



HAL
open science

Synthèse et évaluation de lipophénols deutérés, un nouveau concept pour réduire les stress oxydant et carbonylé dans les maladies rétiniennes

Mélissa Rosell

► **To cite this version:**

Mélissa Rosell. Synthèse et évaluation de lipophénols deutérés, un nouveau concept pour réduire les stress oxydant et carbonylé dans les maladies rétiniennes. Chimie thérapeutique. Université Montpellier, 2017. Français. NNT: 2017MONTT188 . tel-01869838

HAL Id: tel-01869838

<https://theses.hal.science/tel-01869838>

Submitted on 6 Sep 2018

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En chimie organique, minérale et industrielle

École doctorale Sciences Chimiques Balard (ED459)

Unité de recherche IBMM

Synthèse et évaluation de lipophénols deutérés, un nouveau concept pour réduire les stress oxydant et carbonylé dans les maladies rétinienne

Présentée par **Mélissa ROSELL**

Le 20 novembre 2017

Sous la direction de **Jean-Marie GALANO**
et **Joseph VERCAUTEREN**

Devant le jury composé de

Mr Bruno FIGADÈRE, Directeur de recherche, CNRS-Université Paris Sud

Mr Olivier DANGLES, Professeur des universités, Université d'Avignon

Mr Pierre-Yves RENARD, Professeur des universités, Université de Rouen

Mr Jean-Marie GALANO, Chargé de recherche, CNRS-Université de Montpellier

Mr Joseph VERCAUTEREN, Professeur des universités, Université de Montpellier

Mme Céline CRAUSTE, Maître de conférence, Université de Montpellier

Mr Philippe BRABET, Chargé de recherche, INM-CNRS-Université de Montpellier

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Membre du jury

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

In memoriam

Le Professeur Christian Hamel est décédé le 15 août 2017. Nous voulons, ici, lui rendre un hommage appuyé en lui dédiant cette thèse, au cours de laquelle, j'ai été accueillie pendant une année, dans son Laboratoire à l'INM.

Le sujet de mes travaux sur les maladies neurodégénératives rétiniennes, n'a pu exister que parce qu'il avait sollicité notre équipe, à la fin de l'année 2008, pour qu'elle les aide à comprendre mieux l'étiologie d'une maladie rare rétinienne, la maladie de Stargardt (= dégénérescence maculaire juvénile), et à développer des hypothèses de thérapeutiques qui faisaient totalement défaut.

C'est cette sollicitation qui est à l'origine de la collaboration qui perdure entre nos deux équipes, et sa disparition prématurée ne lui aura pas permis d'en connaître tous les résultats, pourtant prometteurs... et qu'il suivait avec envie.

Remerciements

Tout d'abord je remercie M. Thierry Durand, Directeur de l'équipe Synthèse de Lipides Bioactifs de l'IBMM de m'avoir accueillie lors de ces trois années de doctorat. Merci pour votre enthousiasme sans faille et votre positivisme.

Je remercie ensuite mes directeurs de thèse: tout d'abord M. Jean-Marie Galano pour ton encadrement de la partie Chimie de ma thèse et tes précieux conseils. Ensuite M. Joseph Vercauteren pour m'avoir confié ce projet durant trois ans à l'interface Chimie/Biologie et de m'avoir fait confiance, et également pour votre optimisme et vos idées. Merci à vous deux pour tous ces échanges scientifiques constructifs et extrêmement formateurs qui m'ont permis d'effectuer ce travail d'interface.

Je remercie également mon encadrante, Céline Crauste. Merci beaucoup Céline de m'avoir fait confiance durant ces trois ans, et d'avoir cru en moi. Je te dois l'aboutissement de ce travail et de ce manuscrit. Tu as été une encadrante hors normes et j'ai vraiment apprécié nos différents échanges. Je suis contente du travail réalisé et également fière d'être ta première thésarde (sûrement la première d'une longue série !). Merci d'avoir vu durant les moments compliqués le verre à moitié plein plutôt que vide, et d'avoir toujours fait en sorte de me motiver et de me redonner confiance en moi durant les moments critiques. Je t'en suis grandement reconnaissante (je te jure qu'il y a eu des améliorations depuis 3 ans !) et merci encore.

Je tiens à remercier M. Oliver Dangles, Professeur à l'Université d'Avignon et M. Pierre-Yves Renard, Professeur à l'Université de Rouen d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également le Président du jury, M. Bruno Figadère, Directeur de Recherche CNRS-Université Paris Sud d'avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, M. Philippe Brabet, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et également de m'avoir accueillie dans votre équipe durant 1 an. Merci pour votre calme olympien exemplaire, qui a réussi à me tempérer durant tous ces mois qui n'étaient pas toujours faciles en termes de résultats. Grâce à vous j'ai su apprécier une partie de la Biologie (je n'ai pas la prétention de dire "toute la Biologie" car je n'ai pas travaillé sur l'intégralité des facettes de ce domaine), je vous remercie également pour vos différentes idées qui m'ont permis d'effectuer l'étude de mes

composés synthétisés en Chimie. J'espère aussi que je ne deviendrai pas la nouvelle "jamais contente" et que vous avez également apprécié le travail que j'ai fourni.

Je tiens également à remercier M. Christian Hamel, qui nous a malheureusement quittés le 15 août dernier, et qui a permis d'initier la collaboration entre l'équipe Vision de l'INM et l'équipe Synthèse de Lipides Bioactifs/Pharmacognosie.

Je remercie toute l'équipe vision de l'INM de m'avoir accueillie durant un an. Merci à Laurent, à Aurélie de m'avoir appris à utiliser le FACS (dont je ne pouvais plus me passer par la suite !), et également à Manue et Mélanie pour les pauses repas partagées. Grâce à vous je garde un très bon souvenir de cette expérience, non seulement d'un point de vue scientifique mais également humain.

Je remercie tout l'équipe Synthèse de Lipides Bioactifs de l'IBMM. Les personnes du "3^{ème} étage" tout d'abord. Merci Camille pour non seulement tes conseils de chimie mais également pour ta bonne humeur, et aussi de m'avoir aidé en première année à monter les dossiers de financements pour les JMJC. Je remercie également Valérie pour tes conseils de manip concernant la réaction de Wittig. Merci Alex, pour le prêt du sel de phosphonium qui m'a grandement servi à optimiser la réaction de Wittig et pour tous tes conseils de manip... et saches également que "ne mettre que le 1^{er} numéro" m'a grandement aidé pour la biblio de ce manuscrit. Merci aussi à Jean-François pour ton humour particulier (je ne citerai rien), et qui allait toujours chercher les solvants dans la joie et la bonne humeur. Je remercie Laurence pour tous tes conseils de manip et nos différents échanges. Merci aussi à Espérance, ou "toujours plus", pour tous tes conseils en matière de fin de thèse et pour les soirées gras/ciné passées ensemble. Je remercie enfin Téréza, ma petite sœur de thèse pour tous ces moments passés au labo et hors labo, je te souhaite bon courage pour la suite et si je devais te donner des conseils : écris ta partie exp petit à petit (Claire m'avait donné ce conseil en premier et j'ai essayé de le respecter) et aussi n'écris pas tes remerciements au dernier moment....

J'en viens maintenant aux personnes du "1^{er} étage". Tout d'abord l'équipe dosage grâce à qui j'ai pu me servir du fameux LC-QTrap. Merci Claire pour ta bonne humeur et ton soutien tout au long

de ces trois ans et surtout durant la période de la rédaction. Je remercie aussi Jean-Gui, ah non Guigui pardon pour ton aide sur différents sujets et nos échanges. Enfin Amandine de m'avoir formé en SPE et appris à utiliser votre machine de compétition. Au-delà du travail, je te remercie pour tout ma bichette, pour ton soutien, ta bonne humeur, ton humour et ta maniaque attitude que nous affectionnons tant ! Cette fin de thèse aurait été bien triste si tu n'avais pas été là car tu m'as vraiment aidé moralement et je t'en suis reconnaissante !! Finalement je remercie aussi l'équipe Caudalie : Cécile, Zohra (pour ton café excellent, "humm je trouve aussi!"), et mes deux biologistes préférées Christel et Audrey pour votre aide précieuse et vos solutions apportées aux différents problèmes que je me posais. Au-delà du travail vous m'avez également beaucoup apporté durant ces trois années et je vous en suis très reconnaissante... Audrey, également surnommée "la perfection", merci vraiment pour ton aide et ton soutien, sans quoi, comme pour Amandine, ma fin de rédaction aurait été bien différente et sûrement un peu plus morose. La dream team zumba sera enfin de retour après cette période compliquée !

Je remercie les stagiaires avec qui j'ai travaillé durant ces années, surtout le petit Timothée qui n'a jamais manqué de prendre de mes nouvelles ! Merci pour ton travail réalisé ici et qui m'a énormément servi. Tu as été vraiment exemplaire et j'ai été très contente de travailler avec toi. Merci aussi à ma grecque préférée, la petite Konstantina pour ta joie et ta bonne humeur.

Enfin je remercie aussi Audrey, ou la mama, comme on la surnomme, même si tu m'as cruellement manqué durant cette dernière année, merci pour tout !

Je remercie également Anne Françoise Guillouzic des laboratoires Servier, grâce à qui j'ai réussi mon stage de fin d'étude de l'école d'ingénieur et qui a été d'une aide précieuse pour la suite.

Merci aussi à tous les membres du club des jeunes de la SCF pour l'organisation des JMJC.

J'en viens aux remerciements de mes amis (es) qui m'ont apporté tout le soutien moral dont j'avais besoin durant cette thèse. Tout d'abord merci à toi Chloé, ma sœur de cœur. Je n'ai pas besoin d'épiloguer durant 20 pages, tu sais déjà ce que je pense, car tu as été et toujours été d'un réel soutien durant toutes ces années. Ensuite je remercie mes amies de longue date de Montpellier : Laure, Caroline, Alice et Jean-Loup, toujours présents pour moi, durant les moments

difficiles. Laure courage aussi pour la rédaction de ta thèse en Droit, je te soutiens à 300%. Caro, merci j'aurais tellement de choses à dire mais tu les connais déjà aussi, merci pour ton soutien et tes encouragements, ça sera bientôt ton tour aussi, ma future pharmacienne préférée et de compétition, j'ai fort hâte de voir tout ça !

Je remercie également mes anciens collègues de thèse et amis, Aurélien et Claire. Aurélien, merci pour tes conseils et ton humour efficace, bien qu'atypique. Claire, ma grande sœur de thèse, j'ai suivi tes conseils pour faire la partie exp petit à petit je te le promets ! Merci pour ton soutien de début de thèse, tu as été un réel exemple pour moi et je serai toujours admirative de ta personne et de ton travail. Merci également de m'avoir fait connaître les collègues de l'École de Chimie. Merci à Rémi, M. ex président du CdJ, pour tous ces moments passés dans le cadre ou hors cadre du travail, pour les soirées CDB ou les randonnées voire les virées sur les routes du TAAAARN, à quand une visite de la GRAND PLACE ? Merci à Yu Jia, tout pareil, même si on a soutenu le même jour on se soutiendra mutuellement. Merci aussi à Mélina, euh pardon Mélanie, ma marseillaise préférée pour tous les bons moments passés en ta compagnie et les week end à Toulouse et dans le Tarn (t'aurais pas une carte IGN ?). Je remercie aussi le cerveau 1 Vincent et le cerveau 2 Juju (QCQCPTFAT). Finalement je remercie également Romain de m'avoir apporté son soutien durant ces derniers mois compliqués, merci d'avoir été tout simplement là.

Enfin, je remercie toute ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'ont apporté le soutien moral dont j'avais besoin. Je remercie mes cousines Cassandra et Naomie pour leur soutien et leur présence durant les moments compliqués. Je remercie mes parents pour leur soutien sans faille et qui ont toujours su me rassurer et me tempérer. Merci maman de m'avoir encouragé et toujours cru en moi, sans jamais avoir douté une seule seconde, je te dois tout. Merci papa également pour tous tes encouragements et ton aide précieuse durant les derniers moments de précipitation de la thèse. Je remercie également mon frère Guilhem pour ton soutien et tes encouragements, je te dois énormément aussi...

A toutes et à tous, j'y suis arrivé aussi grâce à vous... Grand merci!

Table des matières

<i>In memoriam</i>	3
Remerciements	5
Table des matières	11
Abréviations	23
Introduction générale	29
Partie I : Rôle des stress oxydant et carbonylé dans les maladies rétinienne	37
Chapitre I. Le stress oxydant et le stress carbonylé.....	39
I. Le stress oxydant	39
I.1. La balance oxydo-réductrice (= rédox).....	39
I.2. Les espèces pro-oxydantes et antioxydantes	40
I.2.1. Les espèces pro-oxydantes (EOR, les espèces oxygénées réactives)	40
I.2.1.1. Les différents formes réactives de la molécule d'oxygène : état triplet, singulet et radical superoxyde	41
I.2.1.2. Le peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ et le radical hydroxyle OH [•]	45
I.2.1.3. Les hydroperoxydes RO ₂ H, les radicaux peroxydes RO ₂ [•] et alkoxydes RO [•]	46
I.2.1.4. Le radical monoxyde d'azote NO [•]	47
I.2.2. Les défenses antioxydantes : généralités.....	49
I.3. Les défenses antioxydantes de type polyphénolique	54
I.3.1. Définition du terme "polyphénol" et classification	54
I.3.2. Activité antioxydante des polyphénols.....	56
I.3.2.1. Action antioxydante directe des polyphénols	57
I.3.2.2. Biodisponibilité et action potentielle des polyphénols au sein de l'organisme après ingestion.....	58
I.3.2.3. Action antioxydante indirecte des polyphénols	59
II. Le stress carbonylé	62
II.1. Les stressseurs carbonylés.....	62
II.2. Relation entre stress oxydant et carbonylé	63
II.2.1. Le stress carbonylé provenant du glucose.....	63

II.2.2. Le stress carbonylé provenant de la peroxydation lipidique	66
II.2.3. Autres stressseurs carbonylés.....	71
II.2.4. Schéma général résumant les sources de formation et les conséquences des ECR au niveau de l'organisme.....	72
II.3. Les composés limitant le stress carbonylé.....	73
II.3.1. Molécules connues	73
II.3.2. Cas particulier des polyphénols.....	75
II.3.2.1. Piégeage des composés dicarboxylés : glyoxal (GO) et méthylglyoxal (MG).....	75
II.3.2.2. Inhibition de la glycation par piégeage du glucose.....	78
II.3.2.3. Piégeage d'aldéhydes α,β -insaturés.....	78
III. Conclusion générale sur les stress oxydant et carbonylé et exemples de maladies concernées	80
Chapitre II. Les maladies rétinienne : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la maladie de Stargardt.....	81
I. Origine et conséquence.....	81
I.1. Description de l'œil.....	81
I.1.1. Anatomie de l'œil.....	81
I.1.2. La rétine neurale.....	82
I.1.3. Le cycle visuel.....	84
I.1.4. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)	87
I.2. Description et Origine de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la maladie de Stargardt	89
I.2.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)	89
I.2.2. La maladie de Stargardt (de type 1, juvénile récessive)	91
I.2.3. Physiopathologie de ces deux maladies : un mécanisme de dégénérescence commun lié au stress oxydant et carbonylé	92
II. Traitements thérapeutiques actuels et conclusion (Tableau 5 récapitulatif).....	96
Partie II : Les applications thérapeutiques des lipophénols polyinsaturés ω3	103
Introduction	105

Chapitre I. Les lipophénols ω 3 d'origine naturelle et synthétique	106
I. Intérêt des deux composantes d'un lipophénol	106
II. Lipophénols ω 3 naturels et synthétiques : potentiels antioxydants	107
II.1. Descriptions succinctes des tests d'évaluation de la capacité antioxydante des lipophénols ω 3.....	107
II.2. Lipophénols ω 3présentant une capacité antioxydante.....	111
II.2.1. Activité des lipophénols d'origine synthétique	111
II.2.2. Activité des lipophénols d'origine naturelle	115
II.2.3. Conclusion et observation sur l'activité antioxydante des lipophénols ω 3....	116
Chapitre II. Utilisation de lipophénols contre les stress oxydant et carbonylé, dans le cadre des maladies rétinienne.....	117
I. Résultats précédents de l'équipe : activité du phloroglucinol, partie polyphénolique du lipophénol.....	117
I.1. Propriété anti-stress carbonylé du phloroglucinol <i>in vitro</i> dans un système sans cellule.....	118
I.1.1. Capacité anti-stress carbonylé du phloroglucinol mise en évidence lors des travaux préliminaires.....	118
I.1.2. Inhibition de la formation de l'A2E dans un système sans cellule.....	119
I.2. Propriétés protectrices contre les stress oxydant et carbonylé du phloroglucinol sur les cultures primaires d'EPR et de photorécepteurs	121
I.2.1. Limitation par le phloroglucinol de la cytotoxicité induite par un stresseur carbonylé et oxydant en culture primaire.....	121
I.2.2. Activité anti-stress oxydant et carbonylé du phloroglucinol en culture primaire	123
I.2.2.1. Limitation des EOR induites par H ₂ O ₂	123
I.2.2.1. Réduction des concentrations en rétinol tout-trans.....	123
II. Mise en évidence d'un lipophénol lead : le phloro-OiPr-ODHA 17	125
II.1. Évaluation <i>in vitro</i> , en lignée cellulaire de l'EPR (ARPE-19), de l'activité protectrice des lipophénols contre un stresseur carbonylé (rétinol tout-trans)	125

II.2. Évaluation in vitro, en lignée cellulaire de l'EPR (ARPE-19), de la capacité antioxydant (piégeage d'EOR) du composé lead 17	128
II.3. Évaluation in vivo de l'activité protectrice du composé lead 17	129
Conclusion.....	131
Partie III : Conséquences de la peroxydation lipidique de lipophénol conjugué au DHA et intérêt des AGPI deutérés	133
Chapitre I. La peroxydation lipidique du DHA.....	135
I. Introduction	135
II. Le paradoxe de l'oxydation du DHA.....	136
III. Effets bénéfiques du DHA	136
III.1.1. Rôle au sein de la rétine.....	136
III.1.2. Oxydation enzymatique du DHA : cas particulier de la neuroprotectine D1 (NPD1).....	137
III.1.2. Oxydation radicalaire du DHA : les neuroprostanes	140
IV. Aspect négatif du DHA.....	141
V. Conclusion	144
Chapitre II. Action des deutériums en positions <i>bis</i> -allyliques sur la limitation de la peroxydation lipidique des AGPI.....	145
I. Mécanisme d'action des AGPI deutérés en positions <i>bis</i> -allyliques.....	145
I.1. Effet cinétique isotopique primaire.....	145
I.2. Effet sur les AGPI deutérés en positions <i>bis</i> -allyliques : vitesse d'abstraction de l'hydrogène comparé à celle du deutérium	147
II. Protection des AGPI deutérés en milieu biologique	148
II.1. Résultats biologiques in vitro.....	148
II.2. Mécanisme supposé au sein des membranes cellulaires.....	151
II.3. Évaluations biologiques in vivo des AGPI deutérés.....	152
II.4. Développements précliniques des AGPI deutérés	153
Conclusion et objectifs des travaux de thèse.....	155

Partie IV : Synthèses des DHA et lipophénols deutérés	159
Introduction	161
Chapitre I. Méthodes de deutération et synthèse d'AGPI deutérés	162
I. Les différentes méthodes de deutération.....	162
I.1. Échanges proton/deutérium (H/D)	162
I.1.1 Catalyse basique	162
I.1.2. Catalyse avec les métaux de transition.....	164
I.1.3. Catalyse avec un système NHC.....	166
I.2. Réduction en présence de source de deutérium	168
I.2.1. Réduction catalytique des triples et doubles liaisons en présence de D ₂	168
I.2.2. Réduction par deutéroboration puis solvolyse	171
I.2.3. Réduction en présence de deutérures	172
I.2.4. Réduction en présence de D ₂ O	174
I.3. Réactions avec des réactifs deutérés de faible poids moléculaire.....	176
I.4. Utilisation de micro-organisme pour la biosynthèse d'AG deutérés.....	178
I.4.1. Culture cellulaire en milieu D ₂ O	178
I.4.2. A partir d'AGPI deutérés <i>via</i> une supplémentation de micro-organisme et métabolisation.....	180
II. Synthèses d'acides gras polyinsaturés deutérés en position(s) <i>bis</i> -allylique(s) décrites dans la littérature	182
II.1. Synthèse énantiosélective de l'acide 13(<i>S</i>)-deutéroarachidonique mono-deutérés en positions <i>bis</i> -allyliques rapportée par Peng <i>et al.</i>	182
II.2. Synthèses d'acides linoléiques, arachidoniques, et α -linoléiques deutérés en positions <i>bis</i> -allyliques par Shchepinov <i>et al.</i>	185
Chapitre II. Synthèse des DHA deutérés et lipophénols deutérés	189
I. Stratégies de synthèse.....	189
I.1. Synthèse rapportée du lipophénol non deutéré.....	189

I.2. Schéma rétrosynthétique des DHA deutérés : (6,6-D ₂)-DHA (22) et le (6,6,9,9-D ₄)-DHA (23)	191
II. Synthèse des intermédiaires clés nécessaires à la réaction d'oléfination de Wittig permettant l'accès aux DHA deutérés 22 et 23	192
II.1. Synthèse des aldéhydes 27 et 28	192
II.1.1. Obtention de l'EPA	192
II.1.2. Synthèse de l'aldéhyde 27	195
II.1.3. Synthèse de l'aldéhyde 28	197
II.2. Synthèses des sels de phosphonium di-deutééré 29 et tétra-deutééré 30	202
II.2.1. Synthèse de l'alcyne terminal deutéré 31 , intermédiaire commun aux synthèses des deux sels de phosphonium 29 et 30	203
II.2.2. Synthèse du sel de phosphonium di-deutééré 29	204
II.2.3. Synthèse du sel de phosphonium tétra-deutééré 30	207
II.2.3.1. Synthèse du dérivé propargylique bromé deutéré 32	207
II.2.3.2. Réaction de couplage entre l'alcyne vrai deutéré 31 et le dérivé propargylique deutéré 32	209
II.2.3.3. Hydrogénation du diyne 53	210
IV. Optimisation du couplage de Wittig	215
IV.1. Optimisation sur un synthon test.....	215
IV.2. Résultats de la réaction d'oléfination de Wittig réalisée avec les sels de phosphoniums di-deutééré 29 et tétra-deutééré 30	219
V. Saponification des esters de DHA deutérés 56 et 57	222
V.1. Synthèse des DHA deutérés	222
V.2. Synthèse des lipophénols deutérés	224
VI. Conclusion et perspectives	226
Partie expérimentale	231
Structures des intermédiaires de synthèse et produits finaux décrits.....	233
dans la partie IV, chapitre II	233

Partie V : Impact des deutériums sur l'activité des DHA et lipophénol-DHA en lignée cellulaire ARPE-19 : toxicité, activités antioxydantes, et anti-stresseur carbonylé267

Introduction	269
Chapitre I. Effet des deutériums sur la toxicité du DHA : comparaison des toxicités du DHA naturel vs deutérés et d'autres AGPI naturels vs deutérés, en condition de stress oxydant en lignée cellulaire ARPE-19.....	273
I. Mise au point des conditions d'oxydation engendrant une toxicité des AGPI en lignée cellulaire ARPE-19	275
I.1. Influence de la carence en sérum.....	275
I.1.1. Influence de la carence en sérum sur le stress oxydant cellulaire (sans traitement avec l'AGPI).....	275
I.1.2. Toxicité des AGPI naturels (DHA, ALA et LA) dans des conditions sans sérum	277
I.1.2.1. Test préliminaires des DHA naturel et deutérés	277
I.1.2.2. Test préliminaires de l'ALA et du LA naturels.....	279
I.1.3. Toxicité des AGPI naturels (DHA, ALA et LA) en présence de 2,5% de SVF.....	280
I.1.3.1. Test préliminaires du DHA, de l'ALA et du LA naturels.....	280
I.1.3.2. Test préliminaires du DHA et de l'ALA naturels en présence de H ₂ O ₂	282
I.1.4. Toxicité des séries d'AGPI (DHA, ALA et LA) en présence de 1% de SVF	284
I.1.4.1. Test préliminaires des DHA naturel et deutérés	285
I.1.4.2. Test préliminaires de l'ALA et du LA.....	286
I.2. Choix du stresser chimique.....	288
I.2.1. Toxicité et production d'EOR en présence de H ₂ O ₂ (sans AGPI)	288
I.2.2. Toxicité du DHA en présence de 400 µM de H ₂ O ₂	290
I.2.3. Toxicité en présence de deux autres stressers : <i>tBuOOH</i> et CuSO ₄	291
II. Effet des deutériums en positions <i>bis</i> -allyliques sur la toxicité du DHA, et d'autres AGPI (ALA et LA) dans les conditions optimisées.....	292
II.1. Toxicité de la série DHA.....	292
II.1.1. Toxicité des DHA naturel et deutérés en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF, sans H ₂ O ₂	292

