à bloquer l'accumulation d'adduits 4-HNE sur les protéines tissulaires (comme observés sur le PDGF récepteur, cible du 4-HNE).

L'effet du BVH sur la formation des plaques d'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} est un peu supérieur à celui de l'hydralazine (50-55% de diminution de la surface de la lésion vs 40-45% pour l'hydralazine). Cette différence pourrait être due au fait que le BVH est un meilleur antioxydant que l'hydralazine. Le BVH ne permet pas de réduire le taux de lipides plasmatiques chez la souris ApoE^{-/-}, mais il limite l'accumulation de cellules spumeuses macrophagiques, l'infiltration des cellules T CD3-positives, et l'expression de MCP-1. De même le BVH induit une diminution du taux de protéines carbonylées et l'accumulation des adduits 4-HNE sur les protéines tissulaires indiquant une bonne corrélation avec la diminution de l'accumulation des stries lipidiques et la réduction de la taille de la plaque.

En conclusion, le BVH pourrait être le prototype d'une nouvelle classe d'antioxydant pour une nouvelle approche thérapeutique contre l'athérosclérose.⁶⁴

⁶³ Kalia J, and Raines R T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem.* 120:7633-7636, 2008.

⁶⁴ Bouguerne B, Belkheiri N, Bedos-Belval F, Duran H, Vindis C, Uchida K, Grazide M, Salvayre R, Baltas M, and Nègre-Salvayre A. Antiatherogenic Effect of BisvanillylHydralazone, a New Hydralazine Derivative with Antioxidant, Carbonyl Scavenger, and Antiapoptotic Properties. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.* 11 :2093-2106, 2011.

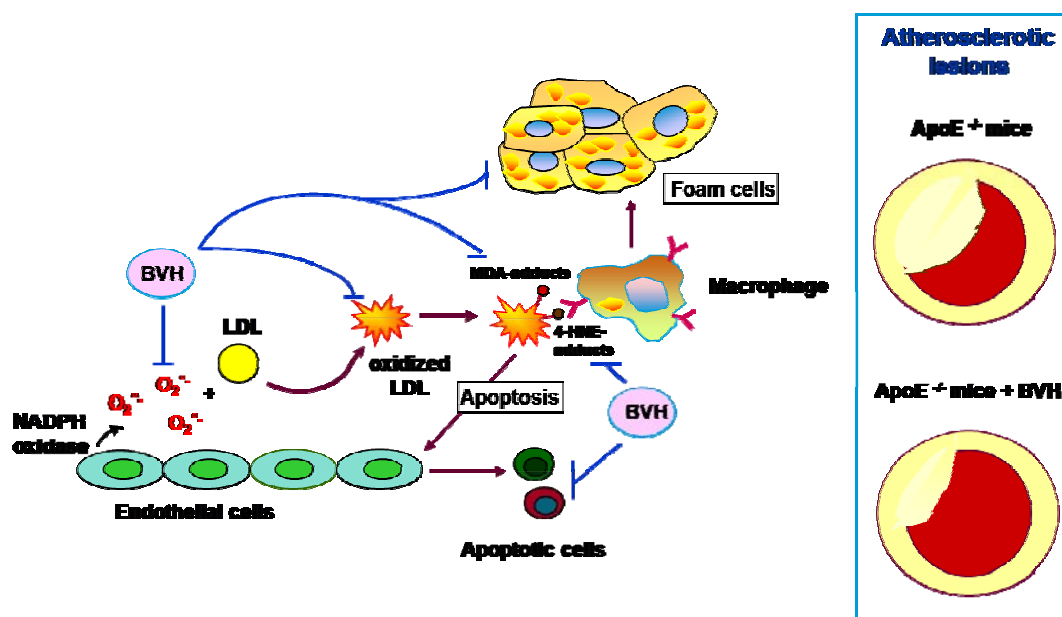


Figure. 47. Résumé schématique des effets de BVH.

4. Perspectives

En perspective, nous prévoyons d'étudier i) la stabilité des hydrazones en milieu physiologique, ii) complexation du cuivre par les monomères et les dimères, iii) le potentiel redox (électrochimie), iv) la formation des radicaux libre par résonance paramagnétique nucléaire, v) la relation structure/activité par modification de la structure des monomères ou dimères les plus actifs (par exemple : alkylation des fonctions phénols et/ou les NH hydrazones) et évaluation de leurs propriétés antioxydantes, cytoprotectrices et physicochimiques.

Nous nous prévoyons aussi, de réaliser la synthèse de nouveaux agents de type diaryl éther, ainsi d'étudier leurs propriétés biologiques (antioxydante, cytoprotectrice, et/ou d'autres propriétés intrinsèque du motif diaryl éther).

Chapitre IV

Diaryl éthers hautement fonctionnalisés

« Nouveaux agents anti-athérogènes »

Introduction

L'introduction d'un lien diaryl éther à la place du lien aryl-aryl pourra avoir un impact significatif sur le pouvoir antioxydant des dimères (hydrazones et phosphonates), ou conférer aux agents une nouvelle propriété intrinsèque à la fonction (aryl aryl éther).

D'un point de vue structural, ce nouveau synthon a plus de flexibilité au niveau du lien entre les deux fragments phénoliques et induit une plus grande distance entre les deux fonctions OH phénoliques par rapport à la bisvanilline (Figure 48).

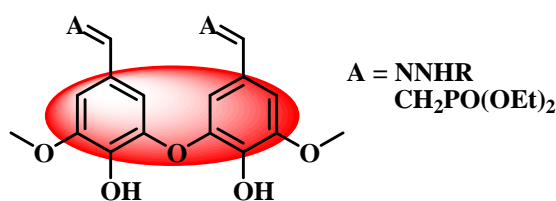


Figure. 48.

Les diaryl éthers représentent une structure commune dans de nombreux produits naturels ou de synthèse chimique, qui possèdent un intérêt thérapeutique, agrochimique¹ ou technologique². En conséquence, le développement de nouvelles méthodes de synthèse pour la préparation du motif aryl-aryl éther, ou l'amélioration de celles existantes, sont d'une importance majeure.

1. Diaryl éthers naturels

La plupart des diaryl éthers naturels proviennent des acides aminés aromatiques (L-tyrosine, L-phénylalanine, L-tryptophane) ou de leurs précurseurs biosynthétiques, réunis par couplage oxydant de phénol.^{3,4} Un diaryl éther naturel porte en général un substituant hydroxy ou alcoxy en *ortho*, une chaîne alkyle en *mé*ta sur l'un des cycles aryle, et un substituant alkyle en *para* sur l'autre cycle aryle. Ils peuvent être acycliques ou cycliques. L'oxygénation ou l'halogénéation des cycles aromatiques est couramment observée.

¹ Schareina T, Zapf A, Cotte A, Muller N, Beller M. A Practical and Improved Copper-Catalyzed Synthesis of the Central Intermediate (IIIa) of Diafenthion (IV) and Related Products. *Org. Process Res. Dev.* 12:537–539, 20089.

² Liu H L, Bernhardsen, and Fiksdahl A. Synthesis of well-defined rod-coil block copolymers containing trifluoromethylated poly(phenylene oxide)s by chain-growth condensation polymerization and atom transfer radical polymerization. *Tetrahedron*, 62:3564–3572, 2010.

³ Nicolaou N C, Boddy C N C, Bräse S, Winssinger N. Chemistry, Biology, and Medicine of the Glycopeptide Antibiotics. *Angew. Chem.* 28:2096-2152, 1999.

⁴ Zhu J P, Islas-Gonzalez G, and Bois-Choussy M. Recent progress in isolation, bioactivity, evaluation and total synthesis of diaryl heptanoids. *Org. Prep. Proced. Int.* 32:505–546, 2000.

Je focaliserai la recherche bibliographique des diaryl éthers présentés ici sur trois catégories, les acides aminés et glyco-peptides, les lignans et les diaryl éthers cycliques heptanoïdes.

1.1. Acides aminés et peptides

1.1.1. Hormones thyroïdiennes

La thyroxine, ou 3,5,3',5'-tétraiodothyronine (T4), est la principale hormone sécrétée par les cellules folliculaires de la glande thyroïdienne avec la 3,5,3'-triiodothyronine (T3). T4 a été parmi les premiers diaryl éthers naturels connus et synthétisés en laboratoire (Figure 49).⁵

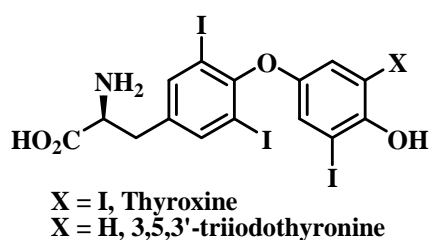


Figure. 49. Thyroxine (T4), et Triiodothyronine (T3).

1.1.2. Isodityrosine

Le couplage oxydant de deux L-tyrosines (Figure 50a) pour former la dityrosine (Figure 50b) et l'isodityrosine (Figure 50c) est l'exemple le plus simple de la formation compétitive entre le diaryl éther et le biaryle.

La pulchérosine (Figure 50d) combine en une seule molécule la fraction dityrosine (biphényle) et l'isodityrosine (diaryl éther). Cette molécule est une illustration de la compétitivité de ces deux fonctions et de leur origine biosynthétique commune.⁶

⁵ Chemburkar S R, Deming K C, and Reddy R. Chemistry of thyroxine: an historical perspective and recent progress on its synthesis. *Tetrahedron*. 66:1955–1962, 2010.

⁶ Jacob J S, Cistola D P, Hsu F F, Muzaffar S, Mueller D M, Hazen S L, and Heinecke J W. Human Phagocytes Employ the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide System to Synthesize Dityrosine, Tityrosine, Pulcherosine, and Isodityrosine by a Tyrosyl Radical-dependent Pathway *J. Biol. Chem.* 271:19950– 19956, 1996.

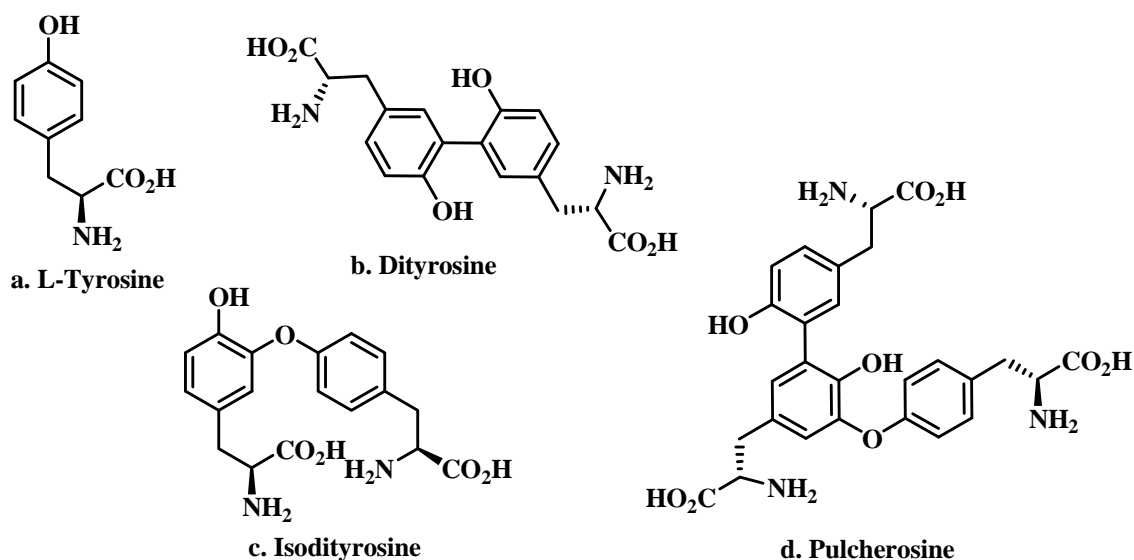


Figure 50.

Après la formation du lien diaryl éther de l'isodityrosine, les deux unités de la tyrosine impliquées dans cette formation peuvent être directement reliées par une liaison peptidique. Les produits naturels résultants sont le cycloisodityrosine (Figure 51a), et un puissant antibiotique et anti-tumoral la bouvardine (Figure 51b).⁷

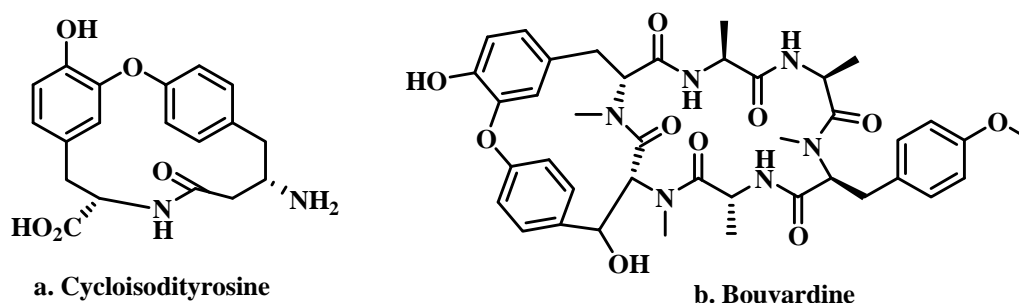


Figure 51.

1.1.3. Glycopeptides

La vancomycine (Figure 52) est peut-être la molécule naturelle la plus connue de cette classe de diaryl éthers, étant un antibiotique utilisé en clinique pour combattre les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM).³

⁷ Feliu L, and Planas M. Cyclic Peptides Containing Biaryl and Biaryl Ether Linkages. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 11:53-97, 2005.

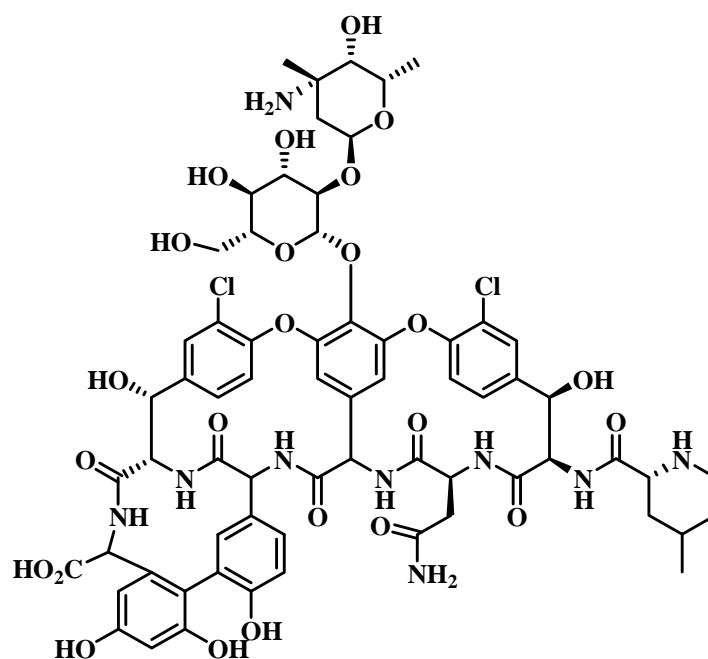


Figure. 52.

1.2. Lignans et néolignans

Les plantes sont une source majeure de composés polyphénoliques. Ces polyphénols sont issus de la phénylalanine par l'intermédiaire de l'acide *p*-coumarique.⁸ Beaucoup de ces produits naturels contiennent le motif diaryl éther dans une structure acyclique ou cyclique. Les deux exemples représentatifs sont la pelliatine (famille de Lignane, Figure 53a),⁹ et le spiriformine (famille de néolignanes. Figure 53b).¹⁰

⁸ Davin L B, and Lewis N G. An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism *Phytochem. Rev.* 2:257–288, 2003.

⁹ Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységou L, Plant Polyphenols: Definitions, Physico Chemical Properties, Biological Activities and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50:586-621, 2011.

¹⁰ Jung N, and Brase S. Synthesis of Natural Products on Solid Phases via Copper-Mediated Coupling: Synthesis of the Aristogin Family, Spiriformin A, and Hernandial *Eur. J. Org. Chem.* 26:4494–4502, 2009.

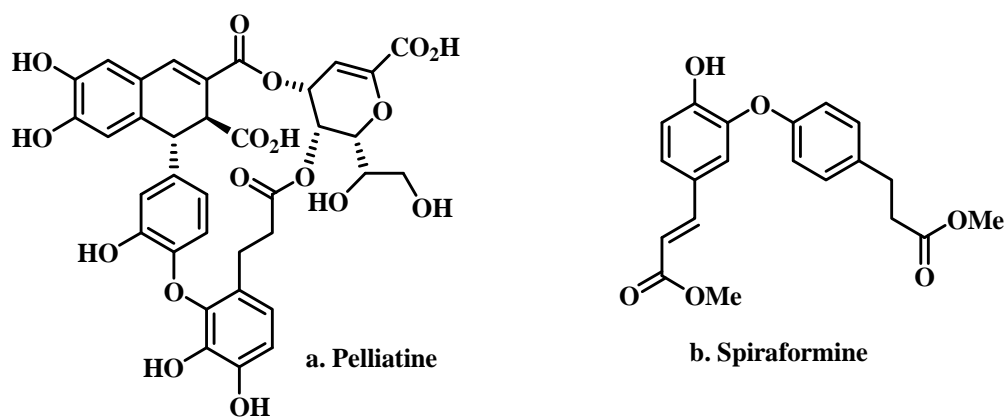
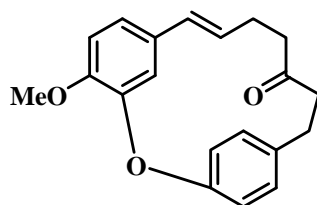


Figure. 53.

1.3. Diaryl éthers cycliques heptanoïdes

C'est une sous-classe d'une famille de produits naturels dérivés de la curcumine. Leur origine biosynthétique n'a pas encore été pleinement élucidée, mais l'un des cycles aromatiques constituant ces motifs semble être dérivé de la phénylalanine.⁴ L'ovalifoliolatin est un exemple de cette famille (Figure 54).



Ovalifoliolatin

Figure. 54.

Remarques

D'autres diaryl éthers naturels constituent une exception d'un point de vue biosynthétique. Ces derniers n'ont pas d'acide aminé comme précurseur dans leur biosynthèse. Parmi ces diaryl éthers, nous pouvons citer :

La gerfeline, un produit naturel utilisé comme inhibiteur de la géranylgeranyl diphosphate (GGPP) synthase. La gerfeline est extraite à partir du bouillon de culture de *Beauveria felina* (Figure 55a).¹¹

¹¹ Sadequl Md I et al. Synthesis of Gerfelin and related analogous compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (10):2523-2528, 2006.

Les corynésidones et les corynéthers dotés d'une activité antioxydante sont des molécules naturelles issues d'extraits de champignons endophytes (Figure 55b).¹²

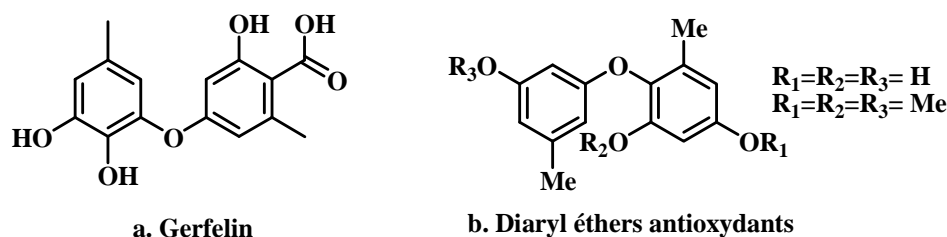


Figure. 55.

2. Diaryl éthers de synthèse

De nombreux produits de synthèse dotés d'activités thérapeutiques contiennent le motif diaryl éther, nous allons citer brièvement quelques uns :

Des aryl éthers possédant un fragment pyridinyl ou benzylamine (Figure 56 a et b) sont conçus pour être des inhibiteurs de recapture de la noradrénaline¹³ et de la sérotonine¹⁴ respectivement. Ces molécules peuvent par la suite devenir de bons candidats médicament pour le traitement de la dépression.

Des diaryl éthers dérivés du synthon 3-alkylnaphthalène (Figure 56c)¹⁵ sont des ligands des récepteurs d'œstrogènes (ER α , ER β).

Le 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol (Figure 56d)¹⁶ appelé triclosan est un agent antifongique et antibactérien à large spectre.

¹² Chomcheon P et al . Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassicola* L36. *Phytochemistry*.70:407–413, 2009.

¹³ Fish P V, Ryckmans T, Stobie A and Wakenhut F. [4-(Phenoxy)pyridin-3-yl]methylamines: A new class of selective noradrenaline reuptake inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:1795–1798, 2008.

¹⁴ Middleton D S et al. Designing rapid onset selective serotonin re-uptake inhibitors. 2: Structure–activity relationships of substituted (aryl)benzylamines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:4018–4021, 2008.

¹⁵ Fang J et al. Synthesis of 3-alkyl naphthalenes as novel estrogen receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:5075–5077, 2008.

¹⁶ Kalyon B D, and Olgun U. Antibacterial efficacy of triclosan-incorporated polymers. *American Journal of Infection Control.* 29(2):124-125, 2001.

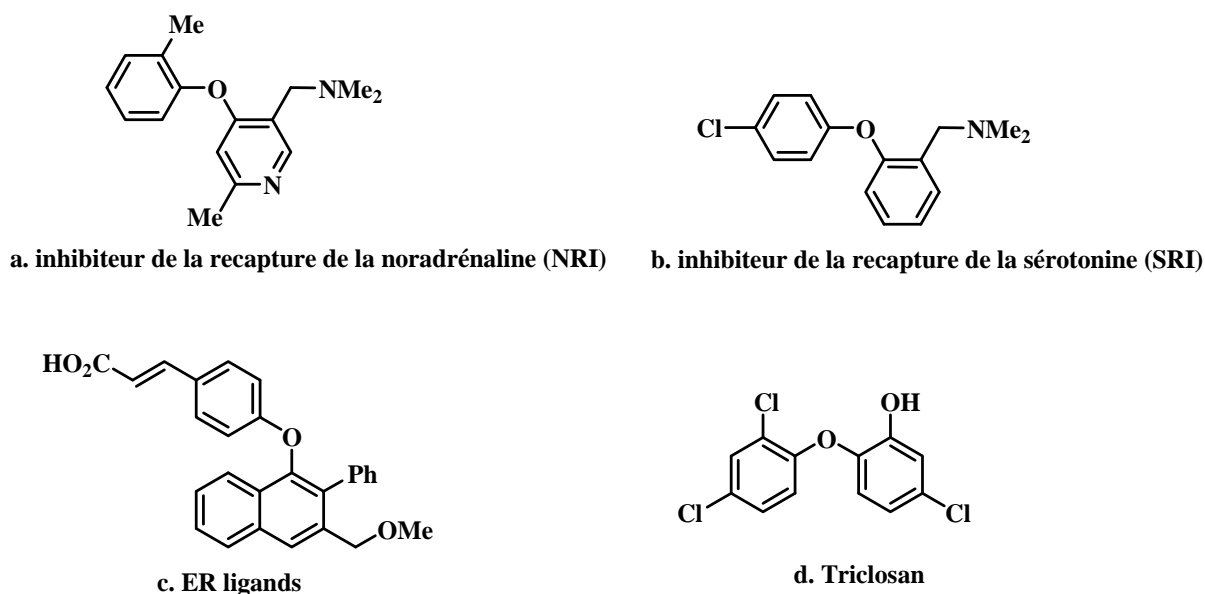


Figure. 56.

En conséquence, la formation du lien (ArOAr') occupe une place majeure en chimie organique. En 2008, la réaction de substitution sur un atome d'oxygène faisait partie des tops 10 des réactions les plus utilisées en occupant la 7^{ième} place.¹⁷

3. Formation de diaryl éther. Généralités et application à la synthèse des produits naturels

Les précédentes figures (49-56) illustrent la grande diversité structurale des diaryl éthers. Beaucoup d'entre eux ont un intérêt thérapeutique et ont ainsi attiré l'attention des chimistes. D'un point de vue rétrosynthétique, un diaryl éther peut être construit en réunissant un motif phénolique et un motif aromatique activé (Schéma 17).¹⁸

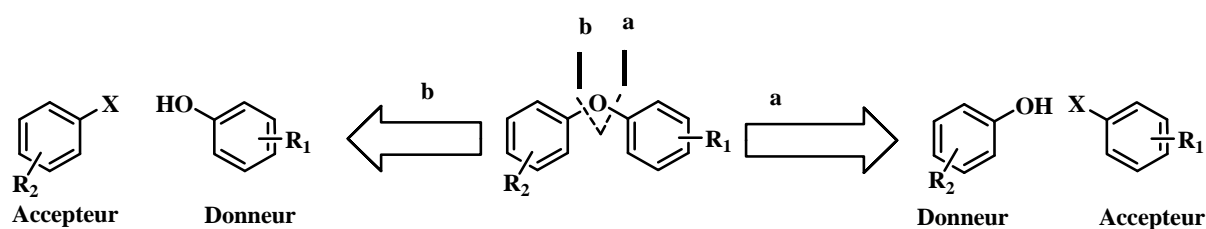


Schéma. 17. Rétrosynthèse du diaryl éther.

¹⁷ Roughley S D, and Jordan A M. The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 54:3451–3479, 2011.

¹⁸ Pitsinos E N, Vidali V P, and Couladouros E A. Diaryl Ether Formation in the Synthesis of Natural Products. *Eur. J. Org. Chem.* 1207–1222, 2011.

Plusieurs méthodes de synthèse pour la construction des diaryl éthers ont été développées, les principales catégories sont :

- Arylation des phénols catalysée par un métal,
- Réactions de substitution nucléophile aromatique,
- Le couplage oxydant.

Le (Schéma 18) représente la réaction générale de la formation du motif diaryl éther.

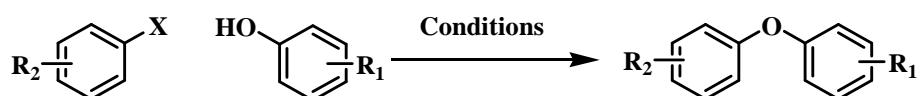


Schéma. 18. Réaction générale pour la formation du lien éther.

3.1. Couplages catalysés par un métal

Le cuivre et le palladium sont les deux métaux les plus utilisés pour l'arylation des phénols ou des phénolates. Les halogénures d'aryles et les acides arylboroniques sont les donneurs d'aryle les plus employés.^{19,20}

3.1.1. Couplages catalysés par le cuivre ou condensation d'Ullmann

Au début des années 1900, Fritz Ullmann et Irma Goldberg ont rapporté leur travail sur la réaction de substitution nucléophile aromatique en présence de cuivre. Cette réaction de couplage nécessite l'utilisation de quantités stœchiométriques de sels de cuivre avec des températures très élevées (≥ 200 °C) et un temps réactionnel très long. Selon la nomenclature de la littérature, la réaction de condensation d'Ullmann se réfère à une réaction entre un halogénure d'aryle et une amine, un phénol ou un thiophénol pour synthétiser les arylamines, les éthers ou les thioéthers correspondants. Cette condensation s'effectue en présence de cuivre (stœchiométrique ou catalytique). En revanche, la réaction d'Ullmann correspond à la synthèse de diaryles à partir d'halogénures d'aryle en présence de cuivre. (Schéma 19).^{21,22}

¹⁹ Marcoux J F, Doye S, and Buchwald S L. A General Copper-Catalyzed Synthesis of Diaryl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* 119:10539-10540, 1997.

²⁰ Sawyer J S. Recent Advances in Diaryl Ether Synthesis, *Tetrahedron* 56:5045-5065, 2000.

²¹ Sperotto E, van Klink G P M, Koten G V and de Vries J G. The mechanism of the modified Ullmann reaction. *Dalton Trans.* 39:10338-10351, 2010.

²² Jwanro H, Sévignon M, Gozzi C, Schulz E, and Lemaire M. Aryl-Aryl Bond Formation One Century after the Discovery of the Ullmann Reaction. *Chem. Rev.* 102:1359-1469, 2002.

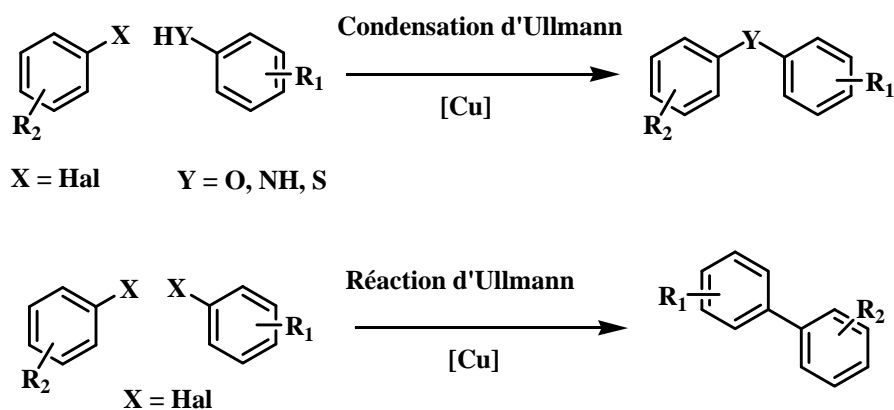
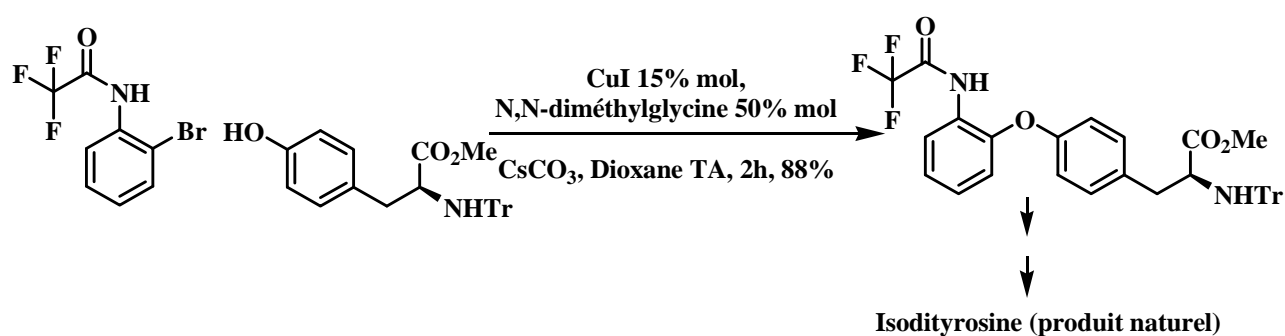


Schéma. 19. Condensation et Réaction d'Ullmann.

La condensation d'Ullmann a connu une renaissance à la fin du 20^{ème} siècle ; elle a pris le nom de « *modified Ullmann condensation* ». Les avantages de cette dernière résident dans l'ajout de ligands qui permettent i) l'utilisation catalytique du cuivre et ii) des conditions expérimentales de température et de temps réactionnel moins drastiques. Dans cette réaction le catalyseur c'est le complexe ligand-cuivre. Les ligands les plus décrits dans la littérature sont des chélateurs bidentés tels que les diamines, les acides aminés, la 1,10-phénantroline, les diols et autres ligands contenant des atomes d'azote et/ou d'oxygène.²²

Deux exemples d'utilisation de cuivre pour la synthèse des fragments diaryl éthers des composés naturels sont présentés ci-dessous. Dans le premier, ou le couplage se fait entre un phénol et un halogénure d'aryle (Schéma 20)²³, dans le second entre un phénol et un aryle boronique (Schéma 21)²⁴


 Schéma. 20. Etape d'éthérification dans la synthèse d'Isodityrosine.²³

²³ Cai Q, Zou B, and Ma D. Mild Ullmann-Type Biaryl Ether Formation Reaction by Combination of ortho-Substituent and Ligand Effects. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45:1276–1279, 2006.

²⁴ Cousin D, Mann J, Nieuwenhuyzen M, and Van den Berg H. A new approach to combretastatin D2. *Org. Biomol. Chem.* 4:54–62, 2006.

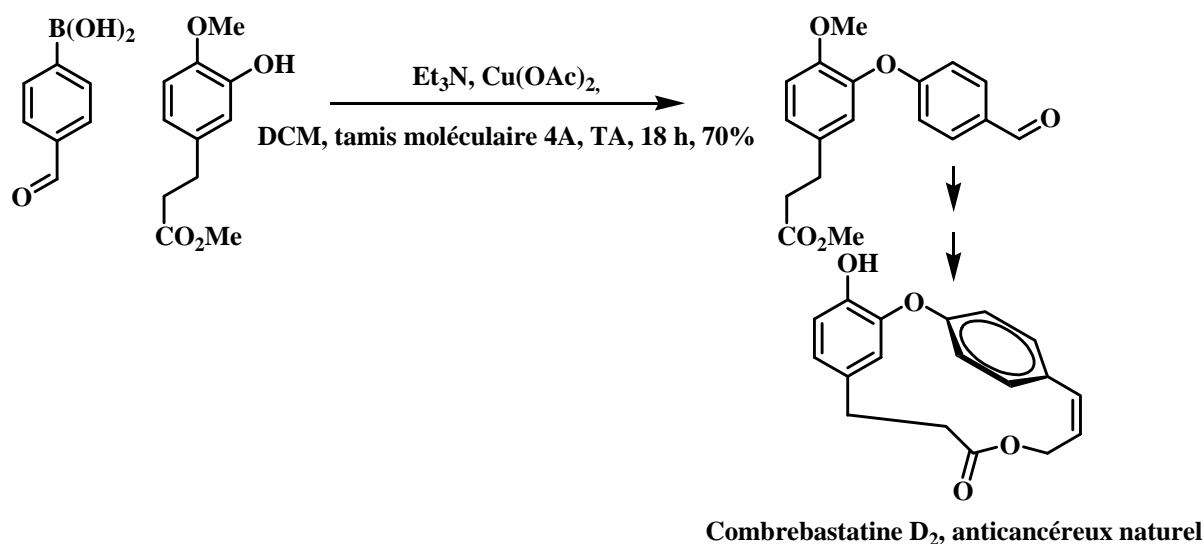


Schéma. 21. Etape d'éthérisation dans la synthèse de la Combrébastatine.²⁴

3.1.2. Couplages catalysés par le palladium

L'arylation catalysée par le palladium des phénols et des aryl-amines est une réaction importante connue sous le nom de couplage croisé de Buchwald-Hartwig.^{25,26}

Un exemple d'utilisation de cette méthode dans la synthèse de produits naturels est rapporté par Sadequl et al pour la synthèse de la gerefeline. Cette réaction est effectuée dans le toluène à 95 °C en présence d'acétate de palladium Pd(OAc)₂, d'une phosphine encombrée comme ligand (triphenylphosphine Ph₃P, ou la molécule 1) et d'une base (Schéma 22).²⁷

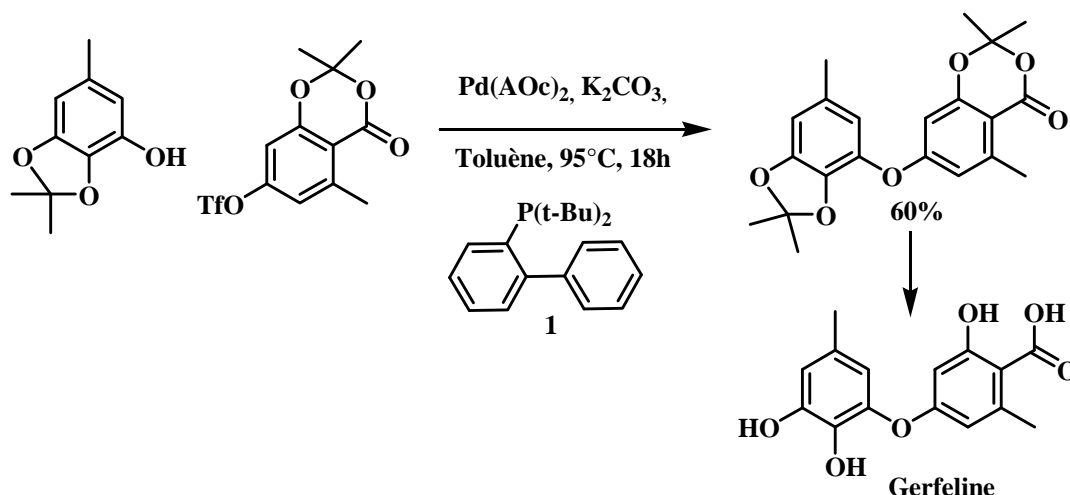


Schéma. 22. Etape d'éthérisation dans la synthèse de la Gerefeline.²⁷

²⁵ Anderson K W, Ikawa T, Tundel R E, and Buchwald L S. The Selective Reaction of Aryl Halides with KOH: Synthesis of Phenols, Aromatic Ethers, and Benzofurans. *J. Am. Chem. Soc.*128:10694-10695, 2006.

²⁶ Hartwig J F, Carbon-heteroatom bond formation catalysed by organometallic complexes. *Nature.* 455:18, 2008.

²⁷ Sadequl Md I et al. Synthesis of Gerefelin and related analogous compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (10):2523-2528, 2006.

3.2. Réaction de substitution nucléophile aromatique

Un halogénure d'aryle substitué par un ou plusieurs groupes fortement électro-attracteurs peut être couplé avec des phénolates en absence de catalyseur.²⁸

Le traitement des sels d'iodonium de diaryle avec des phénolates pour former des diaryl éthers est un exemple de substitution nucléophile. Cette méthode a été appliquée pour la construction de diaryl éthers à partir de dérivés halogénés stériquement encombrés.¹⁸

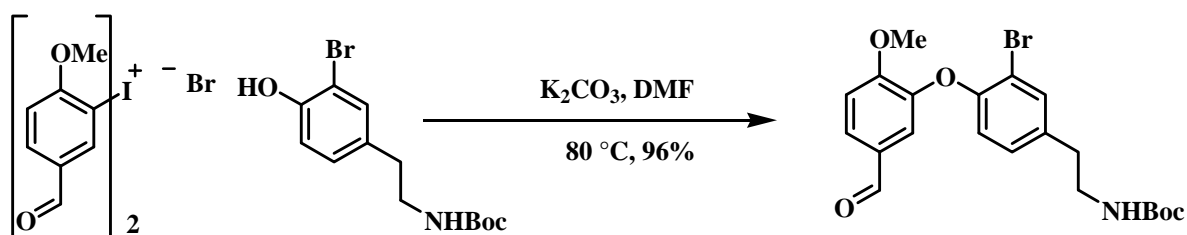


Schéma. 23. Substitution nucléophile aromatique. Synthèse d'un précurseur de la bastadine.²⁹

3.3. Le couplage oxydant

Les phénols di-ortho halogénés sont essentiels en tant que substrats pour cette méthode. Des excès de sels de thallium (III) (2-3 éq.) sont généralement utilisés comme oxydants pour donner un électron.³⁰ En raison de la forte toxicité de ces sels, des tentatives ont été faites pour les remplacer par des peroxydases en présence d' H_2O_2 .³¹

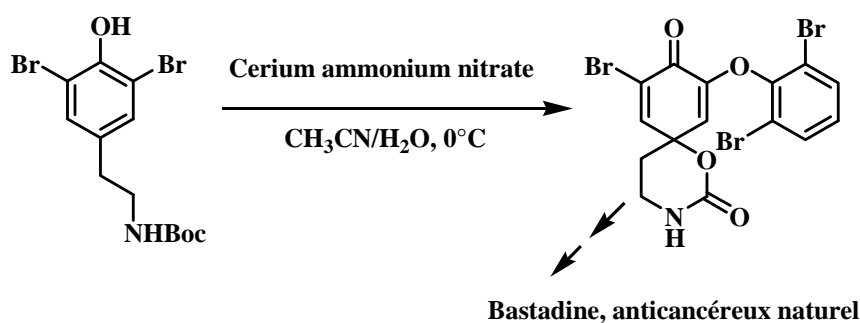


Schéma. 24. Couplage oxydant

²⁸ Zhu J P. SNAr Bases Macrocyclization via Biaryl Ether Formation: Application in Natural Product Synthesis *Synlett*. 133–144, 1997.

²⁹ Kotoku N, Tsujita H, Hiramatsu A, Mori C, Koizumi N, and Kobayashi M. Efficient total synthesis of bastadin 6, an anti-angiogenic brominated tyrosine-derived metabolite from marine sponge. *Tetrahedron*. 61:7211–7218, 2005.

³⁰ Konishi H, Okuno T, Nishiyama S, Yamamura S, Koyasu S, Terada Y. TTN oxidation of mixed halogenated phenols: Synthesis of vancomycin model diaryl ether possessing a chlorine atom. *Tetrahedron Lett*. 37:8791–8794, 1996.

³¹ Couladouros E A, Pitsinos E N, Moutsos V I, and Sarakinos G. A General Method for the Synthesis of Bastaranes and Isobastaranes: First Total Synthesis of Bastadins. *Chem. Eur. J*. 11:406 – 421, 2005.

4. Aperçu bibliographique de la formation de diaryl éthers catalysée par un métal

Parmi toutes les méthodes de couplage citées précédemment et dont nous avons donné quelques exemples, nous avons choisi de détailler le travail méthodologique rapporté dans la littérature pour les couplages catalysés par un métal (cuivre ou palladium).

4.1. Formation de diaryl éthers catalysés par le palladium

Dans les dix dernières années la formation de diaryl éthers catalysée par le palladium a été rapportée essentiellement par trois groupes, ceux de Buchwald,³² Beller³³ et Hartwig³⁴ ainsi que par Damien Prim³⁵ et Fritz Theil³⁶.

Je présenterai ici brièvement les travaux des trois premiers groupes cités.

Le groupe de Buchwald est le premier à rapporter une méthode générale d'obtention des diaryl éthers en utilisant un catalyseur au palladium. Le groupe a synthétisé et utilisé des ligands de type diaryl (ou naphthyl) dialkyl phosphine qui sont à la fois riches en électrons et stériquement encombrants (Figure 57).

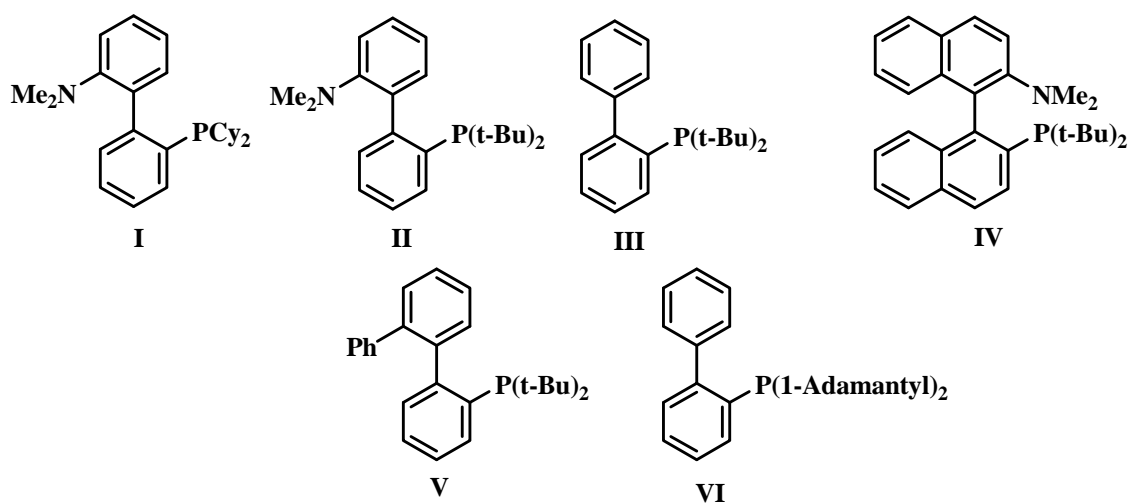


Figure. 57.

³² Aranyos A, Old D W, Kiyomori A, Wolfe J P, Sadighi J P, and Buchwald S L. Novel Electron-Rich Bulky Phosphine Ligands Facilitate the Palladium-Catalyzed Preparation of Diaryl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* 121(18):4369–4378, 1999.

³³ Harkal S, Kumar K, Michalik D, Zapf A, Jackste R, Rataboul F, Riermeier T, Monsees A, and Beller M. An efficient catalyst system for diaryl ether synthesis from aryl chlorides. *Tetrahedron Letters.* 46:3237–3240, 2005.

³⁴ Kataoka N, Shelby Q, Stambuli J P, and Hartwig J F. Air Stable, Sterically Hindered Ferrocenyl Dialkylphosphines for Palladium-Catalyzed C–C, C–N, and C–O Bond-Forming Cross-Couplings. *J. Org. Chem.* 67:5553–5566, 2002.

³⁵ Prim D, Campagne J M, Joseph D, and Andrioletti B. Palladium-catalysed reactions of aryl halides with soft, non-organometallic nucleophiles. *Tetrahedron.* 58:2041–2075, 2002.

³⁶ Theil F, Synthesis of diaryl ethers : A long-standing problem has been solved. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38(16):2345–2347, 1999.

Ainsi, en présence de Pd(OAc)₂, d'une base (NaH ou K₃PO₄), et du ligand approprié dans le toluène, la réaction thermique entre un halogénure d'aryle (Cl, Br) et un phénol substitué a conduit à la formation de diaryl éthers avec de bons rendements. Les auteurs, à travers une étude méthodologique, concluent que : i) les réactions des phénols ortho substitués avec des halogénures d'aryles désactivés conduisent aux meilleurs résultats de couplage en présence du ligand **III** (entrées 1, 2, tableau 13) ; ii) les systèmes phénoliques réagissent mieux avec des halogénures d'aryles ortho substitués et neutres en présence de ligand binaphthyl **IV** (entrées 3, 4, tableau 13) ; iii) les halogénures d'aryles ne possédant pas de substituant ortho réagissent mieux en présence du ligand **V** (entrée 5, tableau 13) ; iv) enfin les halogénures d'aryles très riches en électrons ne donnent des résultats satisfaisants qu'en présence du ligand **VI** (entrées 6, 7, tableau 13).

Tableau. 13. Formation de diaryl éthers catalysée par le palladium à partir d'halogénures d'aryles riche en électrons et neutres, (Rdt, pour rendement).

entrées	halogénure	phénol	produit	base	ligand	Rdt%
1				K ₃ PO ₄	III	92
2				K ₃ PO ₄	III	87
3				NaH	IV	79
4				NaH	IV	87
5				K ₃ PO ₄	V	83
6				K ₃ PO ₄	VI	87
7				K ₃ PO ₄	VI	73

Plus récemment, le groupe de Buchwald a introduit d'autres ligands aryl dialkyl phosphines (Figure 58) pour pallier à la non réactivité des phénols déficients en électrons ou des halogénures d'aryles possédant des groupements électro attracteurs ou ortho électro donneurs.³⁷ Dans ce cadre le ligand **VII** a conduit à la formation de diaryl éthers avec de bons rendements (entrées 1-4, tableau 14). Enfin, les halogénures d'aryles riches ou neutres en électrons réagissent mieux en présence des ligands **VII** ou **VIII** (entrées 5-7, tableau 14) alors que dans les cas les plus difficiles le ligand **IX** répond le mieux (entrée 8, tableau 14).

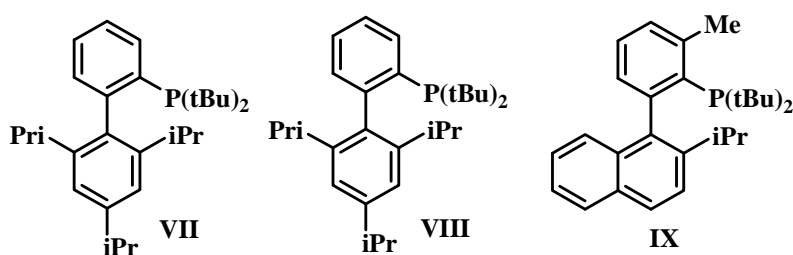
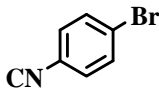
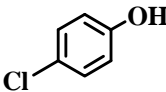
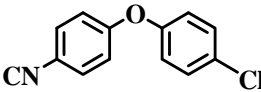
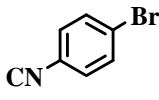
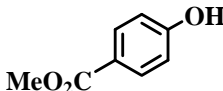
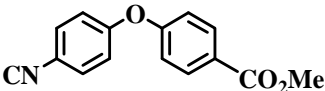
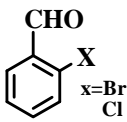
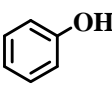
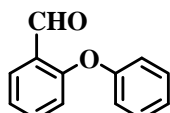
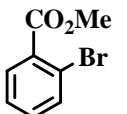
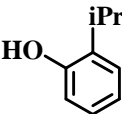
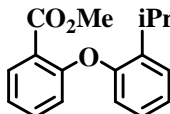
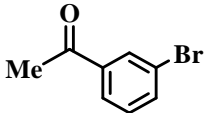
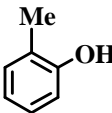
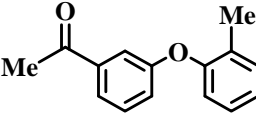
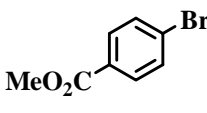
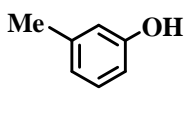
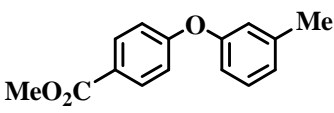
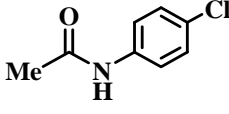
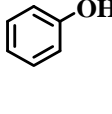
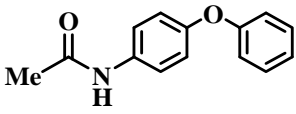

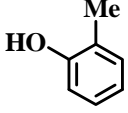
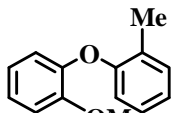


Figure. 58.

³⁷ Burgos C H, Barder T E, Huang X, and Buchwald S L. Significantly Improved Method for the Pd-Catalyzed Coupling of Phenols with Aryl Halides: Understanding Ligand Effects. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45(26):4321–4326, 2006.

Tableau. 14. Formation de diaryl éthers catalysée par le palladium (2%) à partir d'halogénures d'aryles riches en électrons et neutres et en présence de K_3PO_4 dans le toluène à 100°C.