II.1.2. Toxicité des DHA naturel et deutérés en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF et de 600 μM de H_2O_2	295
II.2. Toxicité des séries ALA et LA	296
II.2.1. Toxicité des ALA naturel et deutéré en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF, avec ou sans 600 μM de H_2O_2	296
II.2.2. Toxicité des LA naturel et deutéré en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF, avec ou sans 600 μM de H_2O_2	297
III. Conclusion	298
IV. Le paradoxe du DHA : Effet protecteur ou toxique sur la lignée ARPE-19 évoqués dans la littérature.....	300
Chapitre II. Impact des deutériums sur l'inhibition de la peroxydation lipidique au sein des cellules ARPE-19.....	303
I. Les différentes méthodes pour quantifier la peroxydation lipidique.....	303
I.1. Les différentes méthodes évoquées dans la littérature.....	303
I.2. Présentation et utilisation de la sonde C11-BODIPY ^{581/591}	306
II. Mise au point des conditions d'utilisation de la sonde C11-BODIPY ^{581/591} en culture cellulaire ARPE-19	309
II.1. Choix du temps d'incubation de la sonde	309
II.2. Influence et choix de la carence en sérum.....	311
II.3. Choix de la concentration en C11- BODIPY ^{581/591} dans un milieu carencé à 1% de SVF	313
II.4. Choix du temps de stress (carence à 1% de SVF et H_2O_2) appliqué sur les cellules ARPE-19.....	315
II.5. Mise au point et choix des conditions de stress lumineux.....	317
II.5.1. Ordre d'application du stress au sein du test	318
II.5.2. Temps de stress et choix du type de lumière.....	319
II.5.3. Choix de l'intensité lumineuse.....	322
II.6. Effet du DHA sur l'incorporation de la sonde C11-BODIPY ^{581/591}	324

II.7. Efficacité de la sonde dans des conditions limitant (α -tocophérol) ou accentuant (<i>t</i> BuOOH) la peroxydation lipidique	325
II.8. Résumé du protocole sélectionné après optimisation pour l'évaluation de l'impact des deutériums sur la peroxydation lipidique cellulaire.....	326
III. Mise en évidence de l'effet des deutériums sur la peroxydation lipidique au sein des ARPE-19, en séries DHA (AGPI et lipophénols)	328
III.1. Évaluation des DHA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique	328
III.1.1. Comparaison de l'effet des DHA naturels et deutérés (à 50 μ M) en présence du stress chimique H ₂ O ₂ (400 μ M) et/ou d'une carence à 1% de SVF.....	329
III.1.2. Comparaison de l'effet des DHA naturels et deutérés (à 50 μ M) en présence d'un stress lumineux (lumière blanche, 5 000 lux) et/ou d'une carence à 1% de SVF	332
III.1.3. Comparaison de l'effet des DHA naturel et deutérés utilisé à 60 μ M (proche des CI ₅₀) en présence d'une carence à 1% de SVF	334
III.2. Évaluation des PG-DHA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.....	336
III.2.1. Comparaison de l'effet des PG-DHA non deutéré et deutérés (à 50 μ M) en présence du stress chimique H ₂ O ₂ (400 μ M) et/ou d'une carence à 1% de SVF.....	336
III.2.2. Comparaison de l'effet des PG-DHA non deutéré et deutérés (à 50 μ M) en présence d'un stress lumineux (lumière blanche, 5 000 lux) SVF et/ou d'une carence à 1% de.....	339
III.3. Comparaison des résultats obtenus pour la série DHA : AGPI libres et lipophénols non deutérés et deutérés	341
IV. Mise en évidence de l'effet des deutériums sur la peroxydation lipidique au sein des ARPE-19, en séries ALA et LA (AGPI et lipophénols), et comparaison avec la série DHA	343
IV.1. Évaluation des ALA et LA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique et comparaison avec la série DHA.....	343
IV.1.1. Évaluation de l'effet des ALA et LA naturels et deutérés (à 50 μ M) en présence du stress chimique H ₂ O ₂ (400 μ M) et/ou d'une carence à 1% de SVF.....	343

IV.1.2. Comparaison des résultats obtenus pour les ALA et LA avec les DHA en présence du stresser chimique H ₂ O ₂ (400 µM) et/ou d'une carence à 1% de SVF 347	
IV.2. Évaluation des PG-ALA et PG-LA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique et comparaison avec les PG-DHA.....	349
IV.2.1. Évaluation de l'effet des PG-ALA et PG-LA naturels et deutérés (à 50 µM) en présence du stresser chimique H ₂ O ₂ (400 µM) et/ou d'une carence à 1% de SVF	349
IV.2.2. Comparaison des résultats obtenus pour les PG-ALA et les PG-LA avec les PG-DHA en présence du stresser chimique H ₂ O ₂ (400 µM) SVF et/ou d'une carence à 1% de	353
Chapitre III. Effet des deutériums sur la protection contre le rétinol tout- <i>trans</i>	354
Conclusion : lien entre la toxicité et la peroxydation lipidique	356
Partie expérimentale.....	359
Partie VI :Impact des deutériums en position <i>bis</i>-allylique sur l'oxydation enzymatique et radicalaire du DHA.....	371
Introduction	373
Chapitre I. Évaluation de l'oxydation enzymatique des DHA naturel et deutérés.....	374
I. Les métabolites issus de l'oxydation enzymatique du DHA naturel	374
I.1. Intérêt biologique de la NPD1 au sein de la rétine (rappel)	374
I.2. Mécanisme de formation des protectines NPD1 et PDX.....	375
II. Impact des deutériums en positions <i>bis</i> -allyliques sur l'oxydation enzymatique des DHA deutérés	376
Chapitre II. Évaluation de l'oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés.....	379
I. Oxydation radicalaire du DHA : mécanisme de formation des NeuroPs et potentiel impact des deutériums en positions <i>bis</i> -allyliques 6 et 6/ 9.....	379
II. Comparaison de la formation des F ₄ -NeuroPs des séries 4, 10 et 20 après oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés	382
II.1. Principe du dosage des NeuroPs par micro-LC-MS/MS.....	382
II.2. Oxydation du DHA naturel et mise au point du protocole	384
II.2.1. Choix de l'étalon interne (EI)	384

II.2.2. Protocole de prétraitement de l'échantillon par SPE (solid phase extraction)	385
II.2.3. Oxydation et analyse par LC-MS/MS : mise au point sur le DHA naturel	387
II.3. Impact des deutériums sur l'oxydation radicalaire du DHA conduisant à la formation des F ₄ -NeuroPs des séries 4, 10 et 20	388
Conclusion	392
Partie expérimentale	395
Conclusion générale	403
Références	413
Annexes	431

Abréviations

A2E	Di-rétinoïde éthanolamine
AA	Acides aminés
ABCA4	ATP-binding cassette, sub family A, member 4
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACR	Acroléine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Advanced glycation end products
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ALA	Acide α -linoléique
ALE	Advanced lipoxidation end products
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ArA	Acide arachidonique
ARE	Antioxydant responsive element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARPE-19	Adult retinal pigment epithelial cell line-19
atRAL	All- <i>trans</i> retinal = rétinol tout- <i>trans</i>
BAIB	Bis(acetoxy)iodobenzène
BDE	Bound dissociation enthalpy = enthalpie de dissociation de liaison
BHR	Barrière hémato-rétinienne
BODIPY	Bore-dipyrométhène
CAA	Cellular antioxidant activity
CEP	2- ω -Carboxyéthylpyrroles
Cl ₅₀	Concentrations inhibitrices médianes
CLPAA	Cellular lipid peroxidation antioxidant activity
COX	Cyclo-oxygénase
CRALBP	Cellular retinal binding protein
CSA	Acide camphorsulfonique
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCFDA	2',7'-Dichlorofluoresceine diacetate
DDQ	Dichlorodicyanobenzoquinone
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHCA	Acide dihydrocaféique
DMAP	4-Diméthylaminopyridine

DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
DUOX	Duals oxydases
ECI	Effet cinétique isotopique
ECIP	Effet cinétique isotopique primaire
ECR	Espèces carbonylées réactives
EGCG	Épigallocatechine-3- <i>O</i> -gallate
EI	Étalon interne
ELISA	Enzyrna linked immunosorbent assay
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EOR	Espèces oxygénées réactives
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
Éq.	Équivalent
ERG	Électrorétinogramme
ESI	Electrospray ionization
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FSC	Foward scatter
GlcU	Glucuronide
GO	Glyoxal
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion <i>S</i> -transférase
HAT	Hydrogen-atom transfert
HHE	4-Hydroxy-2-hexenal
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HOHA	Acide 4-hydroxy-7-oxohept-5-énoïque
HPLC	High performance liquid chromatography
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IP	Potentiel d'ionisation
IR	Infrarouges
IRBP	Interphotoreceptor retinoid-binding protein

isoLGD	Isolévuglandine
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1 (en anglais)
LA	Acide linoléique
LC	Liquid chromatography
LOX	Lipoxygénase
LRAT	Lecithin-retinol acyl transferase
MDA	Malondialdéhyde
MG	Méthylglyoxal
MRM	Multiple reaction monitoring
Ms	Mésyle
MS	Spectrométrie de masse
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NeuroP	Neuroprostane
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOX	NADPH oxydases
NPD1	Neuroprotectine D1
N-ret-PE	N-rétinylidène-phosphatidyléthanolamine
Nrf2	NF-E2-related factor 2
OCT	Tomographie par cohérence optique
ONE	4-oxo-nonenal
PBS	Phosphate buffered saline
PDX	Protectine DX
PE	Phosphatidyléthanolamine
PMB	<i>Paramethoxybenzyle</i>
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RDH	Retinal dehydrogenase
RIA	Radio-immunologique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific protein
SD	Standard deviation = écart type

SEM	Standard error of the mean
SET	Single electron transfert
SOC	Stress oxydant et carbonylé
SOD	Superoxyde dismutases
SPE	Solid phase extraction
SSC	Side scatter
SVF	Sérum de veau foetal
t.a.	Température ambiante
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBDPS	<i>Tert</i> butyldiphénylsilyle
TCACN	Trichloroacétonitrile
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl
THP	Tétrahydropyrane
TMP	Tocopherol mediated peroxydation
TrxR	Thiorédoxine réductase
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultra-violet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XO	Xanthine oxydase

Introduction générale

Le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes comme les espèces oxygénées réactives (EOR), peut être la cause ou est la conséquence de la majorité des maladies. Au sein de l'organisme, il est responsable de la dénaturation de substrats cellulaires, comme les lipides de type acides gras polyinsaturés (AGPI), par un phénomène de peroxydation lipidique. Les conséquences de cette oxydation peuvent être délétères, d'autant qu'elle s'accompagne de la formation d'espèces carbonylées réactives (ECR), pouvant également dénaturer d'autres substrats biologiques tels que les protéines, par un phénomène de glycation. Dans le cas de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, ω 3) (**Schéma 1**) par exemple, cet AGPI oméga-3 est indispensable au bon fonctionnement du tissu rétinien et cérébral, n'en est pas moins hautement oxydable. Il peut conduire, après abstraction d'hydrogènes en positions *bis*-allyliques (cercles rouges), à la formation de dérivés délétères comme le HHE (4-hydroxy-2-hexenal), ou le HOHA (acide 4-hydroxy-7-oxohept-5-énoïque) et de dérivés de type CEP (2- ω -carboxyéthylpyrroles), impliqués notamment dans la physiopathologie d'affections visuelles.¹

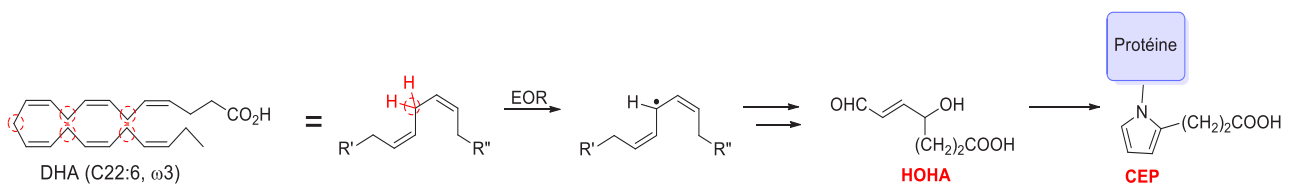


Schéma 1 : Dérivés délétères potentiellement formés suite à la peroxydation lipidique du DHA (C22:6, ω 3).

Les stress oxydant et carbonylé interviennent effectivement dans certaines pathologies rétinienne, telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA, forme atrophique) ou celle due à une mutation génétique, la maladie de Stargardt.² L'étiologie de ces deux maladies a mis en évidence un mécanisme cytotoxique commun (**Schéma 2**), faisant intervenir une molécule endogène et essentielle pour la vision : le rétinol tout-*trans*. Ce dernier est transformé par la combinaison des deux stress oxydant et carbonylé (SOC), en une molécule toxique lipidique A2E. Ce *bis*-rétinoïde présente une cytotoxicité directe et indirecte (par photo-oxydation),³ entraînant la dégénérescence des cellules rétinienne, et à terme une cécité chez le patient atteint de dégénérescence maculaire. Une molécule chef de file ("lead") a été mise en évidence⁴ au sein du laboratoire pour lutter contre ces maladies rétinienne, présentant des propriétés anti-stress oxydant et carbonylé : le phloroglucinol-OiPr-ODHA (**Schéma 2**). Cette molécule, qui a assuré une protection des cellules rétinienne évidente, *in vitro* et *in vivo* (chez la souris), est un composé de

type "lipophénol", caractérisé par une partie phénolique (phloroglucinol-O*i*Pr) et une partie lipidique (DHA).

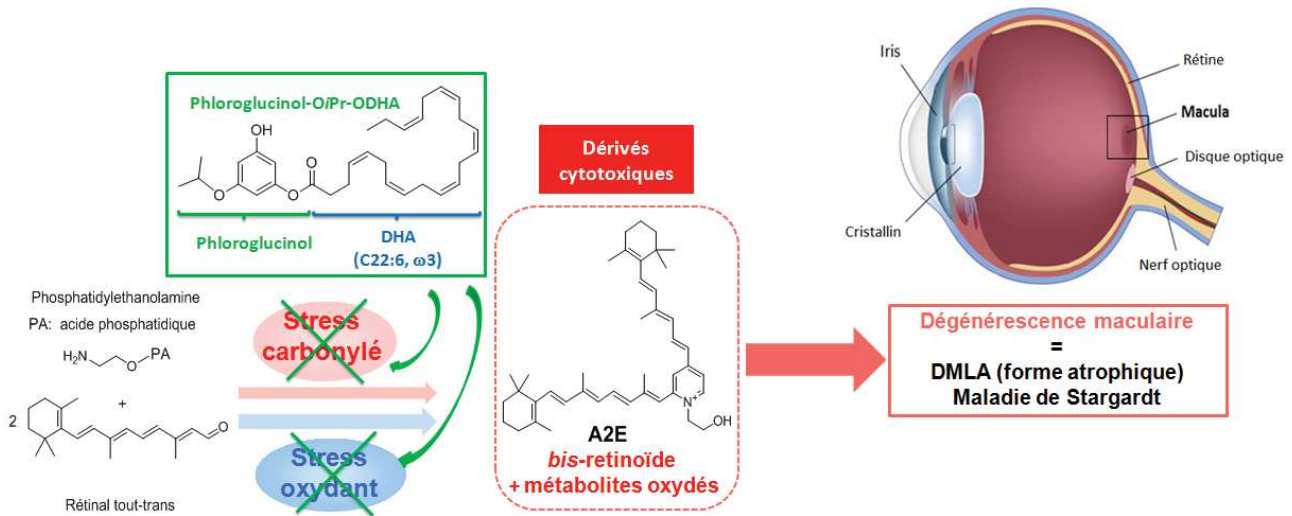


Schéma 2 : Action de la molécule lead, le phloroglucinol-O*i*Pr-ODHA, sur les stress oxydant et carbonylé intervenant dans les pathologies rétinienne (DMLA et maladie de Stargardt).

Le DHA a été choisi pour constituer la partie lipidique du lipophénol, puisqu'il représente environ 50% des AGPI de la membrane des photorécepteurs.⁵ Il favoriserait ainsi un ciblage des tissus rétiens et améliorerait la biodisponibilité de la molécule. La dualité de comportement du DHA⁵ a cependant été mise en évidence au sein de la rétine. Son effet bénéfique pourrait, entre autres, être dû à son oxydation enzymatique, effectuée par une lipoxygénase (LOX), conduisant à la formation d'un composé neuroprotecteur, la neuroprotectine NPD1 (**Schéma 3**). Ce métabolite aurait notamment une fonction protectrice des cellules rétiennes.⁶

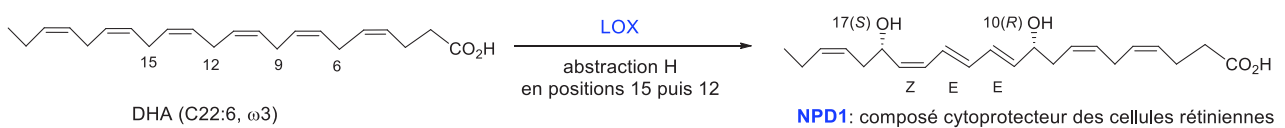
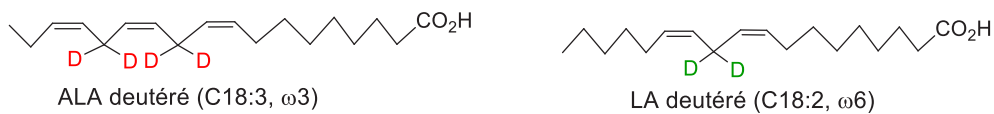


Schéma 3 : métabolite cytoprotecteur, la NPD1, issue de l'oxydation enzymatique du DHA

Cependant, l'autre aspect du DHA, négatif celui-là, correspond à son oxydation radicalaire (peroxydation lipidique, non enzymatique), car il peut alors conduire (dans certaines conditions d'oxydation) à la formation de métabolites cytotoxiques, de type HOHA et CEP (**Schéma 1**), marqueurs du stress oxydant dans les maladies rétiennes mentionnées, et responsable du stress carbonylé. Ainsi, la diminution de la susceptibilité du DHA de la molécule lead à l'oxydation est une amélioration qui a été envisagée dans ces travaux de thèse, afin de réduire sa toxicité lorsqu'il est

soumis à des conditions oxydantes, tout en augmentant son potentiel "anti-stress oxydant", jusque-là, limité.

La protection des AGPI contre la peroxydation lipidique a précédemment été développée par Shchepinov *et al.*,⁷ sur l'ALA (acide α -linoléique ; C18 :3, ω 3) et le LA (acide linoléique ; C18 :2, ω 6), et consisté à incorporer des deutériums en positions *bis*-allyliques des AGPI (**Schéma 4**). Les travaux de Shchepinov *et al.* ont montré que la deutération de ces AGPI entraînait une diminution de leur sensibilité à l'oxydation (par effet isotopique primaire), et même, avaient un effet cytoprotecteur, en conditions de stress oxydant.



Protecteurs contre la peroxydation lipidique et ses effets délétères
(*in vitro*, *in vivo* et essais cliniques (phase IIa))

Schéma 4 : AGPI (ALA et LA) deutérés développés par Shchepinov *et al.*⁷

Afin de limiter la sensibilité à l'oxydation de la chaîne lipidique (DHA) du lipophénol lead, l'ajout de deutériums nous a semblé être une solution efficace. Ces travaux de thèse portent ainsi sur la synthèse et l'évaluation de deux lipophénols deutérés en positions *bis*-allyliques du DHA (**Schéma 5**), à partir des deux DHA deutérés correspondants, obtenus préalablement.

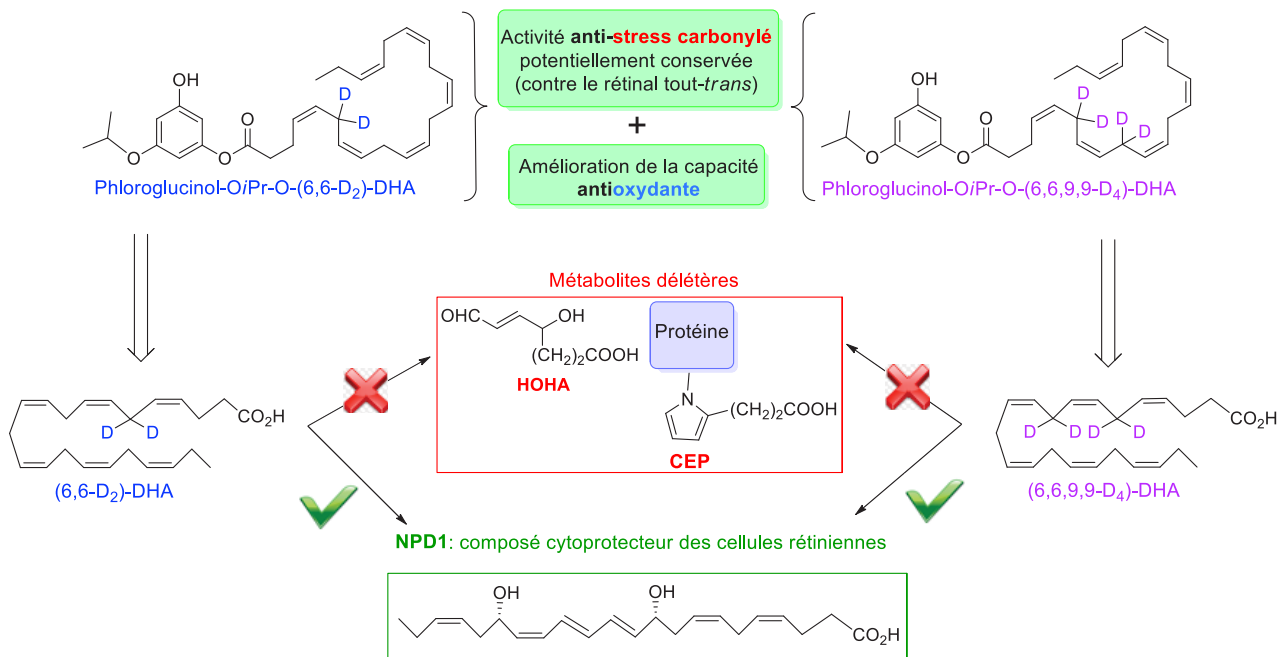


Schéma 5 : Lipophénols et DHA deutérés cibles à synthétiser, et leur action biologiques potentielles.

Les positions *bis*-allyliques à deutérer pour ces deux AGPI ont été choisies dans le but de les protéger d'une oxydation radicalaire, et donc, d'éviter la formation de dérivés délétères, mais de telle sorte qu'elles n'inhibent pas, ou le moins possible, leur potentielle oxydation enzymatique, à l'origine de dérivés cytoprotecteurs, de type NPD1.

L'impact de l'incorporation des deutériums sur la toxicité du DHA et du lipophénol qui l'incorpore, ainsi que leur influence sur la peroxydation lipidique ont été évalués en culture cellulaire d'épithélium pigmentaire rétinien.

La présentation de ces travaux de thèse comprend six parties :

Dans un premier temps, sont présentées des généralités sur l'origine et les conséquences des stress oxydant et carbonylé ainsi que leurs implications dans les pathologies rétinienne, afin de replacer le contexte de ces travaux dans le cadre des dégénérescences maculaires (DMLA et maladie de Stargardt).

Dans une deuxième partie, une présentation de l'intérêt thérapeutique des lipophénols couplés à des AGPI de type oméga-3 est évoquée, en ciblant la physiopathologie des maladies rétinienne, et notamment les activités anti-stress oxydant et carbonylé.

Dans un troisième temps, nous nous focalisons sur la dualité de la partie lipidique(DHA) du lipophénol lead, en abordant les différents métabolites délétères et cytoprotecteurs possiblement formés, *via* son oxydation radicalaire ou enzymatique. L'intérêt de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques est alors présenté au travers des travaux précédemment rapportés dans la littérature. Enfin, la stratégie de préparation des deux DHA deutérés est alors détaillée, en fonction des effets attendus.

La quatrième partie porte sur les synthèses multi-étapes et convergentes, réalisées durant cette thèse, des deux DHA deutérés et des deux lipophénols correspondants.

Dans la cinquième partie, sont exposés nos résultats concernant l'évaluation de l'impact de l'incorporation des deutériums dans les composés synthétisés (AGPI et lipophénols deutérés), sur la toxicité, la peroxydation lipidique et l'activité anti-stress carbonylé, sur une lignée cellulaire humaine d'épithélium pigmentaire rétinien, ARPE-19 (pour, en anglais : "adult retinal pigment epithelial cell line-19").

Enfin, la sixième partie, présente notre étude de l'influence des deutériums en positions *bis*-allyliques dans les DHA deutérés synthétisés, sur l'oxydation enzymatique et radicalaire, puisqu'ils peuvent conduire, respectivement, à des dérivés neuroprotecteurs ou, au contraire, cytotoxiques.

Partie I : Rôle des stress oxydant et carbonylé dans les maladies rétiniennes

Chapitre I. Le stress oxydant et le stress carbonylé

I. Le stress oxydant

I.1. La balance oxydo-réductrice (= rédox)

La production de radicaux libres est présente en permanence dans les systèmes biologiques⁸ *via* l'activité métabolique cellulaire. La formation de ces espèces réactives est inévitable et dans certains cas indispensable pour le bon fonctionnement des cellules, au travers des voies de signalisation et de régulation.⁹ Produits en trop grandes quantités, ces radicaux libres présentent une toxicité en réagissant avec des substrats biologiques tels que l'ADN, les lipides et les protéines. Ils entraînent des dégâts cellulaires irréversibles, et sont à l'origine de nombreuses pathologies chroniques chez l'homme. Cependant, leur surproduction peut être limitée grâce à des espèces dites "antioxydantes" (réductrices), capables de piéger ces espèces radicalaires directement (vitamine C, E ou polyphénols...) ou indirectement (par le biais d'activation des défenses enzymatiques). A faibles doses, selon le principe de l'hormèse,¹⁰ ces radicaux libres déclenchent une réponse biologique, correspondant à l'activation de l'élément de réponse antioxydant (ARE, antioxidant responsive element en anglais).¹¹ Un équilibre de la balance pro-oxydante est alors observé, correspondant à une homéostasie "rédox". Malheureusement, cet équilibre peut être rompu par une surproduction d'espèces radicalaires ou un dysfonctionnement des défenses antioxydantes (**Figure 1**), et conduire à un état de "stress oxydant" dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée.

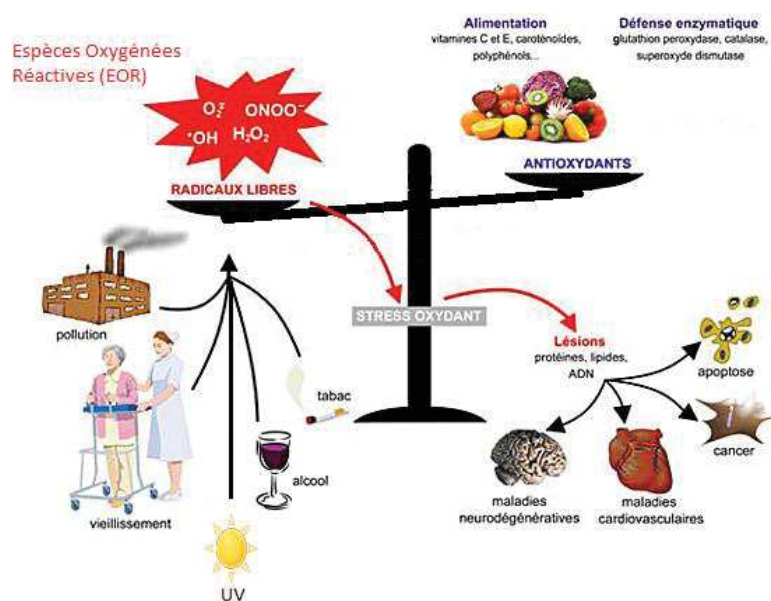


Figure 1: le stress oxydant : une conséquence du déséquilibre de la balance oxydante.

Les principales espèces radicalaires provoquant ce déséquilibre sont les espèces oxygénées réactives (EOR, reactive oxygen species = ROS, en anglais), espèces beaucoup plus toxiques que l'oxygène dont elles proviennent. Ces EOR sont à prendre en compte dans le paradoxe de l'oxygène (énoncé en biologie par Louis Pasteur), un élément indispensable à la vie mais qui peut engendrer une toxicité. Dans les années 50, Gerschman *et al.*¹² mettent en évidence une toxicité de l'oxygène par formation de radicaux libres. Peu après, Harman¹³ évoque pour la première fois l'hypothèse selon laquelle les radicaux libres, provenant de l'oxygène lors de la respiration cellulaire, seraient responsables de dommages moléculaires et cellulaires dont l'accumulation serait synonyme du vieillissement. Leur formation peut être accentuée sous l'effet de différents facteurs tels que la pollution, les rayons UV (ultra-violets), l'usage du tabac et la consommation d'alcool.

I.2. Les espèces pro-oxydantes et antioxydantes

I.2.1. Les espèces pro-oxydantes (EOR, les espèces oxygénées réactives)

Ce sont principalement les espèces oxygénées réactives (EOR). Elles proviennent de l'oxygène et peuvent être des espèces radicalaires ou non radicalaires, chargées ou neutres. Les radicaux libres sont des entités chimiques comportant un ou plusieurs électrons non appariés¹⁴ sur leur couche électronique externe. Dans le cas des EOR radicalaires, l'électron célibataire est situé sur un atome d'oxygène, d'où la dénomination de radicaux libres "centrés" sur l'oxygène. Ces EOR représentent la majorité des radicaux libres générés dans un organisme aérobie, du fait de l'importance de l'oxygène dans le métabolisme énergétique. La présence d'électrons célibataires confère à ces molécules une grande réactivité et donc la possibilité de réagir rapidement avec des substrats environnants. Parmi les EOR, on trouve l'oxygène à l'état singulet ($^1\text{O}_2^*$), l'ozone (O_3) mais également le (radical) anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}).¹⁵ Les EOR englobent également les radicaux alkylperoxydes (RO_2^{\bullet}), les alkylhydroperoxydes (RO_2H), les radicaux alkoxydes (RO^{\bullet}), le radical monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et le peroxyde d'azote (ONOO^{\bullet}), ces deux derniers étant considérés comme des espèces réactives de l'azote (ERA, reactive nitrogen species = RNS, en anglais).

Plusieurs sources de production d'EOR existent, elles peuvent être exogènes (éléments déclencheurs : tabac, pollution, rayonnement ultra-violet, gamma,...), ou endogènes (produites naturellement au sein de l'organisme). Dans les cellules, environ 90% des EOR sont formées par les mitochondries, représentant ainsi la source principale de production.¹⁶ Cette affirmation,

cependant, fait débat puisque la capacité de production de ces espèces par le réticulum endoplasmique et les peroxysomes est plus importante (dans les cellules hépatiques notamment), mais encore, les mitochondries sont capables de dégrader rapidement les EOR.¹⁷

I.2.1.1. Les différents formes réactives de la molécule d'oxygène : état triplet, singulet et radical superoxyde

La molécule d'oxygène peut être présente sous plusieurs formes, stables ou instables, pouvant modifier sa réactivité vis à vis des substrats biologiques environnants. Les configurations électroniques des différentes formes de l'oxygène sont présentées dans la **Figure 2**. En fonction de l'orientation des spins et de la présence d'orbitales moléculaires vacantes, il est possible de déduire leur ordre de réactivité.

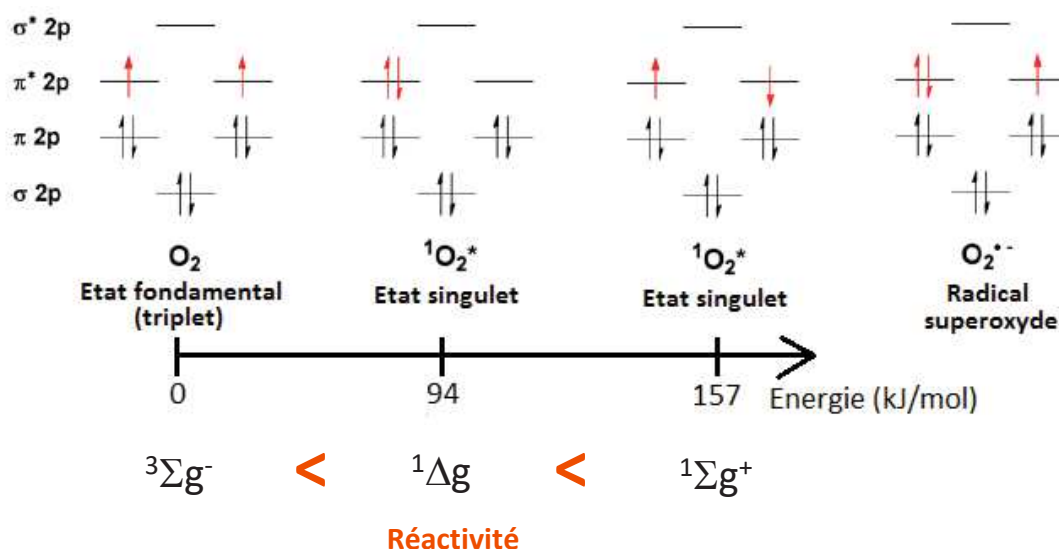


Figure 2 : Configuration électronique de la couche externe des molécules d'oxygène et du radical superoxyde.

I.2.1.1.1. L'oxygène singulet

L'oxygène singulet peut être présent sous deux formes, $^1\Delta_g O_2$ et $^1\Sigma_g^+ O_2$, plus hautes en énergie que la molécule O_2 à l'état fondamental (triplet), la plus instable étant la forme $^1\Sigma_g^+ O_2$ (**Figure 2**). L'oxygène singulet est un oxydant présentant une forte réactivité et donc une toxicité importante. Il peut être obtenu dans un système biologique¹⁴ *via* :

- une réaction photochimique (irradiation) pouvant faire intervenir un photosensibilisateur,
- le système myeloperoxydase/ H_2O_2 /chlorure présent au sein des cellules phagocytaires lors de leur activité antibactérienne et antifongique, selon la réaction suivante (**Schéma 6**) :

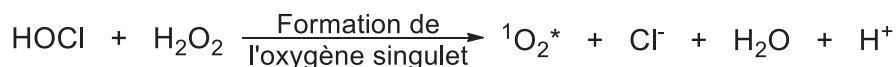
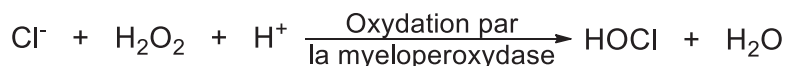


Schéma 6 : Obtention de l'oxygène singulet au sein des cellules phagocytaires.

Après avoir capté un électron, l'oxygène se transforme en radical superoxyde.

1.2.1.1.2. Le radicale superoxyde O_2^{\bullet}

Malgré son nom, le caractère radicalaire de l'anion superoxyde est moins prononcé que celui de O_2 lui-même, car il possède seulement un électron non apparié¹⁴ (contre deux pour O_2) (**Figure 2**). Différentes voies métaboliques sont à l'origine de la production endogène du radical superoxyde O_2^{\bullet} . Les deux plus grandes sources de production (respiration mitochondriale et action des NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite) oxydases) sont détaillées ici, mais d'autres exemples d'enzymes intervenant dans sa formation seront également évoqués.

Le radical superoxyde peut être formé de manière intracellulaire au cours de la chaîne respiratoire mitochondriale, indispensable pour la production d'énergie des organismes aérobies. Avant de donner plus de détails sur sa formation, il est nécessaire d'évoquer brièvement l'intervention d' O_2 au niveau du fonctionnement mitochondrial. Au niveau des membranes internes des mitochondries, la réduction en H_2O de chaque molécule O_2 , permet de capter quatre électrons venant du glucose, oxydé totalement en CO_2 et H_2O (phosphorylations oxydatives), tant que l'oxygène est présent (**Schéma 7**) :



Schéma 7 : Réduction de l'oxygène en eau.

Cette réduction, indispensable pour le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire, correspondant à une chaîne de transport d'électrons (**Figure 3**). Elle s'effectue grâce aux cytochromes c oxydases¹⁸ du complexe IV. Ainsi, O_2 correspond à une sorte de "puits" à électrons puisqu'il intervient en bout de chaîne.

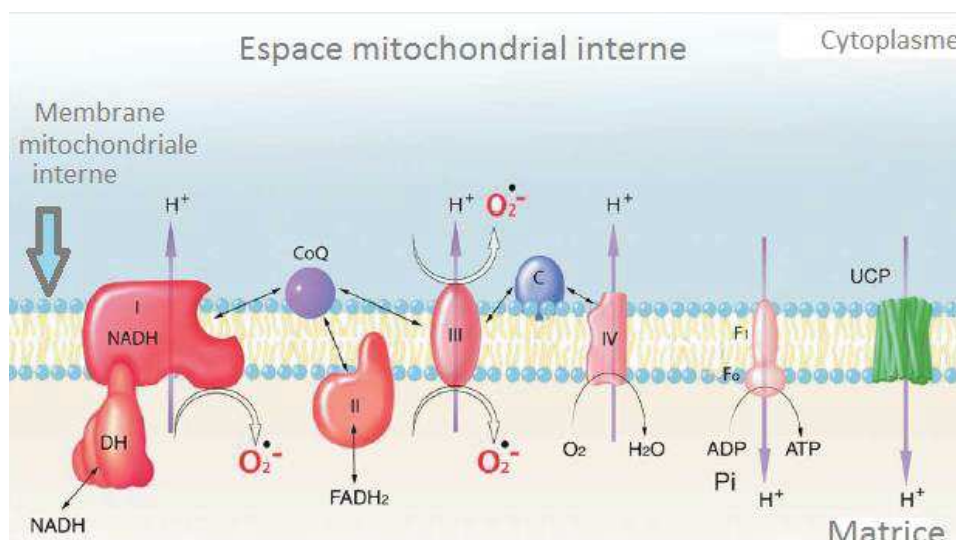


Figure 3 : Production du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ au cours de la chaîne respiratoire mitochondriale.¹⁸

Une certaine proportion du flux d'électrons, associée à cette chaîne respiratoire, peut s'en "échapper" et être captée par une molécule O_2 , en dehors de toute réaction de phosphorylation oxydative (sorte de "fuite" électronique). Ainsi, le radical superoxyde est-il la première espèce formée durant la réduction d'une molécule O_2 (**Schéma 8**).

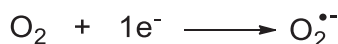


Schéma 8 : Réduction mono-électronique de l'oxygène en radical superoxyde.

Sa production s'effectue essentiellement au niveau des complexes I (dans la matrice) et III (dans la matrice et l'espace intra-mitochondrial) (**Figure 3**). Il est estimé qu'1 à 2 % de la consommation d'oxygène aboutit à la formation mitochondriale de $O_2^{\bullet-}$.¹⁹

Une autre voie métabolique importante dans la formation du radical superoxyde fait intervenir les NADPH oxydases (NOX) et les duals oxydases (DUOX).²⁰ Selon leur nature et leur spécificité, ces protéines ont différents rôles biologiques importants au sein des cellules. Ce sont des enzymes transmembranaires qui catalysent l'oxydation du NADPH (substrat intracellulaire) par O_2 , donc, la réduction de ce dernier, à l'origine des EOR (**Schéma 9**).



Schéma 9 : Réduction de l'oxygène à partir du NADPH.

Les électrons intervenant dans cette réduction sont tout d'abord transférés du NADPH au cofacteur FAD (flavine adénine dinucléotide) du domaine cytosolique des enzymes (**Figure 4**). Ces électrons sont ensuite transférés à des hèmes (autres cofacteurs) responsables de la réduction finale de l'oxygène en radical superoxyde, au niveau du cytosol ou de la matrice extracellulaire. Selon le type cellulaire, $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut être libéré de manière préférentielle vers l'extérieur (cellules phagocytaires) ou vers l'intérieur (cellules non phagocytaires) des cellules.

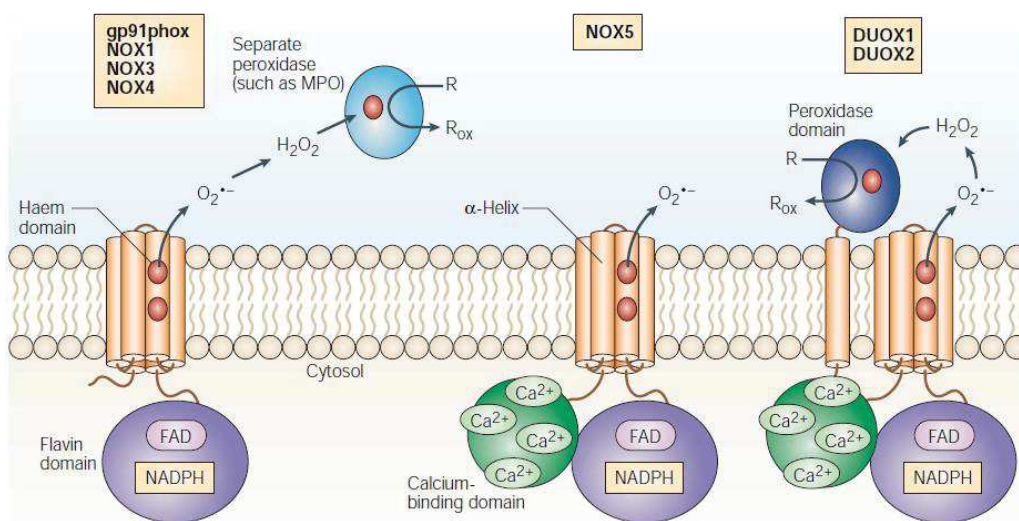


Figure 4 : Production du radical superoxyde par les NOX et DUOX.²⁰

Ces enzymes présentent ainsi une spécificité concernant la production d'EOR. Cela montre l'importance de la formation de ces espèces au niveau de la signalisation et de l'homéostasie cellulaire.

Enfin, chez les mammifères, la production du radical superoxyde peut s'effectuer par d'autres oxydoréductases :

- Les enzymes cytochromes P450 : *via* notamment la métabolisation de composés exogènes toxiques (xénobiotiques). Ces enzymes sont situées au niveau du réticulum endoplasmique des cellules principalement hépatiques.²¹
- La xanthine oxydase (XO) : cette enzyme intervient lors de la métabolisation de l'hypoxanthine (purine pouvant être formée lors de la dégradation de l'ADN ou l'ARN) en acide urique (**Schéma 10**). Elle est située principalement dans le foie.²²



Schéma 10 : Production du radical superoxyde par la xanthine oxydase.

- Les PGH synthase²³ (deux activités associées : cyclo-oxygénase (COX) et hydroperoxygénase) et lipoxygénase (LOX) :²⁴ interviennent dans l'oxydation des acides gras polyinsaturés.

Il est important de noter que parmi les EOR, le radical superoxyde possède une réactivité moins importante vis à vis des substrats bio-organiques. Il présente une toxicité indirecte, de par sa capacité à produire d'autres radicaux beaucoup plus réactifs comme le radical hydroperoxyde HO_2^{\bullet} (forme protonée de $O_2^{\bullet-}$), qui réagit notamment avec les acides gras polyinsaturés²⁵.

I.2.1.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle OH^{\bullet}

Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) peut être généré lors de la décomposition de l'acide peroxyntrique ($ONOOH$) (paragraphe 2.1.4.), ou à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier provient de la dismutation de $O_2^{\bullet-}$, sous sa forme perhydroxyle (HO_2^{\bullet}), favorisée donc en milieu acide, pouvant être soit catalysée par les superoxydes dismutases (SOD) (**Schéma 11, réaction a**), soit non catalysée. (**Schéma 11, réaction b**).

(a) Dismutation catalysée



(b) Dismutation non catalysée

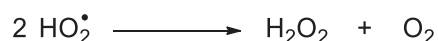


Schéma 11 : Deux voies de formation du peroxyde d'hydrogène.

La formation du radical hydroxyle OH^{\bullet} s'effectue ensuite selon la réaction d'Haber-Weiss,²⁶ faisant intervenir H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ et un métal de transition présent dans un état d'oxydoréduction lui permettant d'intervenir en tant que réducteur, comme le fer par exemple (**Schéma 12**). Cette

réaction bilan peut être décomposée en deux sous réactions, dont l'une correspond à la réaction de Fenton.²⁷ Dans ce cas, la présence du fer est indispensable à la formation du radical OH[•], puisque la réaction entre H₂O₂ et O₂^{•-} n'est pas thermodynamiquement favorisée.²⁸

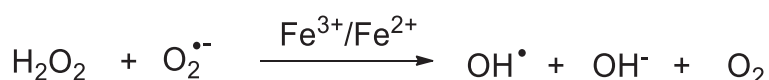
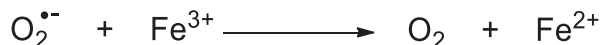


Schéma 12 : Formation du radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss.

La formation de OH[•] en milieu biologique est expliquée principalement par ce mécanisme. Cette formation peut aussi avoir lieu en présence de cuivre (**Schéma 13**), correspondant à une variation de la réaction de Fenton :



Schéma 13 : Formation du radical hydroxyle en présence de Cu⁺.

Cette réaction est assez rare puisque les ions Cu⁺ sont difficilement libérés au sein des cellules et du plasma ; en effet ils vont être chélatés par un grand nombre de protéines.¹⁴

Le radical OH[•] est l'espèce oxygénée la plus réactive, avec une demi-vie de l'ordre du milliardième de seconde, d'où sa non-spécificité vis à vis des cibles biologiques. Ainsi, dès et sur le lieu même de sa formation, il réagit avec n'importe quel substrat, tels que les protéines, acides nucléiques, lipides et les glucides, à l'origine de dommages cellulaires irréversibles.

I.2.1.3. Les hydroperoxydes RO₂H, les radicaux peroxydes RO₂[•] et alkoxydes RO[•]

Les alkylhydroperoxydes (RO₂H) et les radicaux alkylperoxydes (RO₂[•]) et alkoxydes (RO[•]) sont des EOR secondaires. Ils peuvent être formés à partir de radicaux alkyles (centrés sur le carbone, R[•]) provenant de substrats biologiques préalablement oxydés par OH[•] (**Schéma 14, réaction a**). Le radical alkylperoxyde RO₂[•] est formé en premier, par addition de l'oxygène sur R[•]

(Schéma 14, réaction b). S'en suit une étape de propagation aboutissant à la formation de RO_2H (Schéma 14, réaction c), qui est finalement transformé en radical RO^\bullet selon une réaction similaire à la réaction de Fenton (Schéma 14, réaction d).

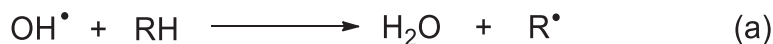


Schéma 14 : Formation des alkylhydroperoxydes RO_2H , radicaux alkylperoxydes RO_2^\bullet et alkoxydes RO^\bullet .

Ces radicaux sont impliqués dans la peroxydation lipidique, mécanisme mis en évidence dans de nombreuses pathologies. Les conséquences de ces derniers seront évoquées au paragraphe II.2.2. de ce chapitre.

I.2.1.4. Le radical monoxyde d'azote NO^\bullet

Le radical monoxyde d'azote (NO^\bullet) est obtenu par oxydation de la *L*-arginine en *L*-citrulline catalysée par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) en utilisant l'*NADPH* en tant que co-substrat (Schéma 15).