*[Pd] = 3%, **[Pd] = 1%

entrée	Halogénure	phénol	produit	Ligand	Rdt%
1				VII	96
2				VII	82
3				VII	81*
4				VII	78*
5				VII	92**
6				VII	92
7				VII	95
8				IX	84

Le groupe de Beller s'est également intéressé aux réactions de couplage catalysées par le palladium pour la formation des diaryl éthers. Ainsi, en 2005 il rapporte des réactions de couplage en présence de N-acyl-2-phosphino pyrroles substitués comme ligands pour complexer le palladium (Figure 59).³³

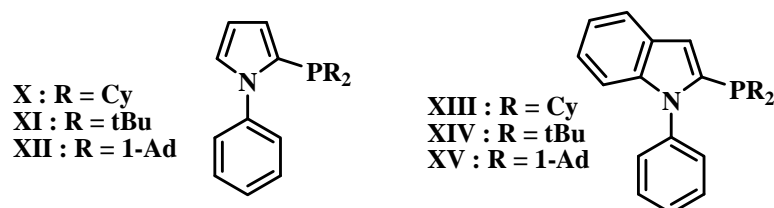
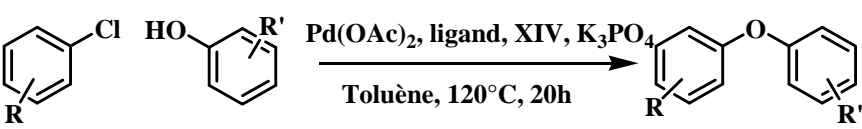
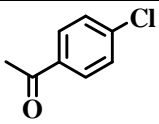
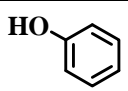
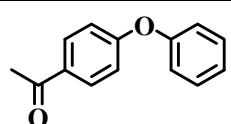
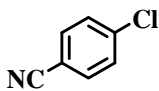
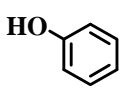
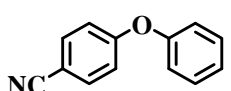
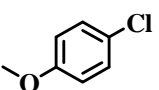
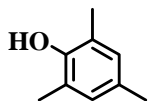
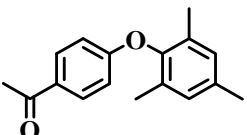


Figure. 59.

Les réactions sont effectuées en présence de Pd(OAc)₂, K₃PO₄ et du ligand dans le toluène à reflux. Le meilleur ligand semble être le dérivé indole possédant deux groupements *tert*-butyles encombrants sur l'atome de phosphore (ligand **XIV**), conduisant à de très bons rendements de formation des diaryl éthers pour les cas étudiés (Tableau 15).

Tableau. 15. Formation de diaryl éthers catalysée par le palladium à partir des chlorures d'aryls et des phénols.



entrée	Chlorures d'aryles	phénols	produits	Pd(OAc) ₂ mol%	Ligand	Rdt %
1				0.1	XIV	96
2				0.1	XIV	86
3				2	XIV	68

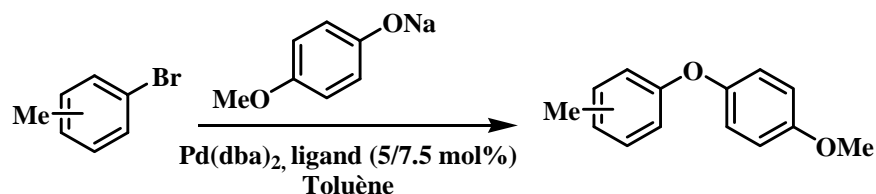
Plus récemment le même groupe a proposé un nouveau ligand à base de N-aryl imidazole-phosphino-di-adamantyl qui peut être utilisé avec succès pour le couplage des différents chlorures ou bromures d'aryles avec des phénols, crésols ou naphthols (Tableau 16).³⁸

³⁸ Hu T, Schulz T, Torborg C, Chen X, Wang J, Beller M, and Huang J. Efficient palladium-catalyzed coupling reactions of aryl bromides and chlorides with phenols. *Chem. Commun.* 47:7330-733, 2009.

Tableau. 16. Formation de diaryl éthers catalysée par le palladium à partir d'halogénures d'aryles et de phénols.

entrée	halogénure	phénol	produit	Rdt%
1				86
2				72
3				90
4				99
5				42

Le groupe de Hartwig a développé des ligands de type pentaphényl-ferrocényl di-*tert*-butyl phosphine capables de stabiliser le catalyseur au palladium pour les réactions de couplage dans des conditions douces.³⁴ Ainsi de manière générale, des bromures d'aryles peuvent réagir avec le *p*-méthoxyphénolate en présence de Pd(*dba*)₂ et du ligand dans le toluène conduisant aux diaryl éthers correspondants (Tableau 17).

Tableau. 17. Formation de diaryl éthers catalysée par le palladium en présence de pentaphényl-ferrocényl di-*tert*-butyl phosphine.


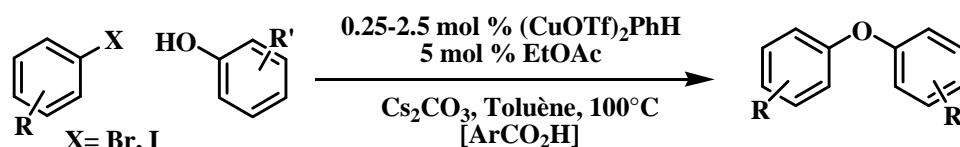
entrée	halogénure d'aryle	ligand	Temps(h)	T°C	Rdt%
1		Ph ₅ FcP(t-Bu) ₂	2	80°C	83
2		Me ₃ FcP(t-Bu) ₂	8	80°C	5
3		Ph ₅ FcP(t-Bu) ₂	24	40°C	>95
4		Ph ₄ FcP(t-Bu) ₂	8	80°C	11

4.2. Formation de diaryl éthers catalysée par le cuivre

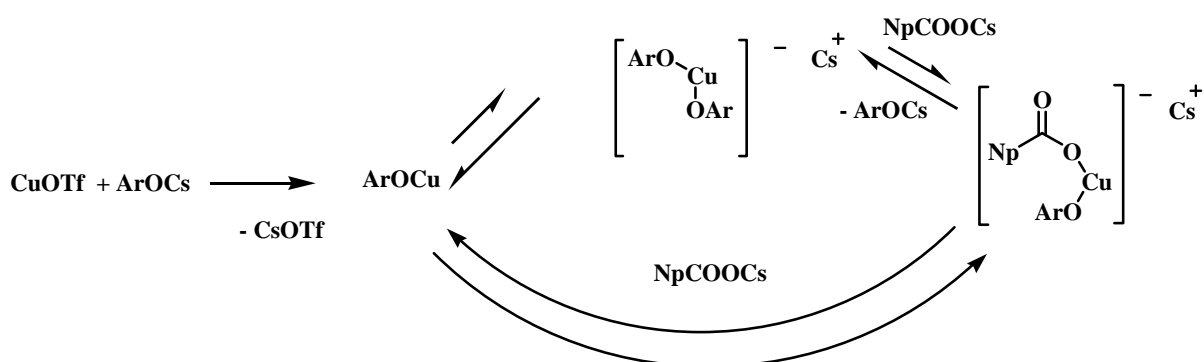
Le groupe de Buchwald a rapporté en 1997 une méthode de formation d'aryl éthers à partir de bromures ou iodures d'aryles avec différents phénols.³⁹ Elle est basée sur l'utilisation i) d'une quantité catalytique de complexe de cuivre, ii) de solvants non polaires comme le toluène, iii) de carbonate de césium comme base et iv) d'une quantité stœchiométrique d'acide carboxylique et plus particulièrement l'acide naphthoïque. Des halogénures d'aryles désactivés peuvent réagir dans ce cas avec des dérivés phénoliques peu solubles ou possédant des groupes électro-attracteurs (Tableau 18).

L'utilisation de carbonate de césium et d'acide naphthique est supposée améliorer la solubilité des deux intermédiaires réactionnels possibles (schéma 25).

³⁹ Marcoux J F, Doye S, and Buchwald S L. A General Copper-Catalyzed Synthesis of Diaryl Ethers. *J. Am. Chem. Soc.* 119:10539-10540, 1997.

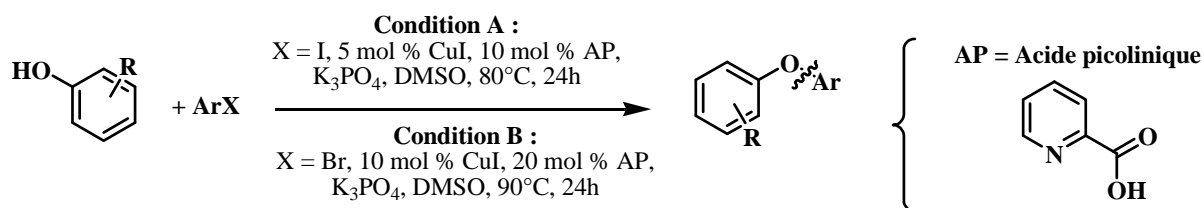
Tableau. 18. Formation de diaryl éthers catalysée par le triflate de cuivre (I), dans le toluène et en présence de carbonate de césium.


entrée	halogénure	phénol	produit	Eq phénol	Rdt %
1				2	20
2				2	79
3				1.4	81
4				2	79


Schéma. 25.

Plus récemment, le même groupe a rapporté la formation d'aryl éthers par couplage des phénols et d'iodures ou bromure d'aryles dans le DMSO en présence de K_3PO_4 et d'acide picolinique utilisé comme ligand du cuivre (Tableau 19).⁴⁰

⁴⁰ Maiti D, and Buchwald L S. Cu-Catalyzed Arylation of Phenols: Synthesis of Sterically Hindered and Heteroaryl Diaryl Ethers. *J. Org. Chem.* 75:1791-1794, 2010.

Tableau. 19. Formation de diaryl éthers catalysée par l'iodure de cuivre (I).


entrée	produit	Conditions	Rendement (%)
1		A	89
2		A	85 (90 °C)
3		B	83 (105 °C)
4		B	78

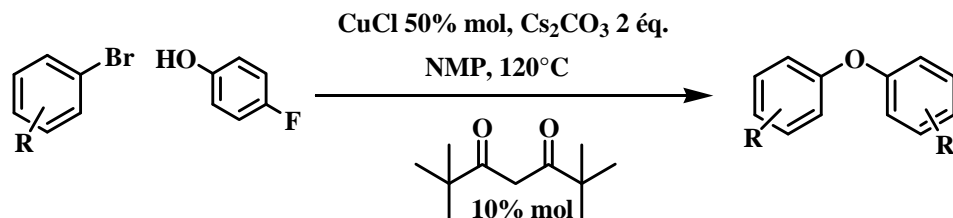
Cette méthode permet le couplage efficace entre partenaires qui sont substitués en ortho des positions phénols et halogénures.

En 2002, Song et al.⁴¹ utilisent un nouveau ligand, le 2,2,6,6 tétraméthylheptane-3,5-dione et la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) comme solvant. Les réactions sont effectuées en présence de CuCl/Cs₂CO₃. De manière générale, il apparaît que : i) ce système donne de très bons résultats avec des phénols possédant des groupes électrodonneurs et des halogénures possédant des groupes électro attracteurs ; ii) ce système donne de bons résultats pour des réactifs électro neutres ; iii) les phénols possédant des groupes fortement électro attracteurs ne se couplent pas. Dans ce cas les halogénures d'aryles se réduisent pour donner les aryles correspondants (Ar-Br en Ar-H par exemple) lors de la réaction du 4-hydroxybenzaldéhyde

⁴¹ Elizabeth Buck, Zhiguo Jake Song, David Tschaen, Peter G. Dormer, R. P. Volante, and Paul J. Reider. Ullmann Diaryl Ether Synthesis: Rate Acceleration by 2,2,6,6-Tetramethylheptane-3,5-dione. *Org. Lett.* 5(21):1623-1626, 2002.

avec le bromure de 2-méthoxy phényl) ; iv) les groupes en ortho ralentissent la réaction et conduisent à des rendements faibles. Le tableau 20 illustre quelques exemples de couplage.

Tableau. 20. Formation de diaryl éthers catalysée par le chlorure de cuivre (I) en présence de 2,2,6,6 tétraméthylheptane-3,5-dione.

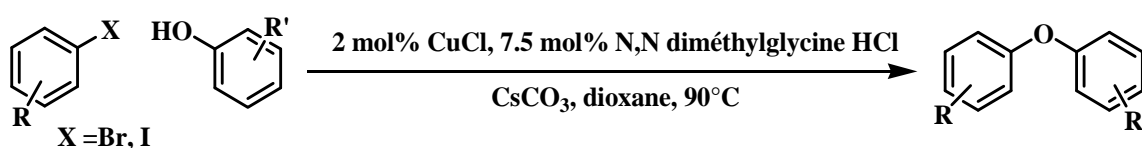


entrée	halogénure	produit	Temps (h)	Rdt%
1			10	55
2			1.5	82
3			4	60
4			15	85
5			24	61

Ma et Cai rapportent en 2003 l'utilisation du CuI/N,N diméthylglycine dans le dioxane comme solvant pour la formation des diaryl éthers.⁴² Le tableau 21 illustre les conditions de la réaction et quelques exemples de couplages effectués par cette approche.

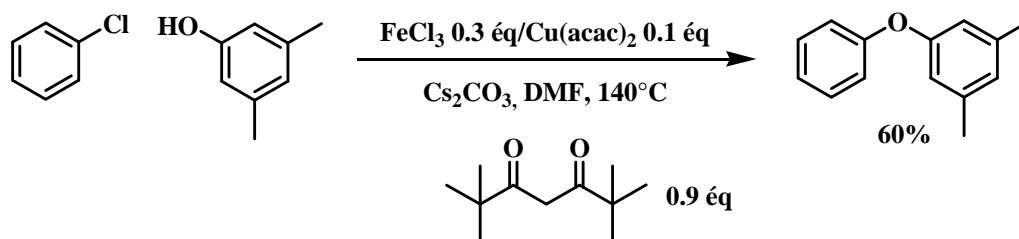
L'effet le plus marquant de leur étude concerne la possibilité de couplage des phénols encombrés (par ex. 2-méthoxy phénol) avec des halogénures d'aryles ortho substitués. Néanmoins dans les cas les plus difficiles 0,2 à 2 éq. de CuI doivent être utilisés. Ainsi, le 2-iodoanisole (entrée 4, tableau 21) couple avec le phénol en présence de deux équivalents de CuI/N,N diméthylglycine.

⁴² Ma Dand Cai Q. *N,N*-Dimethyl Glycine-Promoted Ullmann Coupling Reaction of Phenols and Aryl Halides. *Org. Lett.* 21:3799-3802, 2003.

Tableau. 21. Formation de diaryl éthers catalysée par le cuivre (I) en présence de N,N diméthylglycine.


entrée	halogénure	phénol	produit	Temps (h)	Rdt %
1				22	94
2				22	71
3				24	82 (0.2 mol CuCl, 0.6 mol de ligand)
4				24	80 (2 mol CuI et 2 mol de ligand)
5				24	64 (10 mol% CuI, 30 mol% de ligand, 105°C)

Le groupe de Taillefer a rapporté en 2006 l'utilisation de la 2,2,6,6 tétraméthyl heptane-3,5-dione en présence de $\text{FeCl}_3/\text{Cu}(\text{acac})_2$ dans le DMF et de Cs_2CO_3 comme base. Ce système de couplage est efficace entre le 3,5 diméthyl phénol et le chlorure de benzène ou des chlorures d'aryles désactivés par des substituants électro donneurs (Schéma 26).⁴³


Schéma. 26. Ethérification en présence de $\text{FeCl}_3/\text{Cu}(\text{acac})_2$.⁴³

Le même groupe rapporte en 2008 l'utilisation soit du FeCl_3 (Schéma 27) seul ou le bromure de cuivre (Tableau 22) dans les conditions précédemment décrites.⁴⁴

⁴³ Taillefer M, Xia N, Ouali A. *US* 2006, 60/818,334 and *PCT* 2007001836.

⁴⁴ Xia N, and Taillefer M. Copper or Iron catalyzed arylation of phenols from respectively aryl chlorides and aryl iodides. *Chem. Eur. J.* 14:6037-6039, 2008.

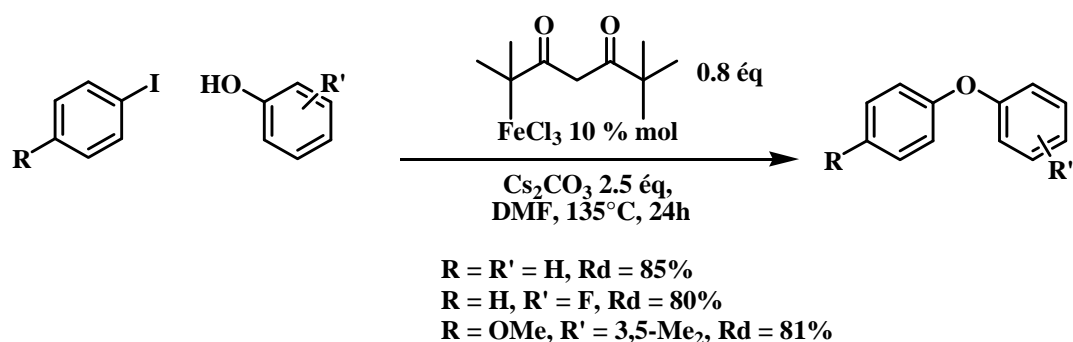
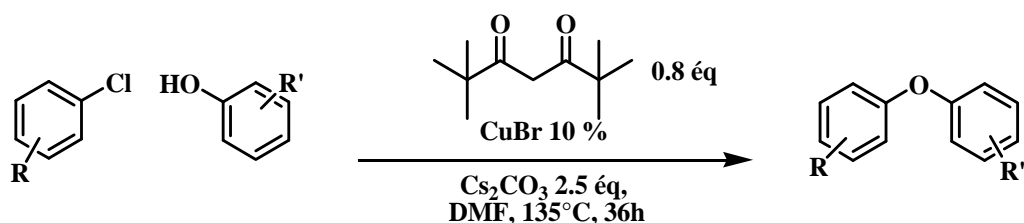


Schéma. 27. Formation de diaryl éthers en présence de FeCl_3 et de 2,2,6,6 tétraméthyl heptane-3,5-dione.

Tableau. 22. Formation de diaryl éthers catalysée par CuBr en présence de 2,2,6,6 tétraméthyl heptane-3,5-dione comme ligand.



entrée	R	R'	produit	Rdt%
1	H	F	<chem>c1ccc(Oc1ccc(F)cc1)cc1</chem>	40
2	4-OMe	4-Me	<chem>Cc1ccc(Oc1ccc(OC)cc1)cc1</chem>	53
3	4-MeCO	3,5-Me ₂	<chem>CC(=O)c1ccc(Oc1c(C)c(C)cc1)cc1</chem>	95

Enfin, Ding et al. rapportent en 2009 l'utilisation de 2-pyridylacétone comme ligand pour le cuivre (CuBr), la réaction se faisant en présence d'une base (Cs_2CO_3) et dans le DMSO dans des conditions thermiques (Tableau 23).⁴⁵

⁴⁵ Zhang Q, Wang D, Wang X, and Ding K. (2-pyridyl)acetone-promoted Cu-catalyzed O-arylation of phenols with aryl iodides, bromides, and chlorides. *J. Org. Chem.* 74:7187-7190, 2009.

Tableau. 23. Formation de diaryl éthers catalysée par le cuivre.

entrée	halogénure	phénol	temps (h)	Rdt %
1			18	92
2			18	97
3			18	65
4			24	50
5			24	70

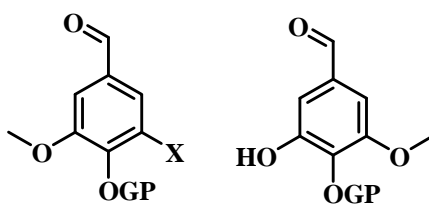
Les résultats montrent des réactions de couplage plus efficaces lorsque l'halogénure d'aryle possède des groupes électro attracteurs, que lorsque les phénols sont déficients en électrons ou lorsque les sites réactionnels sont ortho substitués et encombrés.

Objectif et résultats

L'objectif de cette partie de mon travail est centré sur l'élaboration des systèmes diaryl éthers issus du motif vanilline et leurs fonctionnalisations de manière symétrique ou dissymétrique sur la partie aldéhydique.

L'élaboration de ces molécules, l'étude de leurs activités antioxydantes et la comparaison des résultats obtenus avec ceux des composés diaryl issus de 5,5' bis vanilline pourraient nous donner des pistes de compréhension tant sur le plan fondamental que sur le plan structure/activité.

Pour la construction de ces systèmes, il faut tout d'abord construire les deux partenaires de couplage à savoir l'halogénure d'aryle et le phénol correspondant.



5. Synthèse de diaryl éthers dérivés de la vanilline

5.1. Etude méthodologique de la réaction du couplage aryl aryl éther

Le schéma 28 illustre la rétro-synthèse du synthon diaryl éther préalablement conçu, à savoir le 3-(5-formyl-2-hydroxy-3-méthoxyphénoxy)-4-hydroxy-5-méthoxybenzaldehyde (**17c**).

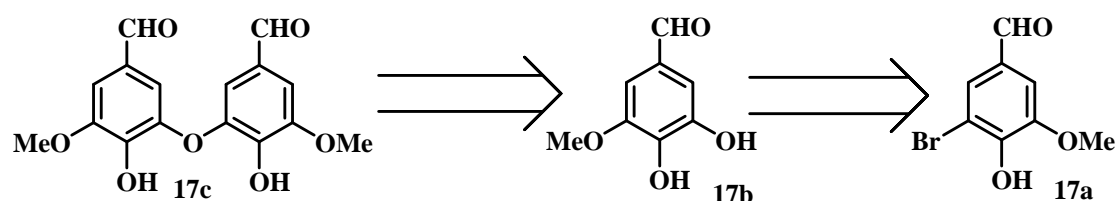


Schéma. 28. Rétrosynthèse de diaryl éthers : 3-(5-formyl-2-hydroxy-3-méthoxyphénoxy)-4-hydroxy-5-méthoxybenzaldehyde (**17c**).

Les deux composés de départ, à savoir la 5 bromovanilline (**17a**) et la 5-hydroxyvanilline (**17b**) sont nécessaires. Nous avons commencé notre synthèse à partir du produit commercial 5-bromovanilline (**17a**) pour synthétiser le dérivé hydroxylé correspondant (**17b**).

Buchwald et al.⁴⁶ ont rapporté l'hydroxylation des halogénures d'aryle en utilisant le tris (dibenzylidène) dipalladium (0) (Pd_2dba_3) comme catalyseur, le 2-di-*tert*-butylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényle (**VIII**, figure 58) comme ligand et l'hydroxyde de potassium comme base. Cette réaction se fait dans un mélange (eau/dioxane) à 130 °C.

D'autre part, Taillefer et al.⁴⁷ ont rapporté l'hydroxylation des halogénures d'aryle en utilisant l'iodure de cuivre (CuI) en tant que catalyseur, la 1,3-diphénylpropane-1,3-dione (**X**) comme ligand et KOH ou CsOH comme base dans un mélange ($\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$) à 130 °C.

Comme ces méthodes nécessitent des conditions expérimentales drastiques (haute température et base forte) et pour éviter toute réaction secondaire, les fonctions phénoxy ont été protégées par un groupe benzyle en traitant **17a** avec du bromure de benzyle et K_2CO_3 dans l'acétone en

⁴⁶ Anderson K W, Ikawa T, Tundel R E, and Buchwald L S. The Selective Reaction of Aryl Halides with KOH : Synthesis of Phenols, Aromatic Ethers, and Benzofurans. *J. Am. Chem. Soc.* 128:10694-10695, 2006.

⁴⁷ Tlili A, Xia N, Monnier F, and Taillefer M. A Very Simple Copper-Catalyzed Synthesis of Phenols Employing Hydroxide Salts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48:8725-8728, 2009.

présence d'une quantité catalytique de NaI sous reflux (Schéma 29a).⁴⁸ Le produit de cette réaction (4-benzyloxy-3-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde, **18**) a été obtenu avec un rendement de 90%.

Nous avons également synthétisé le dérivé 3-bromo-4,5-diméthoxybenzaldéhyde (**18b**) en utilisant les mêmes conditions précédemment décrites (**17a**, l'iodure de méthyle et K₂CO₃ dans l'acétone).⁴⁹ L'aldéhyde **18b** a été obtenu avec un rendement de 74% après purification sur gel de silice (Schéma 29b).

L'analogie hydroxylé du composé **18b** à savoir le 3-hydroxy-4,5-diméthoxybenzaldehyde (**19b**) a été synthétisé par la protection sélective de la fonction OH en *para* de l'aldéhyde du catéchol commercial (3-méthoxy-4,5-dihydroxybenzaldehyde). La réaction se fait dans l'acétone anhydre à reflux en présence de diméthyl sulfate (1.1 éq.) et du carbonate de sodium (1.1 éq.) pendant 5h. Le composé **18b** a été obtenu avec un rendement de 80% après purification sur gel de silice (schéma 29c).⁵⁰

Les composés **18b** et **19b** ont été synthétisés pour deux raisons, i) voir s'il y a des différences de réactivité lors de la réaction de couplage pour la formation des diaryl éthers portant des groupements benzyloxy ou méthoxy en *ortho* de la position de couplage et ii) synthétiser des composés cibles ne possédant pas des fonctions phénoliques afin d'évaluer leur impact sur les activités biologiques.

La première tentative de l'hydroxylation du composé **18a** a été menée suivant la procédure de Taillefer⁴⁷ et al. La réaction a été suivie par CCM jusqu'à la disparition totale du produit de départ. L'analyse par RMN ¹H, ¹³C du mélange brut indique la perte de la fonction aldéhydique et un mélange complexe de produits (entrée 1, tableau 24).

Nous avons par la suite entrepris la réaction d'hydroxylation suivant la procédure de Buchwald. Différentes conditions expérimentales ont été essayées et sont rapportées dans le tableau 24 (entrées 2-6). L'utilisation de Pd₂dba₃ (3 mol%), de ligand **VIII** (9% mol) et 2 équivalents de KOH dans un mélange de 30% d'eau dans le dioxane à 100 °C pendant 20 minutes conduit au composé **19a** avec le meilleur rendement (85%) après purification sur gel

⁴⁸ Ploypradith P, Cheryklin P, Niyomtham N, Bertoni DR, and Ruchirawat S. Solid-Supported Acids as Mild and Versatile Reagents for the Deprotection of Aromatic Ethers. *Org. Lett.* 9:2637-2640, 2007.

⁴⁹ Srikrishna A, and Satyanarayana G. Total synthesis of (G)-herbertenediol. *Tetrahedron.* 62:2892-2900, 2006.

⁵⁰ Ellis J E, and Lenger S R. A convenient synthesis of 3-hydroxy-4,5-diméthoxybenzaldehyde. *Synthetic communications.* 28:1517-1524, 1998.

de silice (entrée 6, tableau 24). Pour les réactions moins performantes (entrées 2-5, tableau 24) nous obtenons en dehors du produit de départ (0 à 15%, suivant les cas) un autre produit identifié par la suite (composé **20**, voir tableau 25).

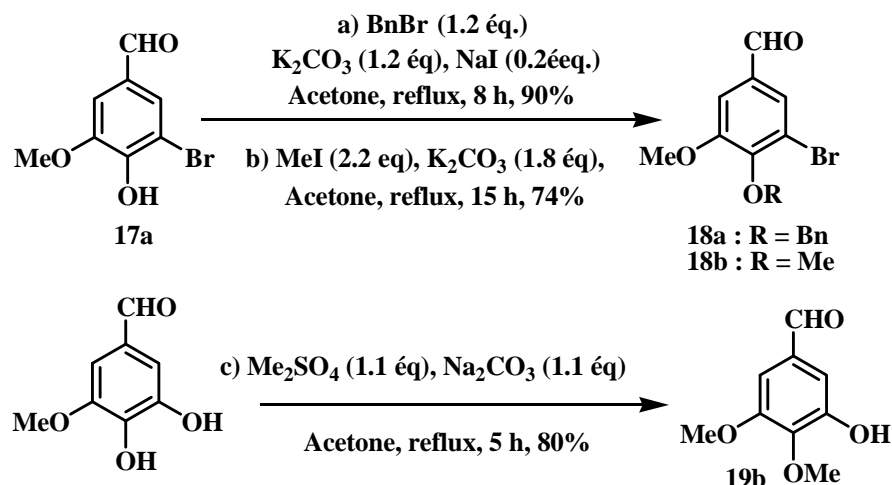
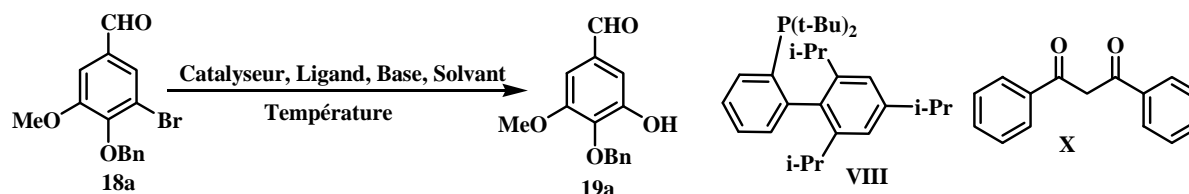


Schéma. 29. Protection de la fonction phénol du 5-bromovanilline.

Tableau. 24. Optimisation des conditions d'hydroxylation du 4-benzyloxy-3-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde.

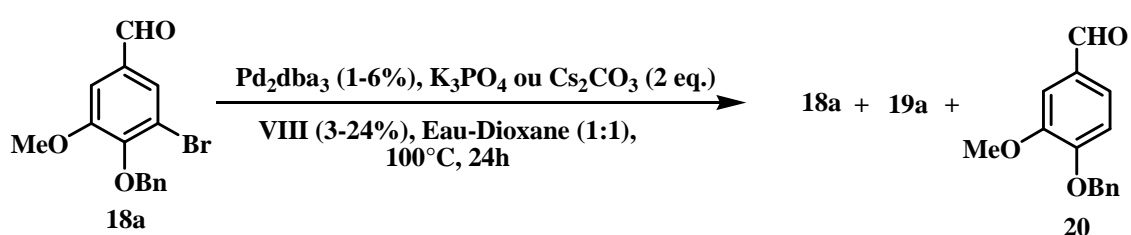


Entrée	Catalyseur	Ligand	Base	Solvant	Température	Temps	Rdt %
1	CuI 10%	X, 10%	CsOH/KOH	DMSO/H ₂ O	130 °C	24 h	0%
2	Pd ₂ dba ₃ 4%	VIII, 12%	KOH	Eau/Dioxane 3/7	100 °C	48 H	0%
3	Pd ₂ dba ₃ 4%	VIII, 12%	CsOH	Eau/Dioxane 3/7	100 °C	18 h	< 10 %
4	Pd ₂ dba ₃ 7%	VIII, 21%	KOH	Eau/Dioxane 3/7	100 °C	18 h	0%
5	Pd ₂ dba ₃ 5%	VIII, 20%	KOH	Eau/Dioxane 3/7	100 °C	50 mn	56 %
6	Pd ₂ dba ₃ 3%	VIII, 9%	KOH	Eau/Dioxane 3/7	100 °C	20 mn	85 %

Les mêmes auteurs (Buchwald, Taillefer)^{46,47} ont également rapporté dans la suite de leurs travaux respectifs de formations des systèmes phénoliques à partir d'halogénures d'aryles, des conditions légèrement modifiées pouvant en même temps conduire au couplage du dérivé halogéné avec le dérivé hydroxylé formé menant à la formation de diaryl éther symétrique (ou même dissymétrique).

Nous avons essayé d'appliquer les conditions rapportées par Buchwald pour la formation d'un diaryl éther à partir de 4-(benzyloxy)-3-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde (**18a**). Les conditions de cette réaction sont les mêmes que celles utilisées pour la réaction d'hydroxylation à l'exception de la base. La base forte (KOH) est remplacée dans ce cas par une base plus faible comme les carbonate de césium ou les phosphate de potassium K_3PO_4 . Dans tous les cas nous observons le produit de départ, des traces du composé hydroxylé (**19**) et un autre composé qui a été purifié et identifié comme étant le dérivé **20** issu de la déhalogénéation du produit **18a** (tableau 25).

Tableau. 25. Tentative de synthèse du synthon diaryl éther en une étape (one pot).



Entrée	Catalyseur	Ligand	Solvant (1:1)	Base (2 éq)	Temps/Temp	Rdt 20 %
1	Pd_2dba_3 6%	VIII 24%	Eau/Dioxane	K_3PO_4	24h, 90°C	35
2	Pd_2dba_3 1%	VIII 3%	Eau/Dioxane	K_3PO_4	5h, 90°C	traces
3	Pd_2dba_3 1%	VIII 3%	Eau/Dioxane	Cs_2CO_3	24h, 100°C	traces
4	Pd_2dba_3 5%	VIII 15%	Eau/Dioxane	Cs_2CO_3	5h, 100°C	33

Nous avons par la suite, et dans un premier temps évalué si la réaction de couplage fonctionne dans des conditions d'Ullmann classiques.

Nos premiers résultats en présence d'un équivalent de cuivre métallique dans différents solvants ne montraient aucun couplage entre les composés **18a** et **19a**.

En même temps Abe et al⁵¹ ont rapporté la synthèse d'un précurseur de dérivé méthylé de l'isorugosin B. Ce composé possède un fragment diaryl éther hautement fonctionnalisé.

Les auteurs décrivent la synthèse du fragment methyl 2-(3-benzyloxy-5-formyl-2-methoxyphenoxy)-3,4,5-trimethoxybenzoate (**23**) par couplage d'Ullmann. Ainsi en présence de 6 équivalents de cuivre métal dans le DMF à reflux, les réactifs methyl 2-bromo-3,4,5-trimethoxybenzoate (**21**, 3éq.) et 3-(benzyloxy)-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (**22**, 1éq.) couplent pour conduire au dérivé **23** avec un rendement de 73% (schéma 30A).

⁵¹ Shioe K, Sahara Y, Horino Y, Harayama T, Takeuchi Y, Abe H. Syntheses of all-methylated ellagitannin, isorugosin B and rugosin B. *Tetrahedron*. 67:1960-1970, 2011.

Dans des conditions similaires nous avons fait réagir les dérivés halogénés **18a** et **18b** avec les dérivés hydroxylés correspondants (**19a** et **19b**). La réaction est effectuée dans le DMF à reflux en présence de différents équivalents de cuivre métallique. Les réactions ont été suivies par CCM. Le meilleur résultat est obtenu après 1h de chauffage à reflux lorsqu'on utilise 5 équivalents de Cu(0). Les composés diaryl éthers **24a** et **24b** sont ainsi obtenus avec des rendements de 48% et 45% respectivement après purification sur gel de silice (Schéma 30B).

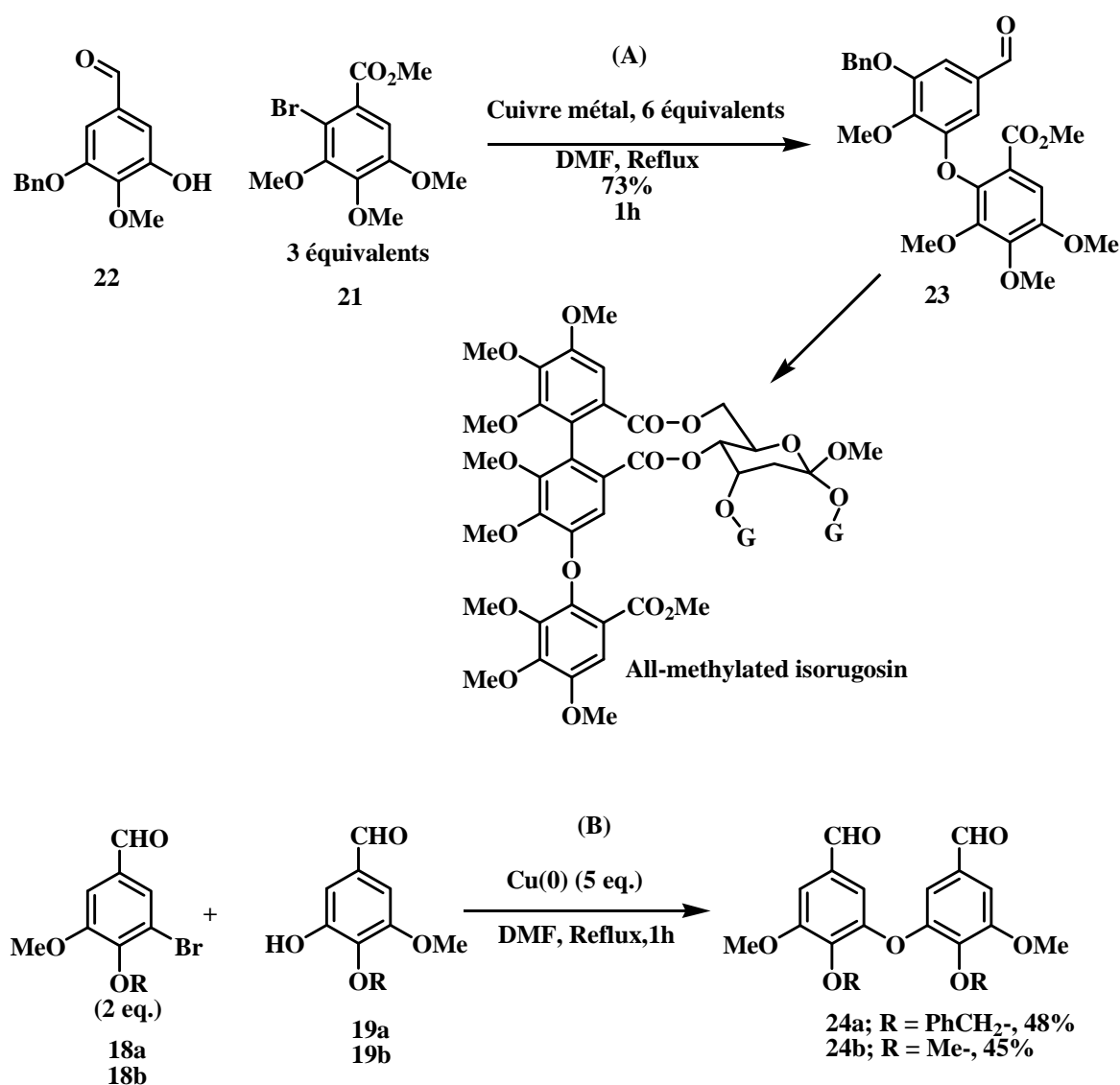


Schéma. 30. Synthèse du diaryl éthers hautement fonctionnalisés.

Cette méthode présente deux points faibles : un rendement moyen et l'utilisation d'un large excès de cuivre métallique.

Pour cela nous avons orienté nos efforts vers une recherche méthodologique afin de trouver des conditions opératoires pouvant répondre à ces points faibles (quantités catalytiques de cuivre, conditions, rendement).

Au début nous avons essayé de comprendre l'impact de chaque substituant du cycle aromatique, et en particulier ceux de la position *ortho* par rapport aux groupements OH phénoliques et aux halogènes dans des réactions de couplage aryl aryl éther catalysées par le cuivre (I).

Nous avons essayé d'évaluer et valider les contraintes stériques et électroniques qui pourraient influencer la réaction de couplage entre ces deux partenaires hautement fonctionnalisés. Ainsi, des réactions exploratoires ont été menées sur la base d'utilisation de systèmes phénoliques ou halogénures simples et l'étude de leur réactivité respectivement avec l'halogénure (**18a**) ou le phénol (**19a**) d'intérêt.

La réaction de couplage a été testée dans des conditions de la littérature où un groupement électrodonneur et éventuellement encombrant est présent en *ortho* de la position de couplage.

La réactivité du 4-(benzyloxy)-3-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde (**18a**) a été testée vis-à-vis du phénol, en présence de CuI (20 mol%), d'acide picolinique (40% mol), K₃PO₄ (2 éq.) dans le DMSO ou le toluène à 110 °C pendant 48 h.⁵² En dehors des deux produits de départ on a obtenu le composé **20** avec un rendement de 27% (schéma 31).

D'autre part la réactivité du 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-méthoxybenzaldéhyde (**19a**) a été testée vis-à-vis d'un halogénure d'aryle simple (iodobenzène). Dans les mêmes conditions que précédemment nous avons obtenu en dehors des deux produits de départ le produit de couplage, le composé 4-(benzyloxy)-3-méthoxy-5-phenoxybenzaldehyde (**27**) avec un rendement de 30% après purification sur gel de silice (schéma 32).

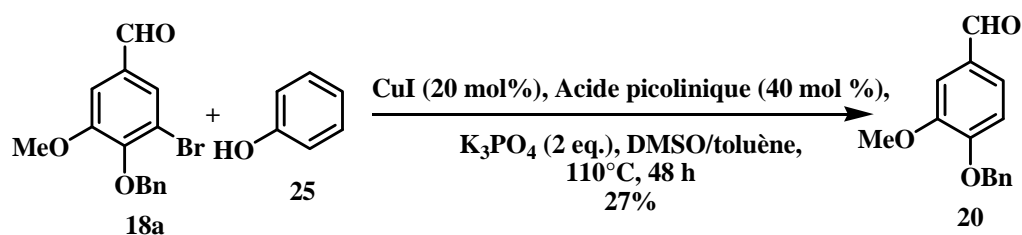


Schéma. 31.

⁵² Maiti D, and Buchwald L S. Cu-Catalyzed Arylation of Phenols: Synthesis of Sterically Hindered and Heteroaryl Diaryl Ethers. *J. Org. Chem.* 75:1791-1794, 2010.

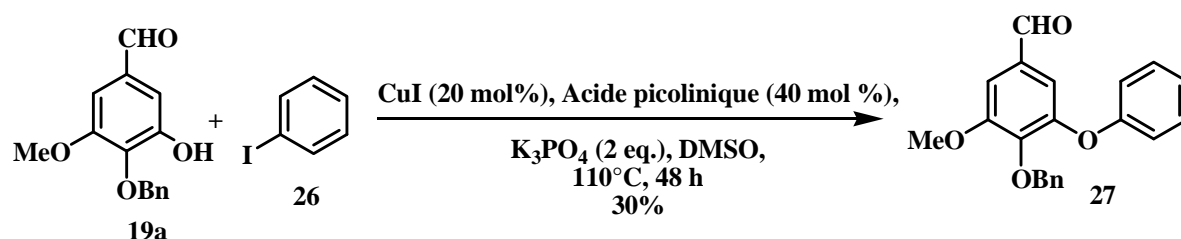
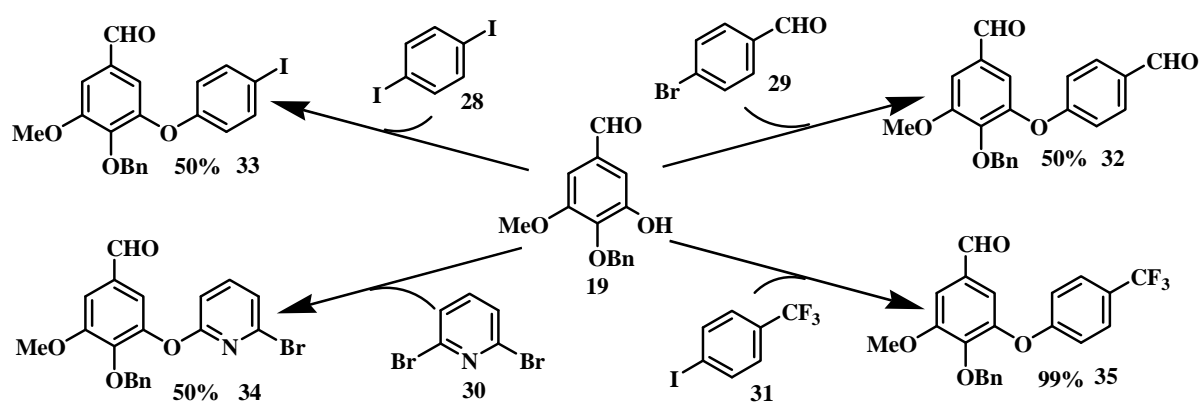


Schéma. 32.

Pour valider ces résultats d'autres halogénures d'aryles ont été testés tels que le 1,4-diiodobenzène (**28**), le 4-bromobenzaldéhyde (**29**), le 4-iodotrifluorométhylbenzène (**30**) et le 2,6-dibromopyridine (**31**) (schéma 33).



Conditions: CuI (20 mol%), acide picolinique (40 mol %), K₃PO₄ (2 éq.), DMSO, 100°C, 72 h.

Schéma. 33.

Dans tous les cas nous obtenons les produits de couplage avec des rendements de 50% (composés **31-34**) et avec un rendement presque quantitatif pour le composé **35**. Le fort caractère électroattracteur du groupement trifluorométhyle peut expliquer le rendement élevé obtenu.

Ces premiers résultats pourraient indiquer que quand le phénol (ne possédant aucun groupe électrodonneur) est utilisé comme nucléophile vis-à-vis du 4-(benzyloxy)-3-bromo-5-méthoxybenzaldéhyde (**18a**) les conditions utilisées ne conduisent qu'au dérivé déhalogéné (pas de réaction de couplage). En revanche le phénol **19a** possédant des groupements électrodonneurs est utilisé dans les réactions de couplages avec des halogénures d'aryle (Br, I) simples, les conditions utilisées peuvent conduire aux dérivés couplés.

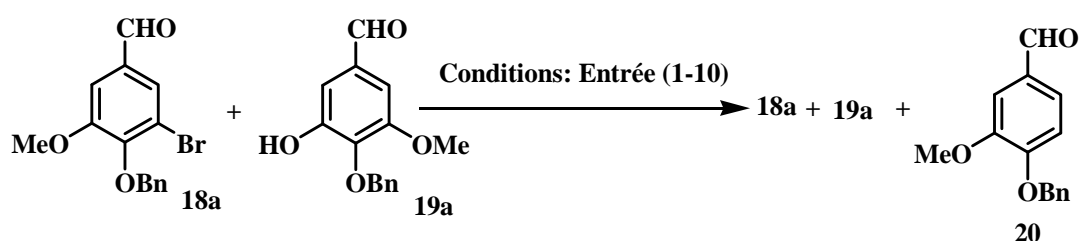
Nous pouvons donc conclure, qu'un groupement électrodonneur en ortho de la fonction phénol et/ou un groupement électroattracteur en ortho et/ou en para de l'halogène peuvent favoriser la réaction de couplage.

Sur cette base, nous avons ensuite tenté la synthèse du diaryl éther désiré (**24a**) dans des conditions de couplage catalysés par CuI. Les différentes conditions expérimentales sont présentées dans le tableau 26. Malheureusement, nos efforts ont échoué.

L'utilisation de l'acide picolinique⁵² a conduit dans des conditions de température élevée (entrée 1, 7-9) à un seul produit de réaction, le composé déhalogéné (**20**) avec un rendement de 20 à 31%.

L'utilisation d'autres ligands tels que la phénanthroline,⁵² la N,N-diméthylglycine⁵³ ou l'acide 1-naphtoïque a abouti à des résultats similaires. Aucune réaction de couplage n'a été observée.

Tableau. 26. Essais de couplages catalysés par le cuivre (I).



Entrée	Catalyseur	Ligand	Solvant	Base 2éq	Temps/Temp	Rdt 20 %
1	CuI 10mol%	Acide picolinique 20mol%	DMSO	K ₃ PO ₄	100°C, 72 h	31
2	CuI 10mol%	N,N-diméthylglycine 20mol%	dioxane	Cs ₂ CO ₃	90°C, 22 h	38
3	CuI 10mol%	N,N-diméthylglycine 20mol%	toluène	Cs ₂ CO ₃	110°C, 22 h	31
4	CuI 10mol%	N,N-diméthylglycine 20mol%	DMSO	Cs ₂ CO ₃	110°C, 22 h	31
5	CuI 10mol%	1,10 phénantroline 20mol%	toluène	Cs ₂ CO ₃	110°C, 22 h	29
6	CuI 10mol%	1,10 phénantroline 20mol%	DMSO	K ₃ PO ₄	90°C, 24 h	31
7	CuI 10mol%	Acide picolinique 20mol%	toluène	Cs ₂ CO ₃	110°C, 78 h	28
8	CuI 10mol%	Acide picolinique 20mol%	DMSO	Cs ₂ CO ₃	110°C, 78 h	30
9	CuI 10mol%	Acide picolinique 20mol%	DMF	Cs ₂ CO ₃	140°C, 78 h	20
10	CuOAc 10mol%	Acide 1-naphtoïque 2.5 éq	toluène	Cs ₂ CO ₃	110°C, 78 h	30

De même que lorsque nous utilisons le 4-(benzyloxy)-3-iodo-5-méthoxybenzaldéhyde (**37**) comme partenaire halogéné de couplage, nous avons récupéré le composé **20** avec un rendement de 24%. Le composé **37** a été obtenu par protection de la fonction phénol du composé commercial 3-iodo-4-hydroxy-5-méthoxybenzaldéhyde dans des conditions précédemment décrites (schéma 34).

⁵³ Ma Dand Cai Q. *N,N*-Dimethyl Glycine-Promoted Ullmann Coupling Reaction of Phenols and Aryl Halides. *Org. Lett.* 21:3799-3802, 2003.

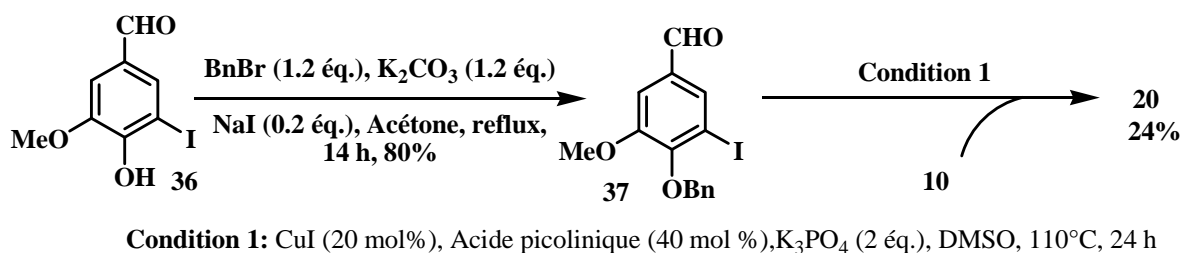


Schéma. 34.

Les résultats précédents pourraient indiquer que la réaction de couplage est délicate par la nature des deux motifs que nous voulons associer et qui sont hautement fonctionnalisés et/ou par la nature de l'agent de couplage catalytique utilisé (CuI) et les conditions expérimentales associées.

En choisissant de maintenir les deux réactifs aromatiques, composés (**18a** et **19a**) pour la réaction de couplage nous avons recherché si d'autres agents de Cu(I) pourraient être utilisés.

En effet, nous avons pensé à utiliser le triflate de cuivre Cu(OTf) composé commercialisé et stabilisé dans le toluène (CuOTf)₂.PhCH₃. Le triflate de cuivre est un complexe plus dissociant que CuI et d'autre part il présente une meilleure solubilité dans les milieux réactionnels étudiés.³⁹

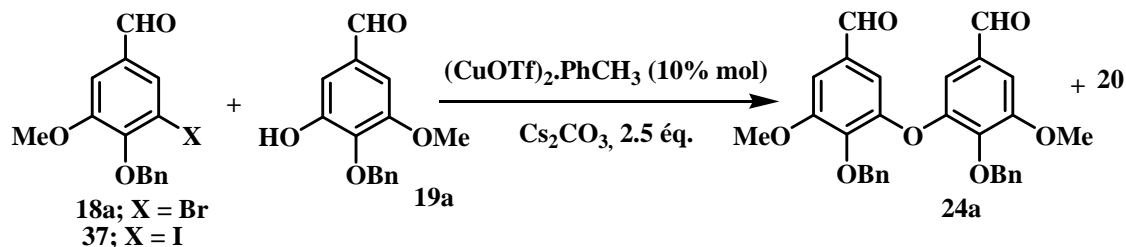
Les premiers essais ont été effectués dans le toluène en présence de (CuOTf)₂.PhCH₃ (10% mol), de l'acide 1-naphtoïque (2,5 équ), du Cs₂CO₃ (2,5 équ) et un tamis moléculaire 4°A (250 mg/mmol). La réaction a été effectuée à reflux (110 °C), sous argon et contrôlée par CCM. Après 24h ou 78h de réaction, en dehors des deux produits de départ nous observons la formation du diaryl éther désiré (**24a**) avec un rendement de 30%. Cependant nous avons observé aussi, une formation de 21% du sous produit **20** (tableau 27).

La même réaction effectuée dans le DMSO conduit à un mélange complexe de nouveaux dérivés (disparition totale des produits de départ). Aussi, l'augmentation de la température à 140 °C n'a pas augmenté le rendement du composé **24a**.

Enfin, le meilleur résultat a pu être obtenu en effectuant la réaction dans le DMF. Ainsi en utilisant une quantité catalytique de (CuOTf)₂.PhCH₃ (10% mol), de l'acide 1-naphtoïque (2,5 équ), du Cs₂CO₃ (2,5 équ) dans le DMF à 140 °C, nous observons après 8h de réaction la disparition totale des produits de départ, la formation du composé désiré **24a** et du composé déhalogéné (**20**) avec un rendement de 18%. Les rendements en composé **24a** sont de 61% (pour le composé **18a**, X = Br) et de 78% (pour le composé **37**, X = I).

En conclusion nous avons rapporté ici pour la première fois la synthèse efficace d'un diaryl éther hautement fonctionnalisé dans des conditions catalytiques de cuivre.

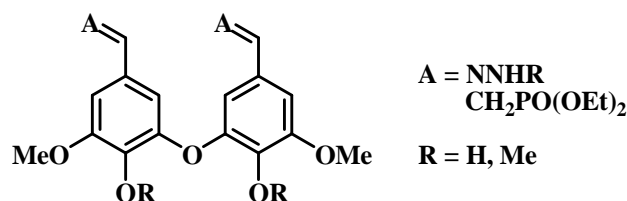
Tableau. 27. Couplages catalysés par $(\text{CuOTf})_2 \cdot \text{PhCH}_3$.



Entrée	Ligand	Solvant	Temps/T°C	Rdt 24a/20 %
11	Acide 1-naphtoiq. 2.5éq	toluène	110°C, 24 h	30/18
12	Acide 1-naphtoiq. 2.5éq	toluène	110°C, 78 h	30/25
13	Acide 1-naphtoiq. 2.5éq	toluène	140°C, 24 h	29/21
14	Acide 1-naphtoiq. 2.5éq	DMSO	140°C, 6 h	mélange
15	Acide 1-naphtoiq. 2.5éq	DMF	140°C, 8 h	61 ou 78/ 18

5.2. Déprotection de la fonction benzyle du diaryl éther (24a)

Ayant réussi à trouver une méthode optimale pour la synthèse des motifs diaryl éthers, nous nous sommes intéressés à la construction des composés cibles symétriques possédant les fonctions hydrazones et phosphonates de structure générique :



Nous aborderons d'abord la synthèse des systèmes phénoliques ($\text{R} = \text{H}$). Pour la synthèse des dérivés hydrazones il faudra comme ceci était le cas pour les systèmes bisaryl hydrazones (chapitre II, composés **16a-j**), procéder à la déprotection des fonctions phénoliques par élimination des groupes benzyles avant l'installation des motifs hydrazones.

En ce qui concerne la synthèse des phosphonates correspondants, la séquence de synthèse est inversée i.e, d'abord l'installation des motifs phosphonates, puis la déprotection des groupements benzyles.

Ainsi dans les deux cas il faudra rechercher des méthodes efficaces pour la libération des fonctions phénols.

En dehors de l'hydrogénolyse (qui a conduit à la réduction de fonction aldéhyde du composé **20**), plusieurs autres méthodes sont décrites dans la littérature pour l'élimination d'un groupement benzyle et libération de phénol.

Ploypradith et al⁴⁸ décrivent l'utilisation d'une résine acide (Amberlyst 15®) pour l'élimination des groupements protecteurs de type benzyle et l'obtention des phénols. Les auteurs ont effectué la réaction de déprotection de la fonction OH d'une vanilline protégée par un benzyle. La réaction se fait dans le toluène à 110°C en présence de 1.1 équivalents de résine pendant 2h. La vanilline déprotégée a été obtenue avec un rendement de 98% (schéma 35A).

Okano et al⁵⁴ décrivent aussi la déprotection d'un dérivé phénolique par élimination du groupe protecteur benzyle en présence d'un acide de Lewis. Les auteurs ont effectué la réaction dans le DCM à -78°C pendant 20 mn en présence de l'acide de Lewis BCl₃ (2 éq) et du pentaméthylbenzène (5éq). Ils ont obtenu le dérivé déprotégé avec un rendement de 85% (schéma 35B).

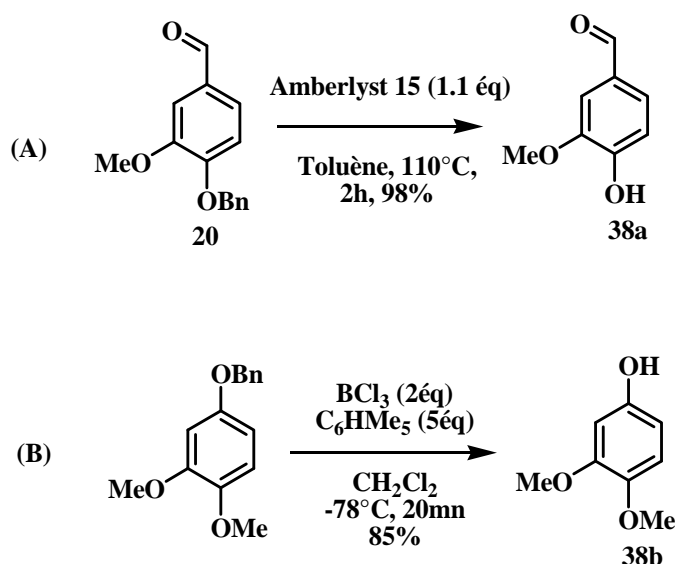


Schéma. 35. Déprotection des fonctions phénols.

Nous avons appliqué ces deux méthodes au composé diaryl éther (**24a**).

⁵⁴ Okano K, Okuyama K, Fukuyama T, Tokuyama H. Mild Debenzylation of Aryl Benzyl Ether with BCl₃ in the Presence of Pentamethylbenzene as a Non-Lewis-Basic Cation Scavenger. *Synlett*. 13 :1977–1980, 2008.

La réaction du **24a** en présence de la résine acide (Amberlyst 15®) (2.2 éq) dans le toluène à reflux a été suivie par CCM. Le résultat optimal a été obtenu après 3h de reflux conduisant après purification délicate (présence de plusieurs sous produits non identifiés) à l'obtention du dérivé déprotégé **17c** avec un rendement de 48% (schéma 36).

Nous avons également effectué la déprotection en présence de l'acide de Lewis BCl_3 (4 éq) et du pentaméthylbenzène (3éq) dans le DCM à -78°C pendant 30 min. Le composé **17c** a été obtenu après purification sur gel de silice avec un rendement de 90% (schéma 36).

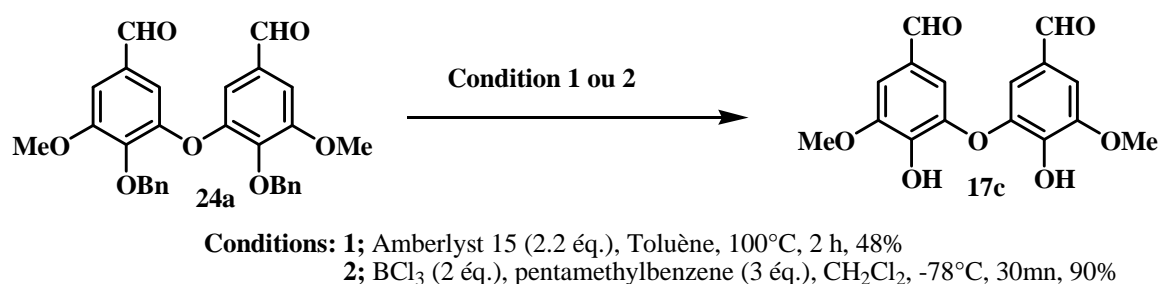


Schéma. 36. Déprotection de **24a**.

5.3. Synthèse des hydrazones

La synthèse des hydrazones a été effectuée comme dans le cas de l'utilisation des motifs bisaryls (chapitre II, composés **16a-j**).

Ainsi en utilisant deux équivalents stricts des différentes hydrazines et en les faisant réagir avec le composé **17c** dans l'éthanol à reflux pendant une nuit, nous obtenons après filtration à chaud des solides formés, les hydrazones correspondantes avec des rendements variant de 62%-76% (Tableau 28).

Comme dans le cas de BVH, afin d'évaluer l'impact des fonctions hydroxyles, nous avons également synthétisé le dérivé **42**. Pour cela le diaryl éther 5,5'-oxybis(3,4-diméthoxybenzaldehyde) (**24b**) a été couplé dans les mêmes conditions que précédemment avec deux équivalents stricts d'hydralazine, conduisant au dérivé **42** obtenu avec un rendement de 62% (schéma 37).

Tableau. 28. Conditions expérimentales pour l'obtention des diaryl éthers hydrazones.

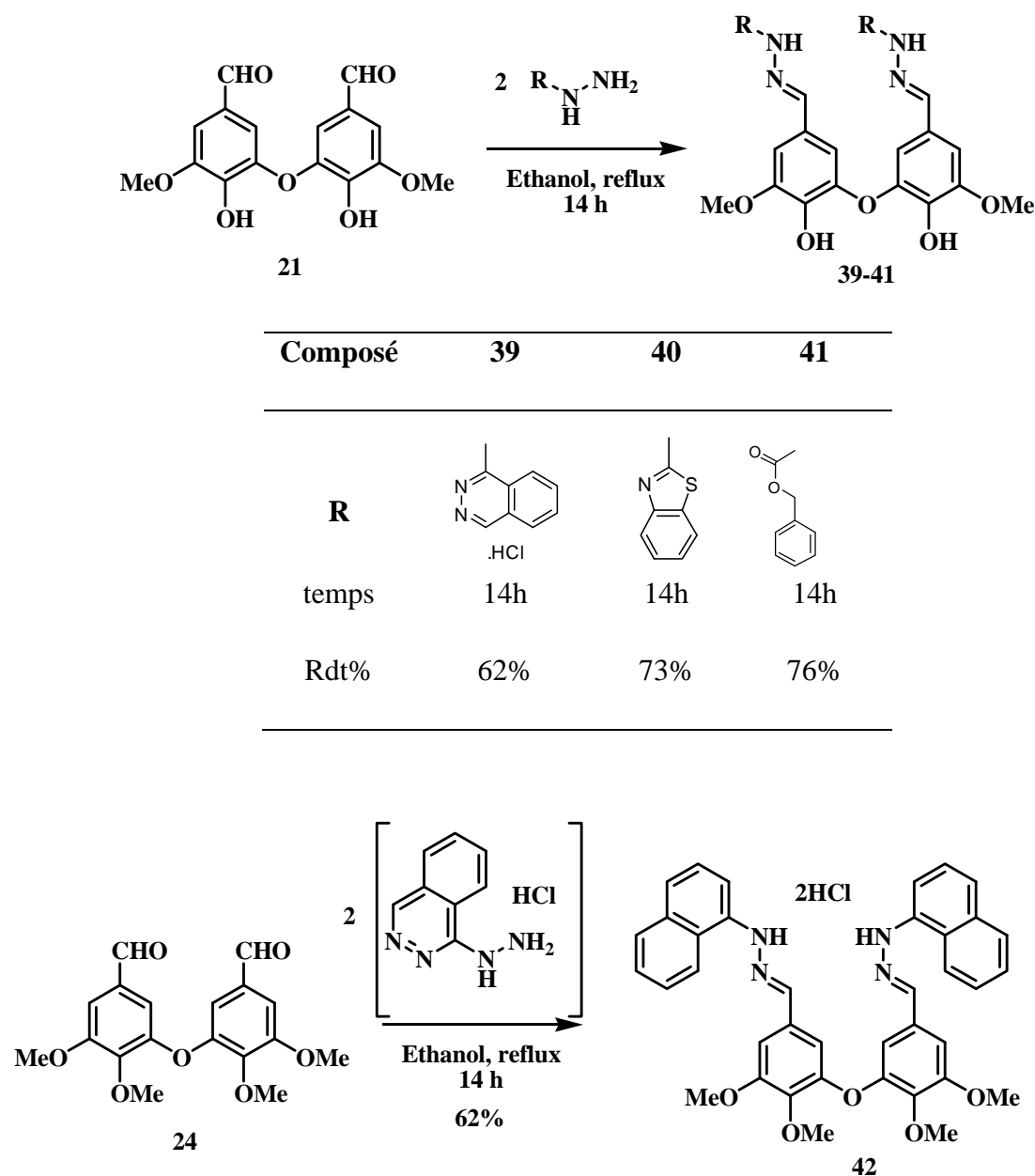


Schéma. 37.

5.4. Synthèse des phosphonates

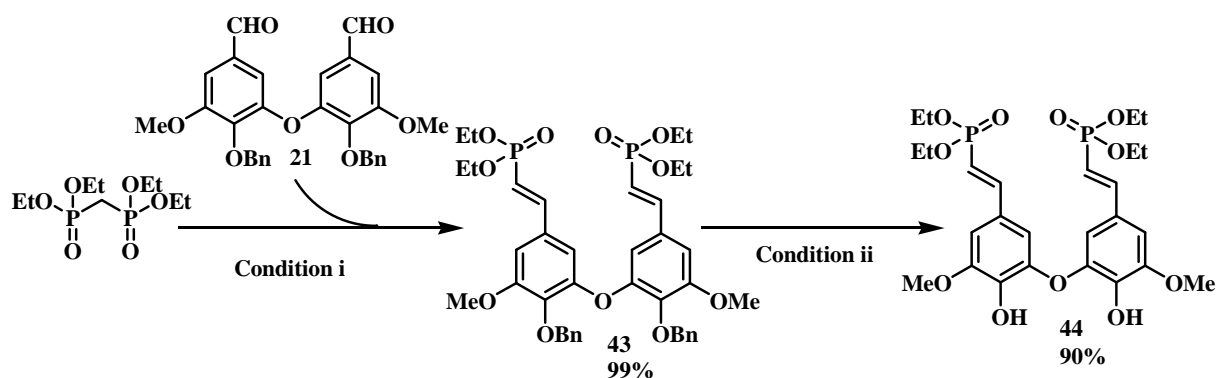
Le diaryl éther bis-phosphonate (**43**) a été préparé par la condensation de Wadsworth-Emmons entre le diaryl éther protégé (**24a**) et le méthylènediphosphonate de tétraéthyle.⁵⁵

⁵⁵ Kennedy K, Baltas M, Douglas K T, Duran H, Embrey K J, Giraudon J G, McKie J H, Grima-Pettenati J, Gorrichon L. Rational inhibitor design, synthesis and NMR spectroscopic study by transferred nuclear overhauser spectroscopy of novel inhibitors of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a critical enzyme in lignification. *J. Enzyme Inhibition*. 14:217-237, 1999.

Le n-butyllithium (4.12 éq) réagit avec la diisopropylamine (4.12 éq) à -78°C pendant 30 min pour former le diisopropylamidure de lithium ou LDA. Le méthylènediphosphonate de tétraéthyle (4.12 éq) est ajouté à cette solution. L'anion ainsi formé stabilisé par effet mésomère, réagit ensuite sur le composé **24a**. L'intermédiaire formé subit une réaction d'élimination thermique des groupements hydroxyles et diéthylphosphonates conduisant au composé (**43**) avec un rendement de 99 % (Schéma 38).

Après obtention de diaryl éther phosphonate, nous avons étudié la déprotection des fonctions phénoliques par élimination des groupements protecteurs benzyles.

La méthode de déprotection en utilisant l'acide de Lewis BCl_3 (4 éq), du pentaméthylbenzène (3éq) dans le DCM à basse température (-78°C) conduit après 30 min de réaction le dérivé débenzylé **44** avec un rendement de 90% après purification sur gel de silice (Schéma 38).⁵⁴



Condition i: Diphosphonates (4.1 éq.), n-BuLi (4.1 éq.), Diisopropylamine (4.1 éq.), THF, -78°C , 1h puis reflux, 2 h
Condition ii: BCl_3 (2 éq.), pentaméthylbenzène (3éq.), CH_2Cl_2 , -78°C , 1 h

Schéma. 38.

Dans le cas des aryl éthers phosphonates, nous avons également essayé un autre acide de Lewis *ie.* AlCl_3 pour la déprotection des groupements benzyles. La réaction a été effectuée dans le DCM à température ambiante en présence de différents équivalents d'acide d' AlCl_3 en excès (8, 16 ou 24 éq) et de la N,N-dimethylaniline également en excès (20, 15 et 30 éq) respectivement.⁵⁶

Sans avoir fait une étude méthodologique approfondie nous obtenons des résultats intéressants en terme de diversité des produits de réaction. Une étude plus approfondie, néanmoins mériterait d'être faite.

⁵⁶ Akiyama T, Hirofujii H, and Ozaki S. AlCl_3 -N,N-Dimethylaniline : A new benzyl and ether cleavage reagent. Tet. Lett. 32(10):1321-1324, 1991.

Ainsi en présence d' AlCl_3 et de base (16 et 15 équivalents respectivement) nous obtenons après 20 min de réaction le dérivé didebenzylé (**44**) avec un rendement de 66% après purification sur gel de silice (schéma 39).

L'utilisation d'un excès moindre d' AlCl_3 (8 éq) en présence d'un excès plus large de N,N-diméthylaniline (20 éq) conduit après 30 min de réaction au dérivé monodebenzylé (**45**) obtenu avec un rendement de 23% (réaction non optimisée, schéma 39).

Enfin l'utilisation d'un excès plus large des deux réactifs (AlCl_3 , 24 éq et N,N-diméthylaniline, 30 éq) conduit après un temps de réaction plus long (1h) à la formation de deux composés, le dérivé didébenzylé (**44**, 19% de rendement) ainsi qu'un composé identifié (**46**) possédant un motif catéchol (perte de groupements benzyle et méthyle) et un motif phénolique avec un rendement de 44% (schéma 39).

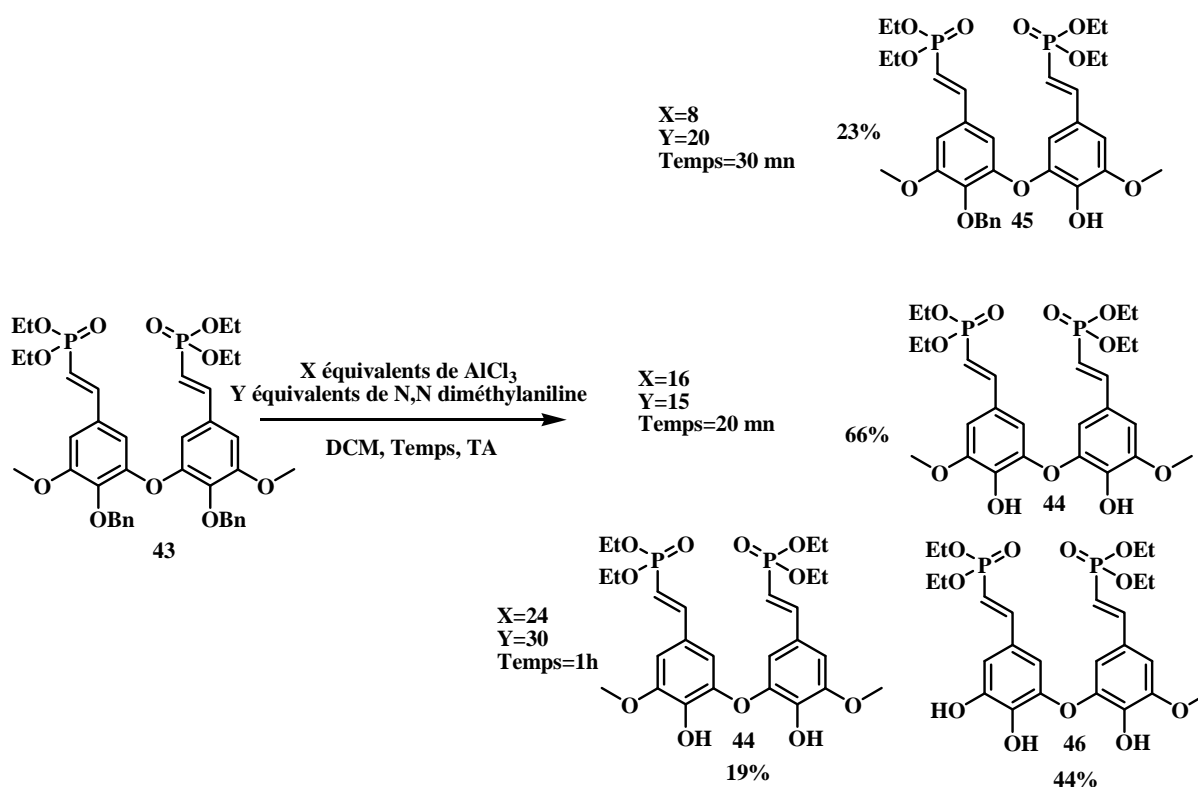


Schéma. 39.

5.5. Evaluation du pouvoir antioxydant et cytoprotecteur des diaryl éthers symétriques hydrazones et phosphonates

Je rapporte ici nos résultats préliminaires concernant les activités antioxydantes de certains systèmes diaryl éthers synthétisés.

Les composés dont nous avons étudié l'activité sont présentés dans le schéma 40. Nous avons également évalué l'activité des deux composés phosphonates : le composé symétrique **44** présentant deux motifs vanilline à savoir une fonction *p*-OH dans chaque cycle aromatique et le composé dissymétrique **46** présentant un motif catéchol sur un cycle et un motif vanilline sur le second.

En ce qui concerne les diaryl éthers hydrazones elles sont toutes symétriques avec des motifs hydrazones différents. Un de ces composés ne possède aucune fonction phénolique (**42**).

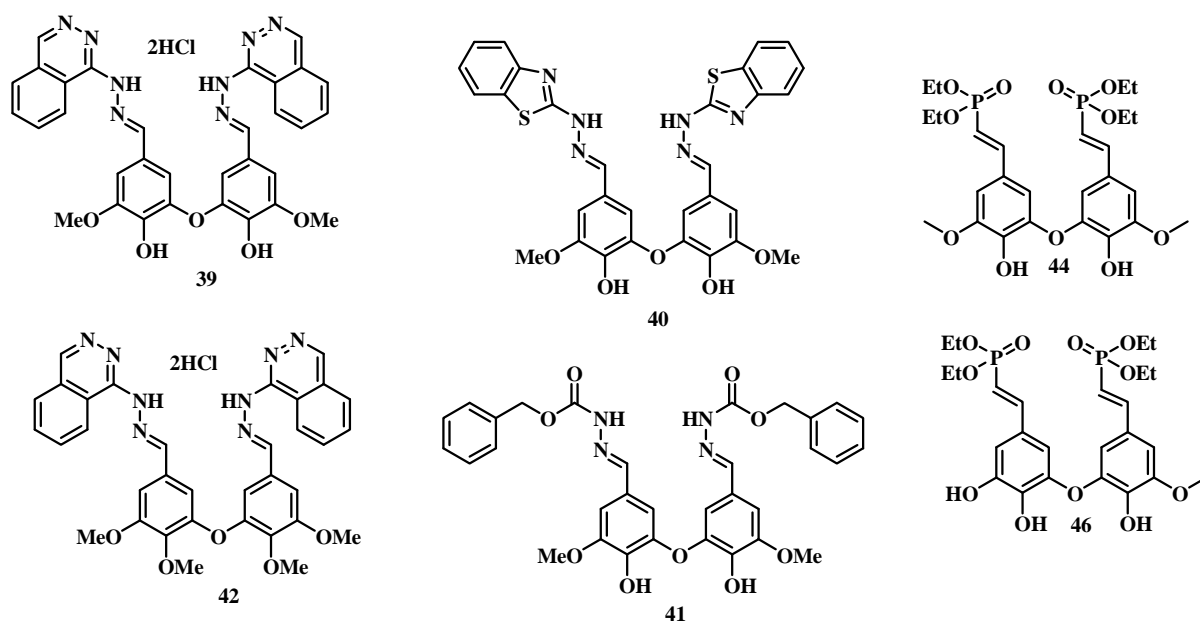


Schéma. 40.

Les études préliminaires que nous avons effectuées sont basées sur l'évaluation de la protection contre l'oxydation des LDLs par des cellules vasculaires (HMEC-1). Nous avons aussi évalué l'autotoxicité de ces molécules.

L'autotoxicité est mesurée par le test de réduction du MTT. Les résultats de viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes résiduelles par rapport au contrôle positif (cellules endothéliales seules, soit 100 % de viabilité).

Les cellules vasculaires oxydent les LDLs natives en présence de sulfate de cuivre qui catalyse la réaction. Ce système permet d'imiter les événements physiopathologiques qui se produisent dans la paroi vasculaire. L'oxydation des LDLs est mesurée par la détection des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui permet de quantifier la peroxydation des LDLs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de TBARS formés dans le contrôle positif c'est-à-dire les LDLs oxydées par les cellules en l'absence d'agents antioxydants, soit 100 % d'oxydation (voir *section expérimentale*).

L'oxydation des LDL par les cellules vasculaires, les rend fortement cytotoxiques vis-à-vis des HMEC-1. Les LDLs co-incubées avec les molécules synthétisées et les HMEC-1 sont oxydées dans une moindre mesure suivant l'activité de l'agent étudié. Ceci implique une plus faible présence des oxLDLs et par conséquent une moindre toxicité globale (la toxicité est évaluée par le test MTT). Les résultats de viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes résiduelles par rapport au contrôle positif (cellules endothéliales seules, soit 100 % de viabilité), « voir *section expérimentale* ».

Les résultats de cette étude préliminaire sont présentés dans les tableaux 29 (phosphonates) et 30 (hydrazones).

Deux concentrations pour chaque agent (5 μ M et 10 μ M) ont été testées et rapportées dans chaque tableau. Nous rapportons également les valeurs des contrôles (positif et négatif) En ce qui concerne les dérivés diaryl éthers phosphonates **44** et **46** (tableau 29), les deux composés présentent de très bonnes activités antioxydantes et aucune autotoxicité.

Tableau. 29. Dosages MTT/TBARS et autotoxicité des phosphonates.

Molécules	10 μ M			5 μ M		
	MTT	TBARS	Autotoxicité	MTT	TBARS	Autotoxicité
44	88 \pm 0.6	2 \pm 0.3	104 \pm 9	80 \pm 5.1	2 \pm 0.3	119 \pm 2.3
46	82 \pm 3.6	2 \pm 0.2	88 \pm 6	75 \pm 4.1	2 \pm 0.2	106 \pm 9
	MTT	TBARS				
Contrôle +	30 \pm 5	100 \pm 8	contrôle positif (en présence des LDLs et HMEC).			
Contrôle -	98 \pm 4	1 \pm 0.1	contrôle négatif (présence unique des HMEC).			

Les deux composés protègent contre l'oxydation des LDLs à hauteur de 98%, dans les deux concentrations étudiées. Les faibles cytotoxicités résiduelles mesurées par le test MTT confirment que ces molécules ont empêché l'oxydation des LDLs par les cellules.

En ce qui concerne les diaryl éthers hydrazones (tableau 30) les résultats obtenus sont également excellents en terme de protection contre l'oxydation des LDLs.

Les molécules **40** et **41** présentent une légère cytotoxicité à 10 μ M. En revanche, les autres ne présentent pas de toxicité intrinsèque.

Pour les composés phénoliques (**39-41**) l'effet protecteur contre l'oxydation des LDLs est très puissant même à 5 μ M (valeurs TBARS entre 2% et 3%) et par conséquent une cytoprotection variant entre 79% et 87%.

Enfin, le composé **42** qui ne possède pas des fonctions phénoliques et n'a aucun effet protecteur contre l'oxydation des LDLs (% TBARS 94% et 104%), protège contre la cytotoxicité des oxLDLs formés. Cette propriété pourrait être intrinsèque à la structure comme c'est le cas de l'analogue tétraméthylé de BVH (chapitre III, page 99).

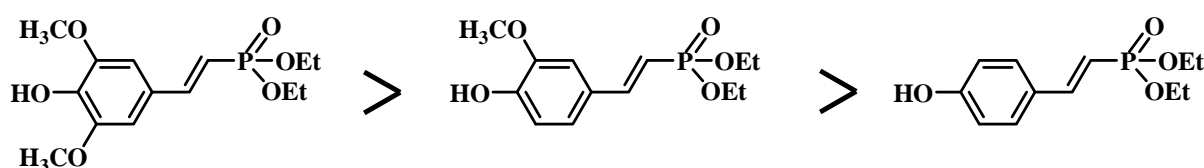
Tableau. 30. Dosages MTT/TBARS et autotoxicité des hydrazones.

Molécules	10 μ M			5 μ M		
	MTT	TBARS	Autotoxicité	MTT	TBARS	Autotoxicité
42	89 \pm 5.4	104 \pm 12.3	114 \pm 5	82 \pm 4.8	94 \pm 25	89 \pm 5.3
39	94 \pm 2.3	2 \pm 0.2	95 \pm 2	87 \pm 6.1	3 \pm 0.7	106 \pm 3
40	88 \pm 1.5	2 \pm 0.1	64 \pm 6.3	82 \pm 2.4	2 \pm 0.4	79 \pm 6
41	72 \pm 12.5	2 \pm 0.1	64 \pm 5	79 \pm 6.3	2 \pm 0.1	76 \pm 15
	MTT	TBARS				
Contrôle +	30 \pm 5	100 \pm 8				
Contrôle -	98 \pm 4	1 \pm 0.1				

5.6. Comparaison avec les résultats antérieurs. Perspectives.

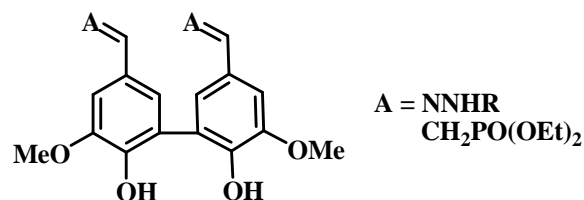
Dans cette partie nous rapporterons de manière synthétique les résultats biologiques des différentes familles de composés qui ont été développées et étudiées jusqu'à présent.

Dans un premier temps nous avons rapporté l'activité antioxydante et cytoprotectrice des dérivés "monomères phosphonates"; la meilleure activité dans cette série étant observée pour les dérivés du syringaldéhyde possédant deux groupements méthoxy en α , α' de la fonction phénol.



Une autre famille de composés, les syringiques hydrazones a montré une activité très importante et ceci pour tout fragment hydrazone utilisé (chapitre II).

Puis, en série diaryl (liaison C-C entre deux cycles aromatiques), les systèmes diaryl phosphonates sont exemptes de toute activité antioxydante intéressante, alors que les diaryl hydrazones présentent des résultats variés en fonction de la nature du fragment hydrazone.



Enfin les systèmes diaryl éthers (phosphonates ou hydrazones) sont très actifs.

A titre comparatif dans le tableau 31 sont rapportés les résultats biologiques des diaryl et diaryl éthers phosphonates et hydrazones possédant des motifs comparables.

Tableau. 30. Comparaison entre les les activités des bisaryles et des diaryl éthers.

R	concentration	TBARS	MTT	TBARS	MTT
	5 μM	19 ± 2	79 ± 3	3 ± 0.7	87 ± 6.1
	10 μM	3 ± 0.2	82 ± 8	2 ± 0.2	94 ± 2.3
	10 μM	10 ± 2	100 ± 18	2 ± 0.1	88 ± 1.5
	10 μM	3 ± 0.2	82 ± 8	2 ± 0.1	72 ± 12.5
	10 μM	67.4 ± 8.6	66.0 ± 5.5	2 ± 0.3	88 ± 0.6

La récupération de l'activité antioxydante observée pour les phosphonates lorsqu'on passe des motifs diaryles aux motifs diaryl éthers pourrait être abordée à travers les résultats de Pedulli et al. En effet Pedulli et al.⁵⁷ ont rapporté en 2003 le rôle de la liaison hydrogène intramoléculaire dans l'activité antioxydante des systèmes diaryl (schéma 41, A) et de type Ar-CH₂-Ar (schéma 41, B).

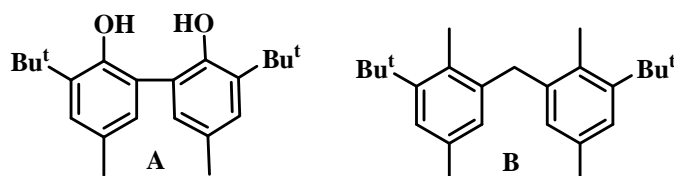


Schéma. 41.

A travers des études cinétiques par spectroscopie RPE, les auteurs ont évalué l'énergie de dissociation de la liaison O-H du composé 2,2'-methylenebis(6-*tert*butyl-4-methylphenol) (A) comme étant 83.1 kcal/mol. C'est une valeur assez élevée indiquant que ce composé présenterait un effet antioxydant moindre que le système simple. Des études de calculs théoriques ont montré que le composé A adopte une géométrie type "cisoidé" (schéma 42) où les deux cycles aromatiques forment un angle dièdre de 50° et où chaque atome d'hydrogène de chaque fonction phénolique est lié par une liaison hydrogène avec l'autre atome d'oxygène. Le radical phenoxy formé sur un des deux cycles peut conserver une liaison hydrogène.

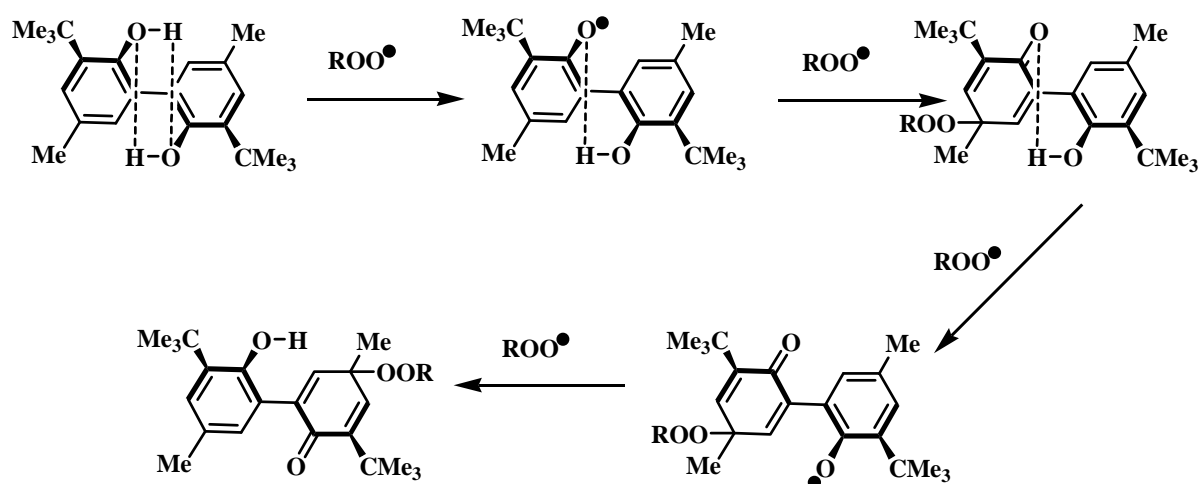


Schéma. 42.

⁵⁷ Amorati R, Lucarini M, Mugnaini V, and Pedulli G F. Antioxidant activity of o-bisphénols : the role of intramolecular hydrogen bonding. J. Org. Chem. 68: 5198-5204, 2003.

D'autre part les auteurs ont montré que le radical phenoxy réagit avec un second radical phenoxy générant une forme quinone à laquelle la fonction OH restante est très fortement liée. Ces effets conjoints conduisent suivant les auteurs à une augmentation de la valeur BDE de la liaison O-H (83.3 kcal/mol) et donc à un effet (mesuré) antioxydant faible.

Enfin l'introduction d'une fonction méthylène entre les deux systèmes aromatiques abaisse de 2 kcal/mol (81.2 kcal/mol vs 83.2 kcal/mol) la valeur de l'énergie de dissociation de la liaison O-H, induisant une activité antioxydante bien supérieure aux systèmes diaryl (A).

En se basant sur les résultats de Pedulli et al on pourrait avancer une hypothèse d'explication quant aux résultats que nous observons concernant les familles des dérivés phosphonates. Les monomères phosphonates présentent en soi une bonne activité antioxydante, qui serait perdue dans le cas de systèmes diaryles pour cause de liaisons hydrogènes croisées fortes entre les fonctions phénols. L'activité antioxydante serait récupérée lorsque les liaisons sont éloignées (cas des diaryl éthers phosphonates).

Néanmoins, cette explication ne peut être que partielle étant donné les bonnes activités des systèmes diaryl hydrazones, même si elles restent inférieures à celles des diaryl éthers hydrazones.

Une étude détaillée à la fois théorique et expérimentale devrait constituer le volet futur le plus important pour mieux appréhender tous les éléments qui interviennent dans l'activité de nos composés. Ces orientations futures comportent :

- i) Une étude théorique sur l'évaluation des énergies de dissociation de la liaison O-H (BDE) à la fois dans les systèmes monomères que dimères. La géométrie des composés dimères serait dans ce sens importante à déterminer.
- ii) Une étude de spectroscopie RPE pour évaluer à la fois l'interaction de nos composés avec d'autres radicaux, leur nature et stabilité. Une étude expérimentale de détermination des valeurs de BDE pourrait également être envisagée.
- iii) L'étude électrochimique de nos composés afin d'évaluer le potentiel redox, le type de cinétique électrochimique (réversible, irréversible) en vue de relier ces propriétés avec leurs activités antioxydantes.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail de thèse a été effectué en sein de deux équipes de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.: i) l'équipe « Produits Naturels et Analogues : Synthèse et Applications » dans le Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, CNRS 5068 ; et ii) l'équipe « Athérosclérose et artériosclérose de greffe » dans INSERM 1048.

L'athérosclérose est aujourd'hui une des causes majeures de mortalité au niveau mondial et est à l'origine de la plupart des maladies cardio-vasculaires. Le stress oxydant joue un rôle majeur dans l'athérogenèse et les maladies cardiovasculaires. Les modifications oxydatives des LDLs (oxLDLs) sont la première étape du processus athérogène. Par ailleurs, les oxLDLs exercent diverses propriétés biologiques (inflammation, prolifération et migration cellulaire, apoptose).

Ce travail de thèse a été situé à l'interface entre la Chimie et la Biologie. Les objectifs que nous nous étions fixés étaient : la conception, la synthèse d'antioxydants phénoliques et leur évaluation biologique vis-à-vis de l'athérosclérose.

Dans un premier temps, nous avons resynthétisé les monomères syringiques hydrazones, ainsi que le dimère symétrique BVH. Nous avons également synthétisé des monomères hydrazones portant le motif cathécholique.

Les monomères syringiques (**5a-j**) et cathécholiques (**5k-p**) ont montré un bon effet antioxydant. Les premiers ont été étudiés d'une façon plus approfondie (inhibition de l'oxydation des LDLs dans des systèmes cellulaires et acellulaires et inhibition de génération de l'anion superoxyde).

Le BVH a été étudié *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, BVH inhibe i) l'oxydation des LDLs dans les systèmes cellulaires et acellulaires métal dépendant ou indépendant, ii) le recrutement des monocytes et la formation des cellules spumeuses, iii) le processus pro-inflammatoire, iv) l'apoptose des cellules endothéliales. *In vivo* BVH réduit la formation de la plaque athéroscléreuse de 55% chez des souris apo E^{-/-}.

Nous avons par la suite conçu et élaboré une nouvelle famille de composés. Elle est basée sur la synthèse de systèmes phénoliques de type diaryl éther hautement fonctionnalisés issus d'un couplage initial entre la 5-bromo(ou 5-iodo)vanilline et la 5-hydroxyvanilline. Après une étude méthodologique de la réaction du couplage aryl aryl éther catalysé par un métal (cuivre ou palladium), nous avons réussi à synthétiser le motif diaryl éther de base (**24a**) suivant deux méthodes. La première est basée sur la réaction d'Ullmann classique en utilisant un large excès de cuivre métal avec un rendement de 48%. La deuxième constitue une nouvelle méthode de

Conclusion générale

couplage de ces composés hautement fonctionnalisés et est réalisée en présence d'une quantité catalytique du triflate de cuivre. Cette dernière a été optimisée et a permis l'obtention du composé **24a** avec un rendement de 78%.

Après obtention des motifs diaryl éthers de base, les nouvelles familles (phosphonates et hydrazones) ont été élaborées.

L'activité antioxydante de ces diaryl éthers (hydrazones : **39-42** et phosphonates : **44, 46**) a été évaluée dans une étude préliminaire. Les diaryl éthers (**39-41, 44, 46**) ont montré une très bonne activité antioxydante qui mériterait d'être étudié d'avantage. Le diaryl éther **42** ne possédant pas de motifs phénols n'a présenté aucune activité antioxydante. En revanche, il a gardé une bonne activité cytoprotectrice.

Ce travail a permis l'identification d'un agent hautement antiathérogène (BVH). Il a également permis l'élaboration d'une nouvelle famille de composés portant le motif diaryl éther. Ce motif a été synthétisé par une méthode originale. Tous les composés phénoliques cibles ont présentés des activités extrêmement intéressantes. Cette famille se révèle être supérieure à la précédente.

Experimental section

Experimental section

I. Chemistry

Solvents and chemicals :

Tetrahydrofuran and diethyl ether were distilled over sodium in the presence of benzophenone.

Anhydrous DMSO and DMF are commercial.

Dichloromethane was distilled over calcium hydride before use.

Triethylamine, diisopropylamine were distilled over calcium hydride and stored over potassium hydroxide.

The other reagents and solvents used are from standard chemical suppliers and were used without further purification.

Chromatography

Thin layer : Aluminum sheet coated with silica gel 60 F254 0.20 mm thick.

phosphomolybdic acid was used as a chemical developer.

Flash column: Merck silica 60 35-70 microns.

Nuclear Magnetic Resonance :

The NMR spectra were recorded on Avance 300 and 500 MHz

300 and 500 MHz for ^1H nucleus.

75 and 125 MHz for ^{13}C nucleus.

121 MHz for ^{31}P nucleus.

189 MHz or 282 MHz ^{19}F nucleus.

Chemical shifts (δ) are expressed in ppm, measured relative to tetramethylsilane (TMS) taken as internal reference for ^1H and ^{13}C .

Ratings are s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet of doublet) and m (multiplet or solid).

Infrared spectroscopy : Perkin-Elmer 1760-X

Experimental section

The wave numbers of stretching vibration bands (ν) are given in cm^{-1} .

Mass spectrometry :

DCI/ NH_3 : TSQ 7000 Thermo Electron

DCI/ CH_4 : Waters GCT Premier

APCI and ESI low-resolution: API 365 Perkin Elmer Sciex and Applied Biosystems Q-TRAP.

ESI high-resolution GC Waters and Waters Q TOF / TOF Ultima

FAB: Nermag R10-10

Melting Point : measured by capillary tube on a Büchi apparatus and uncorrected.

General Procedure for Benzylation (Protocol 1)

To a stirred suspension of ArOH (43.3 mmol, 1 equiv) in acetone (10 mL/mmol of ArOH) was added K_2CO_3 (51.9 mmol, 1.2 equiv), NaI (8.7 mmol, 0.2 equiv), benzylbromide (51.9 mmol, 1.2 equiv) at room temperature. The mixture was refluxed until all ArOH was consumed as indicated by TLC. After cooling, DCM (25 mL) was added and the organic layer was washed with water (25 mL) followed by brine (5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to give crude product which was purified by column chromatography on silica (EtOAc/petroleum ether).

General procedure for the aryl aryl ether formation

Copper I catalyzed (Protocol 2)

A round bottom flask containing a stir bar was charged with copper (I) iodide (55 mol%; 0.23 mmol), picolinic acid (0.47 mmol, 1.1 eq), aryl bromide (0.43 mmol, 1.1 eq), ArOH (0.1 g, 0.39 mmol, 1 eq) and K_3PO_4 (0.85 mmol, 2.2 eq). The round bottom flask was then evacuated and back-filled with argon. The evacuation/backfill sequence was repeated two additional times. Under a counterflow of argon, dimethylsulfoxide (4 mL) was added by syringe. The round bottom flask was placed in a preheated oil bath at 120°C and the reaction mixture was stirred vigorously for 24h. The reaction mixture was cooled to room temperature. Ethyl acetate and H_2O (10 mL/1 mL) were added and the mixture was stirred. The organic layer was

Experimental section

separated and the aqueous layer was extracted twice more with ethyl acetate. Combined organic layer was dried over MgSO_4 . The filtrate was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting with MeOH/DCM).

General procedure for debenylation using BCl_3 (Protocol 3)

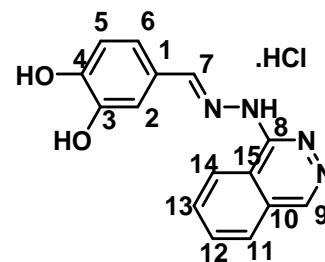
To a stirred solution of ArOBn (0.07 mmol, 1.0 equiv) and pentamethylbenzene (0.45 mmol, 3 equiv) in dry DCM (7 mL/mmol of ArOBn) at $-78\text{ }^\circ\text{C}$ was added BCl_3 (1 M in toluene, 0.3 mmol, 4 equiv) dropwise over 10 min with syringe. After 30 min, TLC indicated complete consumption of the starting material. The reaction was quenched with DCM– MeOH (10:1, 0.4 mL at $-78\text{ }^\circ\text{C}$, and the resulting mixture was warmed to room temperature. The excess organic solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting with ethyl acetate/petroleum ether or Methanol/DCM).

General procedure for hydrazones synthesis (Protocol 4)

A mixture of hydrazine (1 equiv) and ArCHO (1 equiv) was dissolved in absolute ethanol (40 mL/mmol). The solution was heated under reflux for 6 to 24 hours depending on hydrazine used, if the conversion is not completed, drops of acetic acid were added. The mixture was cooled to $25\text{ }^\circ\text{C}$. The precipitated solid was collected by filtration and rinsed thoroughly with ethanol to afford the corresponding hydrazone. If no precipitate was observed, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure.

Experimental section

5k. (E)-4-((2-(phthalazin-1-yl)hydrazono)methyl)benzene-1,2-diol hydrochloride :
MF : C₁₅H₁₃O₂N₄Cl
MW : 316 g.mol⁻¹
CLogP : 2.63



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **5k** from 4,3-dihydroxy-benzaldehyde (0.1 g, 0.73 mmol, 1equiv) and hydralazine chlorhydrate (0.14 g, 0.73 mmol, 1 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 81% yield as a yellow solid.

Mp : > 280 °C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3420 (O-H or NH) ; 3199 (N-H or O-H) ; 3085 (C-H arom.) ; 1616 (C=N) ; 1598 (C=C arom.) ; 1478 (C=C arom.) ; 1290 (C-O arom.).

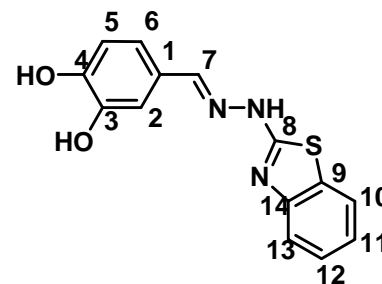
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 6.89 (d, 1H, *J*₅₋₆ = 8.2 Hz, H₅) ; 7.34 (dd, 1H, *J*₆₋₅ = 8.2 Hz, *J*₆₋₂ = 1.8 Hz, H₆) ; 7.60 (d, 1H, ³*J*₂₋₆ = 1.8 Hz, H₂) ; 8.10-8.25 (m, 3H, H_{11,12,13}) ; 8.88 (s, 1H, H₇) ; 9.01 (s, 1H, H₉) ; 9.12 (d, 1H, ³*J*₁₄₋₁₃ = 7.2 Hz, H₁₄) ; 9.97 (bs, 1H, OH) ; 14.28 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 115.2 (s, 1C, C₂) ; 115.5 (s, 1C, C₅) ; 122.1 (s, 1C, C₆) ; 124.4 (s, 1C, C₁) ; 125.1 (s, 1C, C₁₄) ; 127.7 (s, 2C, C_{10,15}) ; 128.1 (s, 1C, C₁₁) ; 133.7 (s, 1C, C₁₂) ; 135.7 (s, 1C, C₁₃) ; 145.5 (s, 1C, C₉) ; 145.6 (s, 1C, C₈) ; 147.3 (s, 1C, C₃) ; 149.4 (s, 1C, C₄) ; 153.5 (s, 1C, C₇).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 281 [M+H⁺].