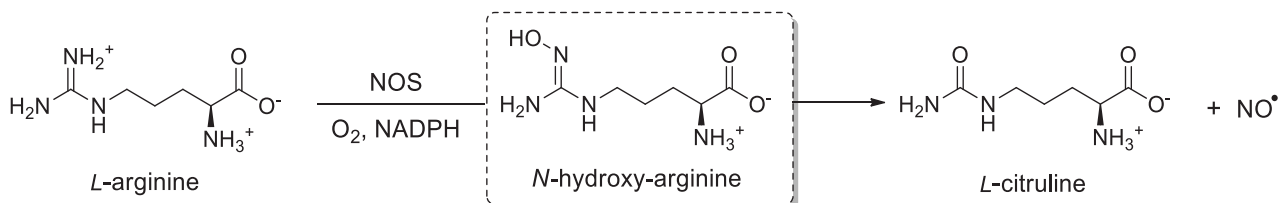


Schéma 15 : Formation radical monoxyde d'azote NO^\bullet .

Il existe trois isoformes de NOS :²⁹ Les NOS neuronales (nNOS), situées au niveau du système nerveux central et périphérique ; Les NOS inductibles (iNOS), d'abord mises en évidence dans les macrophages, et sont en fait présentes dans tous les types cellulaires ; les NOS endothéliales (eNOS), présentes au niveau de l'endothélium vasculaire, notamment, où elles régulent la pression artérielle (NO^\bullet est un vasorelaxant par action directe sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux).

Le NO[•] produit par les NOS, au sein de ces différents types cellulaires, intervient donc dans plusieurs mécanismes importants de régulation comme par exemple la neurotransmission, la régulation du tonus vasculaire ou de la transcription de gène, ou encore, la translation d'ARNm. Il peut présenter une toxicité aboutissant à l'altération de certains tissus, soit directement, soit après réaction avec le radical superoxyde et formation de peroxyne (ONOO⁻) (**Schéma 16, réaction a**).



Schéma 16 : Formation du radical dioxyde d'azote NO₂[•] et hydroxyle OH[•].

Le peroxyne (ONOO⁻) est très réactif et même doublement toxique :

- son électrophilie le rend capable de nitrosyler des amines, des sulfures ou des carbones nucléophiles d'acides aminés, de peptides ou de protéines, ou encore de nucléotides ou des acides nucléiques ;
- son pouvoir oxydant, vis à vis des lipides principalement, est décuplé en milieu acide puisqu'il conduit l'acide peroxyne (ONOOH) (**Schéma 16, réaction b**). Ce composé instable se décompose facilement en radical dioxyde d'azote (NO₂[•]) et OH[•] (**Schéma 16, réaction c**).

Les différentes fonctions biologiques de certaines EOR montrent l'importance de leur présence au sein de l'organisme, mettant en évidence leur rôle complexe, en fonction de leur proportion. En effet, elles peuvent avoir un rôle délétère de par leur importante réactivité, mais elles sont également indispensables à la régulation et à l'homéostasie cellulaire. Ainsi la balance oxydo-réductrice est équilibrée grâce à ces EOR lorsqu'elles sont formées en faible concentration, et sont alors capables d'activer les défenses cellulaires nécessaires à leur détoxification. Cependant leur production importante et incontrôlée entraîne un déséquilibre, aboutissant au stress oxydant. Plusieurs mécanismes ont été mis en place au sein de l'organisme afin de contrer leur surproduction : on parle de défenses antioxydantes.

Plusieurs méthodes de détection et de quantification des EOR existent *in vitro* et *in vivo*, permettant de mettre en évidence les EOR de manière générale (exemple: test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)) ou d'un radical spécifique comme l'ion superoxyde par exemple.³⁰

I.2.2. Les défenses antioxydantes : généralités

Les défenses antioxydantes ont un rôle primordial dans la balance rédox. En effet, elles réagissent contre les espèces pro-oxydantes (comme les EOR) soit de manière directe ou de manière indirecte. Les antioxydants sont définis comme étant "des substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat".³¹ L'importance relative des différents antioxydants dépend du type d'EOR formées, leur origine et du type de lésion engendrée.³²

Les antioxydants peuvent être de plusieurs natures :

- Les protéines (enzymatiques ou non enzymatiques) : elles correspondent aux antioxydants endogènes. Quelques exemples sont présentés dans le **Tableau 1**. Parmi elles, deux types d'enzymes antioxydantes permettent de transformer H₂O₂ en H₂O au sein d'une cellule : les catalases (**Schéma 17, réaction a**), et les glutathion peroxydases (**Schéma 17, réaction b**), où le glutathion (GSH = le co-substrat) est le réducteur et donc s'oxyde en G-S-S-G).

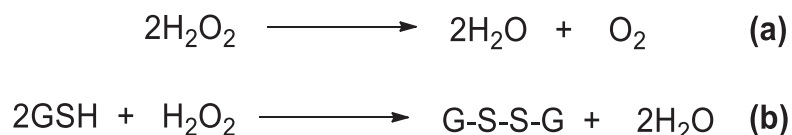


Schéma 17 : Transformation du peroxyde d'hydrogène en eau :
action de type (a) catalase et (b) glutathion peroxydase.

- Les molécules de faible poids moléculaire, pouvant être endogènes (glutathion, ubiquinones, bilirubine, acide urique), ou apportées par l'alimentation (Vitamines E et C, caroténoïdes, polyphénols). Ces "petites molécules" peuvent agir de façon directe, en piégeant les EOR, ou de façon indirecte, soit en tant que cofacteur des systèmes enzymatiques antioxydants, comme le glutathion, soit en activant les voies enzymatiques antioxydantes.

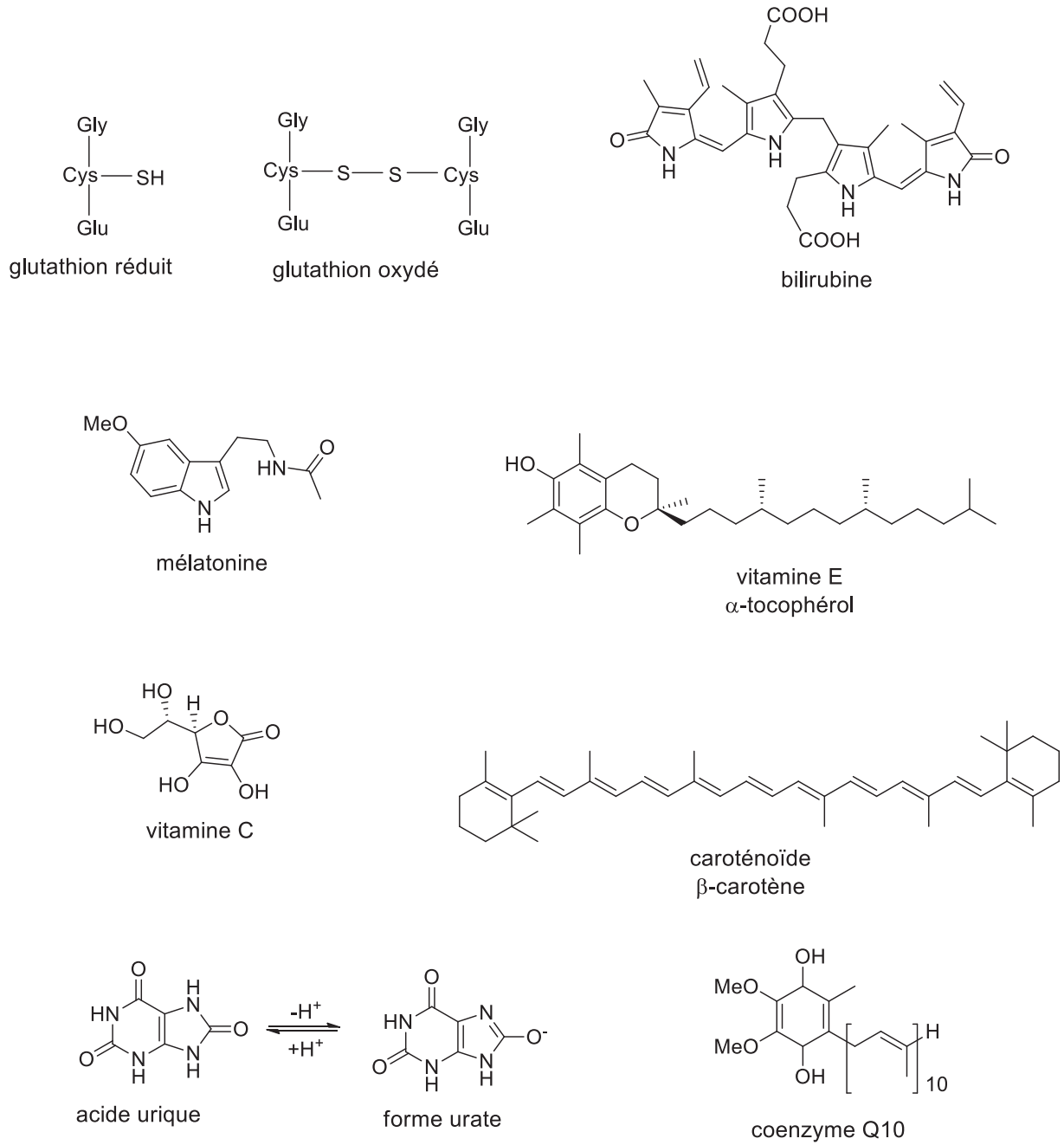


Figure 5 : Structures de quelques antioxydants de bas poids moléculaire.

Défenses antioxydantes présentes dans l'organisme

Systèmes protéiques	
Systèmes enzymatiques	
Superoxyde dismutase (SOD)	Métalloenzyme, découverte en 1968 par McCord et Fridovich, ³³ antioxydant majeur permettant la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (catalyse sa transformation en H_2O_2 : cf. paragraphe 2.1.2.). Chez les mammifères, il en existe 3 isoformes définies selon leur localisation : ³⁴ la Cu/Zn-SOD cytoplasmique (SOD1), la Mn-SOD mitochondriale (SOD2), et la Cu/Zn-SOD extracellulaire (SOD3).
Catalase (CAT)	Également appelée hydroperoxydase, cette enzyme est située essentiellement dans les peroxysomes. Elle permet de transformer H_2O_2 en H_2O et O_2 . Trois classes de protéines, différentes au niveau de leur séquence et de leur structure, présentent une activité de type catalase. ³⁵
Glutathion peroxydases (GPx)	Sélénoenzyme de type peroxydase (réduit non seulement H_2O_2 mais aussi les peroxydes lipidiques), découverte par Mills en 1957 dans les érythrocytes ³⁶ puis dans les tissus d'animaux, ³⁷ catalyse la réaction de réduction au dépend de son substrat spécifique, le glutathion réduit (cofacteur) transformé en glutathion oxydé. Il existe également la glutathion réductase (GR) permettant de régénérer le glutathion réduit à partir du glutathion oxydé. Les glutathion oxydoréductases existent sous 5 isoformes.
Système thiorédoxine	Dans le milieu intracellulaire, ce système permet de maintenir les protéines sous forme réduite grâce à l'intervention de la thiorédoxine. Cette dernière sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui est une sélénoprotéine. La TrxR permet également la régénération de la déhydroascorbate en ascorbate. ³⁸
Systèmes non enzymatiques	
Albumine	Présente dans le plasma, piège les cations Cu^+ permettant de limiter leurs potentiels dégâts oxydants. ³¹
Céruleplasmine	A travers son activité feroxydase en oxydant le Fe^{2+} en Fe^{3+} en réduisant simultanément O_2 en H_2O . Aucune espèce radicalaire réactive n'est libérée pendant cette réaction, car conservée en intégralité dans le site actif de la protéine.
Système non protéique (molécules de faible poids moléculaire)	
Sources endogène	
Glutathion	C'est un tripeptide (Glu-Cys-Gly), présent sous forme essentiellement réduite (fonction thiol -SH) dans le milieu intracellulaire (GSH). Il est capable de réagir <i>in vitro</i> avec les radicaux OH^{\bullet} , RO^{\bullet} et RO_2^{\bullet} , mais également avec le peroxyde d'azote ONOO^{\bullet} . Il participe à l'activité enzymatique des glutathion oxydoréductases en tant que cofacteur. Il est transformé en sa forme oxydé (GSSG) lors de son action antioxydante.
Coenzymes Q (ubiquinol)	Elles font partie, des antioxydants liposolubles limitant la peroxydation lipidique, mais également l'oxydation des protéines et de l'ADN. ³⁹

Système non protéique (molécules de faible poids moléculaire)	
Sources endogène	
Bilirubine	La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème. Elle est capable de piéger les radicaux RO ₂ • et l'oxygène singulet. Lorsqu'elle est liée à l'albumine ⁴⁰ elle réagit avec les radicaux O ₂ •, HO ₂ • et OH•.
Acide Urique	Il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH•, RO ₂ •, NOO•...). Les espèces radicalaires ainsi formées seront à leur tour réduites par la vitamine C notamment.
Sources exogènes (pouvant être apportées par l'alimentation)	
Vitamine E (tocophérol)	Grâce à son caractère lipophile, elle réagit efficacement avec le radical RO ₂ • et limite la peroxydation lipidique au sein des membranes cellulaires. Elle piège de manière efficace les radicaux libres et est utilisée en tant que conservateur (E306 et E309) pour éviter le rancissement des aliments. Elle existe sous 8 formes naturelles : 4 tocophérols (α, β, γ, δ) et 4 tocotriénols (α, β, γ, δ). L'α et le γ-tocophérols sont les plus intéressants d'un point de vue biologique. L'α-tocophérol est la forme la plus active chez l'homme (potentiel de rétention dans l'organisme plus élevé).
Vitamine C (acide ascorbique)	Certains animaux sont capables de la synthétiser mais ce n'est pas le cas de l'Homme. Elle piège les radicaux O ₂ •, HO ₂ • et OH•. Elle limite aussi la peroxydation lipidique indirectement <i>via</i> la régénération de la vitamine E à partir de sa forme oxydée radicalaire. Elle participe également à la régénération du glutathion réduit.
Caroténoïdes	Plus de 600 composés ont été isolés dans les sources naturelles. Certains présentent un potentiel antioxydant plus élevé comme par exemple le β-carotène (provitamine A), la lutéine et zéaxanthine (deux caroténoïdes xanthophylles). L'oxygène singulet peut être piégé par ces composés. Ils font aussi partie des antioxydants liposolubles limitant la peroxydation lipidique.
Les oligoéléments	Le sélénium, le cuivre (bien qu'il intervienne dans la réaction de Fenton) ou le zinc servent de cofacteur pour les enzymes antioxydantes (SOD, GPx).
Mélatonine	Elle permet une protection des mitochondries, pouvant limiter la progression et le développement de certaines pathologies neurodégénératives. ⁴¹ Synthétisée dans la rétine, elle est capable de limiter les dommages provenant d'un stress oxydant au sein de certaines cellules rétinienne. ⁵
Polyphénols	Le rôle antioxydant des polyphénols est décrit dans le paragraphe3.

Tableau 1 : Les principaux systèmes antioxydants.

Enfin, la **Figure 6** permet de résumer les différentes espèces pro et antioxydantes au sein d'une cellule, évoquées lors de ce chapitre.

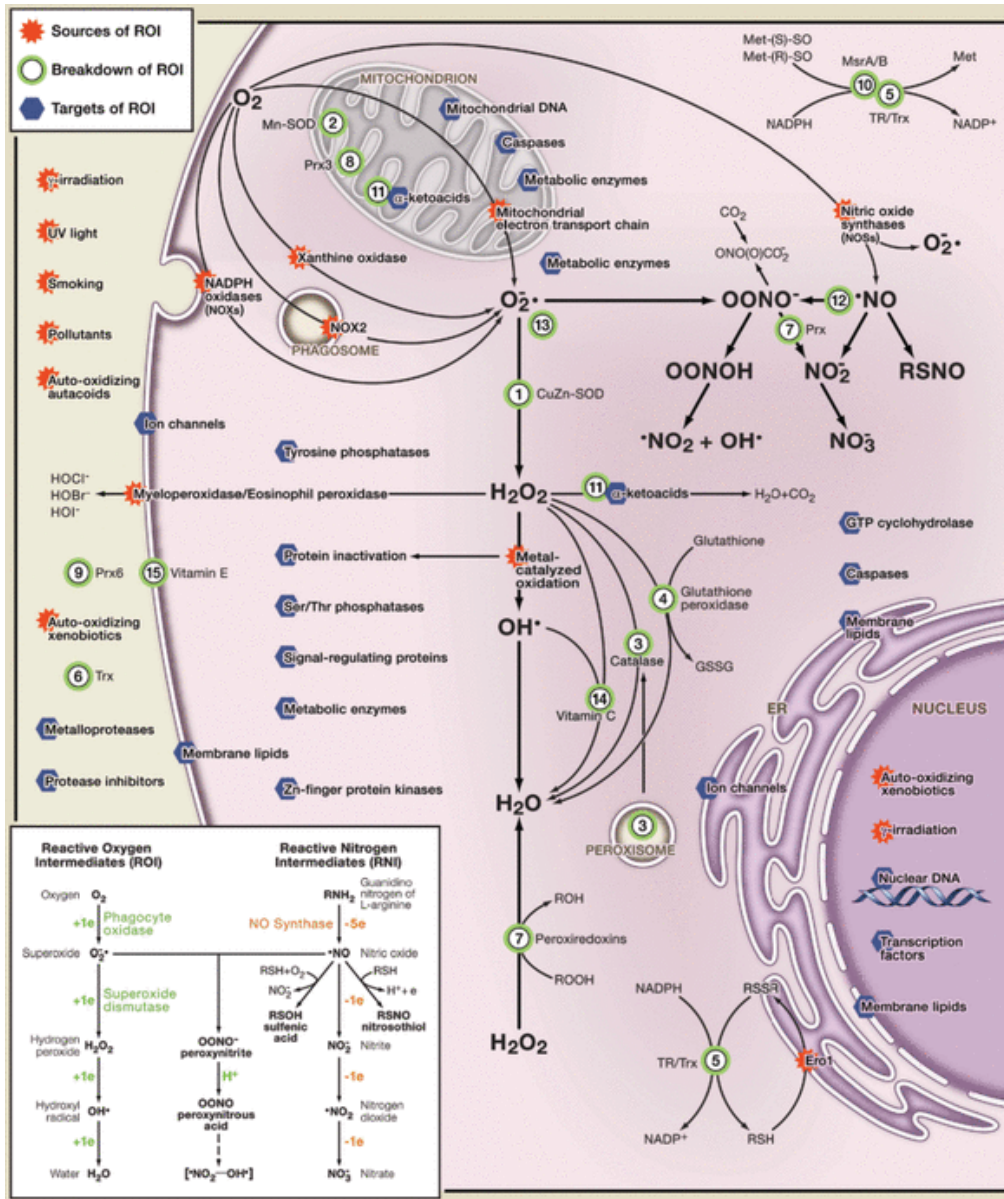


Figure 6 : Les espèces pro et antioxydantes au sein d'une cellule.¹⁵

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux polyphénols, composés de choix pour limiter le stress oxydant, et engendrer différents impacts positifs sur la santé.

I.3. Les défenses antioxydantes de type polyphénolique

I.3.1. Définition du terme "polyphénol" et classification

Plusieurs définitions existent pour le terme "polyphénol". Au sens chimique du terme, les polyphénols correspondent aux composés présentant plusieurs fonctions hydroxyles sur des noyaux aromatiques. Quelques exemples de composés sont illustrés dans la **Figure 7**, présentant pour la plupart au moins deux fonctions phénoliques.

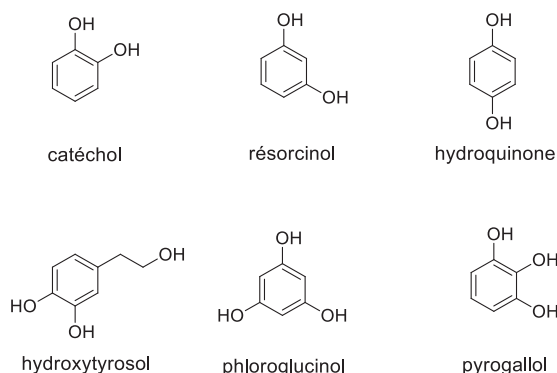


Figure 7 : Composés polyphénoliques simples.

Le terme de "polyphénol" est cependant réservé aux composés issus du métabolisme secondaire des plantes. Pourtant, le simple fait de posséder plusieurs fonctions phénoliques dans sa structure chimique ne fait pas d'une molécule un polyphénol. La morphine ou la papavérine par exemple (**Figure 8**), bien que pourvues de fonctions phénoliques, mais renfermant des azotes, appartiennent à la famille des alcaloïdes.

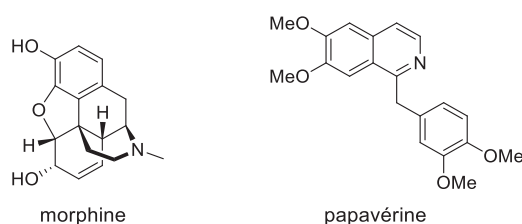


Figure 8 : Exemples de composés n'appartenant pas à la famille des polyphénols mais à celle des alcaloïdes.

Une classification basée sur la biogénèse des polyphénols au sein des plantes permet de les classer en différentes familles, en fonction des voies métaboliques (aromagenèse) dont elles proviennent. Plus spécifiquement, les polyphénols (issus des plantes) sont issus de deux voies métaboliques principales (**Schéma 18**) :⁴²

- la voie des polyacétates (voie de l'acide acétique) (**Schéma 18**, flèches rouges) : formant, entre autre, les acides orselliniques, les isocoumarines et les phlorotanins (oligomères du phloroglucinol).
- la voie shikimate (provenant de l'acide shikimique) (**Schéma 18**, flèches bleues) : conduisant, entre autre, aux acides cinnamiques et caféïques, aux coumarines, aux lignanes et aux acides phénoliques simples ;
- Une voie dite "mixte" existe également, correspondant à la combinaison des voies polyacétate et shikimate (**Schéma 18**, flèches violettes) et constitue la voie la plus productive en terme de polyphénols.⁴³ Elle permet la biosynthèse des flavonoïdes et des stilbénoides.

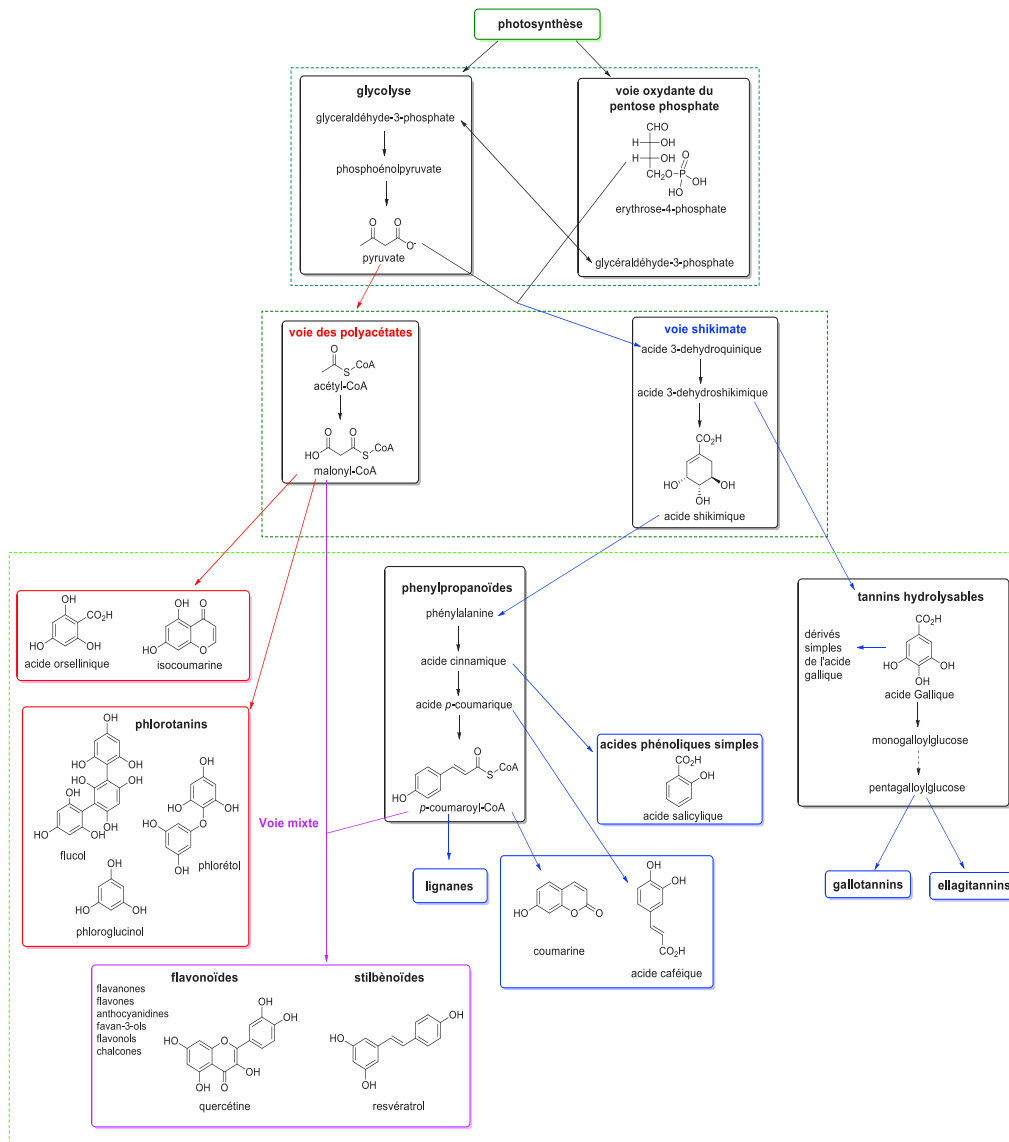


Schéma 18 : Biosynthèse des polyphénols au sein des végétaux.