Experimental section

5l. (E)-4-((2-(benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazono)methyl)benzene-1,2-diol :
MF : C₁₄H₁₁O₂N₃S
MW : 285.32 g.mol⁻¹
CLogP : 3.85



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **5l** from 3,4-dihydroxy-benzaldehyde (0.1 g, 0.73 mmol, 1equiv) and 1-(benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazine (0.12 g, 0.73 mmol, 1 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 74% yield as a yellow solid.

Mp : 262 °C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3473 (O-H or N-H) ; 3247 (N-H or O-H) ; 3057 (C-H arom.) ; 1600 (C=N) ; 1560 (C=C arom.) ; 1515 (C=N) ; 1277 (C-O arom.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 6.77 (d, 1H, ³J₅₋₆ = 8.1 Hz, H₅); 6.91 (dd, 1H, ⁴J₆₋₂ = 2.0 Hz, ³J₆₋₅ = 8.1 Hz, H₆); 7.08 (ddd, 1H, ⁴J₁₂₋₁₀ = 1.1 Hz, ³J₁₂₋₁₁ = 7.3 Hz, ³J₁₂₋₁₃ = 7.8 Hz, H₁₂) ; 7.18 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 2.0 Hz, H₂); 7.28 (ddd, 1H, ⁴J₁₁₋₁₃ = 1.2 Hz, ³J₁₁₋₁₂ = 7.3 Hz, ³J₁₁₋₁₀ = 8.0 Hz, H₁₁); 7.40 (d, 1H, ³J₁₀₋₁₁ = 7.5 Hz, H₁₀); 7.74 (d, 1H, ³J₁₃₋₁₂ = 7.8 Hz, H₁₃); 7.95 (s, 1H, H₇); 9.31(bs, 1H, NH); 11.9 (bs, 1H, OH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 112.4 (s, 1C, C₂); 115.6 (s, 1C, C₅); 119.9 (s, 1C, C₆) ; 121.2 (s, 1C, C₁₀); 121.4 (s, 1C, C₁₁) ; 125.7 (s, 1C, C₁) ; 125.8 (s, 2C, C₁₂); 145.6 (s, 1C, C₃); 147.6 (s, 1C, C₄); 166.7 (s, 1C, C₈).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 286 [M+H⁺].

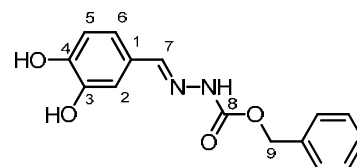
Experimental section

5m. (E)-benzyl 2-(3,4-dihydroxybenzylidene)hydrazinecarboxylate :

MF : C₁₅H₁₄O₄N₂

MW : 286 g.mol⁻¹

CLogP : 2.26



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **5m** from 4,3-dihydroxy-benzaldehyd (0.1 g, 0.73 mmol, 1equiv) and benzyl hydrazine carboxylate (0.12 g, 0.73 mmol, 1 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 99% yield as an orange solid.

Mp : 102 °C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3447 (O-H or N-H) ; 3200 (N-H or O-H) ; 3038 (C-H arom.) ; 1700 (C=O); 1670 (C=N); 1450 (C=C arom.); 1253 (C-O arom.); 1042 (C-O).

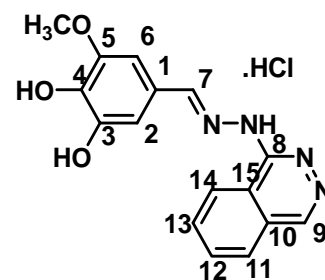
¹H NMR (Aceton-d₆, 300 MHz) δ ppm: 5.20 (s, 2H, CH₂); 6.85 (d, 1H, ³J₅₋₆ = 8.15 Hz, H₅); 6.97 (dd, 1H, ³J₆₋₅ = 8.15 Hz, ⁴J₆₋₂ = 2.0 Hz, H₆); 7.29 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 2 Hz, H₂); 7.32-7.46 (m, 5H, H_{Bn}) ; 7.97 (s, 1H, H₇); 8.14 (bs, 1H, OH) ; 8.21 (bs, 1H, OH) ; 9.8 (bs, 1H, NH).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ ppm : 68.0 (s, 1C, C₉) ; 113.8 (s, 1C, C₂); 116.2 (s, 1C, C₅); 121.9 (s, 1C, C₆); 127.7 (s, 1C, C₁); 129.1 (s, 2C, C_o); 129.2 (s, 1C, C_p); 129.6 (s, 2C, C_m); 137.8 (s, 1C, C_{hyposo(Bn)}); 146.8 (s, 1C, C₃) ; 147.3 (s, 1C, C₇) ; 147.4 (s, 1C, C₄); 156.5 (s, 1C, C₈).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 287 [M+H⁺].

Experimental section

5n. (E)-3-methoxy-5-((2-(phthalazin-1-yl)hydrazono)methyl)benzene-1,2-diol hydrochloride :
MF : C₁₆H₁₅O₃N₄Cl
MW : 346 g.mol⁻¹
CLogP : 2.26



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **5n** from 4,3-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyd (0.1 g, 0.595 mmol, 1equiv) and hydralazine chlorhydrate (0.111 g, 0.595 mmol, 1 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 84% yield as a yellow solid.

Mp : >280 °C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3328 (O-H or N-H); 3070 (C-H arom.); 1614 (C=N); 1593 (C=C arom.); 1527 (C=C arom.); 1435 (C=C arom.); 1318 (C-O arom.); 1100 (C-O).

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.97 (s, 3H, CH₃O) ; 6.99 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1.7 Hz, H₆); 7.38 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1.7 Hz, H₂); 8.1-8,2 (m, 3H, H_{11,12,13}) ; 8.44 (s, 1H, H₇) ; 8.59 (d, 1H, ³J₁₄₋₁₃ = 7.9 Hz, H₁₄) ; 8.81 (s, 1H, H₉).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 56.1 (s, 1C, OCH₃) ; 102.7 (s, 1C, C₆) ; 111.7 (s, 1C, C₂) ; 118.9 (s, 1C, C₁) ; 123.1 (s, 1C, C₁₅) ; 125.5 (s, 1C, C₁₄) ; 127.7 (s, 1C, C₁₀) ; 128.1 (s, 1C, C₁₁) ; 133.6 (s, 1C, C₁₂) ; 135.7 (s, 1C, C₁₃) ; 138.2 (s, 1C, C₄) ; 144.5 (s, 1C, C₉) ; 145.6 (s, 1C, C₈) ; 147.3 (s, 1C, C₃) ; 148.7 (s, 1C, C₅), 153.6 (s, 1C, C₇).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 281 [M+H⁺].

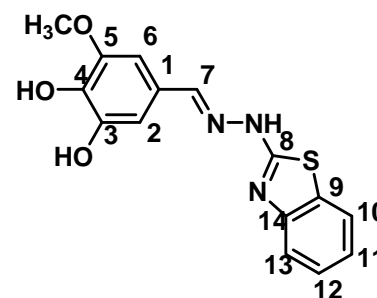
Experimental section

5o. (E)-benzyl 2-(3,4-dihydroxy-5-methoxybenzylidene)hydrazinecarboxylate :

MF : C₁₅H₁₃O₃N₃S

MW : 315 g.mol⁻¹

CLogP : 3.64



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **5o** from 4,3-dihydroxy-3-methoxybenzaldehyde (0.1 g, 0.595 mmol, 1equiv) and 1-(benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazine (0.099 g, 0.595 mmol, 1 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 9% yield as a brown solid.

Mp : 216 °C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3403 (O-H or N-H); 3307 (N-H or O-H) ; 3062 (C-H arom.); 1612 (C=N); 1560 (C=C arom.); 1444 (C=C arom.); 1200 (C-O arom.); 1094 (C-O).

¹H NMR (Aceton-d₆, 300 MHz) δ ppm: 3.89 (s, 3H, OCH₃) ; 6.94 (s, 2H, H_{2,6}) ; 7.10 (ddd, 1H, ⁴J₁₂₋₁₀ = 1.2 Hz, ³J₁₂₋₁₁ = 7.3 Hz, ³J₁₂₋₁₃ = 7.8 Hz, H₁₂) ; 7.28 (ddd, ⁴J₁₁₋₁₃ = 1.3 Hz, ³J₁₁₋₁₂ = 7.3, ³J₁₁₋₁₀ = 8.1 Hz, 1H, H₁₁) ; 7.45 (ddd, ⁵J₁₀₋₁₃ = 0.6 Hz, ⁴J₁₀₋₁₂ = 1.2 Hz, ³J₁₀₋₁₁ = 8.1 Hz, 1H, H₁₀) ; 7.73 (ddd, ⁵J₁₃₋₁₀ = 0.6 Hz, ⁴J₁₃₋₁₁ = 1.3 Hz, ³J₁₃₋₁₂ = 7.8 Hz, 1H, H₁₃) ; 8.04 (s, 1H, H₇).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ ppm : 55.8 (s, 1C, OCH₃) ; 102.5 (s, 1C, C₆) ; 107.3 (s, 1C, C₂) ; 121.3 (s, 1C, C₁₀) ; 121.4 (s, 1C, C₁₁) ; 124.6 (s, 1C, C₁) ; 125.8 (s, 1C, C₁₂) ; 136.2 (s, 1C, C₄) ; 145.9 (s, 1C, C₃) ; 148.4 (s, 1C, C₅) ; 166.7 (s, 1C, C₈).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 316 [M+H⁺].

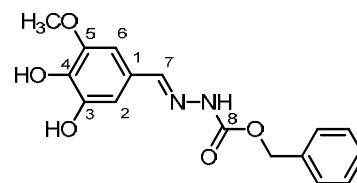
Experimental section

5p. (E)-Benzyl-2-(3-4-Dihydroxy-5-methoxybenzylidene)hydrazinecarboxylate :

MF : C₁₆H₁₆O₅N₂

MW : 316 g.mol⁻¹

CLogP : 2.16



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **5p** from 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.1 g, 0.595 mmol, 1equiv) and benzyl hydrazine carboxylate (0.099 g, 0.595 mmol, 1 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 99% yield as a yellow solid.

Mp : 216 °C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3515 (O-H or N-H); 3364 (N-H or O-H); 3248 (C-H arom.); 1699 (C=O); 1696 (C=N) ; 1594 (C=C arom.) ; 1516 (C=C arom.) ; 1264 (C-O arom.) ; 1200 (C-O).

¹H NMR (Aceton-d₆, 300 MHz) δ ppm: 3.86 (s, 3H, OCH₃) ; 5.20 (s, 2H, CH₂) ; 6.86 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1.8 Hz, H₆) ; 6.90 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1.8 Hz, H₂) ; 7.29-7.46 (m, 5H, H_{Bn}) ; 7.83 (bs, 1H, NH) ; 7.97 (s, 1H, H₇).

¹³C NMR (Aceton-d₆, 75 MHz) δ ppm : 57.5 (s, 1C, OCH₃) ; 68.0 (s, 1C, CH₂) ; 103.7 (s, 1C, C₆) ; 110.2 (s, 1C, C₂) ; 127.8 (s, 1C, C₁) ; 129.8 (s, 2C, C_o) ; 130.3 (s, 3C, C_{m,p}) ; 137.6 (s, 1C, C_{hyso(Bn)}) ; 138.9 (s, 1C, C₄) ; 147.2 (s, 1C, C₃) ; 150.1 (s, 1C, C₅).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 317 [M+H⁺].

Experimental section

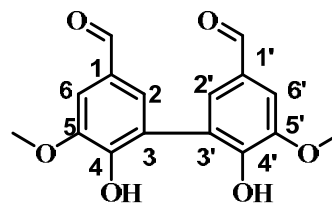
7. 4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-5,5'-biphenyl-1,1'-dicarbaldehyde, Bisvanilline :

MF : C₁₆H₁₄O₆

MW : 302.28 g.mol⁻¹

R_f : 0.25 (Ethyl acetate)

CLogP : 1.32



To vanillin (10.64 g, 70 mmol, 1 equiv) in 700 mL of water was added FeSO₄ (0.4 g, 1.4 mmol, 0.02 equiv) under stirring. After heating for 10 min at 50°C, Na₂S₂O₈ (8.93 g, 37.5 mmol, 0.54 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at 50°C for 5 days. Cooled to room temperature. The brown precipitate formed was filtered off. The solid was dissolved in NaOH (2 M, 200 mL) aqueous solution. HCl (2 M, 200 mL) aqueous solution was added. The bisvanilline was formed as a brown solid which was isolated by filtration (95%).

Mp > 270 °C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3186 (O-H); 1672 (C=O); 1587 (C=C arom.); 1454 (C=C arom.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 3.94 (s, 6H, OCH₃); 7.42 (s, 4H, H₂₊₆); 9.80 (s, 2H, CHO); 9.89 (s, 2H, OH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 56.5 (s, 2C, OCH₃); 109.7 (s, 2C, C₆); 125.0 (s, 2C, C₃); 128.2 (s, 2C, C₁); 128.6 (s, 2C, C₂); 148.6 (s, 2C, C₄); 150.9 (s, 2C, C₅); 191.6 (s, 2C, CHO).

MS (FAB, MNBA) m/z: 303.1 [M+H⁺].

Experimental section

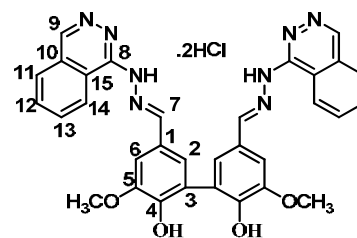
16f. 3,3'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-5,5'-biphenyl-1,1'-(diphthalazin-1-yl)methylhydrazone dihydrochloride

MF : C₃₂H₂₈Cl₂N₈O₄

MW : 659.52 g.mol⁻¹ and 586 g.mol⁻¹ without HCl

R_f : 0.12 (Ethyl acetate)

CLogP : 4.47



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare BVH from Bisvanilline (0.2 g, 0.66 mmol, 1equiv), the reaction time is 6h30 and the product is recover by filtration to give 87% yield as a yellow solid.

Mp > 270 °C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3423 (O-H), 1675 (C=N), 1617 (C=C arom.), 1594 (C=C arom.), 1473 (C=C arom.).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 3.94 (s, 6H, OCH₃); 7.41 (d, 2H, ⁴J₆₋₂ = 1.7 Hz, H₆); 7.78 (d, 2H, ⁴J₂₋₆ = 1.7 Hz, H₂); 8.10-8.23 (m, 6H, H_{11,12,13}), 9.00 (bs, 4H, H_{7,9}); 9.20 (d, ³J₁₄₋₁₃ = 7.3 Hz, 2H, H₁₄); 9.29 (bs, 2H, OH); 14.31 (bs, 2H, HCl).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 56.5 (s, 2C, OCH₃); 109.7 (s, 2C, C₆); 119.3 (s, 2C, C₁₅); 123.9 (s, 2C, C₁₀); 124.3 (s, 2C, C₁₄); 125.1 (s, 2C, C₂); 125.4 (s, 2C, C₁); 126.6 (s, 2C, C₁₁); 128.2 (s, 2C, C₃); 128.6 (s, 2C, C₁₃); 134.1 (s, 2C, C₁₂); 136.3 (s, 2C, C₉); 147.7 (s, 2C, C₄); 148.3 (s, 2C, C₅); 148.5 (s, 2C, C₈); 157.7 (s, 2C, C₇).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 587 [M+H⁺].

Experimental section

17c. 5,5'-oxybis(4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)

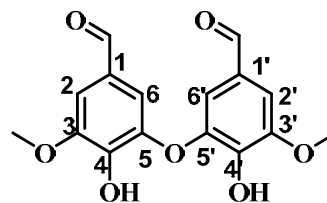
(A12) :

MF : C₁₆H₁₄O₇

MW : 318.07 g.mol⁻¹

R_f : 0.25 (Ethyl acetate)

CLogP : 2



Followed the similar protocol (protocol 3) to prepare **17c** from **24a**, 5,5'-oxybis(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzaldehyde) (0.100 g, 0.2 mmol, 1 equiv). The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with Ethyl acetate /PE, 25/75) to give 90 % as a dark yellow solid.

Mp : 200°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3300 (O-H); 3030 (CH arom.); 2938 (CH aliph.); 2846 (CH aliph.); 1699 (C=O); 1656 (C=C arom.); 1591 (C=C arom.); 1515 (C=C arom); 1332 (C_(Ph)-O); 1205 (C_(Ph)-O); 1132 (C-O-C); 1080 (C-O-C).

¹H NMR (Acetone-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 3.84 (s, 3H, C'H₃O); 3.98 (s, 3H, CH₃O); 6.86 (d, 1H, ⁴J_{2'-6'} = 1.7 Hz, H_{6'}); 7.23 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1.8 Hz, H₂); 7.27 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1.8 Hz, H₆); 7.29 (d, 1H, ⁴J_{6'-2'} = 1.7 Hz, H_{2'}); 9.72 (s, 1H, C'HO); 9.95 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (Acetone-*d*₆, 125 MHz) δ ppm : 55.7 (s, 1C, OC'H₃); 55.9 (s, 1C, OCH₃); 104.1 (s, 1C, C₂); 107.1 (s, 1C, C_{2'}); 109.2 (s, 1C, C_{6'}); 111.5 (s, 1C, C₆); 127.9 (s, 1C, C₁); 134.3 (s, 1C, C₁); 135.9 (s, 1C, C₅); 142.1 (s, 1C, C_{4'}); 146.1 (s, 1C, C_{5'}); 148.9 (s, 1C, C₃); 151.4 (s, 1C, C₄); 153.9 (s, 1C, C_{3'}); 190.2 (s, 1C, C'HO); 191.1 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 336 [M+NH₄⁺].

Experimental section

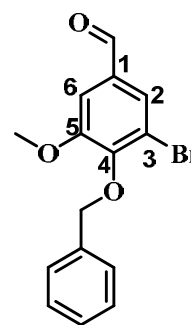
18a. 4-(benzyloxy)-3-bromo-5-methoxybenzaldehyde :

MF : C₁₅H₁₃BrO₃

MW : 321.17 g.mol⁻¹

R_f : 0.8 (DCM/PE 1/1)

CLogP : 3.87



Followed the similar protocol (**Protocol 1**) to prepare **18a** from bromovanilline (1g, 43.3 mmol, 1 equiv). The reaction time is 6h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with ethyl acetate/petroleum ether 5/95) to give 90 % yield as a white solid.

Mp : 50 °C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3033 (CH arom.); 2840 (CH aliph.); 1694 (C=O); 1585 (C=C arom.); 1563 (C=C arom.); 1287 (C_(Ph)-O); 1044 (CH₂-O); 691 (C-Br).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.94 (s, 6H, OCH₃); 5.16 (s, 2H, CH₂); 7.36 (m, 2H); 7.38 (m, 1H); 7.39 (d, ⁴J₆₋₂ = 1,7 Hz, H₆); 7.52 (dd, 2H, ³J_{o-m(Bn)} = 7.6Hz, ⁴J_{o-p(Bn)} = 1.4Hz, H_o); 7.53 (d, 1H, ⁴J_{H4-H2} = 1,7 Hz, H₆); 7.66 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,7 Hz, H₂); 9.84 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm : 55.8 (s, 1C, OCH₃); 74.6 (s, 1C, CH₂); 109.7 (s, 1C, C₆); 118.0 (s, 1C, C₃); 127.9 (s, 1C, C₂); 128.0 (s, 2C, C_o); 128.1 (s, 2C, C_m); 128.3 (s, 1C, C_p); 132.7 (s, 1C, C₁); 136.1 (s, 1C, C_{Hypso(Bn)}); 150.0 (s, 1C, C₅); 153.9 (s, 1C, C₄); 189.5 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 338 and 340 [M+NH₄⁺].

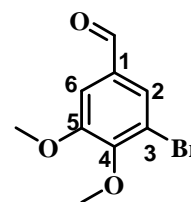
Experimental section

18b. 3-bromo-4,5-dimethoxybenzaldehyde :

MF : C₉H₉BrO₃

MW : 245 g.mol⁻¹

CLogP : 2.1



A mixture of bromovanilline (1.85 g, 8 mmol, 1 eq), methyl iodide (1.4 mL, 17.6 mmol, 2,2 eq) and potassium carbonate (1.8 g, 12 mmol, 1.5 eq) were reflux for 15 hours in acetone (20 mL). After cooling and evaporation of acetone, water and DCM were added. The two phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (1 x 20 mL), dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Column chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 20/80) gave A33 (1.44 g) in 74 % yield as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.92 (s, 3H, OCH₃); 3.94 (s, 3H, OCH₃); 7.38 (d, 1H, ⁴J₆₋₂=1.8 Hz, H₆); 7.64 (d, 1H, ⁴J₂₋₆=1.8 Hz, H₂); 9.83 (s, 1H, CHO).

Experimental section

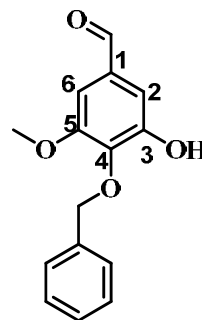
19a. 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde :

MF : C₁₅H₁₄O₄

MW : 258.27 g.mol⁻¹

R_f : 0.2 (Ethyl acetate /PE, 2/8)

CLogP : 2.67



A round bottom flask containing a stirbar was charged with Pd₂dba₃ (0.115g, 0.13 mmol, 3 mol% Pd), L (0.161g, 0.38 mmol, 9 mol %), KOH (0.59g, 10.5 mmol, 2.5 equiv.) and the aryl bromide (1.35g, 4.2 mmol, 1 equiv). The round bottom flask was evacuated and backfilled with argon (this sequence was repeated three times). The solvents (10 mL, mixture of water/dioxane 3/7, degassed) was added by syringe. The mixture was stirred in a preheated oil bath (95 °C) until the aryl bromide was consumed (20 mn). The reaction mixture was cooled to room temperature, carefully acidified with dilute aqueous HCl 1 N. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate. The separated organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by column chromatography over silica gel (eluting with ethyl acetate/petroleum ether 20/80) to give 85 % of the product as a yellow oil.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3378 (O-H); 3031 (CH arom.); 2942 (CH aliph.); 1687 (C=O); 1589 (C=C arom.); 1345 (C_(Ph)-OH); 1268 (C_(Ph)-O).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.96 (s, 3H, OCH₃); 5.19 (s, 2H, CH₂); 5.91 (s, 1H, OH); 7.06 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,8 Hz, H₂); 7.07 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1,8 Hz, H₆); 7.38 (m, 5H_{Bn}); 9.80 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm : 56.0 (s, 1C, OCH₃); 75.4 (s, 1C, CH₂); 103.5 (s, 1C, C₂); 111.6 (s, 1C, C₆); 128.5 (s, 2C, C_o); 128.7 (s, 2C, C, C_m); 128,8 (s, 1C, C_p); 132.2 (s, 1C, C₁); 136.5 (s, 1C, C_{Hypso(Bn)}); 139.5 (s, 1C, C₄); 149.9 (s, 1C, C₃); 152.8 (s, 1C, C₅); 191.2 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 276 [M+NH₄⁺].

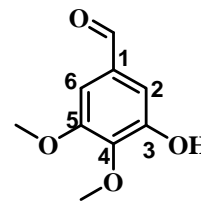
Experimental section

19b. 3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde :

MF : C₁₀H₁₀O₄

MW : 182.17 g.mol⁻¹

CLogP : 0.91



A mixture of 3-Methoxy-4,5-dihydroxybenzaldehyde (1 g, 5.95 mmol, 1 eq), dimethyl sulfate (0.62 mL, 6.54 mmol, 1.1 equiv) and sodium carbonate (695 mg, 6.54 mmol, 1.1 equiv) were reflux for 5 hours in acetone (25 mL). The reaction mixture was cooled to room temperature. After filtering to remove inorganic salts, the acetone was removed by evaporation and replaced with toluene (50 mL). The toluene solution was stirred at room temperature for one hour and filtered to remove an insoluble tar. The product was extracted with a 0.75 N aqueous sodium hydroxide solution (3 x 50 mL). The combined aqueous layer was acidified with hydrochloric acid to a pH of 1 and extracted with toluene (3 x 50 mL). The toluene layer was dried over magnesium sulfate and filtered. The toluene solution was concentrated to an oil which readily crystallized to give A32 (0.87 g) in 80% yield.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.92 (s, 3H, OCH₃); 3.99 (s, 3H, OCH₃); 6.0 (1s, 1H, OH); 7.05 (d, 1H, ⁴J₂₋₆=1.8 Hz, H₂); 7.12 (d, 1H, ⁴J₆₋₂=1.8 Hz, H₆); 9.82 (1H, s, CHO).

Experimental section

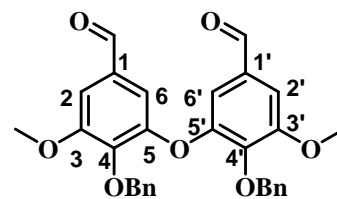
24a. 5,5'-oxybis(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzaldehyde)

MF : C₃₀H₂₆O₇

MW : 498.52 g.mol⁻¹

R_f : 0.15 (Ethyl acetate/PE 2.5/7.5)

CLogP : 5.7



The mixture of 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxyvinylbenzene (3.342g, 12.94 mmol, 1 equiv), 4-(benzyloxy)-3-bromo-5-methoxybenzaldehyde (8.31g, 25.88 mmol, 3 equiv), and Cu (4.11g, 64.70 mmol, 5 equiv) in DMF (34 mL) was heated at 200 °C under argon atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was cooled to ambient temperature, diluted with EtOAc, and filtrated through silica gel. The filtrate was poured into H₂O 100 mL and extracted with EtOAc (3x 100mL). The combined organic layer was washed with brine 15 mL, dried over MgSO₄, and filtrated. The filtrate was evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (eluting with ethyl acetate/PE, 20/80) to afford 48% of the product as brown solid.

Or

A clean dry reaction tube with a magnetic stir bar was charged with with aryl bromide (**18a**) or aryl iodide (**18b**) (1 mmol, 1eq.), 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**19a**; 387 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq.), cesium carbonate (812 mg, 2.5 mmol, 2.5 eq.), 1-naphthoic acid (430 mg, 2.5 mmol, 2.5 eq.), molecular sieves (250 mg) and DMF (8 mL) under argon. (CuOTf)₂·PhCH₃ (10 mol%, 0.1 eq.) was then added quickly and sealed with a septum. The reaction mixture was then heated at 140°C for 7 h when all the starting haloarene was consumed (TLC; 20% EtOAc in Petroleum ether). The solvent was then removed under vacuum and the crude dark brown mass was taken in dichloromethane (30 mL X 2). The organic layer was then washed thoroughly with water (30 mL X 2). It was then dried over anhydrous MgSO₄. Removal of solvent gave a crude brown mass which was purified over silica gel (60-200) using 10-20% EtOAc in Petroleum ether as eluant to get 61% of **24a** when using **18a** or 78% when using **18b**.

Mp : 100°C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3030 (CH arom.); 2940 (CH arom.); 1691 (C=O); 1594 (C=C arom.); 1497 (C=C arom.); 1220 (C_(Ph)-O); 1117 (C-O-C); 1090 (C-O-C).

Experimental section

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm : 3.85 (s, 3H, OCH_3); 3.87 (s, 3H, OCH_3); 5.08 (s, 2H, CH_2); 5.14 (s, 2H, CH_2); 6.73 (d, 1H, $^4J_{6'-2'} = 1.7$ Hz, H_6); 7.09-7.14 (m, 3H); 7.20-7.26 (m, 8H); 7.38-7.41 (m, 2H); 9.68 (s, 1H, CHO); 9.91 (s, 1H, CHO).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm : 56.3 (s, 1C, OCH_3); 56.4 (s, 1C, OCH_3); 71.0 (s, 1C, CH_2); 75.1 (s, 1C, CH_2); 106.4 (s, 1C, C_2); 106.7 (s, C_2'); 108.3 (s, 1C, C_6'); 110.3 (s, 1C, C_6); 127.5 (s, 2C, C_o or m); 127.9 (s, 1C, C_p); 128.1 (s, 2C, C_o or m); 128.2 ; (s, 1C, C_p); 128.3 (s, 2C, C_o or m); 128.5 (s, 2C, C_o or m); 131.5 (s, 1C, C_1'); 133.5 (s, 1C, C_1); 135.7 (s, 1C, C_5); 137.4 (s, $\text{C}_{\text{hypso(Bn)}}$); 137.8 (s, $\text{C}_{\text{hypso(Bn)}}$); 142.8 (s, 1C, C_4'); 152.0 (s, 1C, C_5'); 152.4 (s, 1C, C_3); 153.9 (s, 1C, C_4); 154.5 (s, 1C, C_3'); 190.8 (s, 1C, CHO); 190.9 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH_3 , pos) m/z: 516 [$\text{M}+\text{NH}_4^+$].

Experimental section

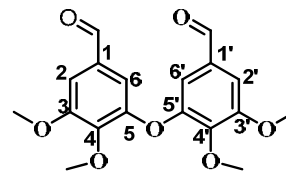
24b. 5,5'-oxybis(3,4-dimethoxybenzaldehyde) :

MF : C₁₈H₁₈O₇

MW : 346.33 g.mol⁻¹

R_f : 0.15 (Ethyl acetate /PE, 2.5/7.5)

CLogP : 2.16



The mixture of ArOH (300mg, 1.65 mmol, 1 equiv), ArBr (807 mg, 3.30 mmol, 2 equiv), and Cu (523 mg, 8.24 mmol, 5 equiv) in DMF (3 mL) was heated at 200 °C under Ar. After stirring for 1 h, the reaction mixture was cooled to ambient temperature, diluted with EtOAc (10 mL), and filtrated. The filtrate was poured into H₂O (20 mL) and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3x20 mL). The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and filtrated. The filtrate was evaporated and the resulting residue was purified by silica gel column chromatography (eluting with ethyl acetate/petroleum ether 30/70) to give A34 (255 mg) in 45% yield as yellow solid.

Mp : 94-96°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 2997 (C-H arom.); 2937 (C-H aliph.); 1693 (C=O); 1579 (C=C arom.); 1499 (C=C arom.); 1454 (C=C arom); 1327 (C_(ph)-O-C); 1110 (C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.96 (s, 3H, OCH₃); 3.97 (s, 3H, OCH₃); 7.03 (d, 2H, ⁴J₆₋₂ = ⁴J_{6'-2'} = 1.8 Hz, H_{6,6'}); 7.28 (d, 2H, ⁴J₂₋₆ = ⁴J_{2'-6'} = 1.8 Hz, H_{2,2'}); 9.79 (s, 2H, CHO).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm : 56.3 (s, 2C, OCH₃); 61.1 (s, 2C, OCH₃); 107.5 (s, 2C, C_{2,2'}); 114.5 (s, 2C, C_{6,6'}); 131.7 (s, 2C, C_{1,1'}); 145.4 (s, 2C, C_{4,4'}); 149.9 (s, 2C, C_{3,3'}); 154.3 (s, 2C, C_{5,5'}); 190.4 (s, 2C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 364 [M+NH₄⁺].

Experimental section

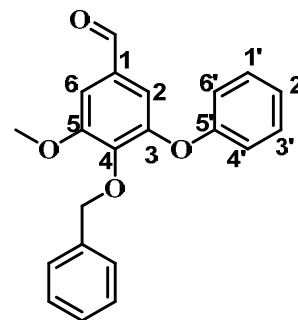
27. 4-(benzyloxy)-3-methoxy-5-phenoxybenzaldehyde :

MF : C₂₁H₁₈O₄

MW : 334.37 g.mol⁻¹

R_f : 0.3 (Ethyl acetate/PE, 1/9)

CLogP : 4.97



Followed the similar protocol (Protocol 2) to prepare 27 from 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.035 g, 0.13 mmol, 1 equiv) and iodobenzene (0.028 g, 0.14 mmol, 1 equiv). The reaction time is 24h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with Ethyl acetate /PE 10/90) to give 30 % as a dark solid.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3064 (CH arom.); 2923(CHaliph.); 1693 (C=O); 1582 (C=C arom.); 1491 (C=C arom); 1222 (C_(Ph)-O); 1094 (C-O-C).

¹H NMR (Acetone-d₆, 300 MHz) δ ppm: 4.04 (s, 3H, OCH₃); 5.18 (s, 2H, CH₂); 7.02 (d, 2H, ³J_{4'-3'} = ³J_{6'-1'} = 7.8 Hz, H_{4',6'}); 7.16 (t, 1H, ³J_{2'-1'} = ³J_{2'-3'} = 7.4 Hz, H_{2'}); 7.22 (d, 1H, ³J₂₋₆ = 1.8Hz, H₂); 7.32-7.41 (m, 7H; H_{Bn}, H_{1',3'}); 7.46 (d, 1H, ³J₂₋₆ = 1.8Hz, H₆); 9.91 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (Acetone-d₆, 75 MHz) δ ppm : 57.4 (s, 1C, OCH₃); 76.1 (s, 1C, CH₂), 109.6 (s, 1C, C₆); 116.6 (s, 1C, C₂); 119.1 (s, 2C, C_{4',6'}); 124.7 (s, 1C, C_{2'}); 129.4 (s, 1C, C_p); 129.6 (s, 2C, C_o or m); 129.7 (s, 2C, C_o or m); 131.4 (s, 2C, C_{1',3'}); 134.1 (s, 1C, C₁); 138.9 (s, 1C, C_{hypso(Bn)}); 146.5 (s, 1C, C₄); 151.7 (s, 1C, C₅); 156.5 (s, 1C, C₃); 159.0 (s, 1C, C_{5'}); 92.0 (s, 1C, CHO).

MS (CI, NH₃, pos) m/z: 352 [M+NH₄⁺].

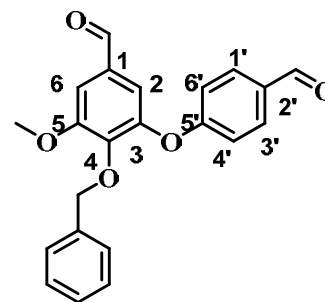
32. 4-(benzyloxy)-3-(4-formylphenoxy)-5-methoxybenzaldehyd :

MF : C₂₂H₁₈O₅

MW : 362.38 g.mol⁻¹

R_f : 0.3 (Ethyl acetate /PE, 1/9)

CLogP : 5.32



Followed the similar protocol (Protocol 2) to prepare **32** from 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.100 g, 0.39 mmol, 1 equiv) and 4-bromobenzaldehyde (0.086 g, 0.46 mmol, 1.2 equiv). The reaction time is 24h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with Ethyl acetate /PE, 10/90) to give 50 % as a yellow oil

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3025 (CH arom.); 2924 (CHaliph.); 1694 (C=O); 1598 (C=C arom.); 1580 (C=C arom.); 1230 (C_(Ph)-O); 1090 (C-O-C).

¹H NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 4.04 (s, 3H, OCH₃); 5.14 (s, 2H, CH₂); 7.08 (d, 2H, ³J_{4'-3'} = ³J_{6'-1'} = 8.6 Hz, H_{4',6'}); 7.26 (m, 5H, H_{Bn}); 7.37 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1,8 Hz, H₆); 7.54 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,8 Hz, H₂); 7.90 (d, 2H, ³J_{1'-6'} = ⁴J_{3'-4'} = 8.6 Hz, H_{1',3'}); 9.93 (s, 1H, CHO), 9.95 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (Acetone-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 57.6 (s, 1C, OCH₃); 76.3 (s, 1C, CH₂); 110.8 (s, 1C, C₆); 118.3 (s, 2C, C_{4',6'}); 118.4 (s, 1C, C₂); 129.6 (s, C_p); 129.7 (s, 2C, C_o); 129.8 (s, 2C, C_m); 133.3 (s, 2C, C_{1',3'}); 133.5 (s, C₁ or 2'); 134.4 (s, 1C, C_{2' or 1}); 138.7 (s, 1C, C_{hypo(Bn)}); 149.8 (s, 1C, C₄); 156.7 (s, 1C, C_{3 or 5}); 164.4 (s, 1C, C_{5'}); 191.9 (s, 1C, CHO); 192.1 (s, 1C, CHO). 1C_{3 or 5} non visible).

MS (FAB, MNBA) m/z: 380 [M+NH₄⁺].

Experimental section

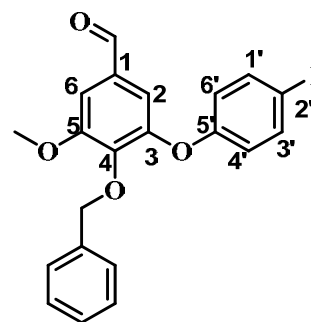
33. 4-(benzyloxy)-3-(4-iodophenoxy)-5-methoxybenzaldehyde :

MF : C₂₁H₁₇IO₄

MW : 460.26 g.mol⁻¹

R_f : 0.3 (Ethyl acetate /PE, 1/9)

CLogP : 6.08



Followed the similar protocol (Protocol 2) to prepare **33** from 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.100 g, 0.39 mmol, 1 equiv) and 1-4-diiodobenzene (0.064 g, 0.19 mmol, 0.5 equiv). The reaction time is 24h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with Ethyl acetate /PE, 10/90) to give 50 % as a yellow oil.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3028 (CH arom.); 2927 (CH aliph.); 1694 (C=O); 1582 (C=C arom.); 1491 (C=C arom.); 1223 (C_(Ph)-O); 1095 (C-O-C); 695 (C-I).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.96 (s, 3H, OCH₃); 5.14 (s, 2H, CH₂); 6.66 (d, 2H, ³J_{4'-3'} = ³J_{6'-1'} = 8.9 Hz, H_{4',6'}); 7.09 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,8 Hz, H₂); 7.28 (m, 6H, H_{Bn}, H₆); 7.58 (d, 2H, ³J_{1'-6'} = ³J_{3'-4'} = 8.9 Hz, H_{1',3'}); 9.80 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (Acetone-d₆, 75 MHz) δ ppm : 57.5 (s, 1C, OCH₃); 76.3 (s, 1C, CH₂); 86.8 (s, 1C, C_{2'}); 110.1(s, 1C, C₆); 117.4 (s, 1C, C₂); 121.2 (s, 2C, C_{4'-6'}); 129.6 (s, 1C, C_p); 129.7 (s, 2C, C_o); 129.8 (s, 1C, C_m); 134.2 (s, 1C, C₁); 138.9 (s, 1C, C_{hypso(Bn)}); 140.3 (s, 2C, C_{1',3'}); 146.7 (s, 1C, C₄); 150.9 (s, 1C, C₅); 156.6 (s, 1C, C₃); 159.5 (s, 1C, C_{5'}); 192.0 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 478 [M+NH₄⁺].

Experimental section

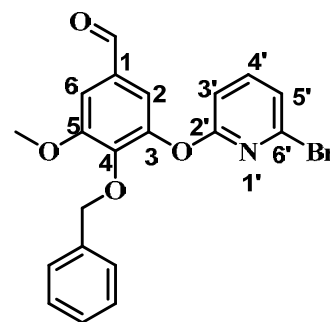
34. 4-(benzyloxy)-3-(6-bromopyridin-2-yloxy)-5-methoxybenzaldehyde :

MF : C₂₀H₁₆BrNO₄

MW : 414.25 g.mol⁻¹

R_f : 0.3 (Ethyl acetate/PE, 1/9)

CLogP : 4.42



Followed the similar protocol (Protocol 2) to prepare **34** from 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.100 g, 0.39 mmol, 1 equiv) and 2,6-dibromopyridine (0.232 g, 0.98 mmol, 2.2 equiv). The reaction time is 24h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with ethyl acetate/petroleum ether 10/90) to give 50 % as a yellow solid

Mp : 120 °C

IR (KBr) v cm⁻¹: 3002 (CH arom.); 2922 (CHaliph.); (1690 (C=O); 1580 (C=C arom.); 1422 (C=N arom); 1261 (C_(Ph)-O); 1085 (C-O-C); 699 (C-Br).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3,96 (s, 3H, OCH₃); 5.11 (s, 2H, CH₂); 6.79 (dd, 1H, ³J_{5'-4'} = 8.1 Hz, ⁴J_{5'-3'} = 0.6 Hz, H_{5'}); 7.11 (dd, 1H, ³J_{3'-4'} = 7.6 Hz, ⁴J_{3'-5'} = 0.6 Hz, H_{3'}); 7.17-7.25 (m, 5H, H_{Bn}); 7.31 (d, 1H, ³J₂₋₆ = 1,8 Hz, H₂); 7.38 (d, 1H, ³J₆₋₂ = 1,8 Hz, H₆); 7.44 (dd, 1H, ³J_{4'-5'} = 8.1 Hz, ³J_{4'-3'} = 7.6 Hz, H_{4'}); 9.87 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm : 56.6 (s, 1C, OCH₃); 75.0 (s, 1C, CH₂); 108.6 (s, 1C, C_{3'}); 109.5 (s, 1C, C₆); 119.3 (s, 1C, C₂); 122.8 (s, 1C, C_{5'}); 128.1 (s, 2C, C₆); 128.2 (s, 1C, C_p), 128.5 (s, 2C, C_m); 132.2 (s, 1C, C₁); 137.1 (s, 1C, C_{hypso(Bn)}); 139.2 (s, C_{6'}); 141.5 (s, 1C, C_{4'}); 146.2 (s, 1C, C₃); 147.1 (s, 1C, C₄); 154.8 (s, 1C, C₅); 162.7 (s, C_{2'}); 190.8 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 414 and 416 [M+H⁺].

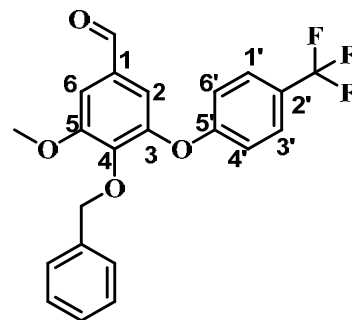
35. 4-(benzyloxy)-3-methoxy-5-(4-(trifluoromethyl)phenoxy)benzaldehyde :

MF : C₂₂H₁₇F₃O₄

MW : 402.36 g.mol⁻¹

R_f : 0.2 (Ethyl acetate /PE, 1/9)

CLogP : 5.85



Followed the similar protocol (Protocol 2) to prepare **35** from 4-(benzyloxy)-3-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (0.055 g, 0.21 mmol, 1 equiv) and 1-(trifluoromethyl)-4-iodobenzene (0.058 g, 0.21 mmol, 1 equiv). The reaction time is 6h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with ethyl acetate/petroleum ether 5/95) to give 99% as a dark solid.

Mp : 100 °C

IR (KBr) v cm⁻¹: 3017 (CH arom.); 2905(CH aliph.); 1636 (C=O); 1511 (C=C arom.); 1453 (C=C arom.); 1323 (C-F); 1234 (C_(Ph)-O); 1063 (C-O-C).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.99 (s, 3H, OCH₃); 5.11 (s, 2H, CH₂); 6.95 (d, 2H, ³J_{4'-3'} = ³J_{6'-1'} = 8.4 Hz, H_{6',4'}); 7.20 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1.8 Hz, H₆); 7.26-7.28 (m, 5H, H_{Bn}); 7.37 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1.8 Hz, H₂); 7.56 (d, 2H, ³J_{3'-4'} = ³J_{1'-6'} = 8.4 Hz, H_{1',3'}); 9.85 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm : 56.3 (s, 1C, OCH₃); 75.2 (s, 1C, CH₂), 107.9 (s, 1C, C₆); 116.9 (s, 2C, C_{6',4'}); 117.2 (s, 1C, C₂); 124.9 (s, 1C, C_{2'}); 127.1 (q, 1C, ²J_{C-F} = 3.7 Hz, CF₃); 128.1, 128.2, 128.3 (3s, 5C, C_{o, m, p, 1', 3'}); 132.1 (s, 1C, C₁); 136.5 (s, 1C, C_{hypso(Bn)}); 145.3 (s, 1C, C₃); 148.7 (s, 1C, C₄); 154.8 (s, 1C, C₅); 160.0 (s, 1C, C_{5'}); 190.2 (s, 1C, CHO).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 420 [M+NH₄⁺].

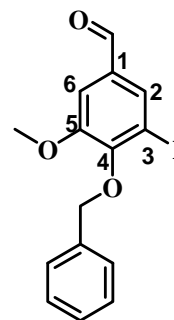
37. 4-(benzyloxy)-3-iodo-5-methoxybenzaldehyde :

MF : C₁₅H₁₃IO₃

MW : 368.17 g.mol⁻¹

R_f : 0.8 (DCM/PE 1/1)

CLogP : 4.08



Followed the similar protocol (**Protocol 1**) to prepare **18b** from iodoovanilline (1g, 43.3 mmol, 1 equiv). The reaction time is 10h. The crude material was purified by column chromatography on silica gel (eluting with ethyl acetate/petroleum ether 5/95) to give 90 % yield as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 3.94 (s, 6H, OCH₃); 5.16 (s, 2H, CH₂); 7.36 (m, 2H); 7.38 (m, 1H); 7.39 (d, ⁴J₆₋₂ = 1,7 Hz, H₆); 7.52 (dd, 2H, ³J_{o-m(Bn)} = 7.6Hz, ⁴J_{o-p(Bn)} = 1.4Hz, H_o); 7.53 (d, 1H, ⁴J_{H4-H2} = 1,7 Hz, H₆); 7.66 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,7 Hz, H₂); 9.84 (s, 1H, CHO).

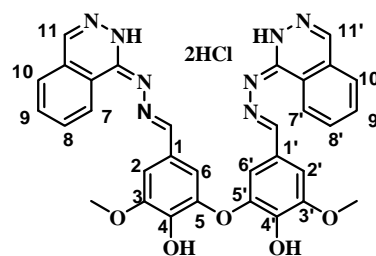
39. 6,6'-oxybis(2-methoxy-4-((E)-(E)-phthalazin-1(2H)-ylidenehydrazono)methylphenol) dihydrochloride :

MF : C₃₂H₂₈Cl₂O₈N₅

MW : 602.6 g.mol⁻¹

R_f : 0.10 (Ethyl acetate)

CLogP : 5.18



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **39** from 5,5'-oxybis(4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) **A12** (0.05 g, 0.16 mmol, 1equiv) and hydralazine chlorhydrate (0.062 g, 0.31 mmol, 2 equiv), the reaction time is 14h and the product is recovered by filtration to give 62% yield as a yellow solid.

Mp : 280°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3393 (O-H); 3029 (CH arom.); 2919 (CH aliph.); 1672 (C=N), 1620 (C=N); 1592 (C=C arom.); 1511 (C=C arom), 1471 (C=C arom.); 1321 (C_(Ph)-O); 1276 (C-O-C), 1213 (C-O-C); 1089 (C-O-C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 3.91 (s, 3H, OCH₃); 4.01 (s, 3H, OCH₃); 6.45 (d, 1H, ⁴J_{6'-2'} = 1.5 Hz, H_{6'}); 7.20 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1.5 Hz, H₂); 7.64 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1.5 Hz, H₆); 7.76 (d, 1H, ⁴J_{2'-6'} = 1,4 Hz, H_{2'}); 8.14 (t, 2H, ³J₈₋₇ = ³J₈₋₉ = 8.2 Hz, H_{8, 8'}); 8.20-8.28 (m, 4H, H_{9, 9', 10, 10'}); 8,97 (s, 1H, ArCH=N), 9,02 (s, 1H, H₁₁); 9.06 (s, 1H, ArCH=N); 9.11 (s, 1H, H_{11'}); 9.20 (d, ³J₇₋₈ = 8.2 Hz, H_{7 or 7'}); 9.31 (d, ³J_{7'-8'} = 8.2 Hz, H_{7' or 7}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 57.3 (s, 1C, OCH₃); 57.4 (s, 1C, OCH₃); 103.3 (s, C₂); 104.9 (s, C_{2'}); 110.8 (s, C_{6'}); 113.0 (s, C₆); 123.6 (s, C₁); 1263.6 (s, C_{1'}); 126.2 (s, C₇); 126.5 (s, C_{7'}); 128.8 (s, C_{10'}); 128.9 (s, C₁₀); 129.2 (s, CH); 131.1 (s, C₅); 134.2 (s, C₄); 134.7 (s, CH); 136.8 (s, CH); 146.9 (s, C_{5'}); 148.8 (s, C₃); 150.2 (s, C₄); 153.9 (s, 1C, ArCH=N); 154.2 (s, 1C, ArCH=N); 154.4 (s, C_{3'}).

MS (FAB, MNBA) m/z: 603 [M+H⁺].

Experimental section

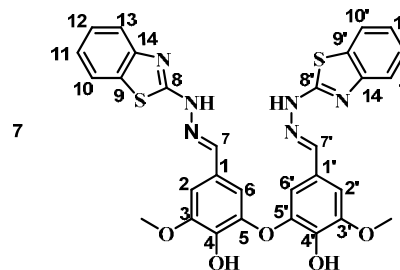
40. (E)-6,6'-oxybis(4-((E)-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazono)methyl)-2-methoxyphenol) :

MF : C₃₀H₂₄O₅N₆S₂

MW : 612.78 g.mol⁻¹

R_f : 0.20 (Ethyl acetate)

CLogP : 7.63



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **40** from 5,5'-oxybis(4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) **A12** (0.067 g, 0.21 mmol, 1equiv) and 1-(benzo[d]thiazol-2-yl)hydrazine (0.070 g, 0.42 mmol, 2 equiv), the reaction time is 14h and the product is recovered by filtration to give 73% yield as a light brown solid.