Dans la nature, les polyphénols sont présents sous formes de conjugués (esters, éther glycosides ou polymérique), plus communément liés à des sucres (poly ou monosaccharides, le terme d'aglycone est ainsi utilisé pour désigner les polyphénols sous cette forme), mais peuvent être également liés à des acides carboxyliques, des amines ou des lipides. Ces liaisons sont présentes au niveau des groupements hydroxyles, ou moins communément directement sur le cycle aromatique.⁴⁴

Quideau *et al.*⁴³ donnent une définition plus restrictive pour le terme "polyphénol" : ce dernier devrait être utilisé pour les métabolites secondaires de plantes issus de la voie des polyacétates, du shikimate ou de la voie dite "mixte"(polyacétates + shikimate), et comportant au moins deux noyaux phénoliques et dépourvu de toutes fonctions azotées dans leur structure." D'après cette définition, certains dérivés phénoliques simples (**Figure 7**) ne devraient pas être considérés comme des "polyphénols". Le phloroglucinol, par exemple, ne possédant qu'un seul cycle aromatique ne serait pas considéré comme polyphénolique. Il peut cependant être présent sous forme monomérique ou oligomérique pour conduire aux phlorotanins, à partir de certaines algues brunes (par exemple *Cystophora retroflexa*).⁴⁵ Il est issu de la voie des polyacétates et sera considéré comme un "polyphénol" dans ce manuscrit.

Les polyphénols sont ubiquitaires dans les plantes même si leur distribution n'est pas uniforme. Ils possèdent plusieurs fonctions physiologiques importantes dans ces dernières, au niveau structural notamment mais également au niveau de la croissance, du développement, de la pigmentation et de la pollinisation. Ils interviennent dans la résistance de la plante face à des agents pathogènes et aux parasites comme les insectes. En outre, de par leur structure chimique, ils présentent des fonctions de protection contre l'irradiation solaire (protection de l'ADN contre les UV), en absorbant l'énergie associée grâce à la présence de leur chromophore (cycle phénolique).⁴³

I.3.2. Activité antioxydante des polyphénols

Leur action antioxydante est liée à leur capacité à limiter des radicaux libres (EOR et dérivés), elle peut être menée de manière directe (par piégeage) ou indirecte (par activation de voie enzymatique).⁴³

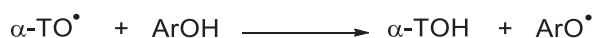
I.3.2.1. Action antioxydante directe des polyphénols

Les polyphénols peuvent arrêter la chaîne d'oxydation initiée par des radicaux libres R^\bullet par un simple piégeage. Deux types de mécanismes de désactivation ont été proposés (**Tableau 2**). Le premier correspond à un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT, hydrogen-atom transfer), conditionné par l'enthalpie de dissociation de liaison (BDE, Bound dissociation enthalpy), où le dérivé polyphénolique $ArOH$ devient à son tour un radical ArO^\bullet . Ce dernier, stabilisé par mésomérie, est beaucoup moins réactif que le radical de départ. Le second mécanisme est un transfert monoélectronique (SET, single electron transfer) conditionné par le potentiel d'ionisation (IP) du polyphénol, $ArOH$ devenant $ArOH^{+\bullet}$. La fréquence relative des deux mécanismes dépend du composé polyphénolique engagé dans cette réaction de terminaison.

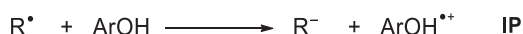
H-atom transfer



Antioxydants intervenant par HAT	Commentaires
catéchol (Figure 7)	
pyrogallol (Figure 7)	Les liaisons hydrogènes (intramoléculaires) formées entre hydroxyles adjacents diminuent la BDE de la liaison -OH phénolique. ⁴⁶
hydroxytyrosol (Figure 7)	
acide caféique (Schéma 18)	
acide gallique (Schéma 18)	
α -tocophérol (Figure 5)	Efficace contre la peroxydation lipidique (bloque la propagation du radical LOO^\bullet). ⁴⁷ Peut intervenir lors d'un effet synergique en étant régénéré par le polyphénol.



Single-electron transfer



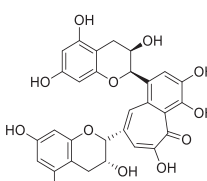
Antioxydant intervenant par SET	Commentaires
théaflavine (issue du thé noir)	
	Le radical formé $ArOH^{+\bullet}$ se déprotonne rapidement pour donner un radical neutre stabilisé par mésomérie. ⁴³

Tableau 2 : Mécanismes possibles de désactivation des radicaux libres par les polyphénols.

Les valeurs des BDE et IP intervenant dans ce mécanisme antioxydant sont obtenues grâce à des méthodes de calcul issues de la modélisation moléculaire. Les mécanismes HAT ou SET antioxydant mis en évidence pour les polyphénols sont donc supposés. Le type de mécanisme intervenant est très dépendant de la polarité et du pH du milieu.

Cependant, deux actions, anti ou pro-oxydantes, peuvent être décrites en présence d'ion métallique. Par exemple, certains flavonoïdes possèdent une activité antioxydante pouvant être expliquée en partie par leur capacité à chélater les ions métalliques Cu^{2+} et Fe^{2+} permettant ainsi leur désactivation et donc la limitation de la réaction de Fenton. En revanche, il a été montré que les composés comportant un motif catéchol ou pyrogallol peuvent devenir pro-oxydants *via* la réduction de certains ions métalliques, comme le Cu^{2+} ou le Fe^{3+} .⁴³ Les cations Cu^+ et Fe^{2+} ainsi formés vont conduire à la formation de OH^\bullet à partir H_2O_2 (réaction de Fenton), causant des dommages cellulaires importants. De plus, les composés polyphénoliques issus de cette oxydation (semiquinone et quinone), électrophiles, peuvent s'avérer cytotoxiques.⁴⁸

1.3.2.2. Biodisponibilité et action potentielle des polyphénols au sein de l'organisme après ingestion

L'efficacité "antioxydante" des polyphénols diffère selon leur absorption dans l'organisme. Lorsque les polyphénols sont ingérés, leur action potentielle au sein de l'organisme dépend de leur biodisponibilité. Au niveau du tractus gastro-intestinal les polyphénols peuvent s'accumuler en forte concentration et protéger notamment les acides gras polyinsaturés de l'oxydation avant absorption⁴⁹ (**Schéma 19**). Néanmoins, la concentration plasmatique en polyphénols atteinte après ingestion est en générale faible. Ceci est dû à une résorption limitée au sein du système digestif, et à leur catabolisme important. Leur biodisponibilité est donc assez restreinte. Il apparaît donc peu probable que les bénéfices d'une alimentation riche en polyphénols ne reposent que sur leur capacité à piéger les radicaux libres R^\bullet . Il a également été suggéré que leurs effets bénéfiques au sein de l'organisme serait liés à l'action de leurs métabolites, obtenus par transformation dans l'intestin grêle ou dans les cellules hépatiques (dérivés glucuronides, sulfates, sulfoglucuronides, éthers méthyliques) ou par la microflore colique.⁵⁰ Les conjugués obtenus

passent dans la circulation générale *via* une interaction avec la sérum-albumine jouant le rôle de transporteur au sein des tissus, dans lesquels ils seront finalement absorbés pour exercer leurs activités antioxydantes (**Schéma 19**).

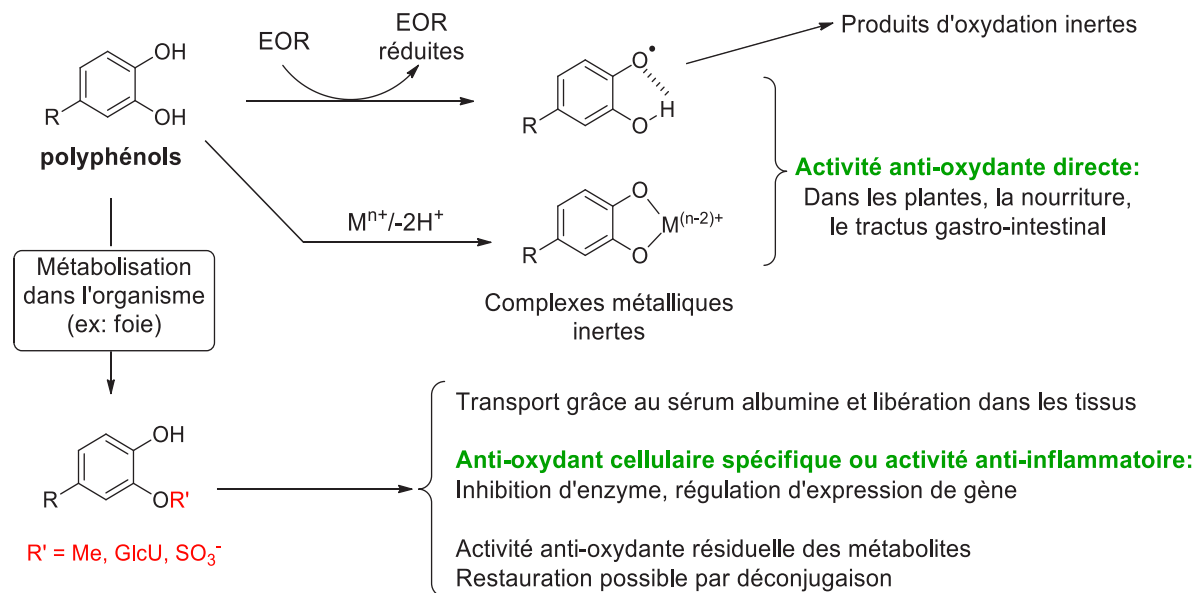


Schéma 19 : Bioactivités potentielles des polyphénols de type catéchol non métabolisés et métabolisés.⁵¹

I.3.2.3. Action antioxydante indirecte des polyphénols

L'action indirecte des polyphénols peut être liée à leur interaction et/ou activation des enzymes intervenant dans la balance rédox.

Certains flavonoïdes peuvent, par exemple, désactiver des enzymes pro-oxydantes, comme la xanthine oxydase ou la NADPH oxydase⁵² responsables de la production du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$.

Les polyphénols peuvent induire la formation de protéines cytoprotectrices antioxydantes. Cette induction est régulée au niveau transcriptionnel par trois composés cellulaires : l'élément de réponse antioxydante⁵³(ARE), le facteur de transcription nucléaire Nrf2 (NF-E2-related factor 2 en anglais) et la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1 en anglais). Ils constituent la voie de régulation Keap1/Nrf2/ARE activant les défenses antioxydantes de la cellule (**Schéma 20**).

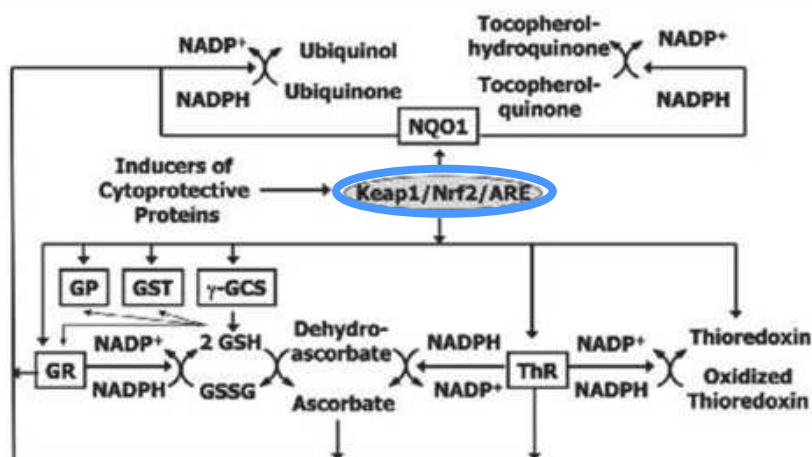


Schéma 20 : Exemples de protéines antioxydantes produites grâce à l'activation de la voie Keap1/Nrf2/ARE.⁵⁴

Le mécanisme d'activation de la voie Keap1/Nrf2/ARE par les dérivés polyphénoliques repose sur leur oxydation (dans le cas d'un stress oxydant "limité") en dérivés quinones (**Schéma 21**). En tant qu'accepteur de Michaël, les dérivés quinoniques vont soit réagir avec les fonctions thiol de Keap1 (**Schéma 21**, flèche verte), soit effectuer une oxydation de ces fonctions aboutissant à la formation de ponts disulfures (**Schéma 21**, flèche bleue). Ces deux transformations chimiques vont induire des modifications conformationnelles de Keap1 aboutissant à la libération du facteur de transcription Nrf2. Ce dernier est ensuite transloqué au noyau et active l'élément de réponse électrophile, anciennement antioxydant (ARE), et déclenche l'expression des gènes codant pour la panoplie d'enzymes antioxydantes qu'il contient (une centaine, environ), comme la NQO1 (NADPH Quinone Oxydoréductase), la glutathion S-transférase (GST) ou la thiorédoxine réductase (TrxR) (**Schéma 21**). Ainsi le "nucleophilic tone" est-il maintenu, correspondant à un niveau de protection des cellules/tissus/organes, et même de l'organisme, contre des électrophiles (radicaux libres, oxydants et aldéhydes réactifs) grâce à la présence de nucléophiles (glutathion, thiorédoxine,...) régénérés par la voie Keap1/Nrf2/ARE. Cette action des polyphénols peut être qualifiée de "para-hormèse" correspondant à un processus par lequel des composés électrophiles (dans ce cas, les quinones) non toxiques présents en faibles proportions maintiennent un système adapté de défense. Cette réponse similaire au principe de l'hormèse (partie I, chapitre I, I.1.) ne nécessite pas d'activation ou d'initiation par un stress.⁵³

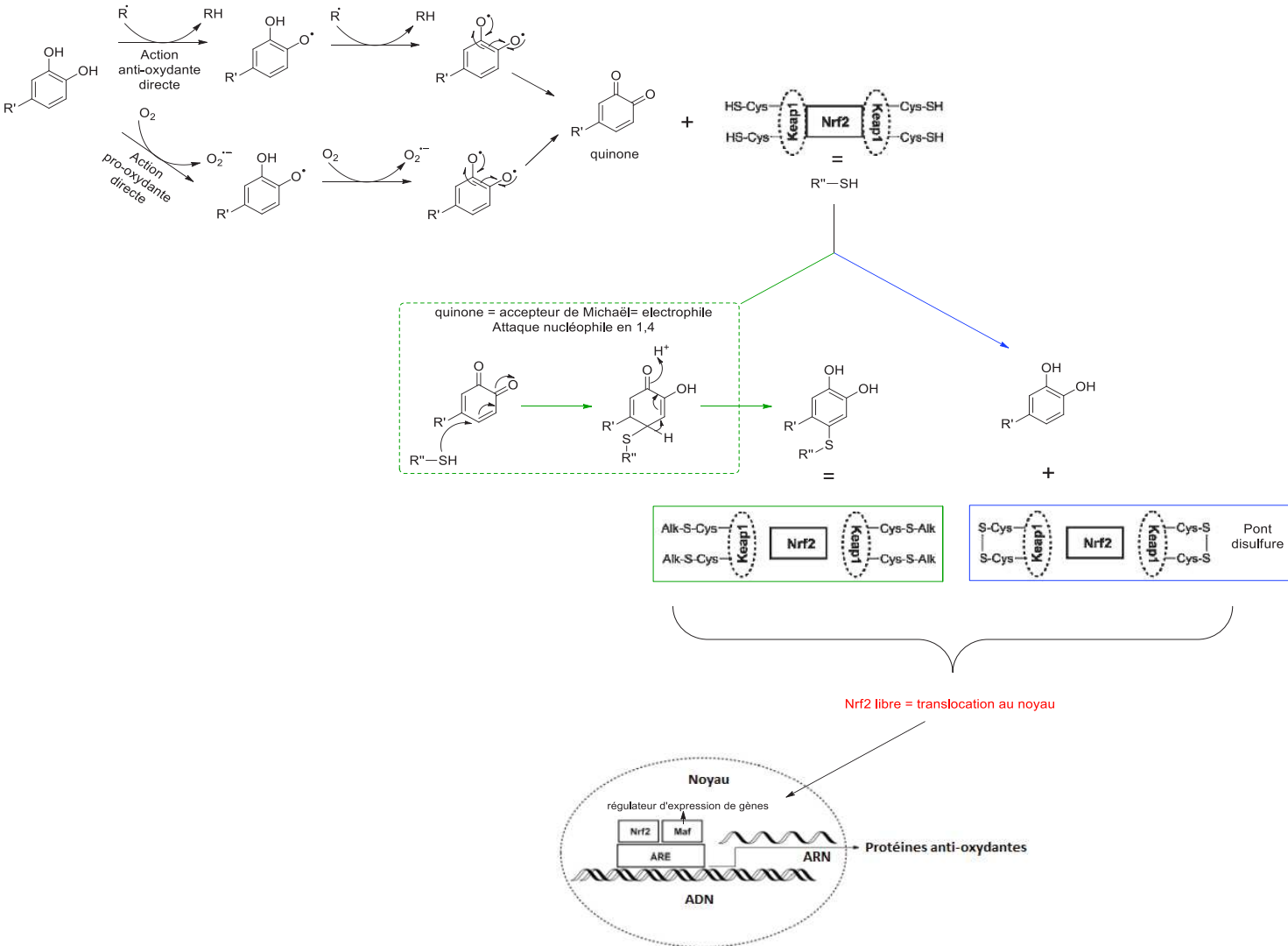


Schéma 21 : Activation de la voie Keap1/Nrf2/ARE par les polyphénols.

II. Le stress carbonylé

II.1. Les stressseurs carbonylés

Les composés carbonylés (**Figure 9**) peuvent provenir de source endogène ou exogène et sont largement présents au sein d'un organisme. Ils peuvent avoir, comme pour les EOR, un rôle délétère comme bénéfique, en respectant aussi ici le concept d'équilibre de la balance pro- et anti-stress carbonylé (à l'état basal). En effet, ils peuvent être indispensables en tant que molécules de signalisation contrôlant les défenses cellulaires, comme pour le cas des globules blancs phagocytaires qui les utilisent pour lutter contre des agents pathogènes.⁵⁵ A l'inverse, leurs productions ou accumulations en proportions anormales peuvent entraîner le développement de certaines pathologies (cancer, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson). Ils réagissent avec des composés cellulaires nucléophiles, et entraînent ainsi leur dénaturation et leur dysfonctionnement. Les origines des ECR détectées *in vivo* sont diverses (**Tableau 3, Figure 9**) : elles peuvent s'accumuler dans l'organisme suite à une alimentation ou à une exposition à des ECR exogènes (cigarette, produit chimique, fumée, ...). Elles peuvent être endogènes, formées de manière non enzymatique (peroxydation lipidique, glycation, glycoxydation, oxydation des acides aminés (AA) ou enzymatique (voie des polyols, glycolyse)(**Tableau 3**),⁵⁵ mais, sont parfois la conséquence d'un stress oxydant important comme par exemple dans le cas de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) (**Tableau 3**).

Sources	Sources enzymatiques			Sources non enzymatiques	
	Glycolyse	Voie polyol	Oxydation d'AA	Glycation	Peroxydation lipidique
ECR	acétaldéhyde méthylglyoxal (MG)	3-déoxyglucosone	glyoxal (GO) MG acroléine glycolaldéhyde	GO MG glucosone 3-déoxyglucosone acroléine	malondialdéhyde (MDA) 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) MG acroléine crotonaldéhyde

Tableau 3 : les ECR présents *in vivo*.

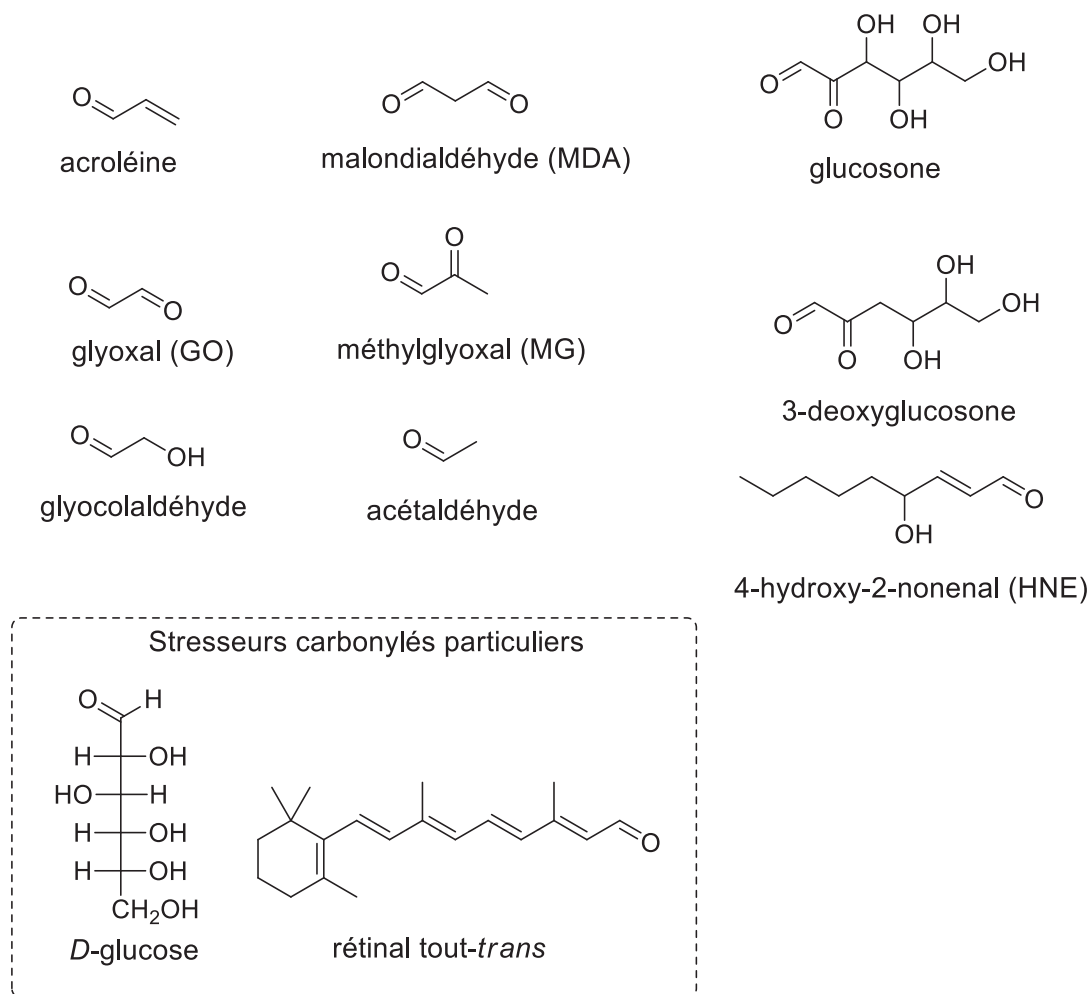


Figure 9 : les ECR présents *in vivo*.

La dénaturation (alkylation) des composés biologiques après réaction avec les ECR, souvent qualifiée de « glycation », même si le stressor carbonylé n'est pas un sucre, correspond au "stress carbonylé".

II.2. Relation entre stress oxydant et carbonylé

II.2.1. Le stress carbonylé provenant du glucose

Le "stress carbonylé" correspond à l'attaque d'un nucléophile sur un composé électrophile carbonylé, appelé "espèce carbonylée réactive" (ECR). La réaction de Maillard⁵⁶ (**Schéma 22**) est un bon exemple de réaction de "stress carbonylé" entre le glucose (ECR, dans sa forme ouverte, linéaire) et une fonction amine nucléophile (d'une protéine, par exemple). Connue depuis 1912, mais élucidée seulement en 1953,⁵⁷ elle survient durant la cuisson, le brunissement des aliments à température élevée (à partir de 100-115°C) en est la manifestation la plus visible. On le sait depuis

moins longtemps, mais elle survient aussi, dans l'organisme, à la température du corps.⁵⁸ La première étape de cette réaction est la "condensation de Maillard", aboutissant à une imine par déshydratation). Cette base de Schiff est en équilibre avec l'énamine (prototropie [1,3]). Du fait qu'on est en série "sucrée", la présence d'un hydroxyle sur le carbone 2, fait que cette énamine est aussi un énol, qui lui est en équilibre très favorable avec la cétone (nouvelle prototropie [1,3]). L'amino-cétone formée correspond au produit dit du "réarrangement d'Amadori". Il est beaucoup plus stable que la base de Schiff et la liaison du sucre à la protéine est quasi définitive : c'est le point de départ à ce qu'on appelle les "AGE", en anglais (pour "advanced glycation endproducts"), ex. : la pentosidine.

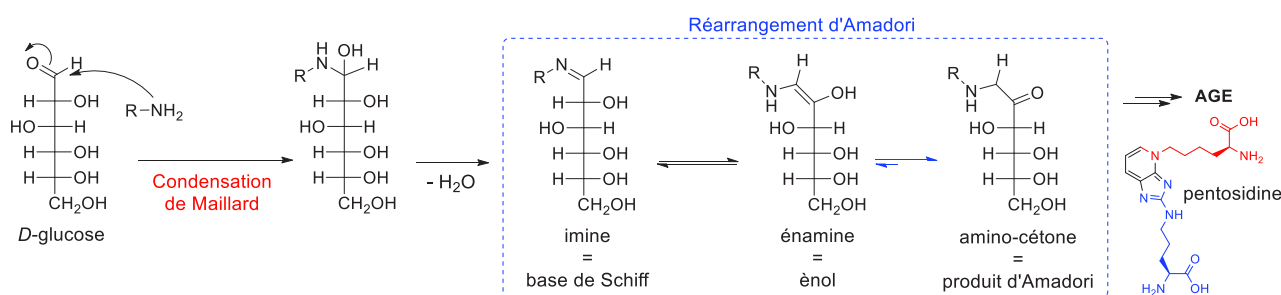


Schéma 22 : Formation de l'amino-cétone à partir de l'adduit de Maillard.

Le glucose (Glc) est donc souvent impliqué dans des réactions de "glycation" (des protéines enzymatiques ou de structure, des fibres de la matrice extra cellulaire, etc). Selon la théorie HSAB (Hard and Soft Acides and Bases),⁵⁹ c'est un électrophile « mou » (= soft), qui peut donc être un stresseur carbonylé efficace pour des fonctions nucléophiles de mollesse/dureté comparable (amines, thiols, ...). Dans le cas des sucres "réducteurs", comme le glucose, le stress carbonylé est souvent accompagné d'un stress oxydant. Le sucre, libre ou engagé dans des adduits de Maillard (base de Schiff, produits d'Amadori), peut subir une réaction de "glycoxydation". Par exemple, l'oxydation par l'oxygène du produit d'Amadori (**Schéma 23**, voie a) fournit l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ (EOR), tout en devenant une glucosone. Une glucosone peut également se former, sans glycoxydation, par simples énoisations (**Schéma 23**, voie b). Ces glucosones, composés α -dicarbonylés, électrophiles ("stresseurs carbonylés") beaucoup plus puissants que le sucre de départ, vont favoriser la formation des AGE.

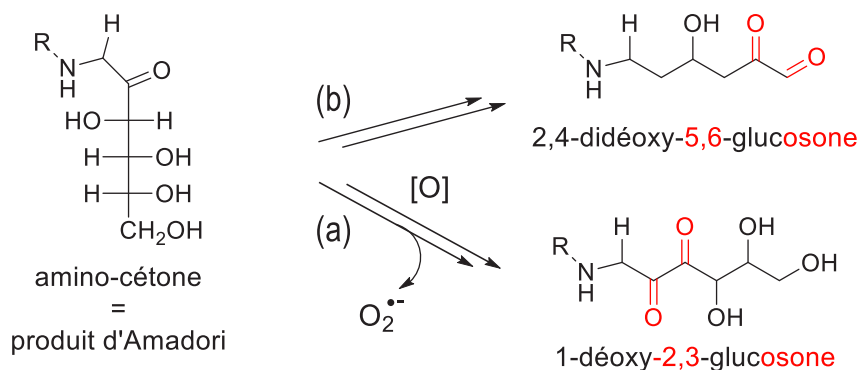


Schéma 23 : Formation d'ECR, les glucosones à partir du produit d'Amadori.

Les stress oxydant et carbonylé sont donc liés. Ainsi l'augmentation de la production des ECR est une conséquence du stress oxydant, et l'augmentation de la production des EOR peut résulter du stress carbonylé. Un cercle vicieux est alors présent, dans lequel les stress oxydant et carbonylé sont indissociables.

Finalement, ces réactions de glycation et glycoxydation conduisent à des dégâts irréversibles *via* la modification des fonctions des protéines entraînant leur dénaturation et affectant l'intégrité cellulaire. Les dérivés protéiques ainsi obtenus sont des AGE.⁶⁰ Ils s'accumulent et forment des produits de couplage par des réactions inter et intra-protéiques (**Schéma 24**), et peuvent également être responsables de la production d'EOR.⁶¹

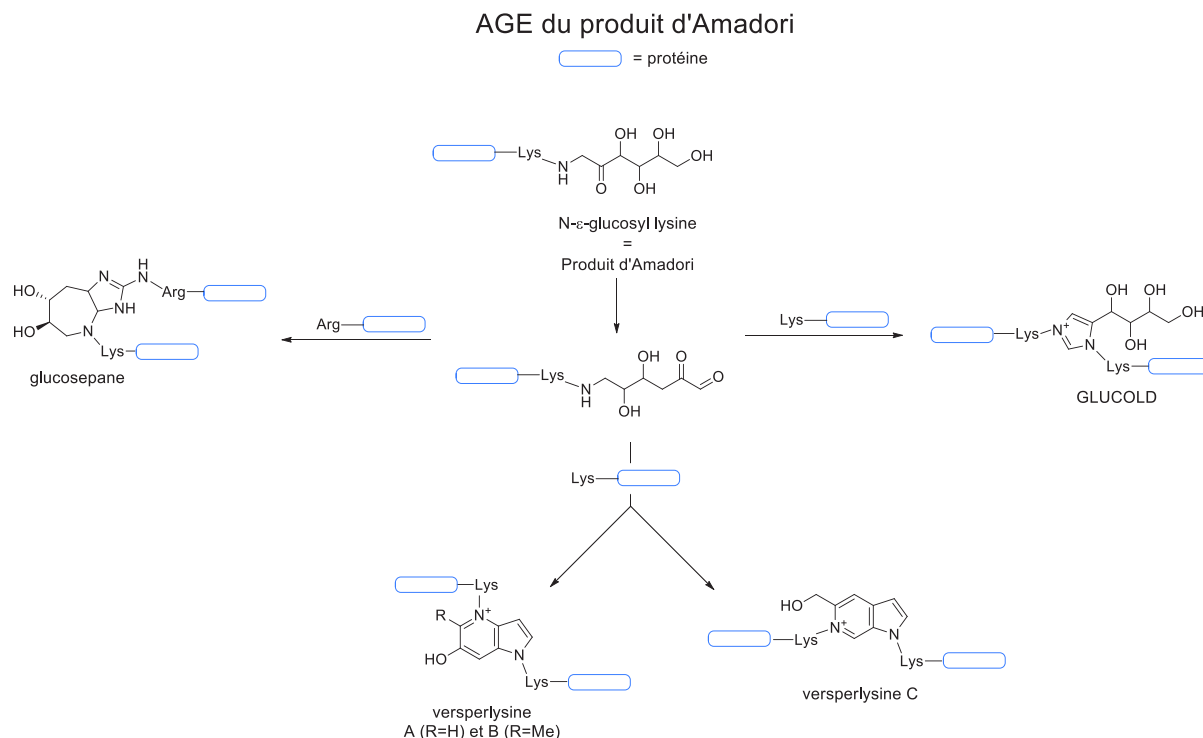


Schéma 24 : Voies de formation *in vivo* des AGE (advanced glycation endproducts) provenant du produit d'Amadori.

II.2.2. Le stress carbonylé provenant de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un mécanisme pouvant intervenir au sein des membranes des cellules, à travers une oxydation des phospholipides. Une dénaturation des membranes caractérisée par une perte de fluidité par exemple est possible suite à ce mécanisme.⁶² Il peut également entraîner une perte d'intégrité cellulaire de par l'importante formation de dérivés délétères provenant de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI). Ces composés toxiques formés correspondent à des ECR, pouvant réagir notamment sur les protéines et l'ADN. Ainsi, la peroxydation lipidique peut être associée à l'étiologie de certaines pathologies neurodégénératives tels que la maladie d'Alzheimer⁶³ ou de Parkinson.⁶⁴

A titre d'exemple, les AGPI oméga-3 (ω 3) et 6 (ω 6) (**Figure 10**) sont particulièrement sensibles à l'oxydation. Ils sont constitués de longues chaînes carbonées (de C18 à 22 atomes de carbone) comportant des motifs pentadiényles ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$). La position dite "bis-allylique" correspond au $-\text{CH}_2-$ (cercles rouges, **Figure 10**). La sensibilité d'un AGPI à l'oxydation est liée à son nombre de positions bis-allyliques oxydables. L'acide α -linoléique (ALA, C18:3), l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5) appartiennent à la

famille des AGPI oméga-3, tandis que l'acide linoléique (LA, C18 :2) et l'acide arachidonique (Ara, C20:4) sont des AGPI oméga-6. Ils sont oxydables au vue du nombre de positions *bis*-allyliques qu'ils présentent (de 1 pour le LA à 5 pour le DHA).

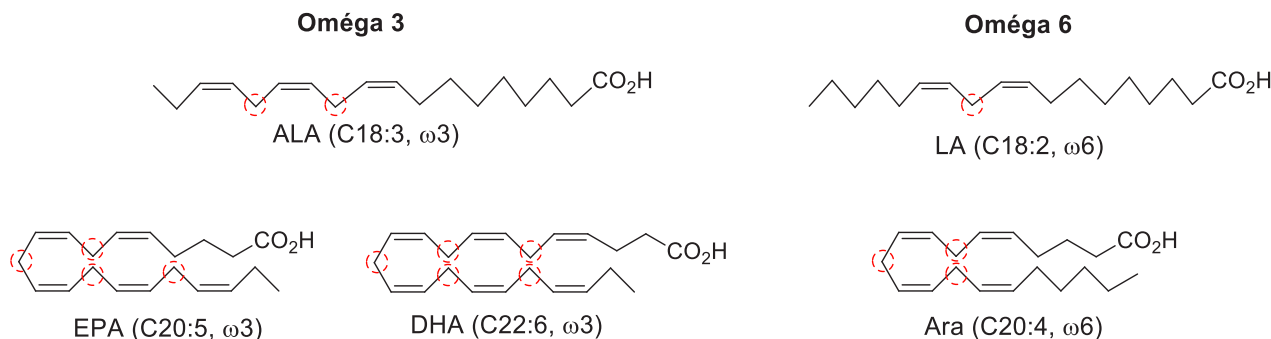


Figure 10 : AGPI oméga-3 : l'acide α -linoléique (ALA, C18:3), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) ; et AGPI oméga-6 : l'acide linoléique (LA, C18 :2).

En effet, la première étape de la peroxydation des AGPI au sein des membranes correspond à l'abstraction d'hydrogène en position *bis*-allylique par un radical R^\bullet (**Schéma 25**), suivi de la formation d'un radical peroxyde en présence d'oxygène et d'une étape de propagation formant une chaîne de peroxydation lipidique.

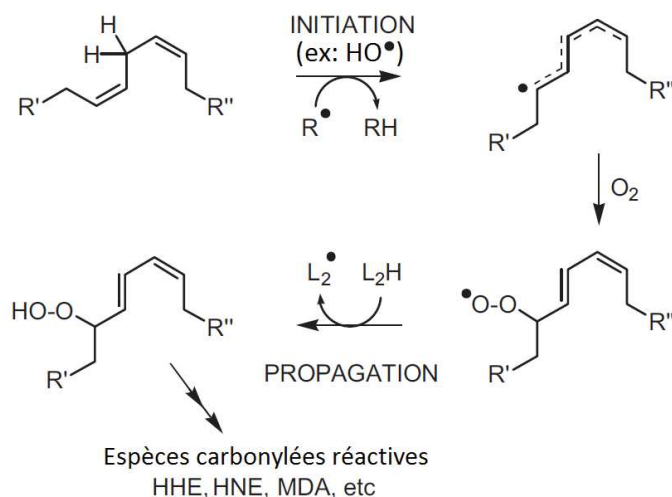


Schéma 25 : Les premières étapes de la peroxydation lipidique.^{7a}

Le terme d'ALE (advanced lipoxidation endproducts) est utilisé pour caractériser une variété d'adduits, générés lors de la formation d'ECR issus de la peroxydation lipidique et réagissant sur les sites nucléophiles des macromolécules comme les protéines, l'ADN et les

aminophospholipides (entraînant ainsi des modifications irréversibles).⁶⁰ Les ALE les plus étudiés sont formés à partir des ECR et des résidus nucléophiles des protéines (principalement les résidus cystéine, lysine, histidine et arginine). Ces ECR provenant de la peroxydation lipidique peuvent être divisées en trois classes (**Schéma 26**) :

- les aldéhydes α,β -insaturés : le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), le 4-hydroxy-2-hexenal (HHE), le nonenal, l'acroléine (ACR) ;
- Les dialdéhydes : malondialdéhyde (MDA), glyoxal (GO) ;
- Les cétoaldéhydes : méthylglyoxal (MG), 4-oxo-nonenal (ONE) et les isocétals également appelés isolévuglandines tels que la isoLGD₂ (provenant de la voie "isoprostane" d'oxydation de l'acide arachidonique).

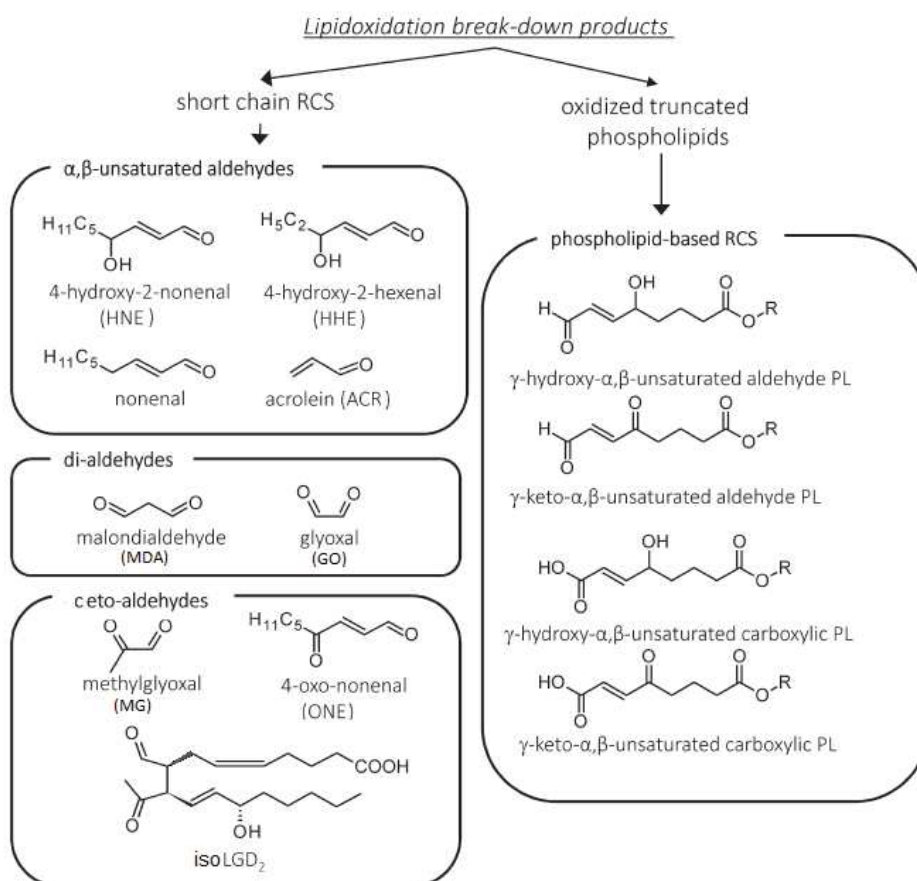


Schéma 26 : Structure des ECR provenant de la peroxydation lipidique.⁶⁰

Le glyoxal et le méthylglyoxal ainsi formés par la peroxydation lipidique des AGPI vont conduire à la formation d'ALE⁶⁰ (**Schéma 27**), correspondant à des couplages protéine-protéine, responsables de leur agrégation et leur dénaturation.

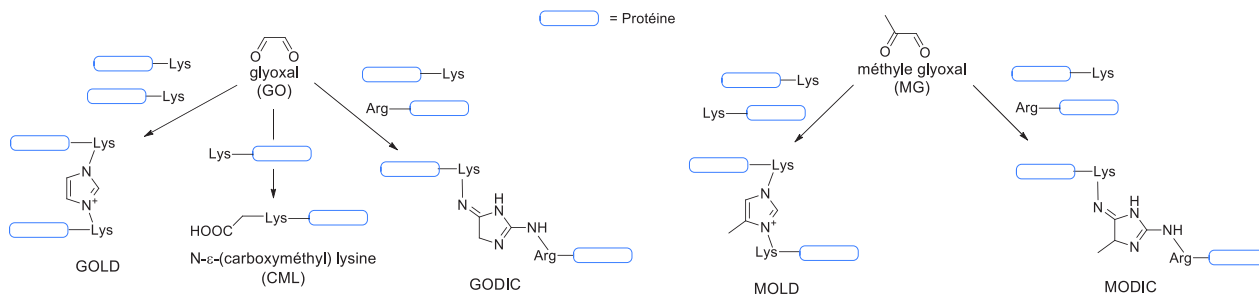


Schéma 27 : Voies de formation *in vivo* des ALE à partir des ECR : GO et MG.

Il a été rapporté que la nature des ALE provenant des aldéhydes α,β -insaturés, comme par exemple le HNE, dépendait du type de réaction mise en jeu (**Schéma 28**). En effet, l'amine du résidu lysine réagit pour former une base de Schiff, tandis que d'autres nucléophiles réagissent selon une addition 1,4 de Micaël. Des modifications irréversibles des substrats biologiques sont ainsi engendrées, entraînant leur dénaturation et expliquant la cytotoxicité décrite du HNE.⁶⁵

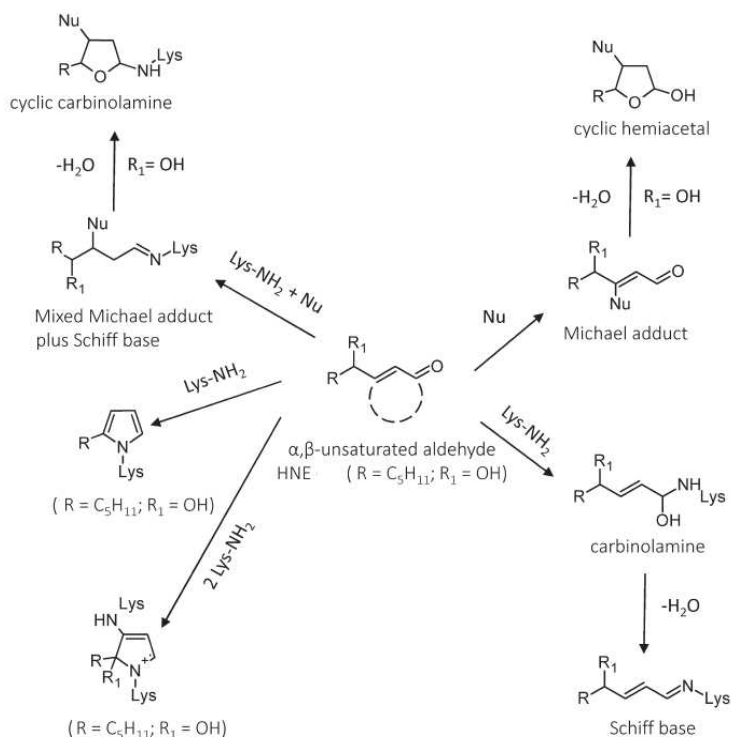


Schéma 28 : Voies de formation *in vivo* des ALE à partir de l'aldéhyde α,β -insaturé : le HNE provenant de la peroxydation lipidique des AGPI oméga-6.⁶⁰

Plusieurs mécanismes de formation du HNE⁶⁵ sont possibles à partir des AGPI oméga-6 et sont transposables à l'oxydation des AGPI oméga-3 (**Schéma 29**).

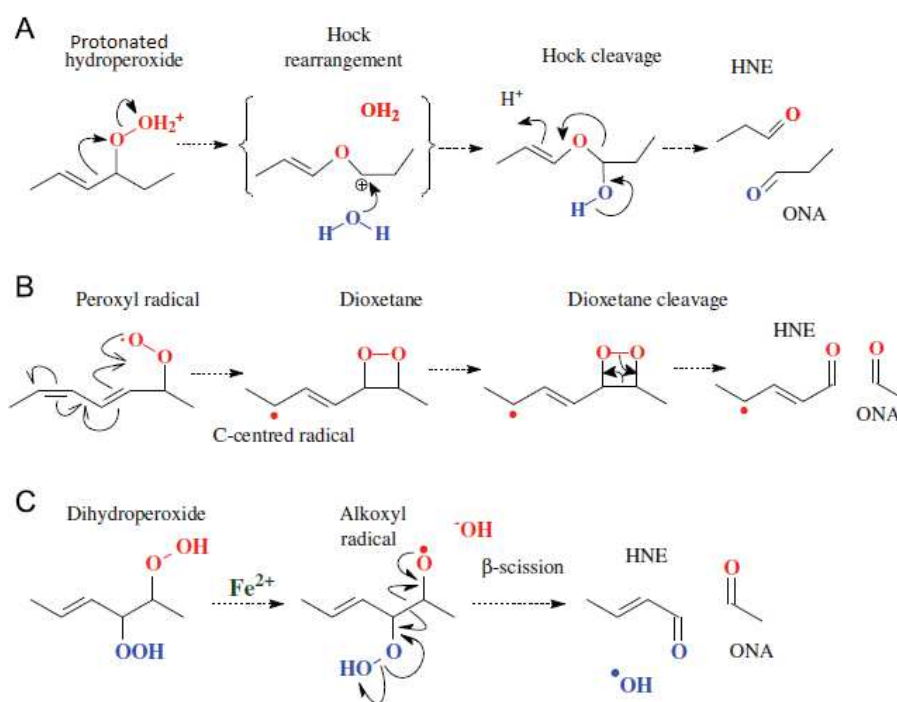


Schéma 29 : Mécanismes possible de formation du HNE à partir d'AGPI oxydés.⁶⁵

Les voies A, B et C du **Schéma 29** correspondent aux étapes pouvant intervenir dans la formation du dérivé HNE. La voie A est associée à un réarrangement de Hock en présence de l'hydroperoxyde protoné, suivie d'une attaque par une molécule d'eau et d'un clivage de Hock. La voie B fait intervenir un intermédiaire dioxétane provenant du radical peroxyde, et conduisant au dérivé HNE après clivage. Au niveau de la voie C, un dihydroperoxyde est transformé en radical alkoxy en présence de Fe^{2+} , similairement à la réaction de Fenton, suivi d'une réaction de β -scission.

Ces différents mécanismes peuvent, par exemple, justifier la formation d'HNE et de différentes ECR après peroxydation lipidique du LA (**Schéma 30**).