Mp : 285°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3404 (O-H); 3064 (C-H arom); 2863 (C-H aliph.); 1620 (C=N arom); 1607(C=C arom.); 1572 (C=C arom.); 1512 (C=N benzothiazol); 1458 (C=C arom.); 1271 (C_(Ph)-O); 1201 (C-O-C); 1098 (C-O-C); 1082 (C-O-C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 3.83 (s, 3H, OCH₃); 3.90 (s, 3H, OCH₃); 6.52 (d, 1H, ⁴J_{6'-2'} = 1,5 Hz, H_{6'}); 7.02 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,6 Hz, H₂ or ₆); 7.02 (t, 1H, ³J₁₂₋₁₁ = ³J₁₂₋₁₃ = 7.7 Hz, H₁₂ or _{12'}); 7.04 (d, 1H, ⁴J_{2'-6'} = 1,5 Hz, H_{2'}); 7.10 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1,6 Hz, H₆ or ₂); 7.15 (t, 1H, ³J₁₂₋₁₃ = ³J₁₂₋₁₁ = 7.7 Hz, H₁₂ or _{12'}); 7.27 (t, 1H, ³J₁₁₋₁₀ = ³J₁₁₋₁₂ = 7.7 Hz, H₁₁ or _{11'}); 7.34 (t, 1H, ³J₁₁₋₁₀ = ³J₁₁₋₁₂ = 7.7 Hz, H₁₁ or _{11'}); 7.40 (d, ³J₁₀₋₁₁ = 7.7 Hz, H₁₀ or _{10'}); 7.49 (d, ³J₁₀₋₁₁ = 7.7 Hz, H₁₀ or _{10'}); 7.70 (d, ³J₁₃₋₁₂ = 7.7 Hz, H₁₃ or _{13'}); 7.90 (s, 1H, H₇ or _{7'}); 8.15 (s, 1H, H₇ or _{7'}).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 55.9 (s, 1C, OCH₃); 56.0 (s, 1C, OCH₃); 102.5 (s, 1C, CH_{ar}); 104.3 (s, 1C, CH_{ar}); 105.4 (s, 1C, CH_{ar}); 107.4 (s, 1C, CH_{ar}); 121.3 (s, 1C, CH_{ar}); 121.4 (s, 1C, CH_{ar}); 121.5 (s, 1C, CH_{ar}); 122.6 (s, 1C, CH_{ar}); 124.3 (s, C_q); 125.9 (s, 1C, CH_{ar}); 126.0 (s, 1C, CH_{ar}); 131.6 (s, C_q); 131.9 (s, C_q); 137.3 (s, C_q); 146.72 ((s, C_q); 148.7 (s, C_q); 151.0 (s, C_q); 153.4 (s, C_q); 166.7 (s, 1C, C₈ or _{8'}); 167.0 (s, 1C, C₈ or _{8'}).

MS (FAB, MNBA) m/z: 613 [M+H⁺].

Experimental section

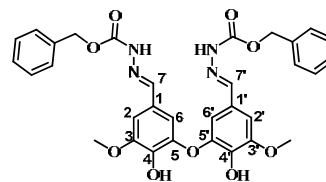
41. (2E,2'E)-benzyl 2,2'-(5,5'-oxybis(4-hydroxy-3-methoxy-5,1-phenylene))bis(methan-1-yl-1-ylidene)bis(hydrazinecarboxylate) :

MF : C₃₂H₃₀O₉N₄

MW : 614.6 g.mol⁻¹

R_f : 0.20 (Ethyl acetate)

CLogP : 4.86



Followed the similar protocol (Protocol 4) to prepare **41** from 5,5'-oxybis(4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) **A12** (0.054 g, 0.17 mmol, 1equiv) and benzyl hydrazine carboxylate (0.056 g, 0.34 mmol, 2 equiv), the reaction time is 14h and the product is recovered by precipitation in 10 ml of DCM to give 76% yield as a white solid.

Mp : 163°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3424 (O-H or N-H); 3234 (O-H or N-H); 3059 (C-H arom.); 2941 (CH aliph.); 1715 (C=O); 1605 (C=N); 1588 (C=C arom); 1548 (C=C arom.); 1510 (C=C arom); 1234 (C_(Bn)O); 1271 (C-O-C); 1201 (C-O-C); 1098 (C-O-C); 1082 (C-O-C).

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.71 (s, 3H, OCH₃); 3.88 (s, 3H, OCH₃); 5.17 (s, 2H, CH₂); 5.23 (s, 2H, CH₂); 6.48 (s, 1H, H_{6'}); 6.88 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1,6 Hz, H₂); 7.07 (s, 1H, H₆); 7.22 (s, 1H, H₂); 7.28-7.43 (m, 10H, H_(Bn)); 7.67 (s, 1H, H_{7 or 7'}); 7.87 (s, 1H, H_{7 or 7'}).

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm : 57.4 (s, 1C, OCH₃); 57.6 (s, 1C, OCH₃); 68.8 (s, 1C, CH₂); 69.0 (s, 1C, CH₂); 104.0 (s, 1C, CH_{Ar}); 105.6 (s, 1C, CH_{Ar}); 110.1 (s, 1C, CH_{Ar}); 111.3 (s, 1C, CH_{Ar}); 127.0 (s, 1C, C₁); 129.8 (s, 2C, CH_{Bn}); 129.9 8 (s, 2C, CH_{Bn}); 130.0 (s, 1C, C_{p(Bn)}); 130.1 (s, 1C, C_{p(Bn)}); 130.3(s, 2C, CH_{Bn}); 130.4 (s, 2C, CH_{Bn}); 134.0 (s, 1C, C_q); 135.0 (s, 1C, C_q); 138.5 (s, 1C, C_q); 138.6 (s, 1C, C_q); 139.7 (s, 1C, C_q); 147.2 (s, 1C, C_{7 or 7'}); 147.9 (s, 1C, C_{7 or 7'}); 148.4 (s, 1C, C_q); 151.0 (s, 1C, C_q); 153.0 (s, 1C, C_q); 155.6 (s, 1C, C_q); 157.1 (s, 1C, C=O); 157.2 (s, 1C, C=O).

MS (FAB, MNBA) m/z: 632 [M+NH₄⁺].

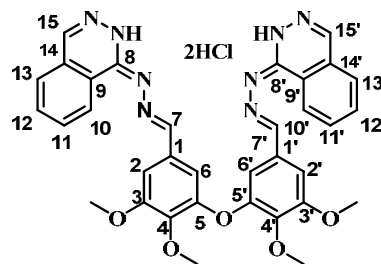
42. (1E,1'E)-1,1'-((2E,2'E)-(5,5'-oxybis(3,4-dimethoxy-5,1-phenylene))bis(methan-1-yl-1-ylidene)bis(hydrazine-2,1-diylidene))bis(1,2-dihydrophthalazine) dihydrochloride :

MF : C₃₄H₃₂Cl₂N₈O₅

MW : 703.57 g.mol⁻¹

R_f : 0.10 (Ethyl acetate)

CLogP : 2.59



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare **42** from 5,5'-oxybis(3,4-dimethoxybenzaldehyde) **A34** (130 mg, 0.375 mmol) and hydralazine chlorhydrate (0.148 g, 0.75 mmol, 2 equiv), the reaction time is 14h and the product is recovered by filtration to give 62% yield as a yellow solid.

Mp : 290°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3392 (N-H); 3000 (C-H arom.); 2944 (C-H aliph.); 1615 (C=C arom.); 1594 (C=C arom.); 1502 (C=C arom.), 1420 (C=N arom.); 1323 (C-N arom); 1239 (C-O-C), 1117 (C-O-C); 1010 (C-O-C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 3,86 (s, 6H, OCH₃); 4.04 (s, 6H, OCH₃); 7.20 (d, 2H, ⁴J₆₋₂ = ⁴J_{6'-2'} = 1.2 Hz, H_{6,6'}); 7.77 (d, 2H, ⁴J₂₋₆ = ⁴J_{2'-6'} = 1.3 Hz, H_{2,2'}), 8.08-8.24 (m, 6H, H_{7,7',8,8',9,9'}); 9.10 (s, 2H, HC=N); 9.14 (s, 2H, H_{11,11'}); 9.36 (d, 2H, ³J₇₋₈ = ³J_{7'-8'} = 8.0 Hz, H_{7,7'}); 14.62 (bs, 2H, HCl) .

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 56.5 (s, 2C, OCH₃); 60.6 (s, 2C, OCH₃); 107.3 (s, 2C, C_{6,6'}); 112.9 (s, 2C, C_{2,2'}); 119.1 (s, 2C, C_{1,1'}); 125.7 (s, C_{10,10'}); 128.0 (s, 2C, C_{14 or 9}); 128.2 (s, 2C, C_{13,13'}); 128.7 (s, 2C, C_{14 or 9}); 133.7 (s, 2C, C_{11,11'}); 135.9 (s, 2C, C_{12,12'}); 142.1 (s, 2C, C_{4,4'}); 147.9 (s, 2C, C_{8,8'}); 149.8 (s, 2C, C_{3,3'}); 152.3 (s, 2C, C_{7,7'}); 154.1 (s, 2C, C_{5,5'}).

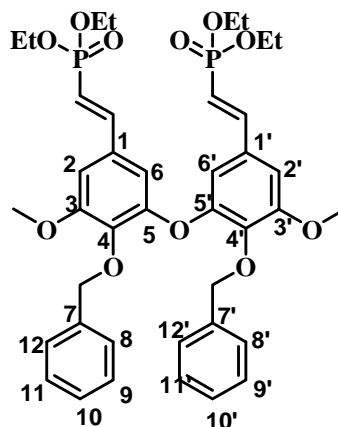
MS (DCI) m/z: 631[M+H⁺].

43. tetraethyl (1E,1'E)-2,2'-(5,5'-oxybis(4-(benzyloxy)-3-methoxy-5,1-phenylene))bis(ethene-2,1-diyl)diphosphonate :

MF : C₄₀H₄₈O₁₁P₂

MW : 766.75 g.mol⁻¹

R_f : 0.3 (Methanol/DCM 0.5/9.5)



In a clean dry round bottom flask diisopropylamine (0.34 g, 3.36 mmol, 4.12 equiv) was dissolved in dry THF (10 ml) under argon. It was then cooled to -78°C. n-BuLi (0.215 g, 3.36 mmol, 4.12 equiv, solution of 1.6 M in hexane) was then added dropwise. The reaction mixture was stirred for 30 min at -78 °C under N₂. Tetraethyl methylenediphosphonate (0.969 g, 3.36 mmol, 4.12 equiv) was added to the reaction mixture and stirred for 1 h at -78 °C. 5,5'-oxybis(4-(benzyloxy)-3-methoxybenzaldehyde) (0.407 g, 0.82 mmol, 1 equiv) in THF (7mL) was added, and mixture was stirred for 45 min at -78 °C, then allowed to warm up to room temperature and refluxed. After 2 h, saturated aqueous NH₄Cl was added to quench the reaction, and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3x 25ml). The combined extracts were dried with MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting with MeOH/DCM from 1% MeOH to 3% MeOH) to afford 99% product as yellow oil.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 2983 (C-H vinyl); 2926 (CH aliph.); 1620 (C=C arom); 1586 (C=C vinyl); 1423 (C=C arom); 1244 (P=O), 1095 (C-O-C); 1026 (P-O, stretch.).

¹H NMR (Acetone-*d*₆, 300 MHz) δ ppm: 1.27 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 1.34 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 3.90 (s, 3H, OCH₃); 3.94 (s, 3H, OCH₃); 4.04 (quint., 4H, ³J_{CH₂-CH₃} = ³J_{H-P} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 4.13 (quint., 4H, ³J_{CH₂-CH₃} = ³J_{H-P} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 5.09 (s, 2H, CH₂(Bn)); 5.23 (s, 2H, CH₂(Bn)); 6.29 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = ²J_{HC-P} = 17.3 Hz, ArCH=CHP); 6.56 (s, 1H, H₆); 6.59 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = ²J_{HC-P} = 17.1 Hz, ArCH=CHP); 7.14 (s, 1H, H₂); 7.20 (s, 1H, H₆); 7.26-7.52 (m, 13H, H_{Bn}, H₂, 2CH=CHP).

¹³C NMR (Acetone-*d*₆, 75 MHz) δ ppm : 17.7 (d, 2C, ³J_{C-P} = 5.4 Hz, POCH₂CH₃); 17.8 (d, 2C, ³J_{C-P} = 5.4 Hz, POCH₂CH₃); 57.7 (s, 2C, OCH₃); 63.0 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, POCH₂CH₃); 63.1 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, POCH₂CH₃); 72.3 (s, 1C, CH₂(Bn)); 76.3 (s, 1C,

Experimental section

CH₂(Bn)); 107.0 (s, 1C, C₂); 107.4 (s, 1C, C_{2'}); 108.6 (s, 1C, C_{6'}); 109.6 (s, 1C, C₆); 116.1 (d, 1C, ¹J_{C-P} = 189.5 Hz, ArCH=C_{HP}); 117.1 (d, 1C, ¹J_{C-P} = 188.4 Hz, ArCH=C_{HP}); 129.4 (s, 1C, C_p(Bn)); 129.5 (s, 2C, C_{Bn}); 129.7 (s, 1C, C_p(Bn)); 129.8 (s, 2C, C_{Bn}); 129.9 (s, 2C, C_{Bn}); 130.2 (s, 2C, C_{Bn}); 132.4 (d, 1C, ³J_{C-P} = 23.8 Hz, C₁); 134.6 (d, 1C, ³J_{C-P} = 23.9 Hz, C_{1'}); 135.9 (s, 1C, C_q); 138.7 (s, 1C, C_q); 140.2 (s, 1C, C_q); 140.8 (s, 1C, C_q); 149.4 (d, 1C, ²J_{C-P} = 3.1 Hz, ArCH=C_{HP}); 149.5 (d, 1C, ²J_{C-P} = 3.1 Hz, ArCH=C_{HP}); 154.1 (s, 1C, C_q); 154.3 (s, 1C, C_q); 155.6 (s, 1C, C_q); 156.3 (s, 1C, C_q).

³¹P NMR (Acetone-*d*₆, 121 MHz) δ ppm: 18.98 (s, P-OEt), 19.31 (s, P-OEt).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 767 [M+H⁺].

Experimental section

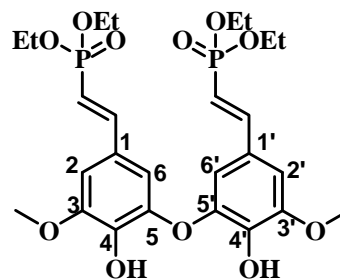
44. tetraethyl (1E,1'E)-2,2'-(5,5'-oxybis(4-hydroxy-3-methoxy-5,1-phenylene))bis(ethene-2,1-diyl)diphosphonate :

MF : C₂₆H₃₆O₁₁P₂

MW : 586.5 g.mol⁻¹

R_f : 0.3 (MeOH/DCM 0.5/9.5)

CLogP : 4.42



Followed the similar protocol (Protocol 3) to prepare **44** from **43** (0.05g, 0.07 mmol, 1 equiv). the crud material was flashed by column chromatography on silica gel to give 90 % as a yellow solid.

Mp : 70°C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3402 (O-H); 2983 (C-H vinyl); 2936(CH aliph.); 1616 (C=C arom); 1591 (C=C vinyl); 1515 (C=C arom); 1229 (P=O), 1151 (C-O-C); 1022 (P-O); 962 (HC=CH, E).

¹H NMR (Acetone-d₆, 300 MHz) δ ppm: 1.22 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 1.28 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 3.91 (s, 3H, OCH₃); 3.98 (quint., 4H, ³J_{CH₂-CH₃} = ³J_{H-P} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 4.07 (quint., 4H, ³J_{CH₂-CH₃} = ³J_{H-P} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 6.10 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = ²J_{HC-P} = 17.3 Hz, ArCH=CHP); 6.41 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = ²J_{HC-P} = 17.3 Hz, ArCH=CHP); 6.55 (d, 1H, ⁴J_{6'-2'} = 1.7 Hz, H_{6'}); 6.92 (d, 1H, ⁴J₂₋₆ = 1.7 Hz, H₂); 6.98 (d, 1H, ⁴J₆₋₂ = 1.7 Hz, H₆); 7.04 (d, 1H, ⁴J_{2'-6'} = 1.7 Hz, H_{2'}); 7.18 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = 17.5 Hz, ³J_{HC=CP} = 22.3 Hz, ArCH=CHP); 7.35 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = 17.5 Hz, ³J_{HC=CP} = 22.3 Hz, ArCH=CHP).

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm : 17.5 (d, 2C, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, POCH₂CH₃); 17.6 (d, 2C, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, POCH₂CH₃); 57.5 (s, 1C, OCH₃); 57.8 (s, 1C, OCH₃); 64.1 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, POCH₂CH₃); 64.3 (d, 2C, ³J_{C-P} = 5.7 Hz, POCH₂CH₃); 105.3 (s, 1C, C₂); 107.2 (s, 1C, C_{2'}); 110.1 (s, 1C, C_{6'}); 111.4 (s, 1C, C₆); 111.5 (d, 1C, ¹J_{C-P} = 193.5 Hz, ArCH=CHP); 114.9 (d, 1C, ¹J_{C-P} = 191.6 Hz, ArCH=CHP); 127.4 (d, 1C, ³J_{C-P} = 24.4 Hz, C₁); 134.1 (d, 1C, ³J_{C-P} = 24.1 Hz, C_{1'}); 135.5 (s, 1C, C₅); 140.6 (s, 1C, C₄); 148.5 (d, 1C, ³J_{C-P} = 1.1 Hz, C₃); 151.0 (s, 1C, C_{5'}); 151.1 (d, 1C, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, ArCH=CHP); 151.5 (d, 1C, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, ArCH=CHP); 153.3 (d, 1C, ⁶J_{C-P} = 0.9 Hz, C₄); 155.8 (d, 1C, ⁶J_{C-P} = 0.8 Hz, C_{3'}).

³¹P NMR (Acetone-d₆, 121 MHz) δ ppm: 18.87 (s, P-OEt); 19.57 (s, P-OEt).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 587 [M+H⁺].

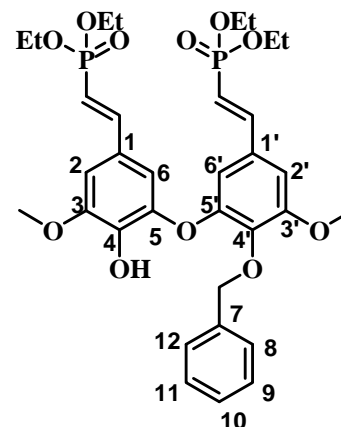
45. 4-hydroxy-4'-benzyloxy-3,3'-dimethoxybisarylether-1,1'-di(diethyl vinylphosphonate) :

MF : C₃₃H₄₂O₁₁P₂

MW : 676.63 g.mol⁻¹

R_f : 0.35 (MeOH/DCM 0.5/9.5)

CLogP : 6.56



To a stirred solution of **43** (0.05g, 0.07 mmol, 1 equiv) and N,N-dimethylaniline (0.158g, 1.3 mmol, 20 equiv) in dry CH₂Cl₂ (1 ml) was added AlCl₃ (0.07g, 0.52 mmol, 8 equiv) at room temperature. After 20 min, TLC indicated complete consumption of the starting material. The reaction was quenched with 1 N HCl (0.5 ml). The resulting mixture was extracted with ethyl acetate (3x 5 mL). The separated organic layer was washed with 5% NaHCO₃ solution (3 mL) and brine (3mL) and dried over MgSO₄, and filtrated. The organic solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting with MeOH/DCM 1-5%/99-95%) to afford 22% product as a yellow oil.

¹H NMR (Acetone, 300 MHz) δ ppm: 1.27 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 1.34 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 3.91 (s, 3H, OCH₃); 3.94 (s, 3H, OCH₃); 4.02 (dq, 4H, ³J_{H-P} = 8.0 Hz, ³J_{CH₂-CH₃} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 4.12 (t, 4H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 5.24 (s, 2H, CH₂(Bn)); 6.13 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = ²J_{HC-P} = 17.3 Hz, ArCH=CHP); 6.53 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = ²J_{HC-P} = 17.3 Hz, ArCH=CHP); 6.56 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz, H_{ar}); 7.10 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz, H_{ar}); 7.18 (d, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, H_{ar}); 7.22 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = 17.4 Hz, ³J_{HC=CP} = 22.4 Hz, ArCH=CHP); 7.24 (d, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, H_{ar}); 7.31 (m, 5H, H_{Bn}); 7.42 (dd, 1H, ³J_{E HC=CH} = 17.4 Hz, ³J_{HC=CP} = 22.4 Hz, ArCH=CHP).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 677 [M+H⁺].

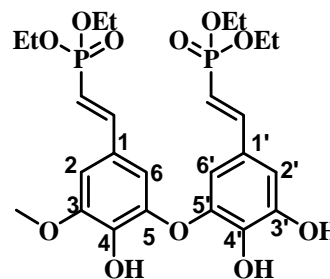
46. 4,4',3'-trihydroxy-3-methoxybisarylether-1,1'-di(diethyl vinylphosphonate) :

MF : C₂₅H₃₄O₁₁P₂

MW : 572.16 g.mol⁻¹

R_f : 0.2 (MeOH/DCM 5/95)

CLogP : 3.97



To a stirred solution of **43** (0.073g, 0.1 mmol, 1 equiv) and N,N-dimethylaniline (0.346g, 2.86 mmol, 30 equiv) in dry CH₂Cl₂ (3 ml) was added AlCl₃ (0.305g, 2.28 mmol, 24 equiv) at room temperature. After 20 min, TLC indicated complete consumption of the starting material. The reaction was quenched with 1 N HCl (0.5 mL). The resulting mixture was extracted with ethyl acetate (3x 5 ml). The separated organic layer was washed with 5% NaHCO₃ solution (3 mL) and brine (3mL) and dried over MgSO₄, and filtrated. The organic solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting with MeOH/DCM 1-5%/99-95%) to afford 44% product as a white solid and 19% of A15.

Mp : 197°C.

IR (KBr) v cm⁻¹: 3410 (O-H); 2919 (C-H vinyl); 2850(CH aliph.); 1612 (C=C arom.); 1590 (C=C vinyl); 1512 (C=C arom.); 1220 (P=O); 1108 (C-O-C); 1028 (P-O, stretch).

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 1.28 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.1 Hz, POCH₂CH₃); 1.35 (t, 6H, ³J_{CH₃-CH₂} = 7.1Hz, POCH₂CH₃); 3.78 (s, 3H, OCH₃); 4.03 (dq, 4H, ³J_{H-P} = 8.0 Hz, ³J_{CH₂-CH₃} = 7.1 Hz, POCH₂CH₃); 4.04 (t, 4H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, POCH₂CH₃); 4.11 (t, 4H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 4.12 (t, 4H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, POCH₂CH₃); 5.90 (dd, 1H, ²J_{HC-P}=18.5 Hz, ³J_{HC=CH} = 17.5 Hz, ArCH=CHP); 6.28 (d, 1H, ⁴J_{6'-2'} = 1,9 Hz, H_{6' or 6}); 6.37 (dd, 1H, ²J_{HC-P} = 18.1 Hz, ³J_{E HC=CH} = 17.5 Hz, ArCH=CHP); 6.77 (d, 1H, ⁴J = 1,9 Hz, H_{ar}); 6.85 (d, 1H, ⁴J = 1,8 Hz, H_{ar}); 6.87 (d, 1H, ⁴J = 1,8 Hz, H_{ar}); 7.12 (dd, 1H, ³J_{HC=CP} = 22.7 Hz, ³J_{E HC=CH} = 17.5 Hz, ArCH=CHP); 7.38 (dd, 1H, ³J_{HC=CP} = 22.7 Hz, ³J_{E HC=CH} = 17.5 Hz, ArCH=CHP).

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm : 17.4 (d, 2C, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, POCH₂CH₃); 17.5 (d, 2C, ³J_{C-P} = 6.3 Hz, POCH₂CH₃); 57.5 (s, 1C, OCH₃); 64.0 (d, 2C, ²J_{C-P} = 5.6 Hz, POCH₂CH₃); 64.2 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, POCH₂CH₃); 105.3 (s, 1C, CH_{Ar}); 108.2 (s, 1C, CH_{Ar}); 110.8 (s, 1C, CH_{Ar}); 110.9 (d, ¹J_{C-P} = 194.1 Hz, ArCH=CHP); 111.4 (s, 1C, CH_{Ar}); 114.8 (d, ¹J_{C-P} = 191.7 Hz, ArCH=CHP), 127.4 (d, 1C, ³J_{C-P} = 24.0 Hz, C_{1 or 1'}); 134.4 (d, 1C, ³J_{C-P} = 24.1 Hz, C_{1' or 1}); 135.5 (s, 1C, C_q); 135.9 (s, 1C, C_q); 148.4 (s, 1C, C_q); 148.8 (s, 1C, C_q); 151.0 (d, ²J_{C-P} = 6.7

Experimental section

Hz, ArCH=CHP); 151.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, ArCH=CHP); 153.2 (s, 1C , C_q); 155.7 (s, 1C , C_q).

^{31}P NMR (Acetone-*d*₆, 121 MHz) δ ppm: 21.65 (s, P-OEt), 22.58 (s, P-OEt).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 573 [M+H⁺].

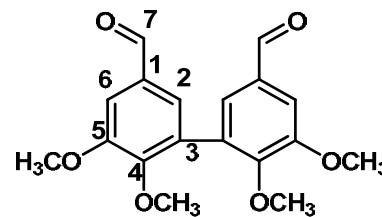
Experimental section

47. 5,5',6,6'-tetramethoxybiphenyl-3,3'-dicarbaldehyde:

MF : C₁₈H₁₈O₆

MW : 330 g.mol⁻¹

CLogP : 1.5



A mixture of bisvanilline (0.3g, 1.303 mmol, 1 eq), methyl iodide (0.4 ml, 5.2 mmol, 4 eq) and potassium carbonate (0.587g, 4.25 mmol, 2.5 eq) were refluxed for 30 hours in DMF 10 mL. After cooling, water and DCM were added. The two phases were separated and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x). The combined organic layers were washed with brine (1 x), dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to give 67 % product as a brown solid.

Mp : 138 °C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 1693 (C=O); 1578 (C=C arom.); 1267 (C-O arom.); 11437 (C-O).

¹H NMR (Aceton-d₆, 300 MHz) δ ppm: 3.76 (s, 6H, OCH₃) ; 4.01 (s, 6H, OCH₃) ; 7.45 (d, 2H, ⁴J₆₋₂ = 1.9 Hz, H₆) ; 7.58 (d, 2H, ⁴J₂₋₆ = 1.9 Hz, H₂) ; 9.96 (m, 1H, 2CHO).

¹³C NMR (Aceton-d₆, 75 MHz) δ ppm : 57.4 (s, 2C, *m*OCH₃) ; 62.0 (s, 2C, *p*OCH₃) ; 112.8 (s, 2C, C₆) ; 128.2 (s, 2C, C₂) ; 134.0 (s, 2C, C_{1 or 3}) ; 134.2 (s, 2C, C_{3 or 1}) ; 154.0 (s, 2C, C_{4 or 5}) ; 155.3 (s, 2C, C_{5 or 4}) ; 192.6 (s, 2C, C₇).

MS (DCI, NH₃, pos) *m/z*: 331 [M+H⁺].

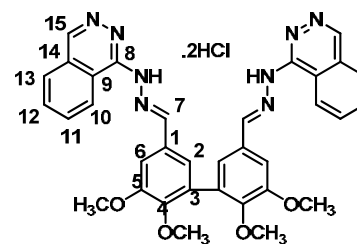
Experimental section

48. 1,1'-(2E,2'E)-2,2'-(5,5',6,6'-tetramethoxybiphenyl-3,3'-diyl)bis(methan-1-yl-1-ylidene)bis(hydrazin-1-yl-2-ylidene)diphthalazine dihydrochloride :

MF : C₃₄H₃₂O₄N₈Cl₂

MW : 686 g.mol⁻¹

CLogP : 3.64



Followed the similar protocol (**Protocol 4**) to prepare A31 from 5,5',6,6'-tetramethoxybiphenyl-3,3'-dicarbaldehyde **A30** (0.05 g, 0.152 mmol, 1equiv) and hydralazine chlorhydrate (0.066 g, 0.334 mmol, 2 equiv), the reaction time is 24h and the product is recovered by filtration to give 39% yield as a brown solid.

Mp : 153 °C.

IR (KBr) ν cm⁻¹: 3401 (N-H); 2937 (C-H arom.); 1613 (C=N) ; 1582 (C=C arom.); 1535 (C=C arom.); 1251 (C-O arom.); 1142 (C-O).

¹H NMR Aceton-d₆, 300 MHz) δ ppm: 3.68 (s, 6H, OCH₃) ; 3.97 (s, 6H, OCH₃) ; 7.35 (d, 2H, ⁴J₆₋₂ = 1.9 Hz, H₆); 6.65-7.74 (m, 6H, H_{11,12,13}); 7.77 (d, 2H, ⁴J₂₋₆ = 1.9 Hz, H₂) ; 7.93 (s, 2H, H₇) ; 8.37 (m, 2H, H₁₀) ; 8.47 (s, 2H, H₁₅), 11.51 (ls, 2H, HCl).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ ppm : 55.8 (s, 2C, *m*OCH₃) ; 59.8 (s, 2C, *p*OCH₃); 110.2 (s, 2C, C₆); 123.3 (s, 2C, C₂); 123.4 (s, 2C, C₁₄); 125.9 (s, 2C, C₁₅); 126.1 (s, 2C, C₁₁); 126.8 (s, 2C, C₁₀); 130.6 (s, 2C, C₁); 131.4 (s, 2C, C₁₂); 131.9 (s, 2C, C₃); 132.1 (s, 2C, C₁₃); 137.3 (s, 2C, C₉); 147.5 (s, 2C, C₈); 147.9 (s, 2C, C₄); 152.3 (s, 2C, C₅); 152.7 (s, 2C, C₇).

MS (DCI, NH₃, pos) m/z: 615 [M+H⁺].

II. Biology

Antibodies directed against MCP-1, Bid, gp91^{phox} and cytochrome C were from Santa Cruz (Tebu-Bio SA, Le Perray en Yvelines, France). Anti phospho-NF- κ B was from Cell Signaling. AntiCD3 and anti α -actin antibodies were from R&D System (Lille, France). Anti Caspase 3 was from Santa Cruz, Clinisciences. Anti 4-HNE antibody was prepared as reported (58). [³H]Thymidine (5 Ci/mmol) was purchased from Amersham, horseradish Acrylamide-4X/bisacrylamide-2X solutions were from Euromedex (Souffelweyersheim, France), SYTO-13, [5-6]-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA), dihydroethidium (DHE) and propidium iodide were from Molecular Probes (InVitrogen France), cell culture reagents and other reagents were from WWR or Sigma.

1. Cell culture

Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) (CDC, Dr. Candal, Atlanta, US) were grown in MCDB131 culture medium supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum, 100U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Human femoral artery SMCs (CRL-1999, ATCC, Atlanta US) were grown in DMEM culture medium supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum, 100U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Raw 264.7 murine macrophages were obtained from ATCC (Manassas, US) and were grown in DMEM. 24h before LDL incorporation, cells were starved in serum-free RPMI medium.

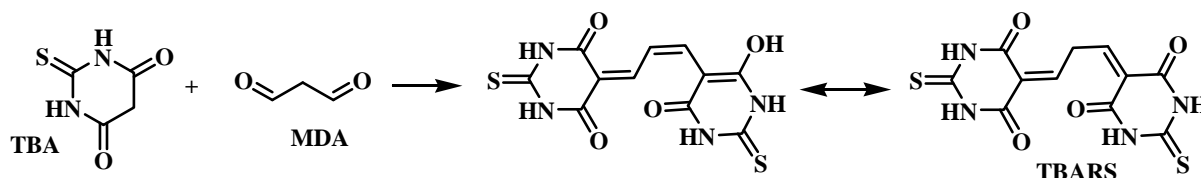
2. LDL oxidation :

LDL were isolated by ultracentrifugation from the pooled plasma of healthy normolipidemic human subjects and dialyzed against PBS containing 100 μ mol/L of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), then sterilized by filtration (0.2 μ m). LDL were stored at 4°C until use.

Experimental section

Thiobarbituric reactive species test (TBARS test)

Substances that react with thiobarbituric acid (TBA), such as malondialdehyde (MDA) form a fluorescent complex.



After oxidation of LDLs, 100 μ l of samples were collected in a test tube, and added to 100 μ l of TBA solution (0.12 M) and 10 μ l of HCl (0.5 N) (pH = 3). After 10 min incubation at 95 °C, the mixture was cooled at 4°C. The TBARS were extracted by adding 200 μ l mL of butan-1-ol. After centrifugation at 2000 rpm for 10 min, two phases are obtained. The butanol phases (upper phase) containing the TBARS were read to the fluorometer (λ exc. = 515 nm; λ eme = 548 nm). Results are expressed as percentage of TBARS formed in the positive control (oxidized LDL by the cells without antioxidants, 100% oxidation).

Copper-induced LDL oxidation:

LDL (0.5 mg apoB/mL in NaCl 150 mM, pH 7.3) were incubated for 3 hours at 37°C, in the presence of CuSO₄ 5 μ M, with or without the different molecules at the indicated concentration. At the end, the oxidation of LDL was monitored by the determination of the TBARS content.

UV-induced LDL oxidation:

LDL (1 mg apoB/mL NaCl 150 mM, pH 7.3 containing or not molecules as indicated), were irradiated for 2 hours, as a thin film (5 mm) in an open beaker placed 10 cm under the UV-C source (HNS 30W OFR Osram UV-C tube, λ_{max} 254 nm, 0.5 mW/cm²). At the end, the oxidation of LDL was monitored by the determination of the TBARS content.

AAPH-induced LDL oxidation:

Native LDLs (1 mg/mL) were incubated with or without the different molecules and with freshly prepared AAPH [2,2'-azobis-(2-amidinopropane) hydrochloride] (at the indicated concentrations, 2h at 37°C). At the end, the oxidation of LDL was monitored by the determination of the TBARS content.

Experimental section

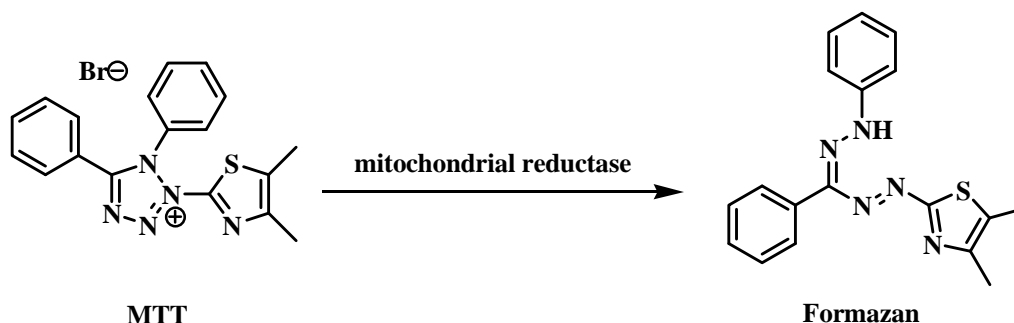
Cell-mediated LDL oxidation:

HMEC-1 were cultured in in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's *medium*) cultured medium containing 10% foetal calf serum and antibiotics. For the experiments, the cells were seeded in 12 multiwell plates. After 24h, the standard culture medium (on sparse proliferative cells), was removed and replaced by serum-free Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium. After 14 h, native LDL (100 $\mu\text{g apoB/mL}$) and CuSO_4 (1 μM) were added to the serum free-culture medium (or with CuSO_4 1 μM only to get a negative control) . This mixture was incubated at 37°C for 14 hours, in the presence (or the absence) of molecules. At the end of incubation, the LDL-containing medium was used for determining TBARS and the subsequent toxicity of cell-oxidized LDL was evaluated by using the MTT test as indicated.

3. Cytotoxicity and proliferation :

MTT test :

The MTT reagent (3-[4 ,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) is a yellow soluble tetrazolium salt which is reduced by mitochondrial chain respiration into insoluble blue crystals of formazan.



Cells are incubated with 50 μl of MTT solution (250 mg/mL), for 50 min at 37 °C. Then the medium is removed and the blue formazan crystals are dissolved in 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). The reading is done by spectrophotometry at 590 nm, the results are expressed as a percentage of viability compared to control.

4-HNE-induced cytotoxicity :

Subconfluent HMEC-1 were incubated overnight in serum-free Hank's medium in the presence of 4-HNE (25 μM), and the different molecules at the indicated concentration. The cytotoxic effect of 4-HNE was evaluated by the MTT test as indicated.

Experimental section

oxLDLs- induced cytotoxicity :

Subconfluent HMEC-1 were incubated overnight in serum free-RPMI and in the presence of oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and the molecules tested at the indicated concentration. The cytotoxic effect of oxLDLs was evaluated by MTT test as indicated.

Necrosis and apoptosis determination :

The cells were incubated 15 min with a mixture of 2 vital fluorescent dyes, 0.6 μM SYTO-13 (a permeant DNA intercalating green-colored probe) and 1.5 μM propidium iodide (a non permeant intercalating red probe), rinsed with PBS and then observed at the microscope (inverted fluorescence microscope Fluovert FU, Leitz).

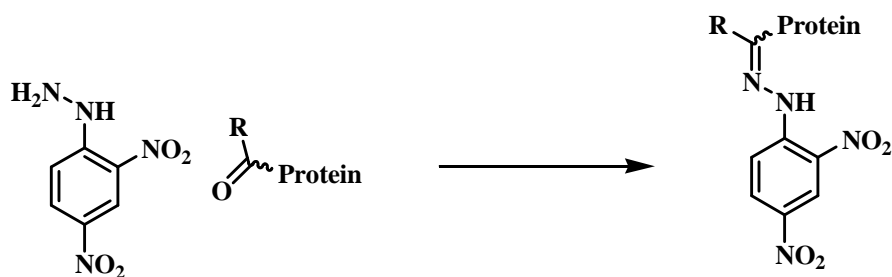
DEVDase activity (caspase 3) :

The enzymatic activity of DEVDase was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) (40 μM), on cell lysates from HMEC-1 stimulated with oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the molecules. After 30 min of incubation at 37°C, the fluorescence of the released product AMC (aminomethylcoumarin) was determined by fluorometry (ex/em 351/430 nm).

4. Carbonyl stress

Determination of carbonyls (DNPH test)

DNPH reacts with carbonyl functions to form a hydrazone which absorbs in UV.



The cells were incubated 14 hours with oxLDL (200 $\mu\text{g} / \text{ml}$) in the presence of molecules at the indicated concentration. The cells were washed two times with PBS containing 1 mM PMSF (protease inhibitor), scraped with a rubber policeman in the same PBS at 4 °C and centrifuged 5 min at 6500 rpm. The cell pellets are taken up in 100 μl of protein extraction buffer and then lysed on ice for 30 minutes. The homogenates were centrifuged for 10 min at

Experimental section

14,000 rpm at 4 °C; the supernatants were recovered and stored in ice. The total protein concentration is determined by the Bradford method on 3 µl of sample, and equivalent masses are taken for each sample. Samples are homogenized in 250 µl of water and 250 µl of [2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10 mM, 2.5 mM HCl]. After incubation for half an hour at room temperature and darkness, a deproteinization is carried out by the 20% trichloroacetic acid for 30 minutes. The precipitate recovered after centrifugation is washed once with trichloroacetic acid (20%), then three times with ethanol / ethyl acetate (1:1, v / v), then dissolved at 37 ° C for 10 minutes in 6 M guanidine hydrochloride, pH 2.3. The absorbance of the solution is measured at 370 nm $\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Foam cell formation :

The formation of foam cells was evaluated on Raw 264.7 macrophages incubated for 14h in serum-free RPMI containing UV-oxLDL (100 µg/mL) and the molecules at the indicated concentrations. After 14 h incubation, the LDL-containing culture medium was removed, cells were fixed in 0.4 % paraformaldehyde/PBS for 10 min, washed in PBS, and stained with oil Red O. Alternatively, cells were stained by Nile Red, 0.5 µg/ml. After washing in PBS, cells were scrapped and the fluorescence was measured spectrofluorometrically (excitation and emission wavelength 460 and 550 nm, respectively).

5. Extracellular and intracellular ROS determination :

Extracellular superoxide anion ($\text{O}_2^{\circ-}$) :

Extracellular superoxide anion ($\text{O}_2^{\circ-}$) generation was measured as the superoxide dismutase (SOD)-inhibitable reduction of cytochrome C. HMEC-1 preincubated for 1h with native LDL (100 µg/mL), CuSO_4 (1 µM), and the molecules tested at indicated concentration, were incubated in 1mL phenol red-free RPMI containing cytochrome C (20 µM) with or without SOD (100 mU/L), for 30 min. The reduction of cytochrome C specific of $\text{O}_2^{\circ-}$ (e.g. SOD inhibitable) was determined spectrophotometrically at 550 nm (difference in absorbance with or without SOD).

Extracellular hydrogen peroxide (H_2O_2) :

Extracellular hydrogen peroxide (H_2O_2) generation was determined as horseradish peroxidase (HRP)-dependent quenching of scopoletin fluorescence : cells (already incubated with oxLDL (100 µg/mL) \pm the indicated agents (5 µM)) were incubated at 37°C in 1 mL of PBS

Experimental section

containing 5 μM scopoletin and 30 nM HRP, and the fluorescence of the medium was read after 0, 30, and 60 min (ex/em 358/448 nm).

Intracellular ROS :

Intracellular ROS generated in cells treated by oxLDL (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the tested molecules were evaluated by measuring the oxidation of H₂DCFDA-AM (for hydroperoxides) and DHE (for O₂^{•-}). The cells were incubated 3 hours with oxLDL (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of molecules at the indicated concentration. Then the probes were added to the culture medium (5 μM final concentration) 30 min before the end of the experiment. At the end, the cells were washed three times in PBS, and the fluorescence of the cell homogenate was measured as reported (ex/em 495/520 nm for H₂DCFDA, and 518/605 nm for DHE respectively) . The data are expressed as ratio of fluorescence/ fluorescence of the unstimulated control.

Proteasome activation :

Cells were homogenized in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 0.5 mM dithiotreitol, and the enzymatic activity of 20S proteasome was measured. The assay mixture contained 50 μl of buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT), 250 μM of sLLVY-MCA, and 50 μl of cell homogenates (30 μg protein). After 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1 ml of 0.2 M glycine buffer pH 10 and the fluorescence of the liberated 7-amino-4 methylcoumarin was measured (exc/em 365/460 nm, respectively).

Monocyte adhesion assay and MCP1 release in the culture medium :

Raw 264.7 macrophages were labelled with Calcein-AM (5 μM) for 10 min at 37°C, rinsed three times in PBS and resuspended in PBS. Labelled fluorescent monocytes were added (100 000/well) to HMEC-1 either unstimulated or stimulated (at the indicated times) with oxLDL (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence or absence of the different agents at the indicated concentration, for 30 min. At the end, the cells were carefully washed three times with PBS for removing unbound monocytes, then lysed in water by sonication and the fluorescence of the cell lysate was immediately determined by fluorometry (ex/em 490/525). MCP-1 released

Experimental section

by cells was measured by ELISA in the culture medium of control and LDL-stimulated HMEC-1, with or without the tested agents, according to the indications of the manufacturer (Pierce).

6. Western blot analysis :

Cells extracts were subjected to SDS-PAGE and revealed using the indicated primary and secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase, and developed by ECL (Amersham). Same protocol was applied on aortas from apoE^{-/-} mice. Western blot was quantified using NIH Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>)

Western blot procedure :

Extraction of total protein (see Composition of buffers) :

After stimulation, the cells were washed two times with PBS, scrapped with a rubber policeman in PBS at 4 ° C and centrifuged 1 min at 1500 rpm. The cell pellet is solubilized in 100 to 200 µl of extraction buffer and lysed on ice for 30 min or directly placed at -20 ° C. The homogenates were centrifuged (15,000 rpm, 15 min, 4 ° C) and the supernatants containing the proteins were collected and used for western-blot experiments. 40 to 60µg of protein for each sample are deposited on polyacrylamide gel.

Extraction of proteins from tissues :

The tissues were homogeneized in extraction buffer, lysed 30 min in ice and placed at -20 ° C. After centrifugation for 15 min at 15000 rpm, the proteins are measured in the supernatant.

Separation cytosol / mitochondria :

The cells were washed twice in PBS and centrifuged 4 min at 6000rpm. The cell pellet was solubilized in 100µL of buffer A and placed 45 min in ice and centrifuged 15 min at 12000rpm. The pellet contains the mitochondrial membrane (in 50µL of buffer A), while the supernatant contains the cytosol.

Protein electrophoresis on polyacrylamide gel (SDS-PAGE) :

Samples are homogeneized in 4X denaturation buffer, heated 10 min at 95 ° C and deposited on a polyacrylamide gel (SDS-PAGE). This technique separates proteins by electrophoresis according to their molecular mass in two stages: pre-separation of 'stacking gel (5% of polycarylamide), then separation on 7.5, 10 or 12% of polyacrylamide gel (20 mA per gel).

Experimental section

Then, proteins are electrotransferred in a liquid medium on nitrocellulose membrane for 2 h (200mA). The transfer efficacy is verified with Ponceau Red, the membranes are bleached with distilled water and non-specific binding sites are saturated in TBS containing 0.1% Tween 20 (pH 7.4) and 5% milk (or 5% BSA) for 2 h at room temperature with stirring. The membrane is incubated overnight at 4 ° C with the primary antibody diluted (usually to 1/1000th) in TBS 0.1% Tween20 and 5% BSA. After 5 washes of 10 min at room temperature with TBS 0.1% Tween20, the membrane is incubated 1 h with the secondary antibody coupled to peroxidase (diluted 1 / 5 000th in the TBS 0.1% Tween20) at room temperature, then washed 5 times of 10 min with TBS 0.1% Tween20.

Revelation :

The membrane is revealed by chemiluminescence (ECL, Amersham, Les Ullis France) mixing equal volumes of both reagents kit (0.125 cm³/cm² membrane), the mixture being placed for 1-5 min of contact with the membrane at room temperature. The excess solution is removed, the membrane is placed in a plastic film and then in an autoradiography cassette, and covered by a photographic film. The exposure time depends on signal strength (from 10 sec to 10 min). The film is revealed in a photographic developer (Sigma), fixed and rinsed with water and dried. The membrane can be used several times with different primary antibodies (in the same conditions as described above) after dehybridization 30 min at 50 ° C in a deshybridation buffer (pH 6.7), washed 5 times with TBS and saturated again before use.

7. Animal studies :

ApoE KO (apoE^{-/-}) mice were from Transgenic Alliance (IFFA Credo, Les Oncins, France). 3 groups of 20 male mice (4 weeks old), housed under specific pathogen-free conditions, were fed a standard diet supplemented (or not) with BVH or hydralazine (10 mg/kg in drinking water). Mice were killed at age 20 weeks. Mouse experiments were approved by the Committee on Research Animal Care of Inserm U-858 Center. Plasma cholesterol, triglycerides and glycemia, were determined immediately after sacrifice (AU 2700 Biochemistry Analyzer *Olympus*, CHU Rangueil Toulouse).

Experimental section

Quantification and Characterization of Atherosclerotic Lesions :

Hearts were washed in phosphate buffered saline, frozen on a cryostatmount with OCT compound (Tissue-Tek), and stored at -80°C . Serial sections $10\ \mu\text{m}$ thick of aortic sinus were stained with oil Red O, counterstained with hematoxylin-eosin, and analyzed for morphometric evaluation of the lesion size, using a computerized Biocom morphometry system. The mean lesion size in aortic sinus was expressed in $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$.

Immunohistochemistry :

Fixed frozen cryo-sections ($10\ \mu\text{m}$ thick) of aortic sinus from control and BVH-treated mice were incubated with the antibodies, anti-CD3 (lymphocytes), anti- α -actin (SMC), anti-4-HNE-adducts (lipid peroxidation) and anti-MCP1. After incubation with appropriate biotin-labelled antibody, sections were revealed using avidin-biotin horseradish peroxidase visualization system (Vectastain, ABC kit Elite, Vector Laboratories).

Buffer Composition :

PBS (Phosphate Buffer Saline)

PH 7,4 : $1.5\ \text{mM}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$
 $2\ \text{mM}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$
 $0,13\ \text{M}\ \text{NaCl}$

Proteins extraction buffer :

$50\ \text{mM}\ \text{Tris}\ \text{HCl}$, pH 7,4
 $250\ \text{mM}\ \text{NaCl}$
 $5\ \text{mM}\ \text{EDTA}$
 $1\ \%$ Triton X100
 $0,50\ \%$ DOC
 $10\ \%$ Glycérol
added extemporaneously : $1\ \text{mM}\ \text{NaVO}_4$
 $10\ \text{mM}\ \text{-glycerophosphate}$
 $50\ \text{mM}\ \text{NaF}$
 $1\ \text{mM}\ \text{PMSF}$

Experimental section

10 µg/ml leupeptine

10 µg/ml aprotinine

Buffer A :

PBS + 1 mM orthovanadate (Na_3VO_4)

+ 1 mM PMSF

TpA (Buffer A) 20 mM HEPES

1 mM EDTA

250 mM sucrose

added extemporaneously : 5 µM digitonin

1 mM PMSF

1 µg/mL Aprotinine

1 mM orthovanadate

1 mM DTT

Proteins denaturation buffer (1X solution) :

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

2% SDS

10 % of glycérol

0,04 % Bromophenol blue

4 % 2-mercaptoethanol

Proteins migration buffer (pH 8,3) :

25 mM Tris

192 M glycine

0,1 % SDS

Proteins transfer buffer :

50 mM Tris

380 mM glycine

0,1 % SDS

20 % methanol

Experimental section

TBS (Tris Buffer Saline)

10 mM Tris-HCl, pH 7,4

0,155 M NaCl

0,1% Tween 20

Membranes dehybridization buffer :

0,25 M glycine pH=2,5

TAE buffer (50X solution)

24,2 g Tris

370 mg EDTA

8,2 g sodium acetate

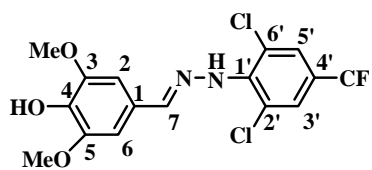
100 mL of distilled water was added. pH was adjusted at 8,2

Tampon HBSS 1X

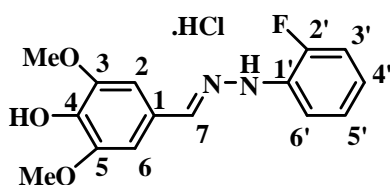
HBSS 10X diluted at 1X.

Annexes

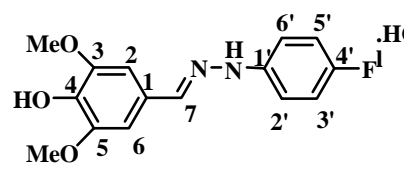
Sommaire des structures



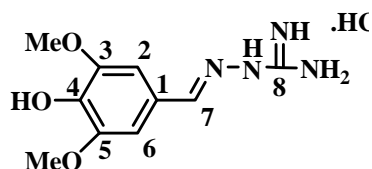
5a



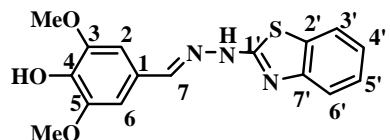
5b



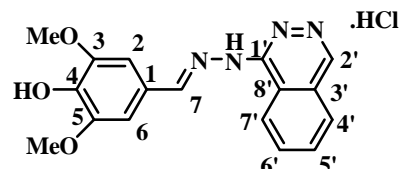
5c



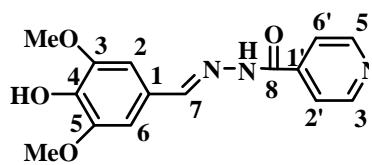
5d



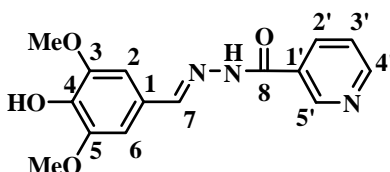
5e



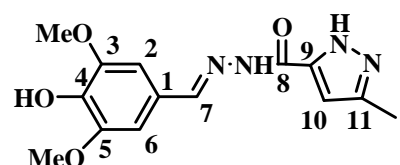
5f



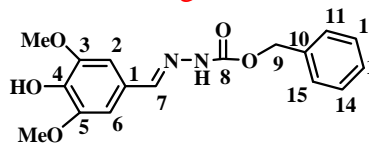
5g



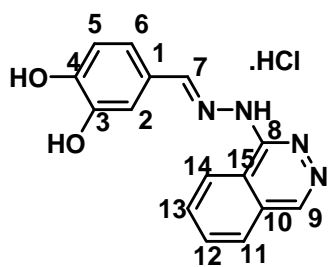
5h



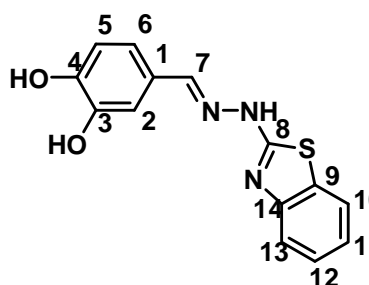
5i



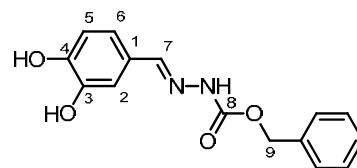
5j



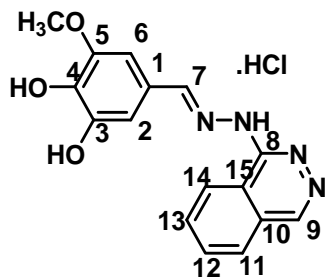
5k



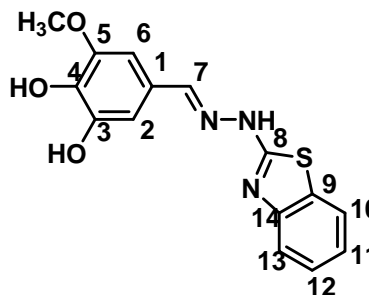
5l



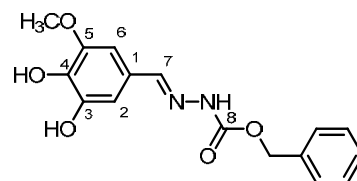
5m



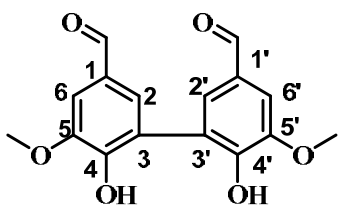
5n



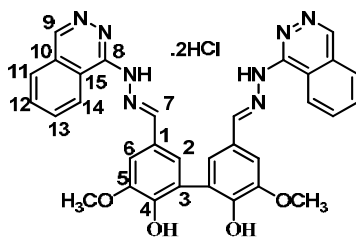
5o



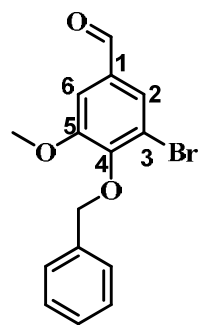
5p



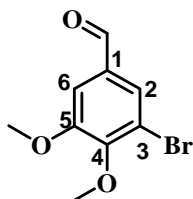
7



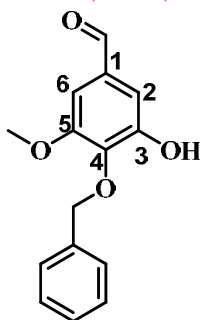
16f (BVH)



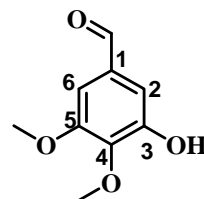
18a



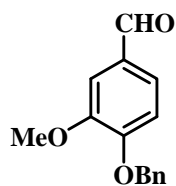
18b



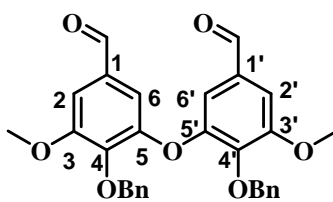
19a



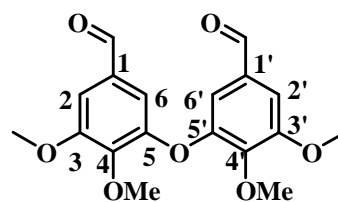
19b



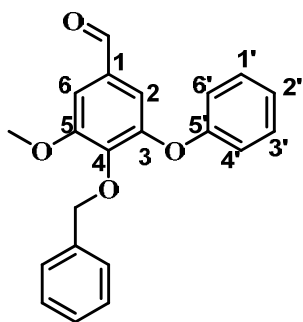
20



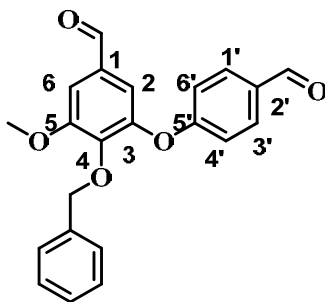
24a



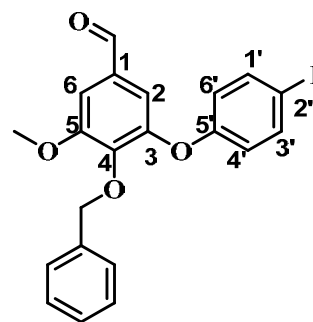
24b



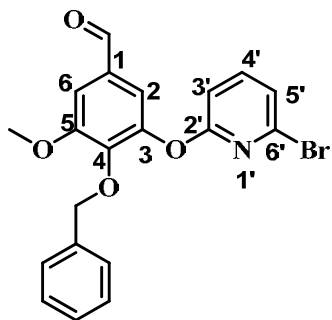
27



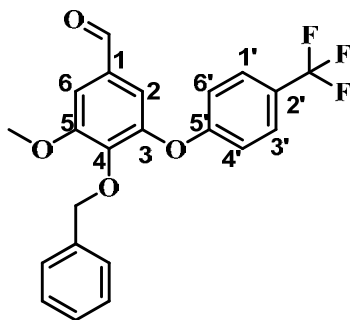
32



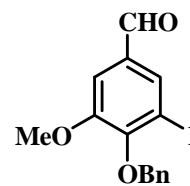
33



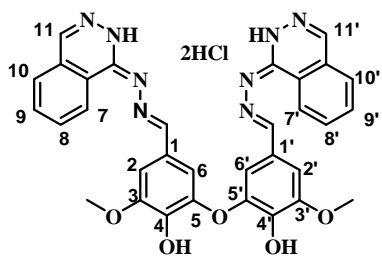
34



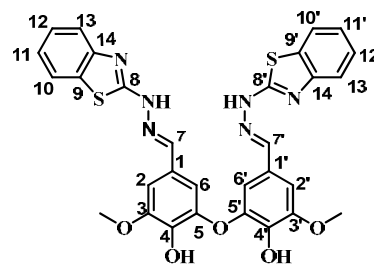
35



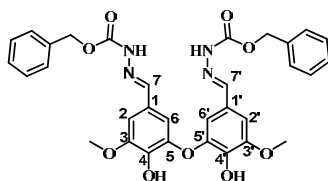
37



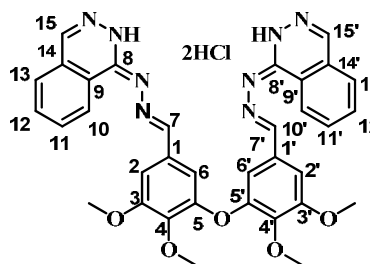
39



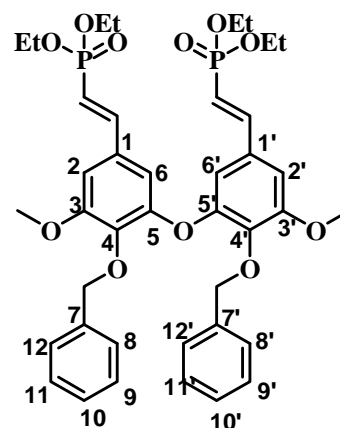
40



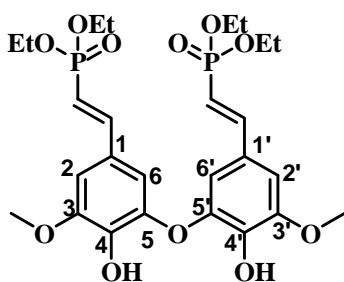
41



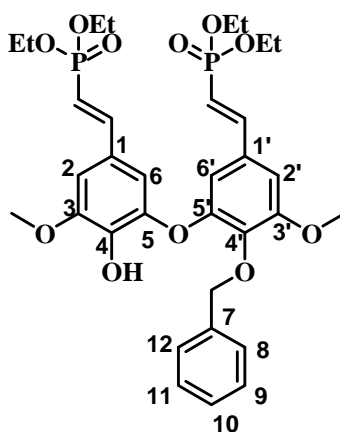
42



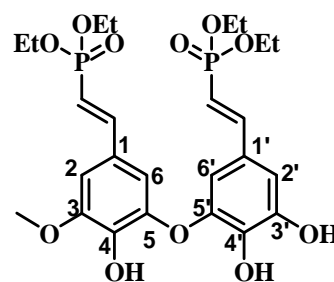
43



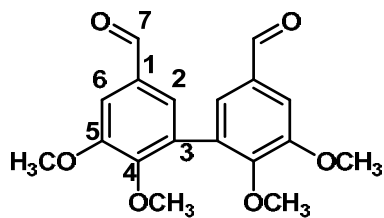
44



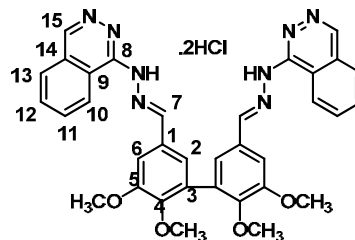
45



46



47



48

Publications

Benaïssa Bouguerne, Nadji Belkheiri, Florence Bedos-Belval, Cécile Vindis, Koji Uchida, Hubert Duran, Marie-Hélène Grazide, Robert Salvayre, Michel Baltas, Anne Nègre-Salvayre. Antiatherogenic effect of bisvanillyl-hydralazone, a new hydralazine derivative with antioxidant, carbonyl scavenger and antiapoptotic properties. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011, 14(11):2093-106. IF □ 8.3

Benaïssa Bouguerne, Christian Lherbet and Michel Baltas. Metal Triflates: Efficient Catalysts for Oxa-Pictet-Spengler Reaction. *Letters in Organic Chemistry*. 2010, 6, 420-423. IF □ 1

Jone Iriondo-Alberdi, Katta Laxmi-Reddy, **Benaïssa Bouguerne**, Cathy Staedel, and Ivan Huc. Cellular Internalization of water-Soluble Helical Aromatic amide Foldamers. *ChemBioChem*. 2010, 11, 1679-1685. IF □ 3.5

Nadji Belkheiri, **Benaïssa Bouguerne**, Michel Baltas, Corinne Bernis, Robert Salvayre, Hubert Duran, Anne Nègre-Salvayre, Florence Bedos-Belval. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *Eur J Med Chem*. 2010, 45, 3019-26. IF □ 3.5

Benaïssa Bouguerne, Pascal Hoffmann; Christian Lherbet. Bismuth triflate as a safe and readily-handled source of triflic acid: Application to the oxa-Pictet-Spengler reaction. *synthetic communications*. 2010, 40, 915-926. IF □ 1

En rédaction, Diaryl-éthers hautement fonctionnalisés, méthodologie de synthèse et applications biologiques.

Articles de vulgarisation

Des antioxydants contre l'athérosclérose, *le petit chimiste illustré*, 2011.

Congrès

La 16^{ème} Journée Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, 4 février 2011. Poster (**Bis-vanillines Hautement Fonctionnalisées à Propriétés Antiathérogènes**).

Journée de Chimie Grand Sud-ouest SCF et de Catalogne SCQ. Montpellier, 26 Novembre 2010. Communication orale et poster (**Antiatherogenic effect of bisvanillyl-hydralazone, a new hydralazine derivative with antioxidant, carbonyl scavenger and antiapoptotic properties**).

Doctoriales de Midi-Pyrénées , 6 au 12 juin 2010. Formation à l'intégration professionnelle.
Poster (interface chimie-biologie).

13^{EME} RENCONTRES DE CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE 21 -25 Mars 2010,
CENTRE PAUL LANGEVIN AUSSOIS (SAVOIE), France. Poster 70 (**Antiatherogenic
effect of bisvanillyl-hydralazone, a new hydralazine derivative with antioxidant,carbonyl
scavenger and antiapoptotic properties**).

Journée de Chimie Grand Sud-Ouest, Toulouse, 19 novembre 2009.

Antiatherogenic Effect of Bisvanillyl-Hydralazone, a New Hydralazine Derivative with Antioxidant, Carbonyl Scavenger, and Antiapoptotic Properties

Benaissa Bouguerne,¹⁻³ Nadji Belkheiri,^{2,3} Florence Bedos-Belval,^{2,3} Cécile Vindis,^{1,3}
Koji Uchida,⁴ Hubert Duran,^{2,3} Marie-Hélène Grazide,^{1,3} Michel Baltas,^{2,3}
Robert Salvayre,^{1,3} and Anne Nègre-Salvayre^{1,3}

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) generated within the vascular wall trigger low-density lipoprotein (LDL) oxidation, lipid peroxidation, and carbonyl stress that are involved in atherogenesis. We recently reported that the antihypertensive drug, hydralazine, exhibits carbonyl scavenger and antiatherogenic properties, but only moderate antioxidant activity, so that high concentrations are required for inhibiting LDL oxidation. We aimed to develop agents sharing both antioxidant and carbonyl scavenger properties. We have synthesized a new hydralazine derivative, the bisvanillyl-hydralazone (BVH). BVH strongly inhibited LDL oxidation induced by copper and by human endothelial cells (HMEC-1), and prevented the formation of macrophagic foam cells. BVH reduced both the extracellular generation of ROS (superoxide anion and hydrogen peroxide) induced by oxidized LDL (oxLDL), as well as intracellular oxidative stress and proteasome activation, NFκB activation, and oxLDL-mediated proinflammatory signaling. In parallel, BVH prevented the carbonyl stress induced by oxLDL on cellular proteins, and blocked the apoptotic cascade as assessed by the inhibition of Bid cleavage, cytochrome C release, and DEVDase activation. Lastly, BVH prevented atherogenesis and carbonyl stress in apoE^{-/-} mice. In conclusion, BVH is the prototype of a new class of antioxidant and carbonyl scavenger agents designed for new therapeutical approaches in atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 2093–2106.

Introduction

Oxidative stress plays a major role in atherogenesis and cardiovascular diseases (50), *via* its implication in the oxidative modifications of low-density lipoproteins (LDLs), that render them highly atherogenic (4, 7, 25, 54, 64). Oxidized LDL (oxLDL) are metabolically deviated toward macrophagic cells and taken-up *via* the scavenger receptor system, leading to the formation of foam cells that accumulate as fatty streaks in the arterial intima (43, 54, 55). Early lesions may be complicated by chronic inflammatory processes and local remodeling of the arterial wall, leading finally to more complex atherosclerotic plaques (33). Besides, oxLDLs exert various biological properties (including inflammation, cell proliferation, migration, growth arrest, and apoptosis) that play a role in the formation of complicated lesions, and in plaque erosion and rupture (31, 39, 44, 47, 48). These responses depend on the local concentration of oxLDLs, and on their content in lipid peroxidation

products oxidized phospholipids, oxysterols (22, 30), and lipid peroxidation-derived aldehydes (4-hydroxynonenal [4-HNE], malondialdehyde [MDA], and acrolein) (13, 14, 59). These aldehydes react with free amino groups and thiol residues of proteins, thereby forming protein adducts ("carbonyl stress"), which modify and alter the function of circulating (*e.g.*, LDL) and cellular proteins (14, 40). Carbonyl stress occurs as a downstream consequence of oxidative stress, and it is inhibited when blocking lipid oxidation by antioxidants (52, 40). However, antioxidants fail to neutralize carbonyl stress, once adducts are formed on proteins (40, 42). Carbonyl stress is involved in cell growth arrest, inhibition of cell migration, inflammation, and (at a lesser extent) apoptosis, and is thought to contribute to the progression of atherosclerosis (40, 42).

The ability of antioxidants to reduce the coronary risk in humans is largely debated. The antiatherogenic effect of antioxidants has been extensively studied through *in vivo* preclinical studies on animal models for atherosclerosis and in

¹Biochimie, INSERM U858, Team "Atherosclerosis," Toulouse, France.

²CNRS, Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, Toulouse, France.

³Université Paul Sabatier, Toulouse Cedex, France.

⁴Laboratory of Food and Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan.

human trials (3, 5, 15, 23, 57, 63). Most antioxidants are highly efficient in preventing atherosclerosis development in animals (which mainly allow to investigate the first steps in atherogenesis, *i.e.*, foam cell formation), but fail to prevent the late athero-thrombotic complications of atherosclerosis and the subsequent cardiovascular events in human trials (3, 23, 63). The low apparent benefit of antioxidant therapy does not question the implication of oxidative stress and LDL oxidation in atherogenesis, as it may result from diverse mechanisms, such as difficulties in delivering effective *in situ* antioxidant therapy, including a lack of antioxidant availability, or a lack of effect on reactive oxygen species (ROS) involved *in vivo* in LDL oxidation and inflammatory signaling. Inhibiting carbonyl stress (which is a consequence of oxidative stress) may represent a new therapeutic strategy for patients, but so far, it is not known if the use of carbonyl scavengers could be beneficial or not on the late steps of atherosclerosis (40, 42). Most carbonyl scavengers usually exhibit poor antioxidant activity and inhibit neither LDL oxidation nor the generation of toxic lipid oxidation products (oxysterols and oxidized phospholipids), which are involved in the inflammatory and apoptotic events characterizing atherosclerosis progression (40). Hydrazine derivatives, such as the antihypertensive drug hydralazine, exhibit potent carbonyl scavenger efficiency associated with anti-atherogenic properties in apoE^{-/-} mice, but present poor or moderate antioxidant properties, so that high concentrations (50–100 μ M) are required for inhibiting cell-mediated LDL oxidation (16). Theoretically, agents sharing both antioxidant and carbonyl scavenger activities should inhibit each step of atherosclerosis progression, including LDL oxidation, oxidative stress, and carbonyl stress as well, and their consequences in the evolution toward advanced lesions.

We have designed and synthesized a hydralazine derivative, the bisvanillyl-hydralazone (BVH), and we have characterized its antioxidant, carbonyl scavenger, and antiatherogenic properties, more precisely its ability to (i) block oxidative stress, LDL oxidation, carbonyl stress, and foam cell formation, (ii) inhibit the inflammatory signaling of oxLDL, (iii) neutralize the apoptotic effect of oxLDL in cultured vascular cells, and (iv) slow down or inhibit the formation of atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice.

Materials and Methods

Chemicals

Antibodies directed against MCP-1, Bid, gp91^{phox}, and cytochrome C were from Santa Cruz (Tebu-Bio SA). Anti phospho-NF- κ B was from Cell Signaling. AntiCD3 and anti α -actin antibodies were from R&D System. Anti 4-HNE antibody was prepared as reported (58). Acrylamide-4X/bisacrylamide-2 \times solutions were from Euromedex; SYTO-13, 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (H₂DCFDA-AM), dihydroethidium (DHE), and propidium iodide were from Molecular Probes (Invitrogen); cell culture reagents and other reagents were from WWR or Sigma.

Synthesis

Organic solvents were purified as described (41) or were purchased from Aldrich Chemie. Melting points (mp) were obtained on a Buchi apparatus and are uncorrected. Infrared

(IR) spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1725 IR spectrophotometer and the data are reported in inverse centimeters. UV spectra were recorded on a Perkin-Elmer lambda 17 UV-vis spectrophotometer. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were obtained with a Bruker AC-300 MHz spectrometer. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) and signals are given as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet. Mass spectra were recorded on an R 10-10 C Nermag (70 eV) quadripolar spectrometer using desorption chemical ionization or electrospray techniques.

Bisvanilline 2 synthesis. To vanillin (10.64 g, 70 mmol) in 700 ml of water was added FeSO₄ (0.4 g, 1.4 mmol) under stirring. After heating during 10 min at 50°C, Na₂S₂O₈ (8.93 g, 37.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirring at 50°C for 5 days. The brown precipitate formed was filtered off. The solid was dissolved in NaOH (2 M) aqueous solution. HCl (2 M) aqueous solution was added. Brown solid formed was isolated by filtration (10 g, 95%). mp > 270°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 3186 (O-H), 1672 (C=O), 1587 (C=C arom.), 1454 (C=C arom.). ¹H NMR (DMSO, 300 MHz) δ ppm: 3.94 (s, 6H, OCH₃), 7.42 (s, 4H), 9.80 (s, 2H, CHO), 9.89 (s, 2H, OH). ¹³C NMR (DMSO, 75 MHz) δ ppm: 56.50 (s, 2C, OCH₃), 109.70 (s, 2C), 125 (s, 2C), 128.23 (s, 2C), 128.62 (s, 2C), 148.60 (s, 2C), 150.90 (s, 2C), 191.60 (s, 2C, CHO). UV (EtOH/0.2% DMSO, 25 μ M, 25°C): λ = 303 nm, ϵ = 14,300 mol⁻¹.L.cm⁻¹. MS (FAB, MNBA) *m/z*: 303.1 [M+H⁺].

BVH synthesis. 5,5'-Bisvanilline (BV) 2 (0.2 g, 0.66 mmol) was suspended in absolute ethanol (26 ml). Hydralazine hydrochloride (0.26 g, 1.32 mmol) was added. The reaction mixture was refluxed for 6h30 and filtrated to give pure BVH (0.38 g, 87%) as a yellow solid. mp > 270°C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3423 (O-H), 1675 (C=N), 1617 (C=C arom.), 1594 (C=C arom.), 1473 (C=C arom.). ¹H NMR (DMSO, 300 MHz) δ ppm: 3.94 (s, 6H, OCH₃), 7.41 (d, 2H, ⁴J = 1.8 Hz), 7.78 (d, 2H, ⁴J = 1.8 Hz), 8.10 (m, 6H), 8.68 (s, 2H, HC=N); 8.95 (s, 2H); 9.03 (s, 2H); 9.20 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H); 9.29 (bs, 2H, OH); 14.31 (bs, 2H, HCl). ¹³C NMR (DMSO, 75 MHz) δ ppm: 56.55 (s, 2C, OCH₃), 109.70 (s, 2C, C₂), 119.35 (s, 2C, C₈), 123.91 (s, 2C), 124.26 (s, 2C), 125.12 (s, 2C), 125.38 (s, 2C), 126.61 (s, 2C), 128.25 (s, 2C), 128.62 (s, 2C), 134.12 (s, 2C), 136.27 (s, 2C), 147.70 (s, 2C), 148.29 (s, 2C), 148.46 (s, 2C), 157.75 (s, 2C, HC=N). UV (EtOH/0.2% DMSO, 25 μ M, 25°C): λ = 376 nm, ϵ = 34,750 mol⁻¹.L.cm⁻¹, λ = 296 nm, ϵ = 21,500 mol⁻¹.L.cm⁻¹. MS (IC, NH₃, pos) *m/z*: 587.2 [M+H⁺].

Cell culture

Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) (CDC, Dr. Candal) were grown in MCDB131 culture medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Raw 264.7 murine macrophages were obtained from ATCC and were grown in DMEM. Twenty-four hours before LDL incorporation, cells were starved in serum-free RPMI medium.

LDL isolation and oxidation

LDL from human pooled sera were prepared by ultracentrifugation, and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) containing 100 μ M EDTA, as previously indicated (62).

The mechanism by which BVH protects against LDL oxidation has been compared *in vitro* on LDL oxidation mediated by transition metal-dependent (copper) and -independent (AAPH) systems. Native LDLs (1 mg/ml) were incubated in the presence of BVH (5 μ M), and either with freshly prepared AAPH [2,2'-azobis-(2-amidinopropane) hydrochloride] (at the indicated concentrations, 2 h at 37°C) (49), or with copper (CuSO₄ 5 μ M, 4 h incubation at 37°C). LDL oxidation was evaluated by determining the thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) content (16). To evaluate cell-mediated LDL oxidation, HMEC-1 were seeded in 12-multiwell plates. The standard culture medium was removed and replaced by serum-free RPMI 1640 containing native LDLs (100 μ g apoB/ml). BVH, hydralazine, and BV were solubilized in DMSO, and added to the culture medium at the indicated concentrations (and 0.1% DMSO final concentration), simultaneously with LDLs. After incubation (14 h at 37°C), the LDL-containing medium was recovered for determining the TBARS and protein carbonyl content (16, 26). For all the other experiments, LDLs were mildly oxidized by UV/copper (in the absence of drug), as previously described (62). Under standard conditions, UV/Cu-oxLDLs contained 71–104 nmol lipid hydroperoxide/mg apoB and 6.4–9.7 nmol TBARS/mg apoB.

Protein carbonyl content and foam cell formation

The protein carbonyl content was determined using DNPH, according to Ichihashi *et al.* (26). The formation of foam cells was evaluated on Raw 264.7 macrophages incubated for 14 h in serum-free RPMI containing UV-oxLDL (100 μ g/ml) and the agents at the indicated concentrations. After 14 h incubation, the LDL-containing culture medium was removed, cells were fixed in 0.4% paraformaldehyde/PBS for 10 min, washed in PBS, and stained with oil Red O, or fluorometrically quantified by Nile Red, as described (16).

Extracellular and intracellular ROS determination

Extracellular superoxide anion (O₂^{•-}) generation was measured as the superoxide dismutase (SOD)-inhibitable reduction of cytochrome C. HMEC-1 preincubated for 1 h with native LDL (100 μ g/ml), CuSO₄ (1 μ M), and the molecules tested at 5 μ M, were incubated in 1 ml phenol red-free RPMI containing cytochrome C (20 μ M) with or without SOD (100 mU/l), for 30 min. The reduction of cytochrome C specific of O₂^{•-} (e.g., SOD inhibitable) was determined spectrophotometrically at 550 nm (difference in absorbance with or without SOD), according to McCord and Fridovich (35). Extracellular hydrogen peroxide (H₂O₂) generation was determined as horseradish peroxidase (HRP)-dependent quenching of scopoletin fluorescence according to Loschen *et al.* (32), modified as follows: cells were incubated at 37°C in 1 ml of PBS containing 5 μ M scopoletin and 30 nM HRP, and the fluorescence of the medium was read after 0, 30, and 60 min (ex/em 358/448 nm).

Intracellular ROS generated in cells treated by oxLDL (200 μ g/ml) and the tested agents (1–5 μ M) were evaluated by measuring the oxidation of H₂DCFDA-AM (for hydroperoxides) and DHE (for O₂^{•-}) (10, 18). The probes were added to the culture medium (5 μ M final concentration) 30 min before the end of the experiment. At the end, the cells were washed three times in PBS, and the fluorescence of the cell homogenate was measured as reported (ex/em 495/520 nm for

H₂DCFDA, and 518/605 nm for DHE, respectively) (18). The data are expressed as ratio of fluorescence/fluorescence of the unstimulated control (12).

Proteasome activation

The *in vitro* activity of 20S proteasome was determined according to Grune *et al.* (21). Cells were homogenized in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 0.5 mM dithiothreitol, and the enzymatic activity was measured. The assay mixture contained 50 μ l of buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 0.1 mM DTT), 250 μ M of sLLVY-MCA, and 50 μ l of cell homogenates (30 μ g protein). After 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1 ml of 0.2 M glycine buffer pH 10 and the fluorescence of the liberated 7-amino-4 methylcoumarin was measured (exc/em 365/460 nm, respectively).

Monocyte adhesion assay and MCP1 release in the culture medium

Monocyte adhesion assay was performed according to Srinivasan *et al.* (51). Briefly, Raw 264.7 macrophages were labeled with Calcein AM (5 μ M) for 10 min at 37°C, rinsed three times in PBS, and resuspended in PBS. Labeled fluorescent monocytes were added (100,000/well) to HMEC-1 either unstimulated or stimulated (at the indicated times) with oxLDL (200 μ g/ml) in the presence or absence of the different agents (5 μ M), for 30 min. At the end, the cells were carefully washed three times with PBS for removing unbound monocytes, and then lysed in water by sonication; the fluorescence of the cell lysate was immediately determined by fluorometry (ex/em 490/525). MCP-1 released by cells was measured by ELISA in the culture medium of control and LDL-stimulated HMEC-1, with or without the tested agents, according to the indications of the manufacturer (Pierce).

Evaluation of cytotoxicity, necrosis and apoptosis

Cytotoxicity was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test. Necrosis and apoptosis were determined by counting the cells (inverted fluorescence microscope Fluovert FU; Leitz), after staining with 2 vital fluorescent dyes, 0.6 μ M SYTO-13 (a permeant DNA intercalating green-colored probe) and 1.5 μ M propidium iodide (a non permeant intercalating red probe) (16). DEVDase activity (caspase 3) was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) (40 μ M), on cell lysates from HMEC-1 stimulated with oxLDLs (200 μ g/ml) and the agents, as reported (16). After 30 min incubation at 37°C, the released fluorescent product AMC (aminomethylcoumarin) was determined by fluorometry (ex/em 351/430 nm).

Western blot analysis

Cells extracts were subjected to SDS-PAGE and revealed using the indicated primary and secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase, and developed by ECL (Amersham). Same protocol was applied on aortas from apoE^{-/-} mice (16).

Western blot was quantified using NIH ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

Animal studies

ApoE KO (apoE^{-/-}) mice were from Transgenic Alliance (IFFA Credo; Les Oncins). Three groups of 20 male mice (4 weeks old), housed under specific pathogen-free conditions, were fed a standard diet supplemented (or not) with BVH or hydralazine (10 mg/kg in drinking water), as reported in (16, 38). Mice were killed at age 20 weeks. Mouse experiments were approved by the Committee on Research Animal Care of Inserm U-858 Center. Plasma cholesterol, triglycerides, and glycemia were determined immediately after sacrifice (AU 2700 Biochemistry Analyzer Olympus, CHU Rangueil Toulouse).

Quantification and characterization of atherosclerotic lesions

The lesions were estimated as described by Bucciarelli *et al.* (6). Hearts were washed in PBX, frozen on a cryostatmount with OCT compound (Tissue-Tek), and stored at -80°C. Serial sections 10 μm thick of aortic sinus were stained with oil Red O, counterstained with hematoxylin-eosin, and analyzed for morphometric evaluation of the lesion size, using a computerized Biocom morphometry system. The mean lesion size in aortic sinus was expressed in μm² ± SEM.

Immunohistochemistry

Fixed frozen cryo-sections (10 μm thick) of aortic sinus from control and BVH-treated mice were incubated with the antibodies, anti-CD3 (lymphocytes), anti-α-actin (SMC), anti-4-HNE-adducts (lipid peroxidation), and anti-MCP1. After incubation with appropriate biotin-labeled antibody, sections were revealed using avidin-biotin horseradish peroxidase visualization system (Vectastain, ABC kit Elite; Vector Laboratories).

Statistical analysis

Data are given as mean ± SEM. Estimates of statistical significance were performed by analysis of variance (one-way ANOVA, Tukey test, SigmaStat software).

Results

We recently reported that hydralazine is an efficient carbonyl scavenger agent with potent antiatherogenic effect

(45% of lesion reduction in apoE^{-/-} mice treated by 10 mg/kg/day hydralazine in drinking water during 16 weeks) (16). However, hydralazine exhibits only mild antioxidant properties, and relatively high concentrations are required to prevent LDL oxidation and subsequent formation of foam cells that accumulate in early atherosclerotic lesions. We aimed to improve the antioxidant properties of hydralazine, without altering its carbonyl scavenger properties. For this purpose we designed and synthesized a hydralazine derivative, and we report its ability to prevent LDL oxidation and oxLDL cytotoxicity, and to delay the formation of atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice.

BVH synthesis

BV was obtained through oxidative coupling reaction of 2 vanilline moieties. The reaction conditions were optimized and the best results were obtained when performing the coupling reaction in the presence of sodium persulfate and catalytic amount iron sulfate in water at 50°C (Fig. 1). The reaction was followed by thin layer chromatography till completion after 5 days, affording after work up BV with an excellent yield (95%). BV was then allowed to react with two equivalents of hydralazine hydrochloride in refluxing ethanol for 6h30 affording pure chlorhydrated BVH as a precipitated solid which was filtered off (87% yield).

BVH copper chelating properties

Transition metals are strongly implicated in the reductive decomposition of lipid hydroperoxides, to give alkoxy and lipid peroxy radicals during the propagation step. As some polyphenolic compounds block the oxidation induced by transition metal ion-induced by chelating copper or iron ions (36), we evaluated whether this mechanism was implicated in the protective effect of BVH against LDL oxidation. To clarify the ability of BVH to react with cupric ion, its interaction was assessed by UV-vis spectroscopy. The wavelength spectra of the complex formed between BVH (25 μM) and increased concentration of copper (10–80 μM) revealed absorbance peaks at 296 and 376 nm related to BVH alone (Fig. 2A). The increase in Cu(II) concentration caused a linear decrease in the absorbance at 296 and 376 nm and a linear increase in

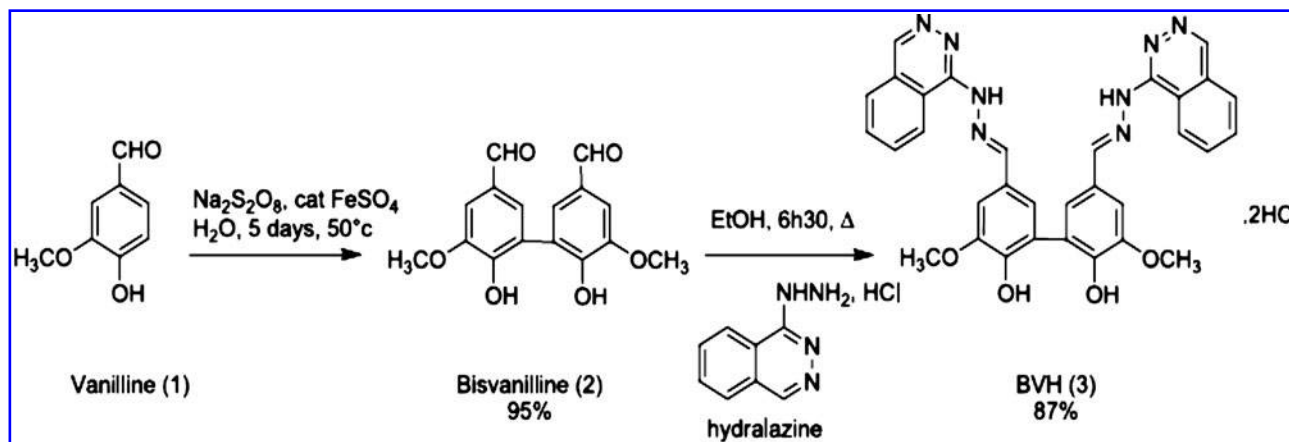
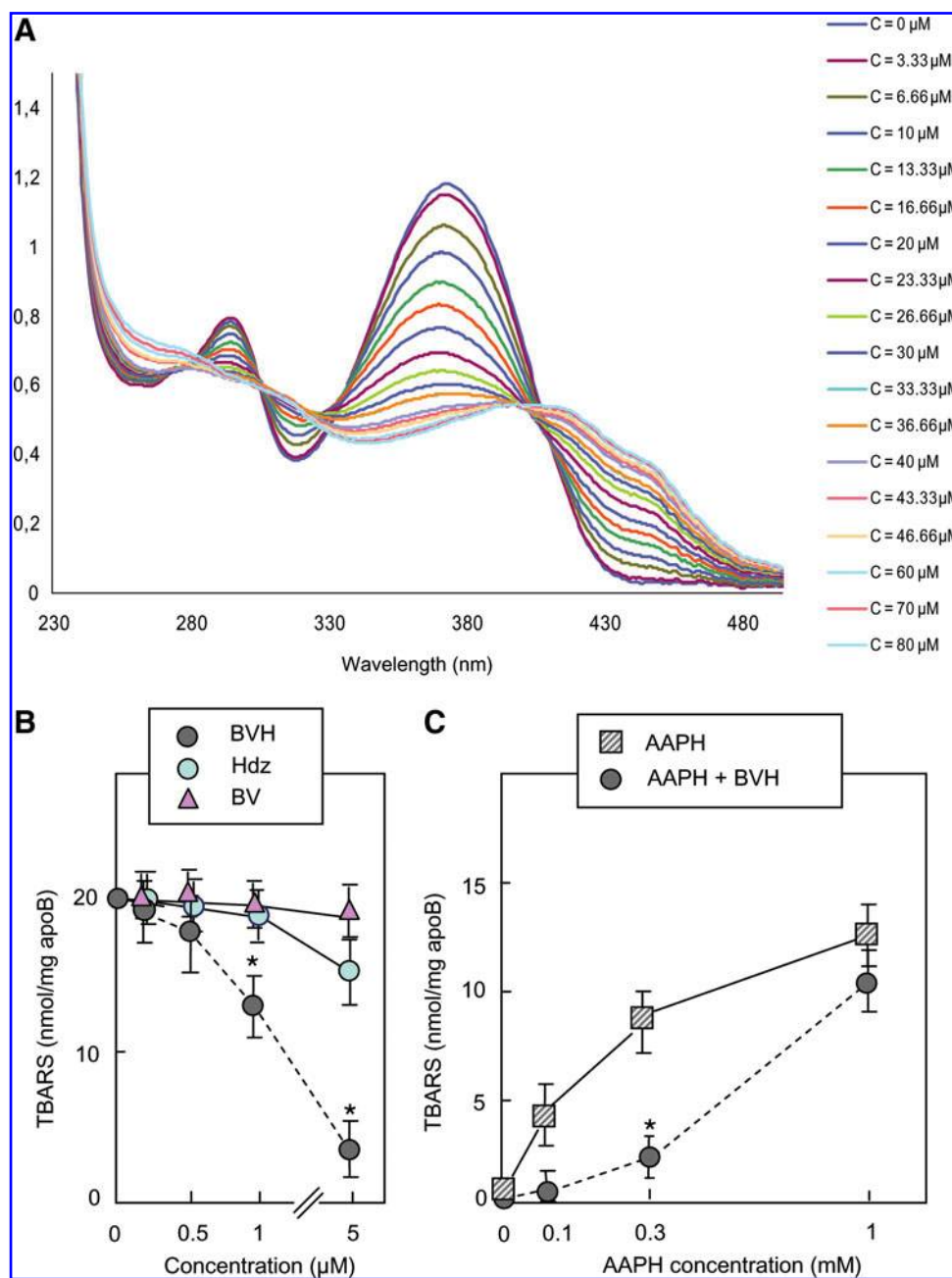


FIG. 1. Chemical structures of bisvanillyl-hydralazone (BVH), hydralazine (Hdz), and bisvanilline (BV), and scheme of BVH synthesis.

FIG. 2. BVH prevents copper-dependent low-density lipoprotein (LDL) oxidation. (A) Wavelength spectra of the complex formed between BVH (25 μM) and increasing copper concentrations (10–80 μM). The absorbance of the complex was measured at 296 and 376 nm related to BVH alone, and at 456 nm (absorbance of the complex). (B) Dose effect of BVH, Hdz, and BV on LDL oxidation (1 mg apoB/ml in phosphate-buffered saline [PBS]) induced by CuSO_4 (5 μM , 2 h incubation at 37°C). (C) Effect of BVH (5 μM) on LDL oxidation (1 mg/ml) incubated for 2 h at 37°C with variable concentrations of AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino propane) hydrochloride) (0.1–1 mM as indicated). LDL oxidation was evaluated by the thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) content, as described in the Materials and Methods section, and the results were expressed as nmol TBARS/mg apoB in LDL oxidized in the absence of antioxidant. In (B, C), the data are mean \pm SEM of four separate experiments. * $p < 0.05$.



absorbance at 456 nm. Figure 2A also shows the formation of four isosbestic points at 274, 306, 330, and 415 nm in the presence of concentration of Cu(II) between 0 and 20 μM . The isosbestic points at 306, 330, and 415 nm shifted, respectively, to 299, 323, and 402 nm in the presence of 23.33 to 80 μM Cu(II). Altogether, these results indicate the formation of copper-BVH complexes.

BVH prevents metal- and AAPH-dependent LDL oxidation

The antioxidant properties of BVH were evaluated on its ability to block LDL oxidation induced *in vitro* by metal-dependent (copper) and -independent (AAPH) oxidation systems or by contact of LDL with HMEC-1. As shown on Figure

2B, low concentrations of BVH (1–5 μM) prevented copper-mediated LDL oxidation (monitored by TBARS formation), in contrast to hydralazine and BV, which had no (or only minor) effect at these concentrations. BVH efficiently inhibited LDL oxidation mediated by AAPH (100 and 300 μM), indicating that it also exhibits free radical scavenger properties in metal-independent oxidation systems (Fig. 2C). Likewise, BVH inhibited cell-mediated LDL oxidation and subsequent cytotoxicity, whereas hydralazine and BV had no effect (Fig. 3A, B).

Since cell-mediated LDL oxidation depends on the secretion of ROS in the extracellular medium, we evaluated the ability of BVH to reduce the level of extracellular ROS, namely, superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). BVH (1 and 5 μM) reduced the generation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 (Fig. 3C, D), in agreement with its inhibitory effect on

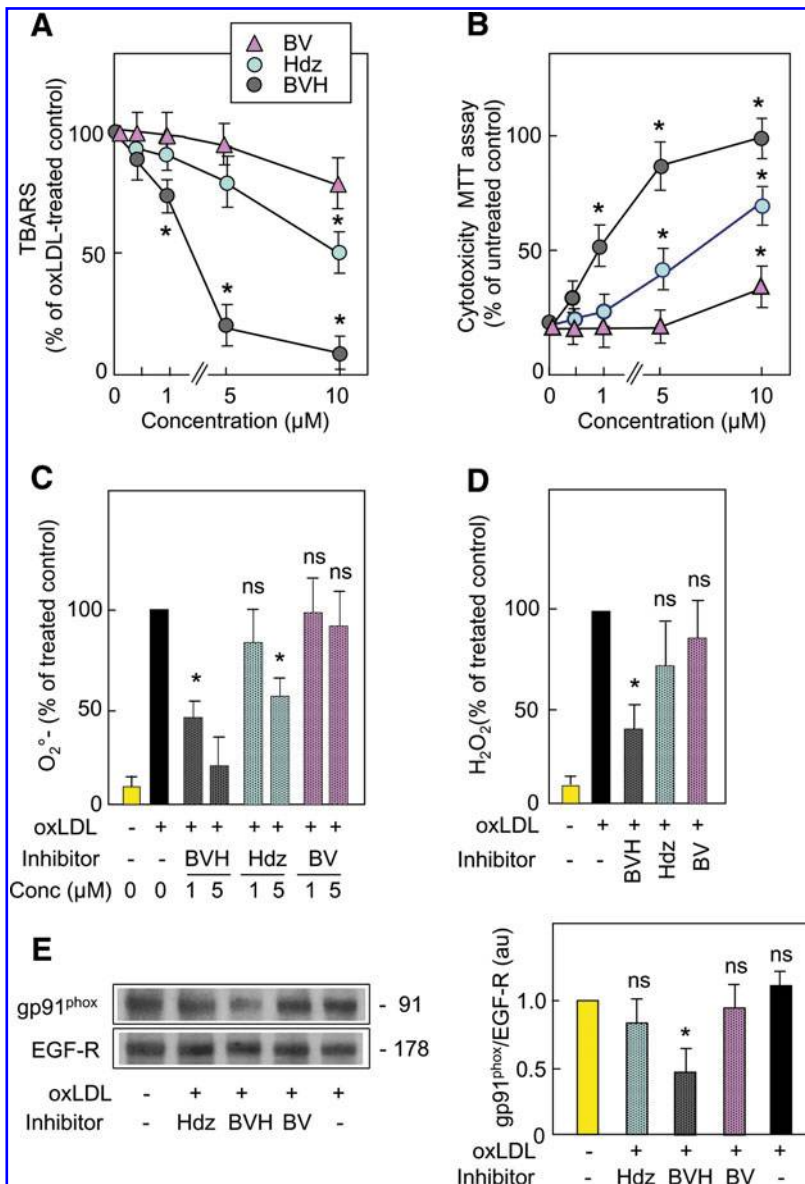


FIG. 3. BVH inhibits cell-induced LDL oxidation and the extracellular generation of reactive oxygen species (ROS). (A) Cell-mediated LDL oxidation was evaluated on human microvascular endothelial cell-1 (HMEC-1) seeded in 12-multiwell plates. The standard culture medium was removed and replaced by serum-free RPMI 1640 containing native LDL (100 µg apoB/ml) and the agents (BVH, Hdz, and BV) used at the indicated concentrations. After 14 h incubation at 37°C, the TBARS content was determined in the LDL-containing medium. Results are expressed as percent of the control incubated with LDLs in the absence of drug (the TBARS content of the oxidized LDL [oxLDL]-containing culture medium was 15 nmol/mg apoB ± 2.5). (B) Determination of HMEC-1 viability after 14 h of incubation in the presence of native LDLs and copper (1 µmol), as indicated in (A). Cell viability was determined by the MTT test. Results are expressed as percent of the untreated control. (C) Determination of O₂⁻ generation by HMEC-1 incubated for 1 h with oxLDL (100 µg/ml) ± the indicated agents (1 and 5 µM). O₂⁻ was measured by the SOD-inhibitable reduction of cytochrome C, as reported in the Materials and Methods section. Results are expressed as percent of the control treated with oxLDLs. (D) Determination of H₂O₂ generation in the extracellular medium of HMEC-1 incubated for 30 min with oxLDL (100 µg/ml) ± the indicated agents (5 µM). H₂O₂ was evaluated by the HRP-dependent quenching of scopoletin fluorescence (ex/em 358/448 nm), measured as indicated in the Materials and Method section. Results are expressed as percent of the control treated with oxLDLs. (E) *Left panel*: Expression of the gp91^{phox} subunit of NAD(P)H oxidase, evaluated by Western blot experiments from HMEC-1 incubated for 5 h with oxLDLs (100 µg/ml) ± the agents (BVH, Hdz, and BV), and revealed with a gp91^{phox} anti antibody and anti EGF-receptor (EGF-R) (Santa-Cruz), as control. *Right panel*: densitometric analysis of gp91^{phox} Western blot experiments by ImageJ software. Gp91^{phox}/EGF-R ratio was calculated and expressed in arbitrary units (au), as mean ± SEM of four separate experiments. **p* < 0.05 (values compared to the unstimulated control). In (A–E), the data are mean ± SEM of four separate experiments. **p* < 0.05. In (C, D), compared to the oxLDL-treated control, black bar. The yellow bars represent the untreated control. (To see this illustration in color the reader is referred to the web version of this article at www.liebertonline.com/ars).

lipid peroxidation and subsequent toxicity (Fig. 3A, B). It may be noted that hydralazine was less efficient than BVH (Fig. 3A–D). BV did not exert any protective effect at the used concentrations.