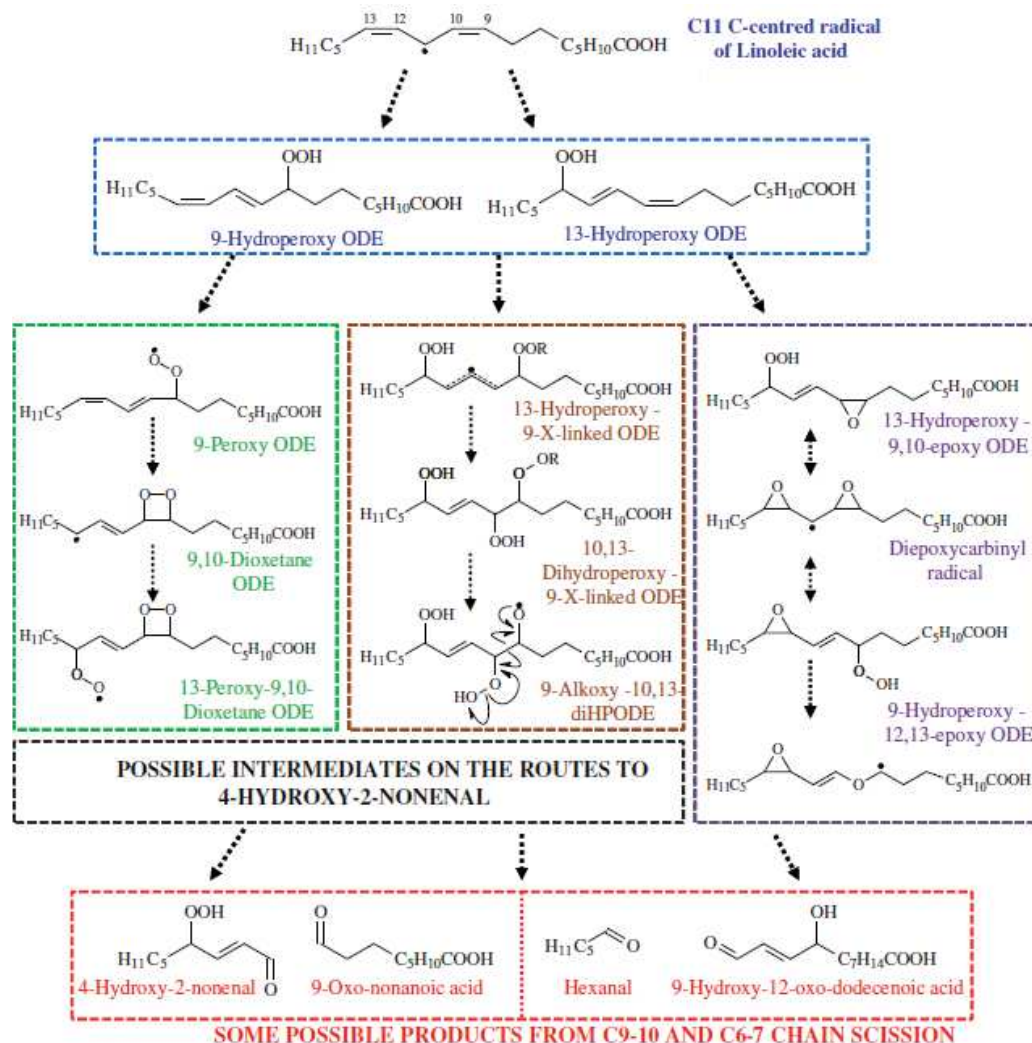
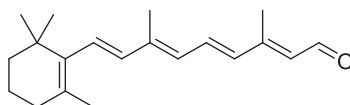


Schéma 30 : Voies de formation des ECR après peroxydation lipidique du LA.⁶⁵

II.2.3. Autres stressseurs carbonylés

Tout comme le glucose, certains aldéhydes endogènes peuvent s'accumuler anormalement dans la cellule et sont alors considérés comme des stressseurs carbonylés, de par leur réactivité et la toxicité qu'ils engendrent. C'est le cas du rétinol tout-*trans* (**Figure 11**), molécule essentielle du cycle visuel et localisée dans les photorécepteurs.



rétinol tout-*trans*

Figure 11 : Le rétinol tout-*trans*, ECR présente dans les cellules visuelles.

L'accumulation anormale du rétinol tout-*trans* au sein des cellules visuelles va engendrer une réaction de stress carbonylé (formation de bases de Schiff), et aboutir après oxydation à la formation et l'accumulation de dérivés lipidiques cytotoxiques, ayant pour conséquence une dégénérescence de l'épithélium pigmentaire rétinien.^{3b} Ces produits issus du rétinol tout-*trans* ayant été modifié par la combinaison des stress carbonylé et oxydant peuvent aussi être qualifiés d'AGE de la macula. Plus de détails seront donnés dans le chapitre II suivant, consacré aux mécanismes de toxicité impliqués dans les pathologies rétiniennes (dégénérescence maculaire liée à l'âge et maladie de Stargardt).

II.2.4. Schéma général résumant les sources de formation et les conséquences des ECR au niveau de l'organisme

Différentes sources d'ECR sont décrites, d'origine endogène ou exogène. La réponse de l'organisme face à ces stressseurs carbonylés dépend de leur formation. En faible quantité, les cellules pourront faire face à ces ECR en mettant en place des mécanismes de défenses (tels que l'activation de la voie Keap1/Nrf2/ARE) entraînant leur détoxification. En revanche, lorsque les ECR sont produites en quantité excessive, elles vont entraîner des modifications irréversibles de substrats cellulaires (protéines, lipides, ADN) conduisant à l'altération de l'intégrité cellulaire (dénaturation des membranes, apoptose, ...) et intervenir dans la physiopathologie de certaines maladies (**Figure 12**). En effet, l'altération de protéines par des ECR conduit à une production d'EOR et au déclenchement de processus inflammatoires. Le stress oxydant devient donc une conséquence du stress carbonylé.

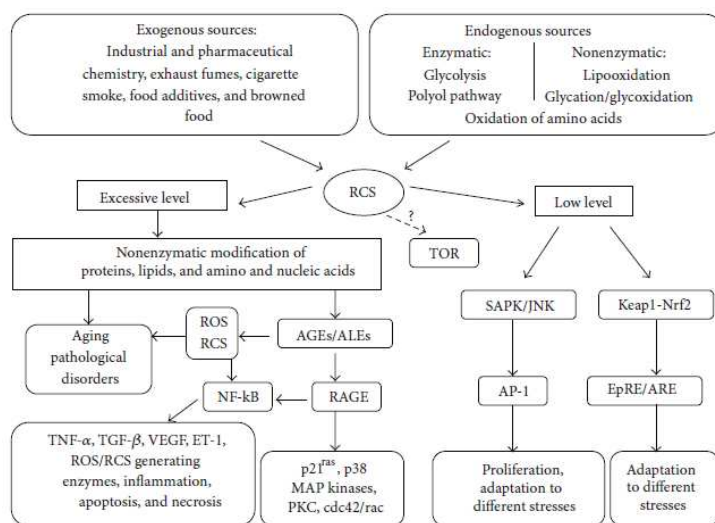


Figure 12 : Vision d'ensemble de la production des ECR/EOR et conséquences du déséquilibre.⁵⁵

Les espèces carbonylées constituent ainsi des cibles thérapeutiques majeures. Différents composés existent pour piéger les ECR et ainsi éviter leurs réactions délétères.

II.3. Les composés limitant le stress carbonylé

II.3.1. Molécules connues

Pour limiter la formation des AGE/ALE et leur effet, plusieurs approches peuvent être envisagées :⁶⁶

- prévenir leur formation en bloquant les ECR ou les espèces précurseurs d'EOR ;
- faire réagir les AGE formés pour les désactiver et diminuer leur concentration.

Les antioxydants, chélateurs de métaux et les espèces nucléophiles réagissant directement avec les ECR électrophiles représentent les voies les plus étudiées pour inhiber la formation des AGE/ALE, dans les conditions *in vitro* et *in vivo*.

Quelques exemples de composés limitant la formation des AGE sont présentés dans le tableau suivant (**Tableau 4**).⁶⁶

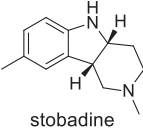
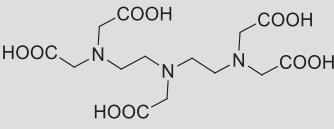
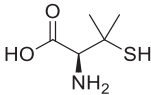
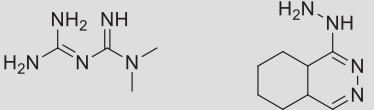
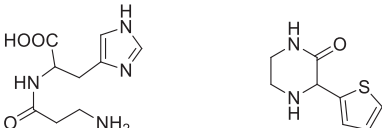
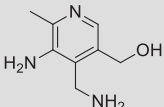
Composés	Mode d'action
Limitation indirecte	
 <p>stobadine</p>	<p>Joue le rôle d'antioxydant en piégeant les radicaux libres intermédiaires formés pendant la glycoxydation. Ne permet pas d'éviter le produit d'Amadori.</p>
 <p>acide diéthylène-triamine-pentacétique (DETAPAC)</p>	<p>C'est un chélateur de métaux, en particulier du fer. Il inhibe l'auto-oxydation du glucose, la glycoxydation, permettant la diminution des AGE.</p>
Limitation directe (piégeage des ECR)	
Composés monoréactifs (une seule fonction réactive)	
<p>Les composés contenant des fonctions thiols :</p> <p>(GSH, D-penicillamine)</p>  <p>D-penicillamine</p>	<ul style="list-style-type: none"> Le GSH possède des fonctions thiols pouvant réagir sur un électrophile comme les aldéhydes α,β-insaturés. Il peut également servir de cofacteur de l'enzyme glyoxalase responsable de la détoxification des composés dicarbonylés. La D-penicillamine réagit avec les composés dicarbonylés.
<p>Dérivés guanine et hydrazine</p>  <p>metformine (aminoguanine) hydralazine</p>	<ul style="list-style-type: none"> La metformine est un antidiabétique permettant de diminuer les ECR et les AGE en plus de son effet anti-hyperglycémique. L'hydralazine piège les aldéhydes α,β-insaturés, précurseurs des AGE et ALE. L'inconvénient de ce composé est son manque de sélectivité.
Composés multiréactifs (plusieurs fonctions différentes réactives)	
<p>Composés hétérocycliques</p>  <p>carnosine tenilsetam</p>	<ul style="list-style-type: none"> La carnosine réagit avec les ECR en faisant intervenir non seulement sa fonction amine libre mais également le groupement imidazole. Le tenilsetam réagit directement avec les ECR mais aussi avec la protéine ayant subi la glycation. Cette dernière action permet d'éviter les réactions de couplage protéine/protéine.
<p>Dérivé amine</p>  <p>pyridoxamine</p>	<p>Son effet de protection est multiple : il permet la chélation de métaux, la neutralisation des espèces radicalaires grâce à l'acidité du benzyle alcool, mais aussi de piéger les ECR de manière efficace.</p>

Tableau 4 : Exemples de composés limitant le stress carbonylé.⁶⁶

II.3.2. Cas particulier des polyphénols

Les polyphénols sont non seulement intéressants pour leurs propriétés antioxydantes, mais (selon leur structure) également pour leur capacité à piéger certaines ECR. Les piégeages de composés dicarboxylés⁶⁷ (glyoxal (GO) et méthylglyoxal (MG)) et des aldéhydes α,β -insaturés (acroléine et HNE) ont été rapportés en condition non cellulaire et permettent d'évaluer le potentiel anti stress-carbonylé des polyphénols.

II.3.2.1. Piégeage des composés dicarboxylés : glyoxal (GO) et méthylglyoxal (MG)

Lo *et al.*^{67a} reportent le piégeage du MG de manière efficace en conditions physiologiques (37°C, à pH=7.4 dans un tampon phosphate) par le pyrogallol ou le phloroglucinol (**Schéma 31**). Le mécanisme de piégeage correspond à une attaque nucléophile du carbone le plus électro-négatif du groupement phényle sur le carbone de la fonction carbonyle (correspondant à une substitution électrophile aromatique).⁶⁸ Le composé mono-carboxylé a également la possibilité de réagir sur une autre molécule de MG, formant ainsi un di-adduit. Ce piégeage est également rapporté pour le GO.⁶⁸ A noter que le phloroglucinol est un meilleur piégeur d'ECR comparé au pyrogallol car celui-ci présente une fonctionnalisation optimale. Cela peut s'expliquer par les positions des groupements hydroxyles activant, qui permettent d'augmenter de manière égale la nucléophilie des trois carbones aromatiques -CH du phloroglucinol (contre deux -CH pour le pyrogallol).

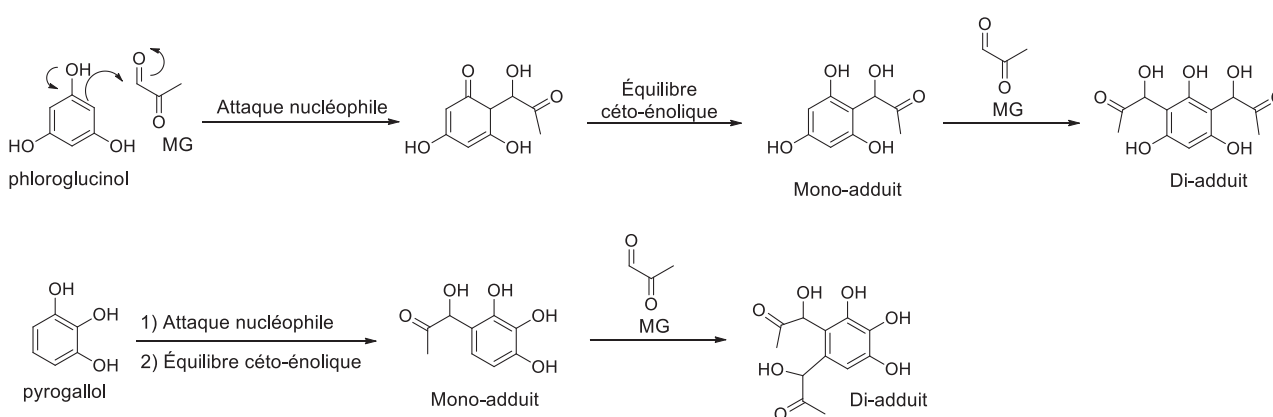


Schéma 31 :Attaque du phloroglucinol⁶⁸ et du pyrogallol⁶⁹ sur le méthylglyoxal et adduits formés en conditions physiologiques (37°C, à pH=7.4).

Dans les travaux de Shao et *al.*^{67b}, le piégeage du MG et du GO en conditions physiologiques peut également s'effectuer par la phlorétine et son analogue glucosylé, la phloridzine (flavonoïdes majoritairement présents dans les pommes et dérivés), bien que possédant un groupement carbonyle désactivant (**Schéma 32**). Des adduits mono et di-MGO ou GO sont également formés.

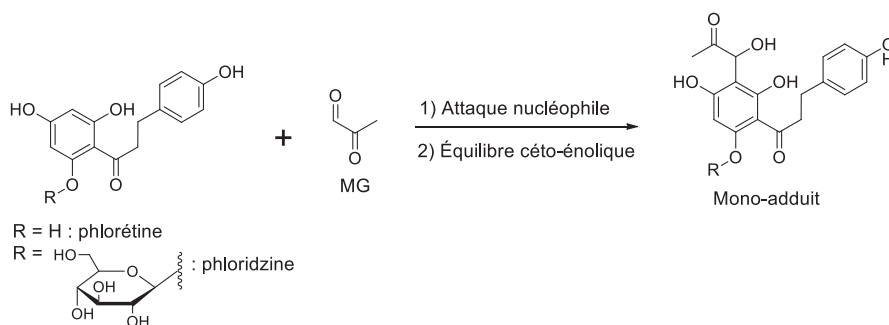


Schéma 32 :Attaque de la phlorétine et la phloridzine^{67b} sur le méthylglyoxal et adduits formés en conditions physiologiques (37°C, à pH=7.4).

Un autre exemple peut être cité pour l'(-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG) rapporté par Sang *et al.*^{67c} pour le piégeage du MG et GO en conditions physiologiques (**Schéma 33**). Pour ce dernier, les positions 6 et 8 du cycle A semblent être les sites majoritaires de piégeage des composés dicarbonylés.

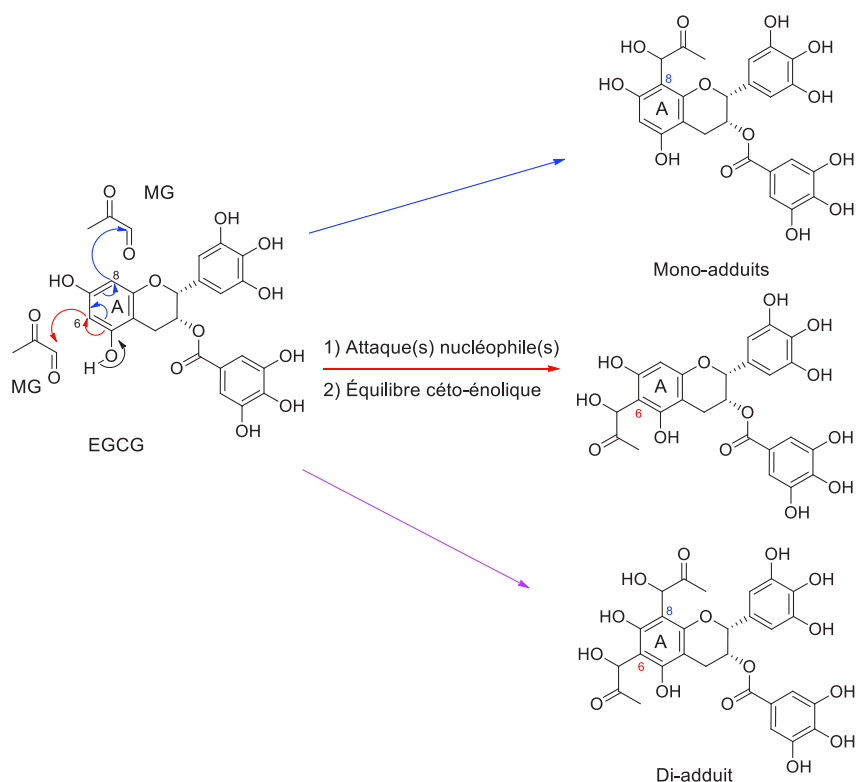


Schéma 33 : Attaque de l' EGCG^{67c} sur le méthylglyoxal et adduits formés en conditions physiologiques (37°C, à pH=7.4).

De plus, dans les travaux de Wu *et al.*,^{67d} un modèle basé sur le mélange BSA - MG (en anglais : bovine serum albumine - methylglyoxal) permet de rendre compte de l'efficacité des polyphénols pour limiter la formation des AGE/ALE, formés à partir de protéines. Par exemple, la lutéoline (**Schéma 34**) permet de limiter de manière efficace cette formation. Ces polyphénols présentent une réactivité plus importante sur le MG, comparés aux résidus lysine ou arginine, expliquant la limitation de l'apparition d'AGE/ALE dans ces conditions.

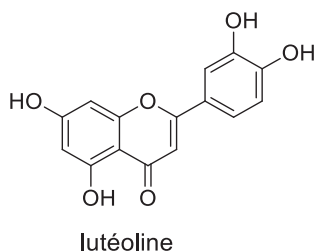


Schéma 34 :Structure de la lutéoline permettant de limiter la formation d'AGE/ALE dans les conditions BSA - MG.^{67d}

II.3.2.2. Inhibition de la glycation par piégeage du glucose

Dans les travaux de Matsuda *et al.*,⁷⁰ plusieurs flavonoïdes et isoflavonoïdes ont été évalués pour leur capacité à inhiber la glycation de la BSA (en présence de glucose) grâce à une méthode de mesure de fluorescence des AGE formés. Les relations structure/efficacité d'inhibition ont mis en évidence que (**Schéma 35**) : 1) lorsque le nombre de groupement hydroxyle est présent au niveau des positions 3', 4', 5 et 7 l'activité inhibitrice devient plus efficace ; 2) l'activité des flavones est supérieure comparée à celles des flavonols, flavanones et isoflavones ; 3) la méthylation ou la glucosylation de l'hydroxyle en position 4' des flavones, flavonols, et flavanones réduit l'activité ; 4) la méthylation ou la glucosylation de l'hydroxyle en position 3' des flavonols semble améliorer l'activité ; (5) la glucosylation de l'hydroxyle en position 7 des flavones et isoflavones diminue l'activité.

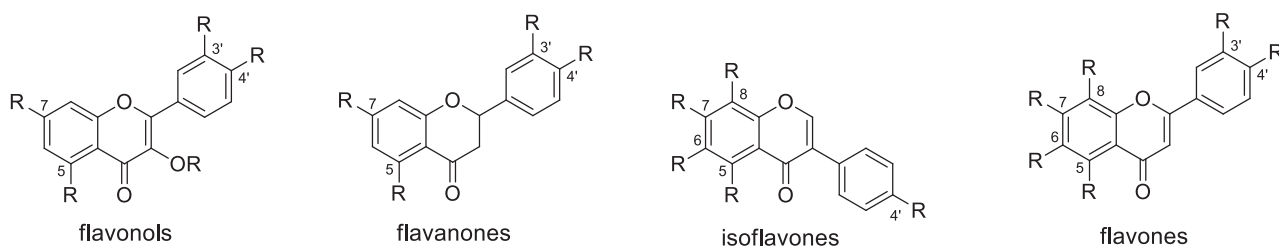


Schéma 35 : Structure générale des flavonoïdes et isoflavonoïdes permettant de limiter la formation d'AGE formés à partir de BSA.⁷⁰

II.3.2.3. Piégeage d'aldéhydes α,β -insaturés

Zhu *et al.*⁷¹ ont rapporté le piégeage d'aldéhyde α,β -insaturés (acroléine et HNE) par la théaflavine et de manière efficace par la phlorétine (**Schéma 36**).