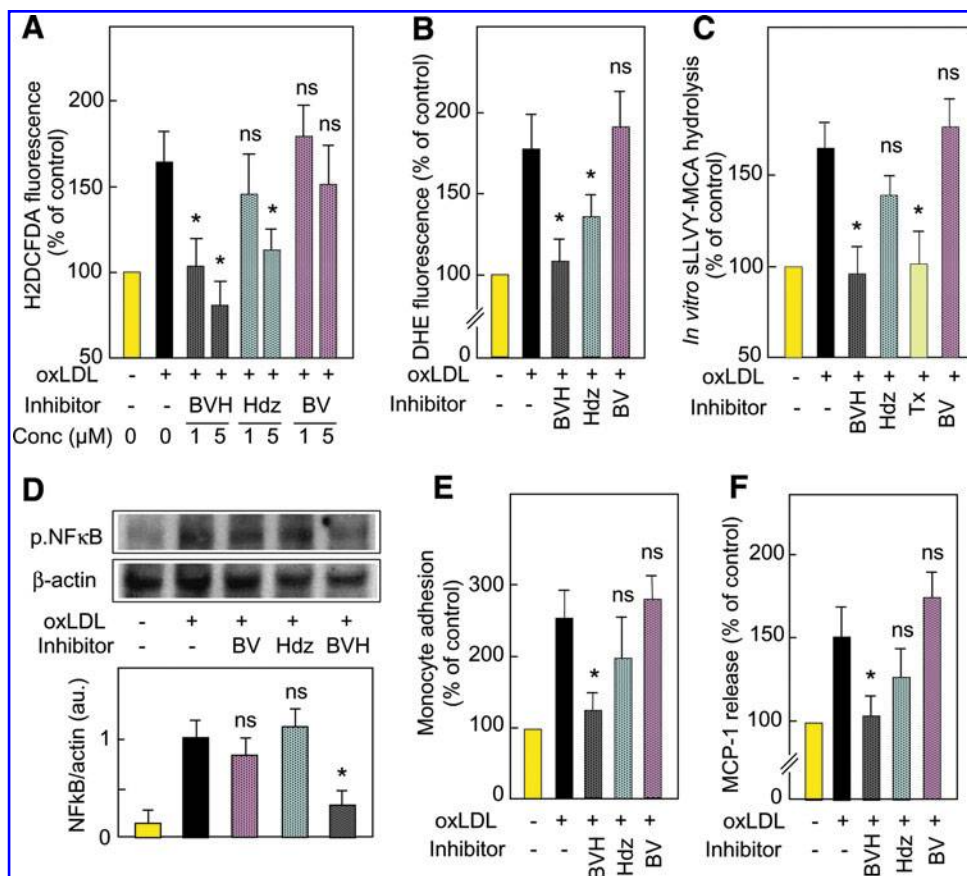
The generation of extracellular ROS by NAD(P)H oxidase and its implication in LDL oxidation and atherosclerosis have been largely investigated (19, 20, 46). This functionally active NAD(P)H oxidase contains the membrane-bound subunits p22^{phox} and gp91^{phox} (20), and is required for the proliferation and migration of these cells (20, 60). The expression of gp91^{phox} is increased and regulated by oxidative stress (20, 46), and is blocked by antioxidants such as resveratrol (8). Moreover, we previously reported that NAD(P)H oxidase is

involved in the generation of extracellular ROS in HMEC-1 (11). We thus checked whether oxLDLs (preoxidized by UV irradiation/Cu in the absence of drug) increase the expression of gp91^{phox} at the plasma membrane, and whether these responses are regulated by BVH and the other tested compounds. As shown in Figure 3E, oxLDLs increased the expression of gp91^{phox} (the data in Fig. 3E were observed after 5 h incubation). All these responses were inhibited by BVH (and at a lesser extent by hydralazine) (both being tested at 5 µM), as well as by the metal chelator desferal, and by trolox (data not shown). BV had no inhibitory effect. Thus, it can be speculated that BVH inhibits the generation of extracellular ROS *via* a direct mechanism including its radical scavenger

FIG. 4. BVH inhibits the intracellular oxidative stress and the release of MCP-1. (A, B) Rise of intracellular ROS triggered by oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 h incubation) and inhibition by BVH, Hdz, and BV. HMEC-1 were incubated with or without oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 3 h) and the indicated agent, used at 1 or 5 μM (A) or at 5 μM (B). Thirty minutes before the end of the experiment, cells were loaded with the ROS-sensitive fluorescent probes

6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester) ($\text{H}_2\text{DCFDA-AM}$) (A) or dihydroethidium (DHE) (B) and the fluorescence of the cells was measured as indicated in the Materials and Methods section. (C) Activation of the 20S proteasome determined by measuring the hydrolysis of the sLLVY-MCA substrate, by lysates from cells incubated for 2 h with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of oxLDL (as described in the Materials and Methods section), and effect of BVH, Hdz, BV, and trolox (Tx) as control (all were tested at 5 μM , except trolox, 10 μM).

(D) *Upper panel:* Western blot experiments showing the phosphorylation of NF- κB , upon 2 h stimulation of HMEC-1 with toxic oxLDL concentrations (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and effect of BVH, Hdz and BV (all the agents were tested at 5 μM). *Lower panel:* densitometric analysis of phospho-NF- κB Western blot experiments by ImageJ software. Phospho-NF- $\kappa\text{B}/\beta$ -actin ratio was calculated and expressed in arbitrary units (au), as mean \pm SEM of four separate experiments. * $p < 0.05$ (values compared to the unstimulated control). (E) Monocytes adhesion to HMEC-1 activated by oxLDLs. HMEC-1 were grown on 12-multiwell culture plaques, and stimulated by oxLDLs for 1–4 h. The adhesion assay was performed using Raw-267.4 macrophages previously loaded with calcein (5 μM) for 10 min and washed three times in warm PBS. The fluorescent calcein-loaded macrophages (50,000 cells/well) were added to HMEC-1 culture for 30 min, and then the cells were carefully washed with warm PBS and lysed in water, and the fluorescence of the mixture was immediately measured (ex/em 490/525). The results are expressed as percentage of the unstimulated control. (F) MCP-1 release by HMEC-1 activated by oxLDLs. HMEC-1 were incubated with oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 to 5 h, and MCP-1 released in the culture medium was determined by ELISA. The data are expressed as percentage of the unstimulated control. In (A–F), the data are means \pm SEM of four separate experiments. * $p < 0.05$; compared to the oxLDL-treated control, black bar. The yellow bars represent the untreated control. (To see this illustration in color the reader is referred to the web version of this article at www.liebertonline.com/ars).



and metal chelator properties, and indirectly, by blocking the increase in gp91phox expression.

We then investigated whether BVH is able to inhibit the intracellular ROS rise generated by oxLDLs, and involved in vascular dysfunction, inflammatory response, and cytotoxicity (1, 44, 45). For this purpose, HMEC-1 were loaded with two permeant ROS-sensitive probes, the $\text{H}_2\text{DCFDA-AM}$ probe that reacts with hydroperoxides, and DHE that is more specific for $\text{O}_2^{\cdot -}$ (18). Incubation of HMEC-1 with toxic concentration of oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resulted in increased level in cellular hydroperoxides and $\text{O}_2^{\cdot -}$, which were completely prevented by BVH (1–5 μM) (Fig. 4A, B), whereas no or only very weak protective effects were obtained with similar concentrations of hydralazine and BV.

Oxidative stress and oxLDLs trigger a proinflammatory signaling, which results (at least in part) from the activation of the redox-sensitive NF- κB transcription factor (44). The

nuclear translocation of NF- κB depends on its phosphorylation, and on the proteasomal degradation of I $\kappa\text{B}\alpha$, the cytosolic constitutive inhibitor of NF- κB (44). The incubation of HMEC-1 with oxLDLs stimulated the *in vitro* hydrolysis of sLLVY-MCA (a fluorogenic synthetic peptide substrate for 20S proteasome) (Fig. 4C) and the phosphorylation of NF- κB (Fig. 4D) (the reported data were observed at 2 h), in agreement with our previous report (61). These responses were completely inhibited by BVH, whereas hydralazine and BV had no effect. The proinflammatory signaling resulting from NF- κB activation is implicated in the expression of adhesion molecules and the secretion of chemoattractants (9, 51, 56). To check whether BVH inhibits the proinflammatory signaling of oxLDLs, we tested its ability to inhibit the monocyte recruitment to the endothelium activated by oxLDLs. As shown in Figure 4E, a significant increase in monocyte adhesion to the endothelium was observed after incubation of cells with

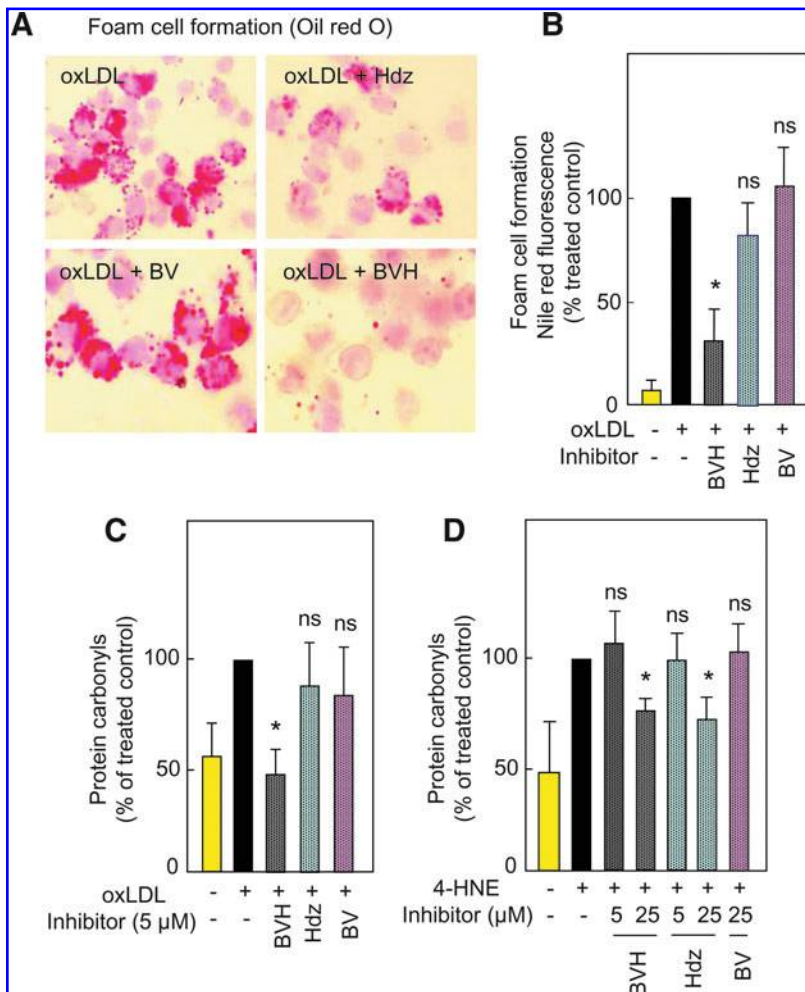


FIG. 5. BVH inhibits foam cell formation and the carbonyl stress. **(A, B)** Inhibition of foam cell formation by BVH. Raw264.7 murine macrophages were incubated for 14 h with oxLDLs (100 μ g/ml) and the tested agents BVH, HdZ, or BV (each used at the final concentration of 5 μ M). In **(A)**, the cells were washed twice, fixed in 4% paraformaldehyde, and stained with oil Red O, and observed microscopically. Representative of three separate experiments. In **(B)** Raw264.7 were stained with Nile Red, scrapped, and the fluorescence of the cells was measured as indicated in the Materials and Methods section. Results are expressed as percentage of the control treated by oxLDLs (without added drug, black bars). **(C)** Protein carbonyl content increase induced by oxLDLs, and inhibition by BVH. The protein carbonyl content was determined on cell extracts after 14 h incubation of HMEC-1 with oxLDLs (200 μ g/ml) used either alone or in the presence of BVH, HdZ, and BV (5 μ M final concentration). Carbonylated proteins were determined spectrophotometrically using DNPH as described in the Materials and Methods section. The results are expressed as percent of the control treated by oxLDLs (without drug, black bars). **(D)** Protein carbonyl content increase induced by 4-hydroxynonenal (4-HNE) (10 μ M, 14 h) and inhibitory effect of BVH and HdZ. These data are means \pm SEM of four separate experiments (* p < 0.05; compared to the oxLDL-treated control, black bar). The yellow bars represent the untreated control. (To see this illustration in color the reader is referred to the web version of this article at www.liebertonline.com/ars).

oxLDLs. This effect was prevented by BVH, but not by hydralazine nor BV. Likewise, the secretion of MCP-1 was inhibited by BVH, but not or only weakly by hydralazine or BV (Fig. 4F). Altogether, these data indicate that BVH exerts a potent antioxidant activity able to prevent the rise of extra- and intracellular ROS. Moreover, BVH inhibits the inflammatory signaling mediated by oxLDLs, as assessed by the inhibition of NF- κ B, and the reduced expression of gp91^{phox}, adhesion molecules, and chemoattractant factors.

BVH inhibit foam cell and carbonyl stress induced by oxLDLs

The formation of foam cells results from the uptake by macrophages of modified and oxLDLs (55). Foam cell formation was evaluated in murine Raw 264.7 macrophages incubated for 14 h with 100 μ g/ml oxLDLs and the tested agents (5 μ M). The lipid accumulation was evidenced by oil red O staining and was fluorometrically quantified by Nile Red. Foam cell formation was strongly inhibited by BVH, but not by BV, whereas hydralazine exhibited only weak protection (Fig. 5A, B) (higher concentrations being required for preventing foam cell formation) (16).

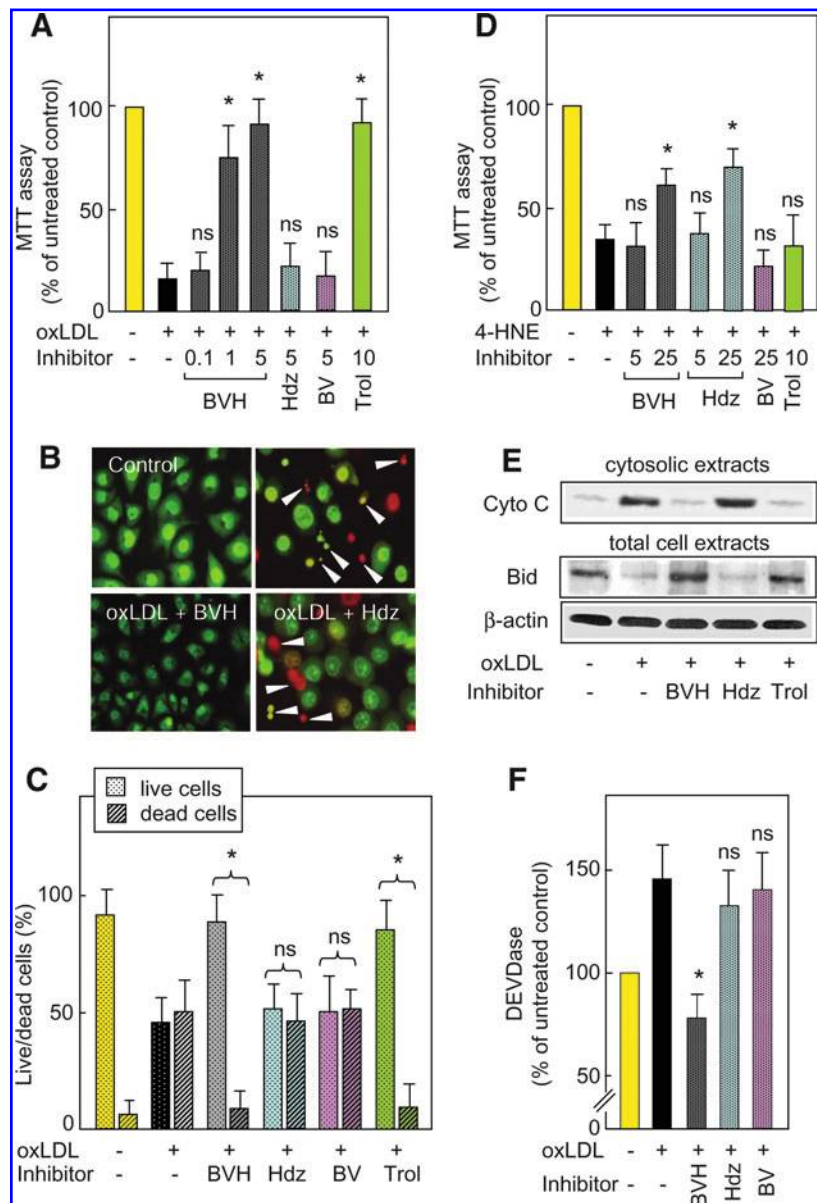
We then investigated whether BVH may block the modification by carbonylation of cellular proteins (53), which can be protected by carbonyl scavengers (16). As shown in Figure

5C, BVH prevented the cellular increase in protein carbonyl content induced by oxLDLs (200 μ g/ml, 14 h incubation), whereas hydralazine and BV were inefficient at the used concentration (5 μ M). As shown in Figure 5D, 4-HNE (10 μ M) directly added to the culture medium of HMEC-1 triggered an increase in protein carbonyl content, which was blocked by BVH and hydralazine, but not by BV. The protection against the carbonyl stress induced by 4-HNE necessitated higher BVH and hydralazine concentrations (25 μ M), whereas the antioxidant properties of BVH were observed from 1 to 5 μ M. Taken together, it is suggested that the inhibitory effect of BVH on the carbonyl stress elicited by oxLDLs mainly results from its antioxidant properties, whereas its intrinsic carbonyl scavenger properties are comparable with those exerted by hydralazine.

BVH prevents oxLDL-mediated apoptosis

The antiapoptotic properties of BVH, hydralazine, and BV were evaluated on HMEC-1 incubated with toxic concentrations of oxLDLs. After 24 h incubation, the residual viability of cells (evaluated by the MTT test) was < 20% of the control (cells incubated without oxLDLs) (Fig. 6A). Dose-response experiments indicated that BVH was strongly efficient even at low concentrations (1 μ M) for preventing the toxic effect of oxLDLs, whereas 5 μ M

FIG. 6. BVH prevents oxLDL-mediated apoptotic signaling. (A–C) Cytoprotective effect of BVH. Sub-confluent HMEC-1 were incubated in serum-free culture medium with oxLDLs (200 μ g/ml) and the tested agents. (A) Cytotoxicity and cytoprotection were evaluated by the MTT assay, after 24h incubation with oxLDLs and with/without the tested agents (used at the indicated concentrations). The results are expressed as percentage of the untreated control. Fluorescence microscopy (B) and count of live and dead cells (C) incubated for 16h with/without oxLDLs (200 μ g/ml) and with/without BVH (5 μ M), Hdz (5 μ M), BV (5 μ M), and trolox (Trol, 10 μ M). Cells were stained by the fluorescent DNA intercalating agents Syto-13 (permeant, green) and propidium iodide (nonpermeant, red), and examined by fluorescence microscopy that reveals live cells (green with normal nucleus) and dead cells with apoptotic nucleus (green apoptotic or red postapoptotic necrosis, arrows) or primary necrosis with red nucleus (without apoptotic features). In (B), representative of three separate experiments. (D) Cytoprotective effect of BVH, Hdz, and BV (5 and 25 μ M) on the toxicity of 4-HNE (10 μ M, 14h incubation), and evaluated by the MTT test as percentage of the untreated control. (E, F) BVH blocks the proapoptotic cascade elicited by oxLDLs in HMEC-1 (similar experimental conditions as in (C)). (E) Western blots of cytochrome C (cyto C) on cytosolic proteins, and Bid and β -actin on total cell extracts. Representative of four separate experiments. (F) Evaluation of the DEVDase activity on cell extracts using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC, as indicated in Materials and Methods section. The results are expressed as percentage of the untreated controls. These data are means \pm SEM of at least four separate experiments. * p < 0.05 (comparison to the oxLDL-treated controls, black bars). The yellow bars represent the untreated control. (To see this illustration in color the reader is referred to the web version of this article at www.liebertonline.com/ars).



hydralazine and BV had no protective effect (Fig. 6A). Cell death was characterized by counting apoptotic cells after double staining with two fluorescent intercalating agents, the permeant DNA probe syto-13 that stains green all the nuclei, and propidium iodide (PI) that stains red only cells with permeabilized membrane (*i.e.*, necrotic cells affected by either primary necrosis or postapoptotic necrosis) (47, 62). As shown in Figure 6B and C, oxLDLs increased the number of apoptotic cells. BVH (1–5 μ M) prevented the apoptosis of HMEC-1 cells, whereas hydralazine and BV (1–5 μ M) were inefficient. BVH (5 μ M) blocked the apoptotic signaling elicited by oxLDLs (Fig. 6E, F), by inhibiting the cleavage of Bid and the cytosolic release of cytochrome C, as well as the activation of DEVDase (caspase 3). BVH and hydralazine (25 μ M), but not BV, blocked the carbonyl stress-induced toxicity, by inhibiting cell death elicited by pure 4-HNE (10 μ M) added to the culture medium of HMEC-1 (Fig. 6D).

The protective effect of BVH on 4-HNE-induced cell death necessitated higher concentrations (25 μ M), and was comparable with that exerted by hydralazine (Fig. 6D). Trolox, an antioxidant deriving from vitamin E, and used as control, blocked oxLDL-mediated apoptosis in agreement with previous studies (33), but had no effect on 4-HNE-induced cytotoxicity.

BVH prevents the development of atherosclerosis in *apoE*^{-/-} mice

The deletion of the *apoE* gene in *apoE*^{-/-} mice leads to severe hypercholesterolemia and spontaneous atherosclerosis, even on a standard chow diet (65). Three groups of 20 *apoE*^{-/-} mice (male) received a standard diet chow, and were either untreated (control) or treated for 16 weeks with BVH or hydralazine added to the drinking water. Blood pressure,

TABLE 1. PLASMA CHOLESTEROL, TRIGLYCERIDE, AND GLYCEMIA CONCENTRATIONS AND BLOOD PRESSURE IN $ApoE^{-/-}$ MICE AFTER 16 WEEKS OF TREATMENT WITH BISVANILLYL-HYDRALAZONE AND HYDRALAZINE

$ApoE^{-/-}$ mice treatment	Glucose (mM)	Total cholesterol (mM)	TG (mM)	BP (mmHg)
Untreated	8.6 ± 0.4 ^a	13.8 ± 1.6 ^a	1.58 ± 0.4 ^a	108 ± 5
BVH	8.2 ± 0.3 ^a	13.4 ± 1.4 ^a	1.76 ± 0.3 ^a	110 ± 6
Hydralazine	8.5 ± 0.3 ^a	13.7 ± 1.5 ^a	1.45 ± 0.3 ^a	107 ± 4

Results are given as mean ± SD.

^a $p < 0.05$ for comparison between untreated and drug-treated $ApoE^{-/-}$ mice, 20 animals per group. BVH, bisvanillyl-hydralazine; BP, blood pressure; TG, triglycerides.

plasmatic levels of total cholesterol, triglycerides, and glucose were comparable in treated and untreated animals (Table 1), thereby indicating that neither BVH nor hydralazine modify the blood level of circulating lipids. In untreated (control) $ApoE^{-/-}$ mice, the area of atherosclerotic lesions in aortic sinus was $24,550 \pm 6340 \mu m^2$, in agreement with (16). BVH administration resulted in a marked reduction (>55%) of the atherosclerotic lesion area (Fig. 7A). By comparison, hydralazine reduced by 40% the size of the lesions, as previously reported (16). In the light of the antioxidant and anti-inflammatory properties of BVH, we checked the composition of atherosclerotic lesions from BVH-treated and control animals. As shown in Figure 7B, BVH reduced the tissular expression of the chemoattractant factor MCP-1, and the number of α -actin-positive cells (SMC), as well as CD68-

positive cells (macrophages) (data not shown). BVH also reduced lymphocyte infiltration (as assessed by a decrease in CD3-positive T cells), and inhibited the accumulation of 4-HNE adducts on tissular proteins (carbonyl stress) in aortic sinus of $ApoE^{-/-}$ mice (Fig. 7B). These data were confirmed by the reduction by BVH (and hydralazine) of the tissular increase in protein carbonyl content (Fig. 7C), and by the decrease in 4-HNE-adduct accumulation on the PDGFR receptor (a target of carbonyl stress) (13, 62), in aortas of treated *versus* untreated animals (Fig. 7D).

Discussion

Oxidative stress, LDL oxidation, and carbonyl stress are involved in the initiation of early atherosclerotic lesions, and

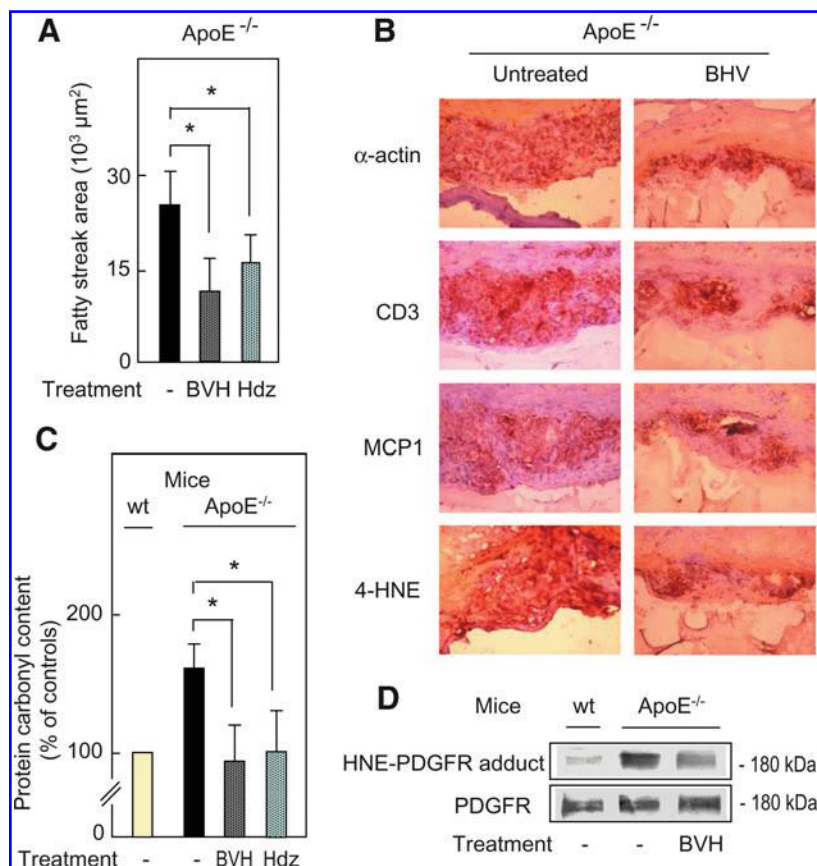


FIG. 7. Antiatherogenic effect of BVH on $ApoE^{-/-}$ mice lesions. $ApoE^{-/-}$ male mice aged 4 weeks (20 in each group) were fed a regular mouse chow diet and treated or not by BVH or Hdz (30 mg/l, *i.e.*, 10 mg/kg/day added to the drinking water) for 16 weeks. Hearts were embedded in OCT (Tissue-Tek) and aortic sinus were cut into 10 μm sections, stained with oil Red O, and counterstained with hematoxylin-eosin, and a morphometric quantification of the lesion size was performed, as indicated in the Materials and Methods section. (A) Fatty streak area quantification. Means \pm SEM of fatty streak area in aortic sinus of untreated male mice was $24,550 \pm 6340 \mu m^2$. (B) Immunohistochemistry of cryosections of aortic sinus from untreated (left) and BVH-treated (right) $ApoE^{-/-}$ mice. From top to bottom, α -actin (SMC), CD3 (T lymphocytes), MCP-1, and 4-HNE-adduct (HNE) immunostaining. The pictures showed here are representative of five separate untreated and BVH-treated mice. (C) Determination of the protein carbonyl content in protein extracts from aortas of control untreated, BVH-, and Hdz-treated mice. (D) Western blot experiments of HNE-adduct accumulation in aortas of control and BVH-treated mice. These results are representative of three separate experiments. In (A, C), the data are means \pm SEM of 20 mice in each group. * $p < 0.05$ (comparison to the untreated controls, black bars). The yellow bars represent the untreated control. (To see this illustration in color the reader is referred to the web version of this article at www.liebertonline.com/ars).

in the inflammatory and apoptotic events involved in the progression of atherosclerosis (3, 4, 23, 25). Antioxidants prevent the development of fatty streaks in animals (3, 24, 37), but their efficacy on advanced atherosclerotic lesions and on cardiovascular events in humans is debated (3, 5, 63). Although the efficiency of carbonyl scavengers on LDL oxidation (27) and on the late steps of atherosclerosis is not clarified, inhibiting both oxidative stress and carbonyl stress may represent a new therapeutic strategy for atherosclerosis. Carbonyl scavengers are usually poor antioxidants, whereas antioxidants fail to neutralize carbonyl compounds once adducts are formed on proteins (40, 42). We recently reported that hydrazine derivatives used in medicine inhibit the carbonyl stress induced by oxLDL, and slow down the development of atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice (this being correlated with a decrease in foam cell formation). Among these agents, the antihypertensive drug hydralazine is a carbonyl scavenger agent with (moderate) antioxidant activity (16). To improve the antioxidant properties of hydralazine, we designed and synthesized BVH, a hydralazine derivative, exhibiting both antioxidant (presence of a phenolic moiety) and carbonyl scavenger properties (presence of hydralazine). The linker between BV and hydralazine is an acid-labile hydrazone group that was designed to undergo hydrolysis, allowing the release of hydralazine under physiological conditions (28).

A first observation is that BVH is a potent antioxidant, associating both metal chelator and radical scavenger properties. BVH (even at low concentrations) formed complexes with copper, and significantly blocked the copper-induced and AAPH-induced LDL oxidation, (which is metal-independent), as well as LDL oxidation mediated by vascular cells (HMEC-1), which depends on the presence of transition metal. The later mimicks the mechanism of LDL oxidation occurring *in vivo* in the vascular wall, since copper ions are present in the vessels, and contribute in the generation of oxLDLs and atherogenesis (3, 25, 64). The metal chelator and radical scavenger properties of BVH allow to block the generation of extracellular ROS that are involved in cell-mediated LDL oxidation (O₂⁻ initiates the generation of H₂O₂ and OH[•], formed through the Fenton reaction in the presence of iron or copper) (29). The copper-chelating properties of BVH should help to inhibit the Fenton reaction as assessed by the inhibition of H₂O₂ secretion in the culture medium. These effects are reinforced by the inhibitory effect of BVH on the expression of the gp91^{phox} subunit of NADPH-oxidase, in agreement with reports showing the role of gp91^{phox} in extracellular ROS generation (19, 20). The inhibitory effect of BVH on gp91^{phox} expression could result from an inhibition by BVH, of the redox sensitive proinflammatory NF-κB transcription factor, which regulates the expression of NAD(P)H oxidase (2, 17), and is activated by oxLDLs (1). These data are in agreement with the classical inhibitory effect of antioxidants on the intracellular oxidative stress, the proteasome activation (as reported here with BVH), and the proteasomal degradation of I-κB, the natural cytosolic inhibitor of NF-κB (44). Besides, BVH inhibited the proinflammatory signaling mediated by oxLDLs (44, 47), leading to stress-mediated cellular responses, such as the adhesion of monocytes to HMEC-1 stimulated by oxLDL, and the secretion of the

chemoattractant MCP-1 involved in mononuclear cell recruitment (9, 44). Interestingly, BVH prevented oxLDL cytotoxicity, by blocking the apoptotic signaling resulting in the activation of the intrinsic mitochondrial apoptotic cascade (characterized by the cleavage of the proapoptotic factor Bid, the release of cytochrome C, and the activation of caspase 3) (47). These data are in agreement with the generally known cytoprotective properties of antioxidants (vitamin E, Trolox, probucol, phenolic acids, and flavonoids) (34, 37, 57). The antioxidant effect of BVH was not reproduced by co-incubating BV and hydralazine, thereby suggesting that the effect of BVH results from a conformational change in the chemical structure of its components, which confers to the molecule a better access to its targets (ROS, copper), and its subsequent antioxidant and cytoprotective properties.

The second observation is that BVH exhibited carbonyl scavenger properties similar to those observed for hydralazine, and evidenced by the inhibitory effect of BVH on protein carbonylation and toxicity elicited by 4-HNE directly added to the culture medium of HMEC-1 (which triggers a carbonyl stress independent of lipid peroxidation). Trolox used as control cytoprotective antioxidant was unable to block the carbonyl stress induced by 4-HNE, and this suggests that the carbonyl scavenger properties of BVH (on the direct formation of 4-HNE-adducts) are independent of its antioxidant activity. These effects of BVH necessitate relatively higher concentrations (25 μM), and are comparable with (thus probably result from) hydralazine, which is an hydrazine derivative, and a strong carbonyl scavenger (45). One hypothesis is that BVH undergoes hydrolysis of its acid-labile hydrazone group, thereby releasing hydralazine at acidic pH under physiological conditions (28). In contrast, the strong inhibitory effect of low BVH concentrations (1–5 μM) on the formation of protein carbonyls and foam cell accumulation induced by oxLDLs likely resulted from its antioxidant and cytoprotective rather than carbonyl scavenger properties. Nevertheless, it can be speculated that BVH is protective through its antioxidant properties (inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis induced by oxLDLs), and through its carbonyl scavenger properties at least in the vascular wall of apoE^{-/-} mice, where it prevented the accumulation of HNE-adducts on PDGF-R, a known target of carbonyl stress (13, 62). The antiatherogenic effect of BVH in apoE^{-/-} mice was superior to that of hydralazine (55%–60% of lesion area decrease *vs.* 40%–45% for hydralazine), perhaps because of its better antioxidant properties. BVH did not reduce the plasma lipid content of apoE^{-/-} mice, but prevented in part the accumulation of macrophagic foam cells, CD3 T-cell infiltration, and MCP-1 expression. The protein carbonyl content and the accumulation of 4-HNE adducts on tissular proteins (such as PDGFR) were reduced in BVH-treated apoE^{-/-} mice, indicating a good correlation of these parameters with the decrease in fatty streaks accumulation and plaque size reduction.

In conclusion, BVH is a potent antiatherogenic agent, and represents the prototype of new antioxidant and carbonyl scavenger molecules, which should be of interest for slowing down the progression of early atherosclerotic lesions formation, and more generally of pathologies associated with oxidative and carbonyl stress.

Financial Support and Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support by INSERM, CNRS, Université Paul Sabatier, Fondation Coeur et Artères (FCA-06T6), Fondation pour la Recherche Médicale (DCV2007040927), and European COST-B35. Dr. Gallet (SNCF Laboratory, Toulouse) is gratefully acknowledged for providing human sera. The authors thank Mrs. Corinne Bernis for her excellent technical assistance.

Benaissa Bouguerne is recipient of support from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Nadji Belkheiri is recipient of a grant from Algerian government.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Andalibi A, Liao F, Imes S, Fogelman AM, and Lusis AJ. Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NF-kappa B. *Biochem Soc Trans* 21(Pt 3): 651–655, 1993.
- Anrather J, Racchumi G, and Iadecola C. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem* 281: 5657–5667, 2006.
- Aviram M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res* 33, Suppl: S85–S97, 2001.
- Berliner JA and Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20: 707–727, 1996.
- Brigelius-Flohe R, Kluth D, and Banning A. Is there a future for antioxidants in atherogenesis? *Mol Nutr Food Res* 49: 1083–1089, 2005.
- Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, and Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106: 2827–2835, 2002.
- Chait A and Heinecke JW. Lipoprotein modification: cellular mechanisms. *Curr Opin Lipidol* 5: 365–370, 1994.
- Chow SE, Hshu YC, Wang JS, and Chen JK. Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol* 102: 1520–1527, 2007.
- Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Contessi GB, Pastorino AM, and Lo Cascio V. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 22: 117–127, 1997.
- Cossarizza A, Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Gibellini L, Bertoncelli L, Nasi M, and Pinti M. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. *Nat Protoc* 4: 1790–1797, 2009.
- de Souza JA, Vindis C, Nègre-Salvayre A, Rye KA, Coutrier M, Therond P, Chantepie S, Salvayre R, Chapman MJ, and Kontush A. Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med* 14: 608–620, 2010.
- Duval C, Cantero AV, Auge N, Mabile L, Thiers JC, Nègre-Salvayre A, and Salvayre R. Proliferation and wound healing of vascular cells trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* 35: 1589–1598, 2003.
- Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Vacaressse N, Jürgens G, Darblade B, Arnal JF, Parthasarathy S, and Nègre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation* 104: 1814–1821, 2001.
- Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxy nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81–128, 1991.
- Fang YZ, Yang S, and Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872–879, 2002.
- Galvani S, Coatrieux C, Elbaz M, Grazide MH, Thiers JC, Parini A, Uchida K, Kamar N, Rostaing L, Baltas M, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Carbonyl scavenger and anti-atherogenic effects of hydrazine derivatives. *Free Radic Biol Med* 45: 1457–1467, 2008.
- Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, DeLeo FR, and Quinn MT. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol* 82: 729–741, 2007.
- Georgiou CD, Papapostolo I, Patsoukis N, Tsegenidis T, and Sideris T. An ultrasensitive fluorescent assay for the *in vivo* quantification of superoxide radical in organisms. *Anal Biochem* 347: 144–151, 2005.
- Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, and Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 87: 26–32, 2000.
- Griendling KK, Sorescu D, and Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494–501, 2000.
- Grune T, Reinheckel T, and Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem* 271: 15504–15509, 1996.
- Harkewicz R, Hartvigsen K, Almazan F, Dennis EA, Witztum JL, and Miller YI. Cholesteryl ester hydroperoxides are biologically active components of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 283: 10241–10251, 2008.
- Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized LDL hypothesis. *Atherosclerosis* 141: 1–15, 1998.
- Hishikawa K, Nakaki T, and Fujita T. Oral flavonoid supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 442–446, 2005.
- Holvoet P and Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 8: 1279–1284, 1994.
- Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S, and Uchida K. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: implications for oxidative stress. *J Biol Chem* 276: 23903–23913, 2001.
- Jedidi I, Therond P, Zarev S, Gardès-Albert M, Legrand A, Barouki R, Bonnefont-Rousselot D, and Aggerbeck M. Paradoxical protective effect of aminoguanidine toward LDL oxidation: inhibition of apolipoprotein B fragmentation without preventing its carbonylation. Mechanism of action of aminoguanidine. *Biochemistry* 42: 11356–11365, 2003.
- Kalia J and Raines RT. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew Chem* 120: 7633–7636, 2008.

29. Kritharides L, Jessup W, and Dean RT. Macrophages require both iron and copper to oxidize LDL in Hanks' balanced salt solution. *Arch Biochem Biophys* 323: 127–136, 1995.
30. Leonarduzzi G, Arkan MC, Basaga H, Chiarotto E, Sevanian A, and Poli G. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 28: 1370–1378, 2000.
31. Libby P, Ridker PM, and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135–1143, 2002.
32. Loschen G, Azzi A, and Flobe A. Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett* 33: 84–87, 1973.
33. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233–241, 2000.
34. Mabile L, Fitoussi G, Periquet B, Schmitt A, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Alpha-tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 19: 177–187, 1995.
35. McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049–6055, 1969.
36. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, and Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 36: 1199–1208, 2002.
37. Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B, and Frolich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 99: 1733–1739, 1999.
38. Munzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, Freeman BA, and Harrison DG. Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J Clin Invest* 98: 1465–1470, 1996.
39. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 698–709, 2003.
40. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, and Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 153: 6–20, 2008.
41. Perrin DD and Armarego WLF. *Purification of Laboratory Chemicals*, third edition. Oxford: Pergamon Press, 1988.
42. Peyroux J and Sternberg M. Advanced glycation end-products (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)* 54: 405–419, 2000.
43. Rader DJ and Puré E. Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell? *Cell Metab* 1: 223–230, 2005.
44. Robbesyn F, Salvayre R, and Negre-Salvayre A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. *Free Radic Res* 38: 541–551, 2004.
45. Rollas S and Küçükgülzel SG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* 12: 1910–1939, 2007.
46. Rueckschloss U, Duerschmidt N, and Morawietz H. NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 5: 171–180, 2003.
47. Salvayre R, Auge N, Benoist H, and Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 213–221, 2002.
48. Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marachet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res* 104: 328–336, 2009.
49. Seccia M, Albano E, and Bellomo G. Suitability of chemical *in vitro* models to investigate LDL oxidation: study with different initiating conditions in native and alpha-tocopherol-supplemented LDL. *Clin Chem* 43: 1436–1441, 1997.
50. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291–295, 1997.
51. Srinivasan S, Hatley ME, Reilly KB, Danziger EC, and Hedrick CC. Modulation of PPARalpha expression and inflammatory interleukin-6 production by chronic glucose increases monocyte/endothelial adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 851–857, 2004.
52. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928: 22–38, 2001.
53. Steffen Y, Jung T, Klotz LO, Schewe T, Grune T, and Sies H. Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin. *Free Radic Biol Med* 42: 955–970, 2007.
54. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272: 20963–20966, 1997.
55. Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1436: 279–298, 1999.
56. Tedgui A and Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86: 515–581, 2006.
57. Traber MG and Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43: 4–15, 2007.
58. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, and Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized LDLs. *J Biol Chem* 273: 16058–16066, 1998.
59. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28: 1685–1696, 2000.
60. Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, and Alexander RW. Novel role of gp91^{phox}-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 91: 1160, 2002.
61. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J* 14: 532–542, 2000.
62. Vindis C, Escargueil-Blanc I, Elbaz M, Marcheix B, Grazide MH, Uchida K, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res* 98: 785–792, 2006.
63. Willcox BJ, Curb JD, and Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol* 101: 75D–86D, 2008.
64. Witztum JL and Steinberg D. Role of oxidized LDL in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785–1792, 1991.
65. Zedelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, and Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1706–1721, 2007.

Address correspondence to:

Dr. Anne Nègre-Salvayre
Biochimie
INSERM U858
CHU Rangueil
1 Avenue Jean Poulhès
BP84225
31432 Toulouse Cedex 4
France

E-mail: anne.negre-salvayre@inserm.fr

Date of first submission to ARS Central, May 21, 2010; date of final revised submission, October 19, 2010; date of acceptance, November 2, 2010.

Abbreviations Used

4-HNE = 4-hydroxynonenal
BV = bisvanilline
BVH = bisvanillyl-hydralazone
DHE = dihydroethidium
H₂DCFDA-AM = 6-carboxy-7' dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester)
HMEC-1 = human microvascular endothelial cell-1
IR = infrared
LDL = low-density lipoprotein
mp = melting points
OxLDL = oxidized LDL
PBS = phosphate-buffered saline
ROS = reactive oxygen species
SOD = superoxide dismutase
TBARS = thiobarbituric reactive substances



Original article

Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family

Nadji Belkheiri^{a,b}, Benaissa Bouguerne^{a,b,c}, Florence Bedos-Belval^{a,b}, Hubert Duran^{a,b},
Corinne Bernis^c, Robert Salvayre^c, Anne Nègre-Salvayre^{c,*}, Michel Baltas^{a,b,**}

^a Université de Toulouse, UPS, LSPCMIB (Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique), 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

^b CNRS, LSPCMIB (Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique), 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

^c INSERM I2MR 858, IFR 31 CHU Rangueil, L3 Building, Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2009

Received in revised form

17 March 2010

Accepted 20 March 2010

Available online 25 March 2010

Keywords:

Syringic hydrazones

Antioxidants

Oxidative stress

Carbonyl stress

LDL oxidation

Atherosclerosis

ABSTRACT

A novel series of hydrazones derived from syringaldehyde and their antioxidant properties have been explored. Several employed methods such as scavenging effect on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) radical cation expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), inhibition of superoxide anion (O₂^{•-}) generation and of human cell-mediated low-density lipoprotein oxidation (monitored by the formation of TBARS) exhibited their potent antioxidant properties. The carbonyl scavenger efficacy was also evaluated by measuring the ability to decrease the protein carbonyl content in cells challenged with oxidized LDL. In this report, we discuss about the synthesis of hydrazones and their dual biological role, antioxidant and carbonyl scavenger for further application in atherosclerosis.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidative stress is a well-known mechanism that is responsible for the development of vascular damage. Different pathogenic stimuli involved in cardiovascular diseases, such as activated macrophages, hyperglycaemia, oxidized low-density lipoprotein (LDL), exert their harmful effects, at least partially, through an increased local generation of reactive oxygen species. Reactive Oxygen Species (ROS) are normally produced throughout oxygen metabolism and play a major role in physiological and pathological cell redox signalling [1]. Oxidative stress results from an imbalance between i) an overproduction of ROS by the different cellular sources such as the mitochondrial respiratory chain, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydride oxidases (NADPHOXs or NOXs), xanthine oxidase, lipoxygenases, cytochromes P450, and other oxidases and ii) decreased cellular and plasma antioxidant defenses [1]. Besides the direct free radical attack of cellular components, oxidative stress induces a lipid peroxidation of

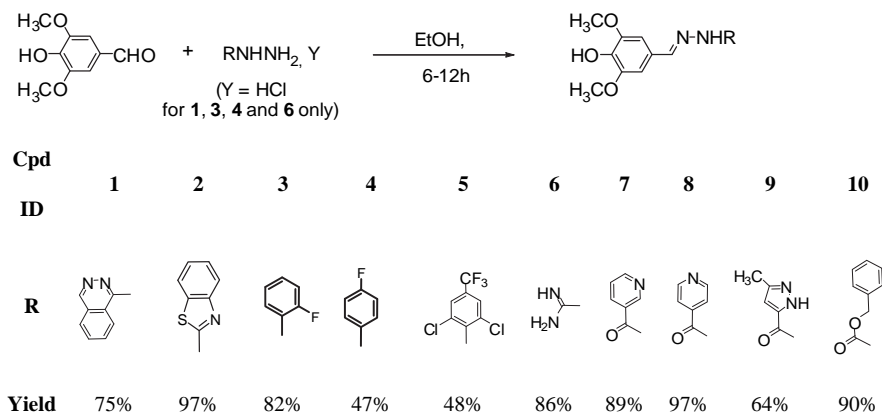
cellular membranes resulting in the generation of reactive carbonyl compounds (RCC) that react rapidly with free amino groups and thiol residues on proteins thereby forming adducts involved in the “carbonyl stress” [2,3]. Both oxidative and carbonyl stress alter protein function and trigger the accumulation of modified proteins, which results in inflammation and apoptosis [3,4]. ROS and RCC are implicated in the pathophysiology of ageing and oxidative stress-associated pathologies such as diabetes, neurodegenerative diseases, atherosclerosis and cardiovascular complications [5,6]. Low-density lipoproteins (LDL) become atherogenic after undergoing oxidation within the vascular wall, in the presence of transition metals and ROS generated by vascular cells [7]. Oxidized LDL are involved in the formation of early atherosclerotic lesions (foam cell deposition as fatty streaks), and in their evolution toward more advanced states characterized by endothelial dysfunction, chronic inflammatory responses and toxic events leading to plaque rupture and thrombosis [7,8].

Antioxidants inhibit the generation of ROS and the subsequent formation of lipid peroxidation products, thereby preventing both oxidative and carbonyl stress. Most antioxidants prevent LDL oxidation in cell-dependent and cell-free systems, and delay the formation of atherosclerotic lesions in animal models for atherosclerosis such as apoE^{-/-} mice [9]. Discrepancies exist about their efficiency against atherosclerosis in humans; this resulting at least in part, from their bioavailability within the plaque, their chemical

* Corresponding author.

** Corresponding author. Université de Toulouse, UPS, LSPCMIB (Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique), 118 Route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France. Tel.: +33 (0) 5 61 55 62 89; fax: +33 (0) 5 61 55 60 11.

E-mail address: baltas@chimie.ups-tlse.fr (M. Baltas).



Scheme 1. Synthesis of syringic hydrazones.

nature and their inability to scavenge RCCs, once adducts are formed on proteins [10]. However antioxidants remain very efficient in preventing the early atherosclerotic lesions and inflammatory events implicated in the evolution of the lesions toward more advanced states [9,10].

We have recently reported that hydrazine derivatives such as hydralazine, exhibit efficient antiatherogenic activity mediated by their carbonyl scavenger activity [11]. However their antioxidant capacity is moderate, limiting their use as antiatherogenic agents. Moreover, we have also reported that phosphonocinnamic derivatives obtained by reaction between syringaldehyde and activated phosphonates possess interesting dual biological activities as antioxidant and cytoprotective properties [12]. More recently, we have designed biaryl compounds based on 5,5'-bisvanillin scaffold possessing identical or different substitutions: the known phosphodiester and/or fluorophosphonoester moiety and a hydrazone function [13]. The best compounds in term of antioxidant and cytoprotective effects was found to be the symmetrical compound bearing two hydralazine scaffolds while all other ones were much less potent. In continuation of this work and in order to get insight on the efficiency of the hydrazone functionality, we report here the synthesis of simpler monomeric hydrazono-derivatives obtained through syringaldehyde coupling with a series of hydrazines and their ability to block oxidation parameters. Their potency have been evaluated through their impact on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay [14], Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) [15], the carbonyl and O_2^- scavenging activities.

2. Chemistry

Syringic hydrazones described were readily synthesized according to the procedures outlined in Scheme 1. Commercially available syringaldehyde was refluxed in absolute ethanol with the different hydrazines during 6–12 h. The reaction was followed by TLC until completion. The solution was then cooled to room temperature and the resulting precipitate was collected by filtration to provide the corresponding hydrazones as hydrochloride salt or not, depending on the nature of commercially available hydrazines in good to excellent yield (Scheme 1).

3. Pharmacology

3.1. Scavenging radical activity on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical

Radical scavenging potency of the compounds tested was assessed in vitro by the DPPH assay. DPPH is one of the few stable

and commercially available organic nitrogen radicals. DPPH radicals are considered as a representative method for the preliminary screening of compounds able to scavenge activated oxygen species, since they are more stable and easier to handle than oxygen free radicals and DPPH assay has been largely used to measure the antioxidant activity of different phenolic compounds.

This method is based on measuring the continual absorbance decrease of the ethanol solution of the stable free nitrogen radical DPPH at 517 nm, in the presence of the derivatives tested. All tested hydrazones present UV absorbance between 230 and 350 nm, and do not interfere with the kinetic measurement of DPPH absorbance decrease at 517 nm. The radical scavenging activity was expressed as the molar amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% (efficient concentration) EC₅₀ (Fig. 1).

The DPPH[•] absorbance decrease in presence of antioxidants is due to hydrogen transfer from the antioxidant, thus forming the DPPH-H stable compound. Ethanolic DPPH[•] solutions used at different concentrations were stable (checked over a 60 min period). A significant decrease in the concentration of DPPH[•] radical due to the scavenging ability of some of the antioxidants was observed. The DPPH[•] absorbance values were respectively 0.16, 0.34, 0.38, 0.38, 0.48, 0.50, 0.64, 0.65, 0.75, 0.92 and 1.00 with DPPH[•] initial optical absorbance of 1.01 at 517 nm. The IC₅₀ values were determined for all compounds and reported in Fig. 1. Compounds possessing a pyridine ring adjacent to the carbonyl group have the lowest IC₅₀ values among the synthesized hydrazones (17 and 18 μM for compounds 8 and 7 respectively).

As shown in Scheme 2 for compound 8, the hydrogen atom of the isoniazid moiety in α position from the hydrazone function is highly activated. Compound 8 may easily undergo abstraction of

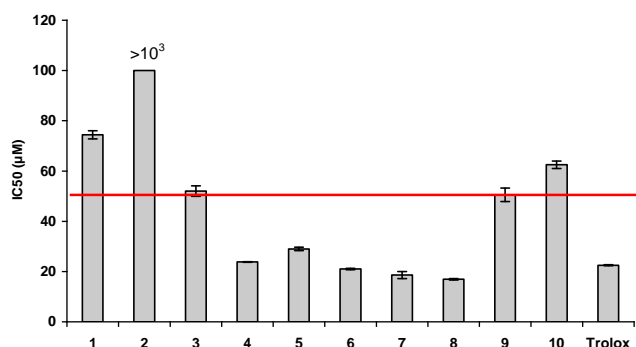
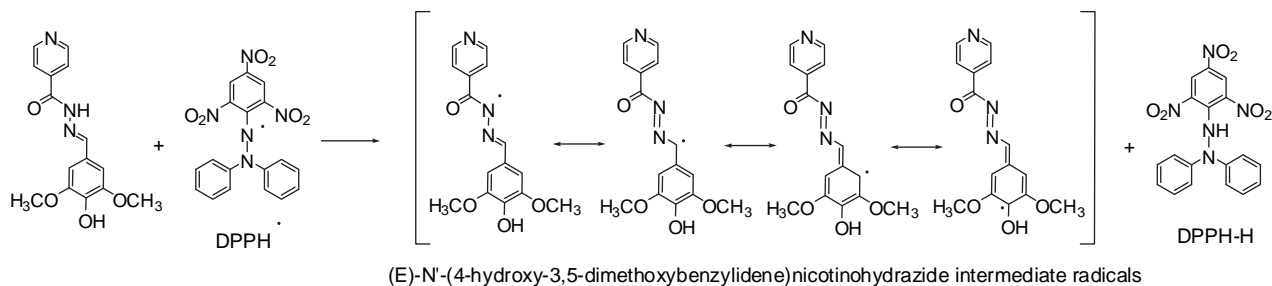


Fig. 1. IC₅₀: concentration needed for reducing DPPH[•] absorption by 50% at 517 nm. Values are average of 3 independent measurements for each compound. Errors are ±log SD (standard deviation).



Scheme 2. Purposed reaction of DPPH• with nicotinohydrazone derivative **8**.

one hydrogen atom from this position. Hydrogen atom abstraction from phenolic ring under the examined conditions is quite difficult due to its strong intramolecular bond with the adjacent methoxy groups. As a consequence the reaction of DPPH radicals may create nitrogen radical on the antioxidant considered. This is in agreement with the recent work of Dolenc et al. [17] concerning the autoxidation process of hydrazones. After studying structurally different hydrazones, the authors proposed for those possessing at least one hydrogen atom on nitrogen, the formation of N• centered radical (hydrazonyl radical) which is stabilized through conjugation forming delocalised C• centered radicals. The different DPPH• scavenging properties (IC₅₀) of the synthesized hydrazones may reflect the relative ability for the N–H hydrogen atom abstraction from the considered compound.

3.2. Scavenging radical activity on 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) radical cation

The antioxidative activity of syringic hydrazones was also evaluated by measuring the Trolox equivalent antioxidant capacity values (TEAC). This method measures the relative ability of antioxidant substances to scavenge the radical cation 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) compared with a standard amount of the synthetic antioxidant Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a vitamin E analogue. The TEAC value is defined as the concentration of standard Trolox with the same antioxidant capacity as 1 mM concentration of the antioxidant compound under investigation. This assay is based on the generation and detection of a coloured long-lived specific radical cation; ABTS is chemically oxidized by potassium

persulphate to give the relatively stable (over 24 h) ABTS radical. The concentration of ABTS^{•+} is measured at 734 nm [16]. Thus the antioxidant-induced reduction of the ABTS^{•+} concentration is directly related to the antioxidant capacity of the compound being tested.

ABTS radicals are involved in an electron transfer process. All screening compounds exhibited at various levels radical cation scavenging activity. There were no differences between the TEAC values for the syringic hydrazones at 1 min, 4 min and 6 min (data not shown).

As seen in Fig. 2, compounds **7** and **8** were the most effective ABTS^{•+} radical scavengers depending on concentration range (0–15 μM). ABTS^{•+} absorbance decreases significantly with all hydrazone concentrations, the effect being less pronounced for hydrazone **8** at concentrations above 12 μM. The scavenging effects on ABTS^{•+} decreased in the order **7** > **8** > **9** > **10** > **4** = Trolox = **5** > **2** > **3** > **1** > **6**.

Table 1 summarised the results obtained in terms of Trolox equivalents capacity. Three hydrazones, among the tested ones, **7**, **8** and **9** possess TEAC values more than 15% of the Trolox value while the other compounds possess equivalent or inferior values. This might be due to a better transfer of radical and better resonance stabilisation of the radical species for these compounds (Table 1).

3.3. Effect of syringic hydrazones on LDL oxidation and superoxide anion generation

The protective effect of syringic hydrazones was studied on LDL oxidation induced either by cell contact with human microvascular endothelial cells (HMEC-1) (this system allows to mimic the pathophysiological events occurring in the vascular wall) [18], or by two “cell-free systems” e.g. i) oxidation by copper ions at 37 °C, which initiates radical chain reaction with lipoperoxides preformed in LDL, thereby generating peroxy radicals, hydroxides, hydroperoxides and aldehydes [19], and ii) UV-C irradiation at

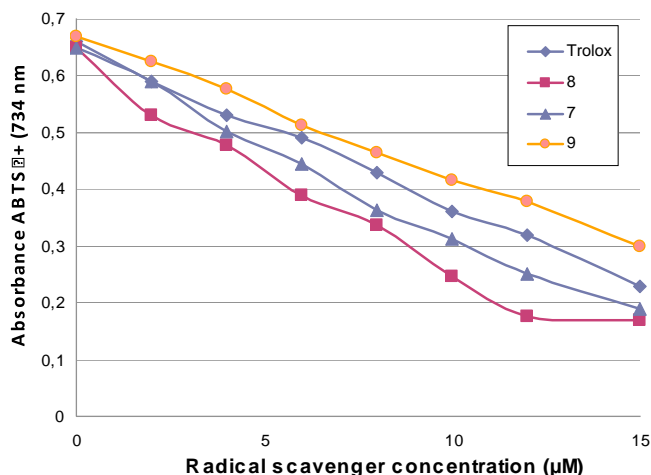


Fig. 2. ABTS Radical scavenging activity of syringic hydrazones compared with Trolox. Average values of 3 independent measurements ± log SD for each compound.

Table 1
Determination of antioxidant activity as TEAC of syringic hydrazones by ABTS.

Cpd ID	TEAC
1	0.75 ± 0.1
2	0.89 ± 0.01
3	0.78 ± 0.016
4	1.02 ± 0.01
5	0.98 ± 0.03
6	0.69 ± 0.02
7	1.25 ± 0.024
8	1.25 ± 0.02
9	1.15 ± 0.02
10	1.11 ± 0.024
Trolox	1

Average values ± log SD of 3 independent measurements for each compound.

Table 2
Determination of protective activity of syringic hydrazones on LDL oxidation.

Cpd ID	LDL oxidation			MTT	O ₂ ⁻
	In vitro: Cu	In vitro: UV	Cell-mediated		
1	5 ± 1.5	18 ± 2.5	4 ± 0.2	66 ± 5	30 ± 3
2	2 ± 0.3	17 ± 0.3	3 ± 0.2	55 ± 1	56 ± 4
3	4 ± 0.1	16 ± 3.5	13 ± 9	79 ± 1	33 ± 2
4	6 ± 0.3	18 ± 2.5	5 ± 0.3	58 ± 6	57 ± 6
5	3 ± 0.1	15 ± 3.5	4 ± 0.3	74 ± 4	42 ± 3
6	6 ± 0.2	24 ± 1.5	10 ± 6	70 ± 1	36 ± 3
7	77 ± 6	20 ± 1.5	5 ± 0.1	60 ± 10	44 ± 3
8	85 ± 7	18 ± 1.5	7 ± 0.2	65 ± 7	22 ± 2
9	4 ± 0.3	17 ± 1.5	3 ± 0.1	69 ± 0.2	50 ± 3
10	6 ± 0.5	18 ± 3.5	3 ± 0.2	69 ± 9	50 ± 4
Trolox	6 ± 0.2	18 ± 4.5	3 ± 0.1	57 ± 0.1	5 ± 2

254 nm, which generates polyunsaturated fatty acid (linoleate) hydroperoxides, as well as oxysterols and aldehydes [20]. Preliminary self-toxicity experiments indicated that some syringic hydrazone monomers exhibit a slight cytotoxicity for HMEC-1, at concentrations higher than 100 μM. As a consequence, the protective effect of the different agents on LDL oxidation was studied and compared to that of Trolox [21] at a fixed concentration of 10 μM (Table 2).

The data presented in Table 2, indicate that all the monomers except hydrazones **7** and **8** exhibited a comparable inhibitory effect on cell-induced and UV-induced LDL oxidation, which was similar to that of Trolox. All the agents blocked effectively copper-induced LDL oxidation, except compounds **7** and **8** which were inefficient (note that isoniazid and syringaldehyde alone did not block copper- or UV-induced LDL oxidation, data not shown).

All the evaluated compounds blocked efficiently cells-induced LDL oxidation at the same level observed for 5,5'-bisvanillin bearing two hydralazine scaffolds [13]. Syringic hydrazones inhibited by 30–50% the generation of O₂⁻ by HMEC-1, in agreement with the implication of O₂⁻ in LDL oxidation, as reported [18]. However, the inhibitory effect of syringic hydrazone on O₂⁻ generation was lower than that observed with Trolox (Table 2), suggesting that other ROS are implicated in cell-mediated LDL oxidation.

Since oxidized LDL are highly cytotoxic for vascular cells, we measured the cell viability of HMEC-1 at the end of the cell-induced LDL oxidation process by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. As shown in Table 2, cell-oxidized LDL exhibited a strong cytotoxicity for HMEC-1, which was protected by all the newly synthesized syringic hydrazones, and was similar to the protective effect of Trolox but less to the one of 5,5'-bisvanillin bearing two hydralazine scaffolds (55–79% vs 82%) [13].

We then compared the antioxidant ability and cytoprotective effect to the constitutive frame (Fig. 3), of three agents possessing different hydrazone links: compound **1** with hydralazine frame (only hydrazone link), compound **6** with aminoguanidine moiety (free NH) and compound **8** with isoniazid fragment (hydrazide link). Likewise, syringaldehyde, aminoguanidine or isoniazid did not block cell-mediated LDL oxidation, while syringic isoniazid hydrazone **8** and syringic aminoguanidine hydrazone **6** were very efficient (Fig. 3A). The ability of these agents to inhibit LDL oxidation and O₂⁻ generation mediated by HMEC-1 was tested, and compared to the results obtained in the presence of native hydrazines. Interestingly, neither syringaldehyde, nor aminoguanidine and isoniazid were protective against oxidized LDL-induced cytotoxicity, while their respective monomeric derivatives **6** and **8** were strongly efficient for inhibiting LDL oxidation and cytotoxicity as well (Fig. 3). It is to note that hydralazine and its related monomer exhibited comparable inhibitory properties against LDL oxidation and cytotoxicity (Fig. 3B), in agreement with previous results showing the strong antioxidant and cytoprotective properties of hydralazine [11].

3.4. Carbonyl scavenger properties

Carbonyl stress is characterized by the formation and the accumulation of adducts formed on proteins by aldehydes generated during the oxidation of polyunsaturated fatty acids [3,5]. The formation of adducts on proteins lead to a progressive protein dysfunction finally resulting in apoptosis [11]. As an example, 4-hydroxynonenal (4-HNE) is a major aldehyde generated during the peroxidation process of polyunsaturated fatty acid in LDL [11]. 4-HNE is involved in the carbonyl stress, as it forms adducts on proteins and induces cytotoxicity. The

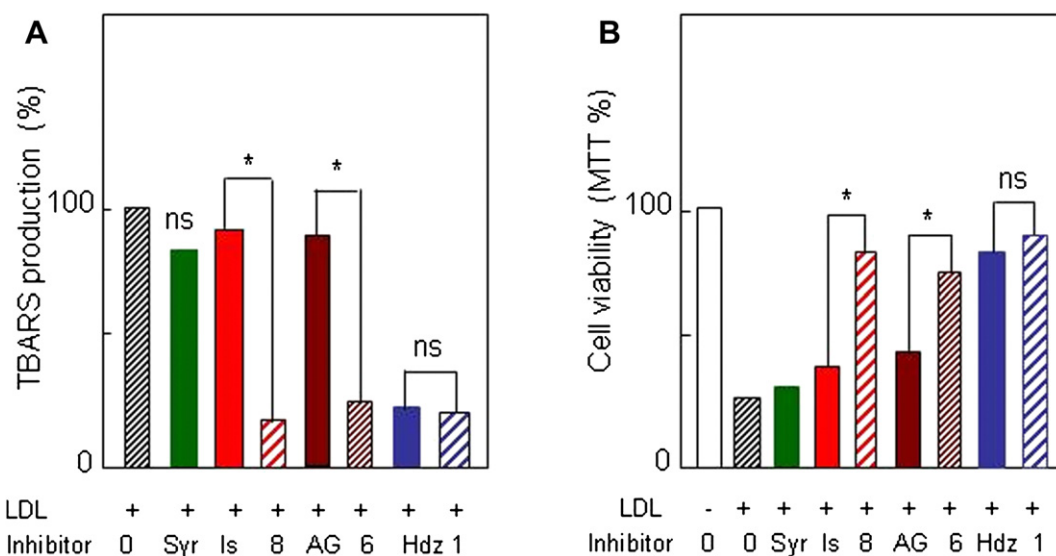


Fig. 3. Cell-mediated LDL oxidation and subsequent toxicity on HMEC-1 cells of syringic hydralazine **1**, syringic aminoguanidine **6** and syringic isoniazid **8**. Comparison with their constitutive frames. *Significant between the indicated values. ns: not significant between the indicated values. Syr, syringaldehyde; Is, isoniazid; AG, aminoguanidine; Hdz, hydralazine.

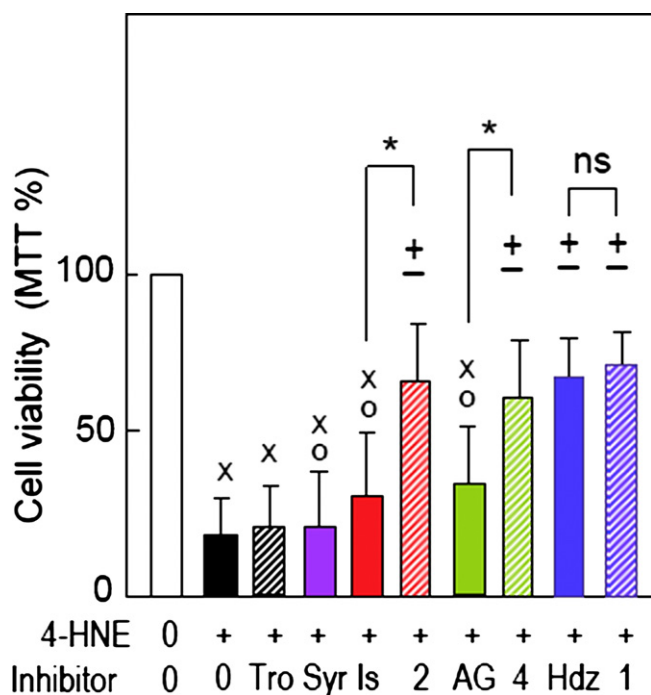


Fig. 4. Cytoprotective effect of syringic hydrazones against 4-HNE-induced cytotoxicity. *Significant between the indicated values. ns: not significant between the indicated values. Syr, syringaldehyde; Is, isoniazid; AG, aminoguanidine; Hdz, hydralazine; Tro, Trolox.

protective effect of syringic hydrazones against carbonyl stress, was evaluated on their ability to block the cytotoxicity induced by 4-HNE (25 μ M) in HMEC-1. As shown on Fig. 4, most agents almost completely prevented 4-HNE-induced cell death, and were much more efficient than hydrazine derivatives used alone, particularly isoniazid. Syringic acid (used for the synthesis of syringic hydrazones) and (used as antioxidant) were inefficient in preventing 4-HNE-induced cytotoxicity.

4. Conclusion

In this work, we have evaluated the antioxidant and carbonyl scavenger capacities of a series of newly synthesized syringic hydrazones. They have been obtained easily through coupling reaction between syringaldehyde and suitably chosen hydrazine possessing electron withdrawing or electron attracting groups. Their potency against the oxidative stress was addressed by different means: *via* the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), inhibition of LDL oxidation and of superoxide anion generation. These new compounds are of interest because all of them were found to be effective antioxidants possessing reducing power on the DPPH \cdot and TBARS assays, depending on their capacity of an N–H hydrogen abstraction and on resonance stabilisation of the phenoxy radical. In the TBARS assay the compounds seemed at most equivalent to the Trolox scavenging capacity, which does not reflect their overall antioxidant activity possibly due to other mechanisms involved. Moreover, these agents exhibit a strong carbonyl scavenger activity evidenced by their ability to block 4-HNE-mediated cell death (which is not prevented by antioxidants, as reported here with Trolox).

Altogether the data suggest that the inhibition of cell-mediated LDL oxidation by syringic hydrazones is higher than that observed with the initial hydrazine compounds, and probably does not result from a simple ROS-scavenger or antioxidant activity in the culture

medium, but rather from the inhibition of cell-mediated ROS generation, in agreement with the inhibition of cellular NADPH oxidase by hydralazine previously reported [23]. It is hypothesized that the protective (antiatherogenic) effect of syringic hydrazones should result from their carbonyl scavenger properties and the potent antioxidant effect against LDL oxidation (and O $_2^{\cdot-}$ generation), resulting from the combination of syringaldehyde with hydrazine compounds (isoniazid) or aminoguanidine, while these agents alone exhibit poor antioxidant activity. It is to note that Trolox, though strongly efficient antioxidant, is unable to trap and neutralize carbonyl compounds and aldehydes issued from lipid peroxidation, once formed, in contrast to syringic hydrazones which share both antioxidant and carbonyl scavenger properties. These new and original hydrazone drugs could constitute a new class of agents sharing both valuable antioxidant and carbonyl scavenger activities, with potential application in oxidative stress-associated pathologies, and particularly atherosclerosis.

5. Experimental section

5.1. Chemistry

A mixture of hydrazine (1 equivalent) and syringaldehyde (1 equivalent) was dissolved in absolute EtOH (40 mL/mmol). The solution was heated under reflux for 6–24 h depending on hydrazine used and then cooled to 25 $^{\circ}$ C. The precipitated solid was collected by filtration and rinsed thoroughly with EtOH to afford the corresponding hydrazone. If no precipitate was observed, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by silica gel chromatography affording the corresponding hydrazone.

5.1.1. (*E*)-4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde phthalazin-1-ylhydrazone hydrochloride (**1**)

Yellow solid; yield 75%; m.p. 154–156 $^{\circ}$ C; IR (KBr) ν cm $^{-1}$: 3415 (O–H), 1630 (C=N), 1619 (C=C), 1592 (C=C arom.), 1516 (C=C arom.), 1464 (C=C arom.), 1222 (C–O), 1122 (C–O); 1 H NMR (CDCl $_3$, 300 MHz) δ ppm: 3.84 (s, 6H, OCH $_3$), 7.38 (s, 2H, H $_{2,6}$), 8.15 (td, J = 8.2 Hz, 1H, H $_{11}$), 8.21 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H $_{12}$), 8.25 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H $_{13}$), 8.98 (s, 1H, H $_7$), 9.04 (s, 1H, H $_{15}$), 9.23 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H $_{10}$); 13 C NMR (CDCl $_3$, 75 MHz) δ ppm: 56.83 (s, 2C, OCH $_3$), 106.95 (s, 2C, C $_{2,6}$), 123.60 (s, 1C, C $_1$), 125.93 (s, 1C, C $_{10}$), 128.30 (s, 1C, C $_9$), 128.64 (s, 1C, C $_{13}$), 134.14 (s, 1C, C $_{11}$), 136.27 (s, 1C, C $_{12}$), 140.00 (s, 1C, C $_4$), 145.01 (s, 1C, C $_{15}$), 147.95 (s, 1C, C $_{14}$), 148.66 (s, 2C, C $_{3,5}$), 153.94 (s, 1C, C $_7$), 162.24 (s, 1C, C $_8$); UV (EtOH, 50 μ M, 25 $^{\circ}$ C): λ = 300 nm, ϵ = 13,220 mol $^{-1}$ L cm $^{-1}$, λ = 372 nm, ϵ = 22,180 mol $^{-1}$ L cm $^{-1}$; FAB MS: m/z: 325 [M + H $^+$]; ES HRMS: [M + H $^+$] C $_{17}$ H $_{17}$ N $_4$ O $_3$: 325.1315 (calcd 325.1301).

5.1.2. (*E*)-4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde -1,3-benzothiazol-2-ylhydrazone (**2**)

Yellow solid; yield 97%; m.p. 219–221 $^{\circ}$ C; IR (KBr) ν cm $^{-1}$: 3543 (O–H); 3480 (N–H); 3185 (=C–H ethyl.), 3068 (C–H arom.), 2846 (C–H, O–CH $_3$), 1672 (C=N ethyl.), 1608 (C=C arom.), 1510 (C=C arom.), 1249 (O–C arom.), 1219 (O–C), 1110 (O–C); 1 H NMR (CDCl $_3$, 300 MHz) δ ppm: 3.97 (s, 6H, OCH $_3$); 6.94 (s, 2H, H $_{2,6}$); 7.18 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H $_5$); 7.36 (t, 1H, J = 8.1 Hz, H $_{11}$); 7.56 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H $_{10}$); 7.68 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H $_{13}$); 7.90 (s, 1H, H $_7$). 13 C NMR (CDCl $_3$, 75 MHz) δ ppm: 56.45 (s, 2C, OCH $_3$); 104.67 (s, 2C, C $_{2,6}$); 121.97 (s, 2C, C $_{11}$); 122.06 (s, 1C, C $_{12}$); 125.05 (s, 1C, C $_1$); 126.44 (s, 2C, C $_{10,13}$); 129.43 (s, 2C, C $_{14}$); 129.44 (s, 1C, C $_9$); 138.05 (s, 1C, C $_4$); 145.46 (s, 1C, C $_7$); 148.63 (s, 2C, C $_{3,5}$); 167.24 (s, 1C, C $_8$). UV (EtOH, 29.92 μ M, 25 $^{\circ}$ C): λ = 342 nm, ϵ = 34,920 mol $^{-1}$ L cm $^{-1}$; ES MS: m/z 330.4 [M + H $^+$]; ES HRMS: [M + H $^+$] C $_{16}$ H $_{16}$ N $_3$ O $_3$ S: 330.0927 (calcd 330.0912).

5.1.3. (E)-4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde(2-fluorophenyl) hydrazone hydrochloride (**3**)

Green solid; yield 82%; m.p. 104–106 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3422 (N–H), 3332 (O–H), 3243 (=C–H ethyl.), 3009 (C–H arom.), 2938 (C–H, O–CH₃), 1619 (C=N ethyl.), 1591 (C=C arom.), 1514 (C=C arom.), 1243 (O–C arom), 1206 (O–C), 1115 (C–F); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.80 (s, 6H, OCH₃), 6.62 (dddd, J = 8.1 Hz, J = 7.4 Hz, J = 4.8 Hz, J = 1.6 Hz, 1H, H_{4'}), 6.88 (s, 2H, H_{2,6}), 6.89 (ddd, J = 8.4 Hz, J = 4.1 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, H_{6'}), 6.96 (dddd, J = 8.1 Hz, J = 7.4 Hz, J = 1.3 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, H_{5'}), 7.42 (ddd, J = 8.4 Hz, J = 8.3 Hz, J = 1.6 Hz, 1H, H_{3'}), 7.80 (s, 1H, H_{7'}); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 55.37 (s, 2C, OCH₃), 103.36 (s, 2C, C_{2,6}), 113.74 (d, J = 3.1 Hz, 1C, C₁₃), 114.18 (d, J = 180.0 Hz, 1C, C₁₀), 118.09 (d, J = 6.8 Hz, 1C, C₁₁), 124.35 (d, 1C, C₁₂), 126.59 (s, 1C, C₁), 133.90 (d, J = 9.3 Hz, 1C, C₈), 136.51 (s, 1C, C₄), 139.99 (s, 1C, C₇), 148.07 (s, 2C, C_{3,5}), 149.70 (d, J = 237 Hz, 1C, C₉); ¹⁹F NMR (CD₃OD, 282 MHz) δ ppm: -137.96 (s, 1F); UV (EtOH, 45.24 μ M, 25 °C): λ = 244 nm, ϵ = 16,220 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 290 nm, ϵ = 9750 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 345 nm, ϵ = 22,700 mol⁻¹ L cm⁻¹; ES MS: m/z 291.2 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₅H₁₆N₂O₃F: 291.1135 (calcd 291.1145).

5.1.4. (E)-4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde(4-fluorophenyl) hydrazone hydrochloride (**4**)

Brown crystals; yield 47%; m.p. 170–174 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3493 (O–H), 1611 (C=N), 1584 (C=C), 1505 (C=C arom.), 1212 (O–C), 1117 (C–F); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.90 (s, 6H, OCH₃), 6.95 (s, 2H, H_{2,6}), 6.96 (dd, J = 9.0 Hz, 2H, H_{3',5'}), 7.07 (dd, J = 9.1 Hz, J = 4.8 Hz, 2H, H_{2',6'}), 7.70 (s, 1H, H₇); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 55.32 (s, 2C, OCH₃), 102.92 (s, 2C, C_{2,6}), 112.71 (d, J = 7.5 Hz, 2C, C_{9,13}), 114.93 (d, J = 22.5 Hz, 2C, C_{10,12}), 127.19 (s, 1C, C₁), 137.52 (s, 1C, C₇), 141.13 (d, J = 209.1 Hz, 1C, C₁₁), 142.41 (s, 1C, C₄), 148.06 (s, 2C, C_{3,5}), 158.17 (s, 1C, C₈); ¹⁹F NMR (CD₃OD, 282 MHz) δ ppm: -128.77 (s, 1F); UV (EtOH, 39.73 μ M, 25 °C): λ = 240 nm, ϵ = 17,940 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 313 nm, ϵ = 19,680 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 345 nm, ϵ = 25,370 mol⁻¹ L cm⁻¹; ES MS: m/z 291.1 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₀H₁₅N₃O₃: 291.1118 (calcd 291.1107).

5.1.5. (E)-4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde[2,6-dichloro-(trifluoromethyl)phenyl] hydrazone (**5**)

White crystals; yield 48%. m.p. 161–163 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3430 (N–H), 3295 (O–H), 3080 (=C–H ethyl.), 3007 (C–H arom.), 2945 (C–H, O–CH₃), 1607 (C=N ethyl.), 1587 (C=C arom.), 1514 (C=C arom.), 1261 (O–C arom), 1209 (O–C), 1116 (C–F), 1104 (C–Cl); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.89 (s, 6H, OCH₃), 7.01 (s, 2H, H_{2,6}), 7.64 (s, 2H, H_{3',5'}), 7.97 (s, 1H, H₇); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 55.32 (s, 2C, OCH₃), 103.52 (s, 2C, C_{2,6}), 123.09 (q, J = 34 Hz, 1C, C₁₁), 123.20 (q, J = 270.9 Hz, 1C, C₁₀), 123.87 (s, 2C, C_{9,13}), 126.15 (s, 1C, C₁), 126.17 (q, J = 3.5 Hz, 2C, C_{10,12}), 136.91 (s, 1C, C₄), 141.55 (s, 1C, C₈), 143.15 (s, 1C, C₇), 148.05 (s, 2C, C_{3,5}); ¹⁹F NMR (CD₃OD, 282 MHz) δ ppm: -63.55 (s, 1F); UV (EtOH, 56.25 μ M, 25 °C): λ = 273 nm, ϵ = 6860 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 340 nm, ϵ = 19,270 mol⁻¹ L cm⁻¹; ES MS: m/z 409.22 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₆H₁₄N₂O₃Cl₂F₃: 409.0319 (calcd 409.0334).

5.1.6. (E)-2-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene) hydrazinecarboximidamide hydrochloride (**6**)

Yellow solid; yield 86%; m.p. 226–228 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3387 (O–H), 3320 (N–H), 3200 (=C–H ethyl.), 3094 (C–H arom.), 2967 (C–H, O–CH₃), 1689 (C=N ethyl.), 1609 (C=C arom.), 1519 (C=C arom.), 1469 (N–H), 1115 (O–C arom); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.92 (s, 6H, OCH₃), 7.14 (s, 2H, H_{2,6}), 8.00 (s, 1H, H₇); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 55.53 (s, 2C, OCH₃), 105.00 (s, 2C, C_{2,6}), 124.03 (s, 1C, C₁), 137.25 (s, 1C, C₄), 148.15 (s, 2C, C_{3,5}), 148.52 (s, 2C, C₇), 208.7 (s, 1C, C₈); UV (EtOH, 50 μ M, 25 °C): λ = 234 nm,

ϵ = 19,080 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 315 nm, ϵ = 19,160 mol⁻¹ L cm⁻¹; ES MS: m/z 239.2 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₀H₁₅N₃O₃: 239.1115 (calcd 239.1144).

5.1.7. (E)-N'-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene) nicotinohydrazide (**7**)

Yellow solid; yield 89%; m.p. 214–216 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3480 (O–H), 3185 (=C–H ethyl.), 2995 (C–H arom.), 2848 (C–H, O–CH₃), 1645 (C=N ethyl.), 1600 (C=C arom.), 1580 (N–H), 1510 (C=C arom.), 1252 (O–C arom), 1214 (O–C); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.92 (s, 6H, OCH₃), 7.20 (s, 2H, H_{2,6}), 7.60 (dd, 1H, H₁₂), 8.74 (dd, J = 1.1 Hz, J = 4.8 Hz, 1H, H₁₀), 9.09 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H₁₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 55.43 (s, 2C, OCH₃), 105.05 (s, 2C, C_{2,6}), 123.84 (s, 1C, C₁₀), 124.62 (s, 1C, C₁), 129.40 (s, 1C, C₈), 136.00 (s, 1C, C₉), 138.36 (s, 1C, C₄), 147.94 (s, 2C, C₁₂), 148.09 (s, 2C, C_{3,5}), 150.36 (s, 1C, C₇), 151.69 (s, 1C, C₁₁), 163.12 (s, 1C, CO); UV (EtOH, 49.76 μ M, 25 °C): λ = 330 nm, ϵ = 22,080 mol⁻¹ L cm⁻¹; ES MS: m/z 302.2 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₅H₁₆N₃O₄: 302.1143 (calcd 302.1141).

5.1.8. (E)-N'-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene) isonicotinohydrazide (**8**)

Yellow solid; yield 97%; m.p. 195–198 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3397 (O–H), 3195 (=C–H ethyl.), 2846 (C–H, O–CH₃), 1646 (C=N ethyl.), 1587 (C=C arom.), 1515 (C=C arom.), 1453 (C=C arom.), 1219 (C–O), 1116 (C–O); ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ ppm: 3.80 (s, 6H, OCH₃), 7.06 (s, 2H, H_{2,6}), 7.78 (dd, J = 4.5 Hz, J = 1.7 Hz, 2H, H_{10,13}), 8.29 (s, 1H, H₇), 8.74 (dd, J = 4.5 Hz, J = 1.7 Hz, 2H, H_{11,12}); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ ppm: 56.47 (s, 2C, OCH₃), 105.32 (s, 2C, C_{2,6}), 122.02 (s, 2C, C_{10,13}), 124.65 (s, 1C, C₁), 138.39 (s, 1C, C₄), 140.96 (s, 1C, C₉), 148.44 (s, 2C, C_{3,5}), 150.45 (s, 1C, C₇), 150.67 (s, 2C, C_{11,12}), 162.24 (s, 1C, C₈); UV (EtOH, 49.66 μ M, 25 °C): λ = 333 nm, ϵ = 20,960 mol⁻¹ L cm⁻¹; FAB MS: m/z 302 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₅H₁₆N₃O₄: 302.1148 (calcd 302.1141).

5.1.9. (E)-N'-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-3-methyl-1H-pyrazole-5-carbohydrazide (**9**)

Yellow solid; yield 64%; m.p. 223–225 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3433 (N–H), 3293 (O–H), 3208 (=C–H ethyl.), 3117 (C–H arom.), 2964 (C–H, O–CH₃), 1664 (C=O ethyl.), 1621 (C=N ethyl.), 1590 (C=C arom.), 1516 (C=C arom.), 1327 (C–N), 1241 (O–C arom), 1216 (O–C); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 2.36 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 6H, OCH₃), 6.62 (s, 1H, H₁₀), 7.21 (s, 2H, H_{2,6}), 8.20 (s, 1H, H₇); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 10.80 (s, 1C, CH₃), 56.49 (s, 2C, OCH₃), 104.95 (s, 2C, C_{2,6}), 105.27 (s, 1C, C₁₀), 125.32 (s, 1C, C₁), 138.22 (s, 1C, C₄), 140.46 (s, 1C, C₁₁), 146.49 (s, C, C₇), 148.29 (s, 2C, C_{3,5}), 148.59 (s, 1C, C₉), 158.70 (s, 1C, C₈); UV (EtOH, 40 μ M, 25 °C): λ = 240 nm, ϵ = 18,430 mol⁻¹ L cm⁻¹, λ = 327 nm, ϵ = 27,500 mol⁻¹ L cm⁻¹; ES MS: m/z 305.2 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₄H₁₇N₄O₄: 305.1252 (calcd 305.1250).

5.1.10. (E)-Benzyl-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene) hydrazinecarboxylate (**10**)

Yellow solid; yield 90%; m.p. 115–117 °C; IR (KBr) ν cm⁻¹: 3350 (O–H), 3243 (=C–H ethyl.), 3071 (C–H arom.), 2964 (C–H, O–CH₃), 1707 (C=O), 1673 (C=N ethyl.), 1588 (C=C arom.), 1548 (N–H), 1513 (C=C arom.), 1245 (O–C arom), 1217 (O–C); ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm: 3.77 (s, 6H, OCH₃), 5.13 (s, 2H, H₉), 6.95 (s, 2H, H_{2,6}), 7.29 (m, 5H, H_{ar}), 7.74 (s, 1H, H₇); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ ppm: 55.40 (s, 2C, OCH₃), 66.66 (s, 2C, C₉), 104.34 (s, 2C, C_{2,6}), 125.17 (s, 1C, C₁), 127.17 (s, 1C, C_{ar}), 127.72 (s, 2C, C_{ar}), 127.86 (s, 2C, C_{ar}), 136.47 (s, 1C, C₄), 137.50 (s, 1C, C₁₀), 145.78 (s, 1C, C₇), 148.36 (s, 2C, C_{3,5}), 155.10 (s, 1C, CO); UV (EtOH, 45.24 μ M, 25 °C): λ = 233 nm, ϵ = 25,040 mol⁻¹ L cm⁻¹; λ = 308 nm, ϵ = 23,080 mol⁻¹

L cm⁻¹; ES MS: m/z 331.2 [M + H⁺]; ES HRMS: [M + H⁺] C₁₇H₁₉N₂O₅: 331.1281 (calcd 331.1294).

5.2. DPPH scavenging activity

The DPPH[•] solution has a deep violet colour. Radical scavenging activity of antioxidant compounds can be measured spectrophotometrically at 517 nm. The DPPH radical shows absorbance at 517 nm, that decreases by the bleaching of a violet coloured ethanol solution upon reduction by an antioxidant or a radical through hydrogen atom or electron transfer to the odd electron in DPPH[•] producing the pale yellow non-radical form (DPPH-H). This decrease is proportional to the increase of non-radical forms of DPPH [22]. Briefly, 6 mM solution of DPPH[•] was prepared in ethanol and, 90 µL of this solution was added to 2.1 mL of hydrazones solution in ethanol at different concentrations (5–500 µM). The absorbance was measured at t = 0 min (A₀) and after 60 min incubation at room temperature (A₆₀). Percentage inhibition of DPPH free radical (I%) was calculated in the following way: I% = 100 * (A₀ - A₆₀)/A₀. IC₅₀ represents concentration of the tested compound, providing 50% inhibition of DPPH radicals. All experiments were carried out in triplicate. The 6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) was used as antioxidant reference [14].

5.3. ABTS^{•+} scavenging activity

The second test is based on the ability of antiradical molecules to quench the ABTS^{•+}, a blue–green chromophore with characteristic absorption at 734 nm. The addition of antioxidants to the pre-formed radical cation reduces it to ABTS, determining a decolourization. In this method, an antioxidant is added to a pre-formed ABTS radical solution, and after a fixed time period, the remaining ABTS^{•+} is quantified spectrophotometrically at 734 nm [22]. The ABTS^{•+} was produced by reacting 7 mM ABTS in H₂O with 2.45 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈), stored in the dark at room temperature for 12–16 h before use (the radical was stable for more than two days under these conditions). The ABTS^{•+} solution was further diluted in ethanol until the initial absorbance value of 0.70 ± 0.02 at 734 nm at 30 °C. Then, in a 3 mL solution of ABTS^{•+}, was added an ethanolic solution of the compound under study so that their final concentrations vary between 0 and 15 µM. In each case, a 20–80% decrease in the initial absorbance of the reaction solution was achieved.

The absorbance was recorded at 0, 1, 4 and 6 min. The scavenging capacity of test compounds was calculated using the following equation: ABTS^{•+} scavenging effect (%) = 100(A₀ - A_c)/A₀, where A₀ is absorbance of a control lacking any radical scavenger and A_c is absorbance of the remaining ABTS^{•+} in the presence of scavenger. Graphs of antioxidant concentration versus percent absorbance reduction were then plotted. The concentration of Trolox giving the same percentage reduction of absorbance at 734 nm as the 1 mM antioxidant solution was calculated from the three point graphs. The results were thus expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values. For each hydrazone and each concentration, measurements were performed in triplicate. Absorbance values were corrected for radical decay using blank solutions.

5.4. Biochemical experiments

5.4.1. LDL oxidation

LDL were isolated by ultracentrifugation from the pooled plasma of healthy normolipidemic human subjects and dialyzed against PBS containing 100 µmol/L of ethylenediaminetetraacetic

acid (EDTA), as previously indicated [11]. LDL oxidation and the antioxidant effect of syringic hydrazones were evaluated using three different protocols, two cell-free systems (copper- and UV-mediated oxidation) and one cell-mediated oxidation system by HMEC-1. Trolox (10 µM) was used as reference inhibitor of LDL oxidation, for the 3 methods. The extent of LDL oxidation was monitored by the determination of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content in the culture medium after 6 h incubation. The amount of TBARS formed in the absence of any agent was: cell-mediated oxidation, 10.2–15.4 nmol TBARS/mg apoB; UV-induced oxidation, 6.4–9.7 nmol TBARS/mg apoB; copper-mediated LDL oxidation, 21.6–27.8 nmol TBARS/mg apoB. The results are expressed as % of TBARS formed in the presence of the different agents vs TBARS formed in the absence of antioxidants.

- Copper-induced LDL oxidation: LDL solutions (0.5 mg apoB/mL NaCl 150 mM, pH 7.3) were incubated for 3 h at 37 °C, in the presence of CuSO₄ 5 µM, as reported [11–23] and of the different syringic hydrazones used at the fixed concentration of 10 µM. At the end, the oxidation of LDL was monitored by the determination of the TBARS content, using the fluorimetric procedure of Yagi [24].
- UV-induced LDL oxidation: LDL solutions (1 mg apoB/mL NaCl 150 mM, pH 7.3 containing or not syringic hydrazones, 10 µM) were irradiated for 2 hours, as a thin film (5 mm) in an open beaker placed 10 cm under the UV-C source (HNS 30W OFR Osram UV-C tube, λ max 254 nm, 0.5 mW/cm²) [11]. At the end, the TBARS content was determined [24].
- Cell-mediated LDL oxidation: HMEC-1 diluted in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) cultured medium containing 10% foetal calf serum and antibiotics were seeded in 24 multiwell plates. After 24 h, the standard culture medium (on sparse proliferative cells), was removed and replaced by serum-free Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium containing native LDL (100 µg apoB/mL) and CuSO₄ (1 µM), and HMEC-1. This mixture was incubated at 37 °C for 6 h, in the presence (or the absence) of syringic hydrazones or Trolox (10 µM each) [11–24]. The same experiment was also conducted for syringaldehyde, hydralazine, isoniazid and aminoguanidine. At the end of the incubation, the LDL-containing medium was used for determining TBARS [24]. The results were expressed as % ± S.E. of TBARS content in LDL oxidized in the absence of antioxidant. Statistical analyses were performed by ANOVA (Tukey test – SigmaStat software).

5.4.2. Cytoprotective and carbonyl scavenger effect

The subsequent toxicity of cell-oxidized LDL (in the absence or presence of the different agents), was evaluated on HMEC-1 after 24 h incubation, using the MTT test [11,24]. Results were expressed as % of cell viability vs the unstimulated control (without LDL). The residual cell viability in cell incubated with LDL in the absence of agents was around 15–21%. The carbonyl scavenger effect of the various compounds was indirectly measured by evaluating their cytoprotective effect on the cytotoxicity induced by 4-hydroxynonenal (4-HNE), an aldehyde formed during the peroxidation of polyunsaturated fatty acids, and involved in the formation of adducts on proteins. The effect of the newly synthesized agents was compared to that observed with Trolox, a classical antioxidant unable to block 4-HNE-induced cytotoxicity.

5.4.3. Superoxide anion generation

Superoxide anion (O₂⁻) production was measured as the superoxide dismutase (SOD)-inhibit able reduction of cytochrome

C and expressed as % of O_2^- generated in HMEC-1 incubated 1 h with LDL in the presence of agents vs HMEC-1 incubated with LDL alone (8.2–10.6 nmol/h/mg protein). All these data are a mean of 6 separate experiments \pm SEM. Briefly, sub confluent HMEC-1 were pre-incubated for 30 and 60 min, in 1 mL phenol red free RPMI containing cytochrome C (20 μ M) with or without SOD (100 mU/L), LDL (100 μ g apoB/mL) and the different hydrazones or Trolox (10 μ M). The O_2^- specific reduction of cytochrome C was determined spectrophotometrically at 550 nm (difference in absorbance with or without SOD), according to McCord and Fridovitch [25] and under the previously used conditions [23].

5.4.4. 4-HNE-induced cytotoxicity

Subconfluent HMEC-1 were overnight incubated in serum-free Hank's medium in the presence of 4-HNE (25 μ M), and the different molecules tested at a fix concentration of 10 μ M. The cytotoxic effect of 4-HNE was evaluated by MTT. Data are expressed as % of the untreated control. Statistical analysis was performed by ANOVA (Tukey test – SigmaStat software).

Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support from INSERM, CNRS, Université Paul Sabatier and COST B35. Nadji Belkheiri is recipient of a grant from algerian government. Benaissa Bouguerne is recipient of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- [1] H. Sies, *Am. J. Med.* 91 (1991) 315–385.
- [2] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.
- [3] K. Uchida, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1685–1696.
- [4] G. Leonarduzzi, M.C. Arkan, H. Basaga, E. Chiarpotto, A. Sevanian, G. Poli, *Lipid Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1370–1378.
- [5] E.R. Stadtman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 928 (2001) 22–38.
- [6] A. Nègre-Salvayre, C. Coatrieux, C. Ingueneau, R. Salvayre, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 6–20.
- [7] D. Steinberg, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20963–20966.
- [8] A.J. Lusis, *Nature* 407 (2000) 233–241.
- [9] R. Stocker, *Curr. Opin. Lipidol.* 10 (1999) 589–597.
- [10] R. Brigelius-Flohe, D. Kluth, A. Banning, *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (2005) 1083–1089.
- [11] S. Galvani, C. Coatrieux, M. Elbaz, M.H. Grazide, J.C. Thiers, A. Parini, K. Uchida, N. Kamar, L. Rostaing, M. Baltas, R. Salvayre, A. Nègre-Salvayre, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 1457–1467.
- [12] C. Lapeyre, M. Deloméne, F. Bedos-Belval, H. Duran, A. Nègre-Salvayre, M. Baltas, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 8115–8124.
- [13] M. Deloméne, F. Bedos-Belval, H. Duran, C. Vindis, M. Baltas, A. Nègre-Salvayre, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 3171–3181.
- [14] M.C. Foti, C. Daquino, C. Geraci, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 2309–2314.
- [15] N. Nenadis, L.-F. Wang, M. Tsimidou, H.-Y. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4669–4674.
- [16] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [17] M. Harej, D. Dolenc, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 7214–7221.
- [18] J.W. Heinecke, M. Kawamura, L. Suzuki, A. Chait, *J. Lipid Res.* 34 (1993) 2051–2061.
- [19] O. Ziouzenkova, A. Sevanian, P.M. Abuja, P. Ramos, H. Esterbauer, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 607–623.
- [20] I. Pinchuk, D. Lichtenberg, *Free Radic. Res.* 24 (1996) 351–360.
- [21] R. Albertini, P.M. Abuja, *Free Radic. Res.* 30 (1999) 181–188.
- [22] P. Molyneux, Songklanakarin, *J. Sci. Technol.* 26 (2004) 211–219.
- [23] L. Mabile, O. Meilhac, I. Escargueil-Blanc, M. Trolly, M.T. Pieraggi, R. Salvayre, A. Nègre-Salvayre, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 1575–1582.
- [24] K. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* 45 (1987) 337–351.
- [25] J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049–6055.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) generated within the vascular wall trigger LDL oxidation, lipid peroxidation and carbonyl stress that are involved in atherogenesis.

New families of compounds with antioxidant activities have been developed around the phenolic phosphonates or hydrazones derived from cinnamic acid, syringaldehyde, or bisvanillin.

The aim of this work was first focused on the biological evaluation of molecules previously synthesized in the laboratory. These molecules are monomers deriving from syringaldehyde/hydrazones coupling reaction, and a dimer (Bisvanillylhydralazone or BVH) resulting from the coupling of two hydralazines equivalents with bisvanilline. The syringic hydrazones demonstrated a good antioxidant activity against the oxidation of LDLs. More gratifyingly, the bisvanillylhydralazone (BVH) showed that it i) strongly inhibited LDL oxidation induced by copper and human endothelial cells (HMEC-1), and prevented the formation of foam cells, ii) reduced the generation of extracellular ROS (anion superoxide and hydrogen peroxide) induced by oxLDLs, intracellular oxidative stress, activation of proteasome, of NF- κ B and of the proinflammatory signaling induced by oxLDL, iii) prevented protein carbonylation and blocked the apoptotic cascade initiated by oxLDLs in endothelial cells, iv) reduced by more than 50% the formation of atherosclerotic plaques in apoE^{-/-} mice.

Based on previous results on structure activity relationships (bis aryl phosphonates: no activity, BVH: important activity), we have developed another family of compounds based on bis aryl ether structure. An extensive synthetic methodological study was overtaken in order to find the conditions for coupling between a carefully protected hydroxyvanilline and the corresponding halide. The coupling was rendered possible by the *Ullmann* reaction leading to the desired bis aryl aldehyde, but also through “*Ullmann* modified reaction” i.e coupling of two partners in the presence of a catalytic amount of copper triflate and base.

Symmetrical phosphonate compounds and hydrazones were then synthesized and tested, with very good antioxidant and cytoprotective activities for both families. The diaryl ether constitutes therefore a new scaffold to elaborate compounds with the desired activities.

Keywords: Polyphenols; Aryl Aryl ethers, Ullmann condensation; Cell signaling.

Résumé

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées dans la paroi vasculaire génèrent un stress oxydant à l'origine de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDLs), de la peroxydation lipidique, et du stress carbonyle. Ces événements sont impliqués dans l'athérogenèse.

Des familles de nouveaux composés possédant des activités antioxydantes ont été synthétisées autour des systèmes phénoliques phosphonates ou hydrazones dérivés de l'acide cinnamique, du syringaldéhyde, ou de la bis-vanilline.

Dans un premier temps, le but de ce travail a été d'étudier les effets biologiques des molécules déjà synthétisées au laboratoire et qui sont des monomères hydrazones/hydrazides dérivés du syringaldéhyde, ainsi que les propriétés antiathérogènes d'un dimère résultant du couplage de la bisvanilline avec deux hydralazines, la bisvanillylhydralazone ou BVH.

Les hydrazones syringiques bloquent efficacement l'oxydation des LDLs. Nous avons plus particulièrement étudié l'effet du bisvanillylhydralazone (BVH) et nos résultats montrent qu'il i) inhibe fortement l'oxydation des LDL induite par le cuivre et les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1), et prévient la formation des cellules spumeuses, ii) réduit la génération extracellulaire des ROS (anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène) induits par les oxLDLs, le stress oxydant intracellulaire, l'activation du protéasome, l'activation de NF- κ B et la signalisation pro inflammatoire induite par les oxLDLs, iii) empêche la carbonylation des protéines et bloque la cascade apoptotique des cellules endothéliales, iv) réduit la formation de plaques athéromateuses chez les souris apoE^{-/-} de plus de 50%.

En se basant sur deux résultats essentiels précédents concernant les relations structure activité (bis aryl phosphonates : pas d'activité, BVH : activité importante), nous avons développé une autre famille de composés en se basant sur une structure de diaryl éther. Une étude méthodologique extensive de synthèse a été menée pour trouver des conditions de couplage entre une hydroxyvanilline judicieusement protégée et l'halogénure correspondant. Le couplage a pu être réalisé à travers une réaction d'Ullmann conduisant au diaryl éther souhaité, ou à travers une réaction d'Ullmann modifiée entre ces deux partenaires et en présence d'une quantité catalytique du Cu(OTf) et une base.

Les composés symétriques phosphonates et hydrazones ont été par la suite synthétisés et évalués en montrant pour les deux familles de composés de très bonnes activités antioxydantes et cytoprotectrices. Les diaryl éthers constituent donc une nouvelle brique moléculaire pour développer des composés avec les activités souhaitées.

Mots clés : Polyphénols ; Diaryl éthers ; Condensation d'Ullmann ; signalisation cellulaire.