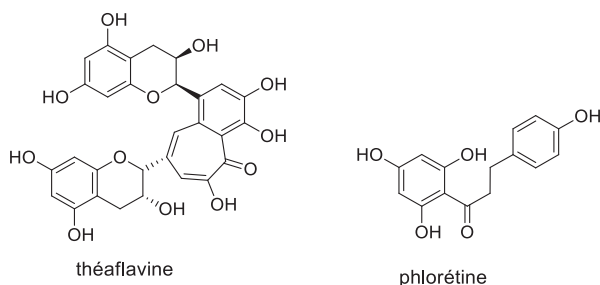
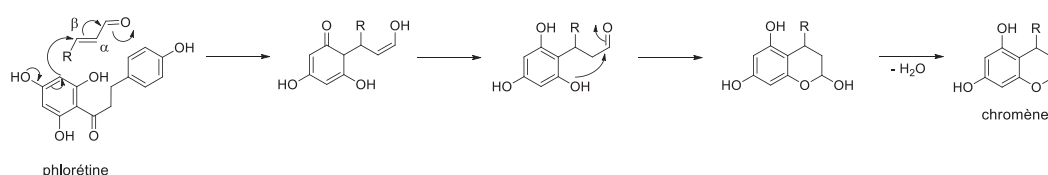


Schéma 36 : Polyphénols réactifs face aux aldéhydes α,β -insaturés.⁷¹⁻⁷²

Le mécanisme engagé pour ce piégeage (**Schéma 37, a**) correspond à une addition de Michaël du carbone le plus électro-négatif du groupement phényle sur le carbone en position β de l'aldéhyde α,β -insaturés, suivi d'une condensation intramoléculeire conduisant à des dérivés chromènes stables (**Schéma 37, b**). Il est rapporté que le motif phloroglucinol présent au niveau des composés est important pour ce piégeage. Il permet ainsi d'éliminer les ECR issus de la peroxydation lipidique. La protection par la phlorétine contre l'acroléine a été mise en évidence *in vitro* sur des neuroblastes (cellules nerveuses).⁷²

a. Mécanisme général de piégeage des composés aldéhydes α,β -insaturés pour la phlorétine

b. Piégeage de l'acroléine et HNE pour la phlorétine et adduits formés

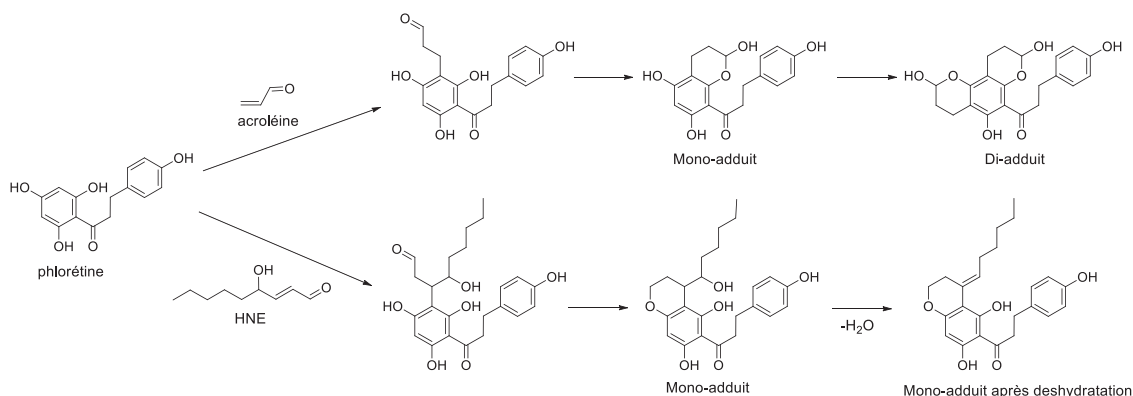
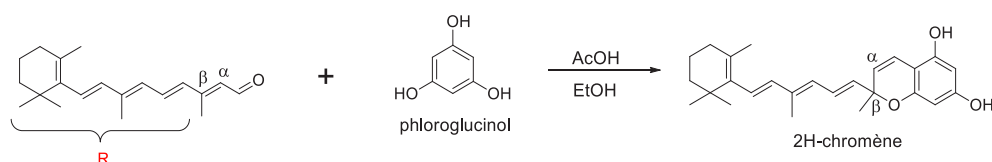


Schéma 37 : Mécanisme de formation des adduits formés après piégeage de la phlorétine des aldéhydes α,β -insaturés : a) mécanisme général et b) mécanisme pour l'acroléine et le HNE).⁷¹⁻⁷²

Le piégeage par le phloroglucinol du rétinol tout-*trans*, stresseur carbonylé et responsable de la formation des AGE de la macula, a été rapporté par Crauste *et al.*,⁴ travaux réalisés au sein du laboratoire, dans l'éthanol acidifié par de l'acide acétique (**Schéma 38**). Contrairement à ce qui est décrit pour les composés α,β -insaturés (acroléine et HNE) dans le cas de la phlorétine,⁷¹ Crauste *et al.*⁴ ont mis en évidence ici que le dérivé 2H-chromène est obtenu grâce à une addition 1,2 et non 1,4 sûrement due à la gêne stérique présente au niveau du carbone en position β du rétinol tout-*trans*.



Mécanisme proposé pour la formation du 2H-chromène:

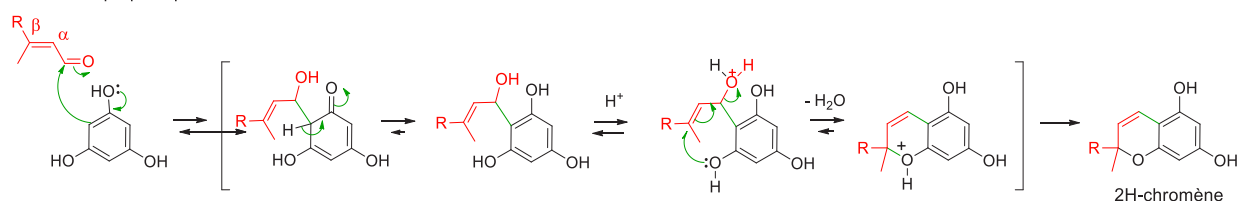


Schéma 38 : Action anti-stress carbonylé du phloroglucinol sur le rétinol tout-*trans*.⁴

De plus, Cia *et al.*⁷³ ont également mis en évidence dans des cellules primaires murines de l'épithélium pigmentaire rétinien, le potentiel "anti-stress carbonylé" de phloroglucinol face à la toxicité induite par le rétinol tout-*trans* (stresseur carbonylé).

III. Conclusion générale sur les stress oxydant et carbonylé et exemples de maladies concernées

Les mécanismes de stress oxydant carbonylé sont complexes de part une grande variabilité des espèces à partir desquelles ils sont générés. Ils sont responsables de l'apparition et l'évolution de certaines pathologies. A défaut de pouvoir contrer les EOR, ECR et ainsi la formation d'AGE/ALE, l'organisme accumule ces composés, engendrant de ce fait des dégâts irréversibles responsables de la progression de différentes pathologies. A titre d'exemple, la maladie d'Alzheimer ou le diabète sont deux pathologies dans lesquels ces deux stress participent à la progression de la maladie. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la peroxydation lipidique participe aux mécanismes physiopathologiques décrits. Cette dernière aboutie à la formation d'HNE correspondant à une ECR pouvant réagir avec des protéines selon une réaction de stress carbonylé, altérant ainsi leur conformation et leur fonction.⁶³ Dans le cas du diabète, suite à l'hyperglycémie, la glycoxydation des protéines est le mécanisme biochimique intervenant dans l'évolution et la progression de la maladie.⁷⁴

Nous nous intéressons plus particulièrement dans le prochain chapitre aux maladies rétiniennes correspondant à des dégénérescences maculaires, liées à l'âge (DMLA) ou d'ordre génétique (la maladie de Stargardt) faisant également intervenir les stress oxydant et carbonylé.

Chapitre II. Les maladies rétinienne : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la maladie de Stargardt

I. Origine et conséquence

Afin de mieux appréhender et comprendre les dégénérescences maculaires, liées à l'âge (DMLA) ou d'ordre génétique (la maladie de Stargardt), ce chapitre bibliographique sera dans un premier temps orienté sur l'anatomie et le fonctionnement du tissu rétinien.

I.1. Description de l'œil

I.1.1. Anatomie de l'œil

L'œil correspond à l'organe de la vue, appartenant aux cinq sens (avec l'ouïe, le toucher, l'audition et l'odorat) indispensables pour appréhender le monde et adapter notre comportement vis-à-vis de l'environnement. Globalement sphérique, l'œil humain mesure 2,5 cm de diamètre et avec une masse de 7 g environ. Il se compose de trois milieux transparents (la cavité antérieure, le cristallin et la cavité postérieure) et de trois tuniques (**Figure 13**) :

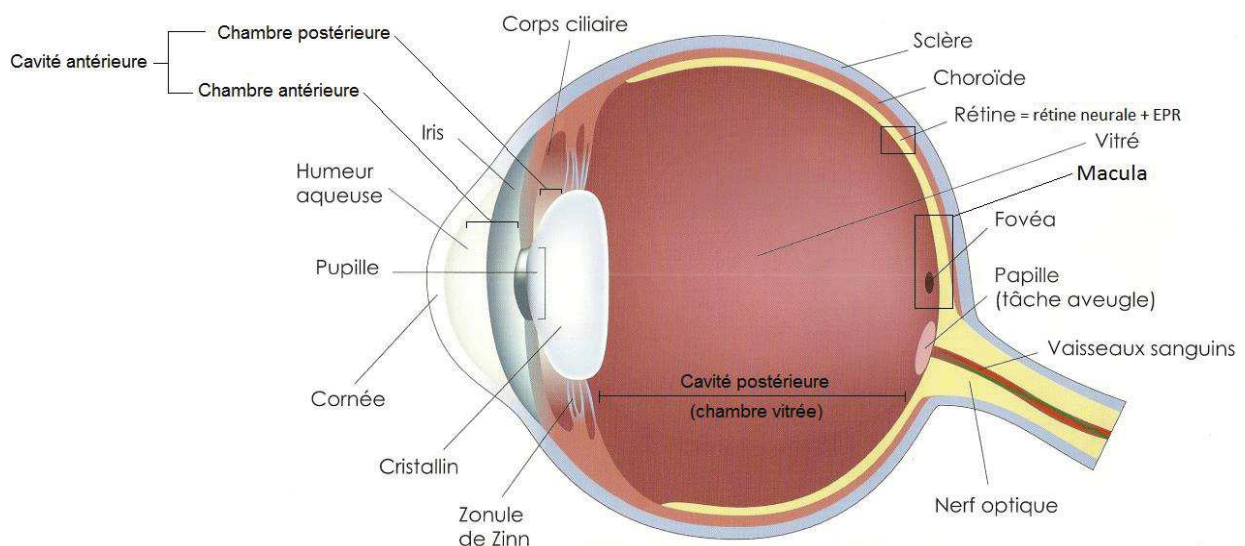


Figure 13 : Anatomie de l'œil. (<http://www.opticienperrier.com/actualites/anatomie-de-loeil-et-defauts-visuels/>)

- La tunique fibreuse est constituée de deux composantes : la cornée correspondant à un tissu conjonctif dense qui permet la convergence des rayons lumineux vers la rétine ; la sclère, constituée de fibres de collagène et protéoglycanes, correspondant à la tunique la plus résistante de l'œil, qui possède ainsi une fonction de protection.

- La tunique uvéale est constituée de trois composantes : l'iris, innervée par des fibres du système nerveux autonome, et possédant un trou en son centre qui correspond à la pupille ; le corps ciliaire permettant, entre autre, le maintien du cristallin ; et la choroïde qui est une couche riche en vaisseaux sanguins et en mélanocytes, participant aux apports en oxygène et nutriments nécessaires aux cellules de la rétine.
- La tunique nerveuse se compose de la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).

Plus de détails seront évoqués sur la tunique nerveuse car elle correspond à la cible thérapeutique visée par ces travaux.

I.1.2. La rétine neurale

La rétine neurale est la partie de l'œil responsable de la transformation des rayons lumineux en influx nerveux (phototransduction). Son épaisseur est d'environ 0,25 mm et elle est constituée de divers types cellulaires répartis de manière à former trois couches distinctes (**Figure 14**) : la couche des cellules ganglionnaires dont les 1,2 million d'axones forment le nerf optique au niveau de la papille qui conduit l'influx nerveux jusqu'aux corps géniculés latéraux du système nerveux central ; la couche nucléaire interne (constituée des cellules bipolaires, amacrines et horizontales) et la couche nucléaire externe (constituée de photorécepteurs). Chacune de ces couches possède une organisation structurale et une physiologie propre. La lumière qui provient des cavités antérieure et postérieure (chambre vitrée) doit traverser la rétine neurale pour atteindre la couche externe des photorécepteurs.

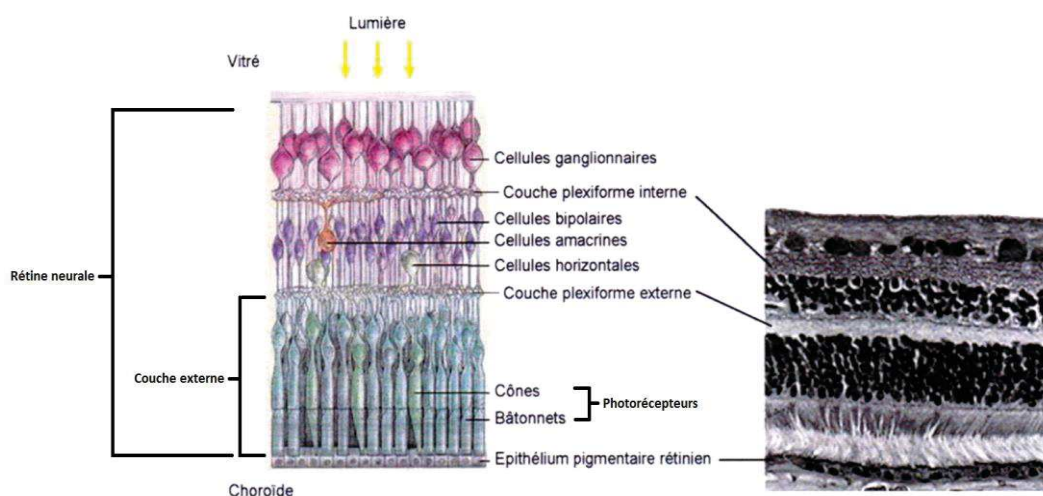


Figure 14 : Organisation cellulaire de la rétine.⁷⁵

La couche nucléaire externe est constituée de deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes, permettant la vision nocturne (ou scotopique) et diurne (ou photopique) respectivement. Ils possèdent une structure similaire (**Figure 15**) mais se distinguent l'un par rapport à l'autre par la forme caractéristique de leurs segments externes : cylindriques pour les bâtonnets et coniques pour les cônes. Leurs segments internes contiennent la machinerie cellulaire nécessaire au métabolisme comme les mitochondries ou les complexes de Golgi. Leurs segments externes contiennent essentiellement des photopigments enchâssés dans les membranes correspondant aux disques pour les bâtonnets ou à des replis de la membrane plasmique pour les cônes. Le segment externe est continuellement renouvelé grâce à un équilibre entre sa croissance depuis le segment interne et la phagocytose de son extrémité effectuée par l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et les cellules de Müller (ces dernières s'étendant sur toute l'épaisseur de la rétine).

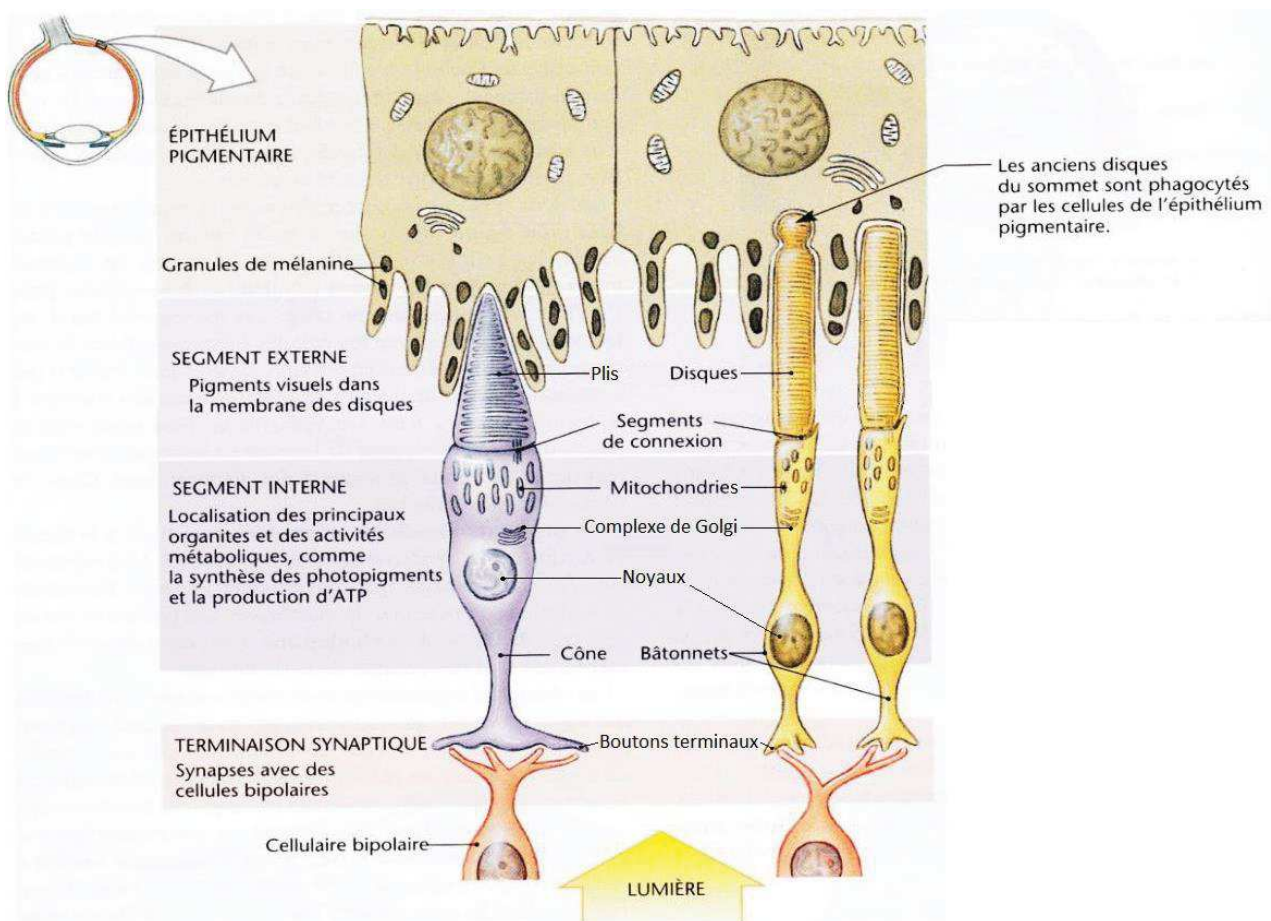


Figure 15 :Structure des photorécepteurs et relation avec l'épithélium pigmentaire rétinien.⁷⁶

Chez l'Homme la rétine contient en moyenne 4,6 millions de cônes, et 92 millions de bâtonnets dont les segments externes peuvent contenir 700 à 1100 disques chacun. Les 100 millions de photorécepteurs représentent un nombre bien supérieur par rapport aux 1,2 million d'axones des cellules ganglionnaires. Il y a donc convergence, une cellule ganglionnaire intégrant l'activité de plusieurs photorécepteurs (champ récepteur). La répartition des photorécepteurs n'est pas homogène sur toute la rétine (**Figure 16**). En effet, au centre de la rétine se trouve une région d'environ 3 mm de diamètre caractérisée par une concentration maximale de cônes, la macula lutea. Cette dernière contient en son centre une petite dépression appelée fovéa (**Figure 13** et **Figure 16**) qui est exclusivement constituée de cônes, correspondant à la zone d'acuité visuelle maximale et confère ainsi la vision diurne la plus précise des détails et des couleurs.

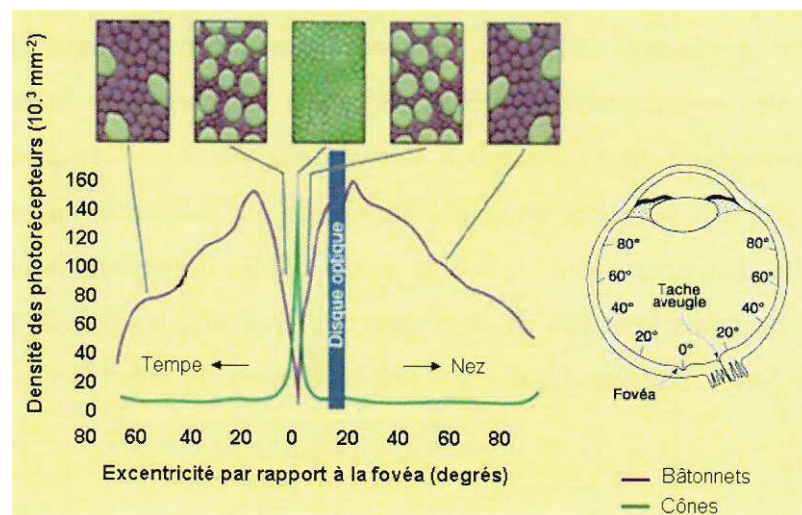


Figure 16 : Densité des photorécepteurs dans la rétine.⁷⁷

I.1.3. Le cycle visuel

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, la rétine neurale est responsable de la transformation du signal lumineux en message nerveux. Ce dernier est généré au niveau des photorécepteurs grâce à l'activation des photopigments (pigments visuels ou rhodopsine pour les bâtonnets) contenus dans leurs segments externes (**Figure 17**).

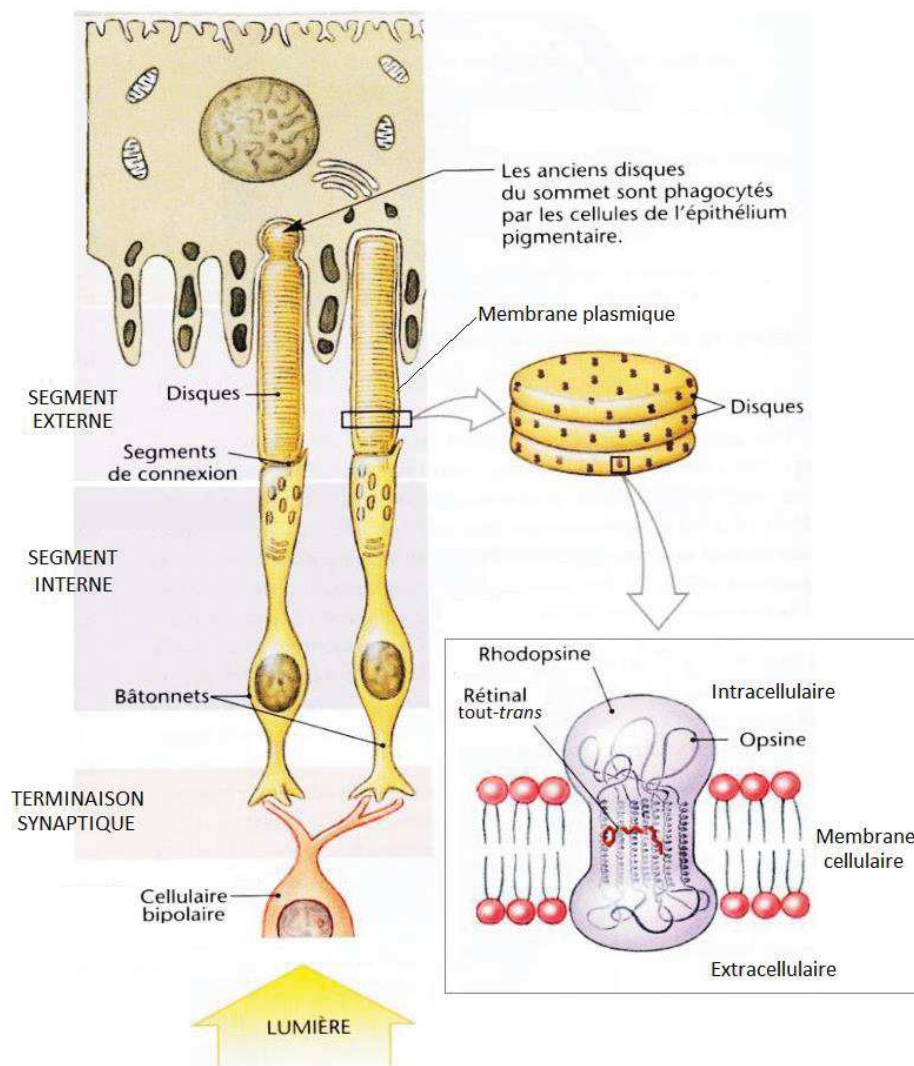


Figure 17 : Localisation du photopigment (rhodopsine liée au rétinol tout-*trans*) dans les bâtonnets.^{76b, 77b}

Il existe quatre types de photopigments, ils font partie des protéines membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G de transduction (RCPG). Ces photopigments sont nommés "opsines" dans les cônes (on en compte 3 types différents) et "rhodopsine" dans les bâtonnets. Ces opsines sont liées à un chromophore, le rétinol 11-*cis*, sous forme de rétinylidène 11-*cis* (**Figure 18**). Les quatre opsines diffèrent par leur structure primaire (séquence d'acide aminé) ce qui a une influence sur leurs longueurs d'onde d'absorption de la lumière. Les bâtonnets sont ainsi sensibles à de faibles intensités lumineuses (vision nocturne) mais ne permettent pas de distinguer les couleurs, tandis que l'activation des cônes nécessite de fortes intensités lumineuses (vision diurne) et permettent la vision en couleur.

Le rétinol 11-*cis* est synthétisé à partir de la vitamine A, un rétinol tout-*trans*, qui est produit à partir de carotène pro-vitaminique provenant de l'alimentation. Le rétinol 11-*cis* lié à l'opsine (correspondant au photopigment, **Figure 18**) représente le point de départ de l'influx lumineux, puisqu'il est isomérisé en rétinol tout-*trans* en présence d'un signal lumineux. Sa régénération est effectuée au cours du cycle visual et fut initialement décrite par Wald⁷⁸ en 1968. Le cycle visual décrit ci-dessous correspond à celui intervenant dans les bâtonnets (**Figure 18**). Un procédé différent et moins connu a lieu au niveau des cônes et des cellules de Müller (mais ne sera pas présenté ici).

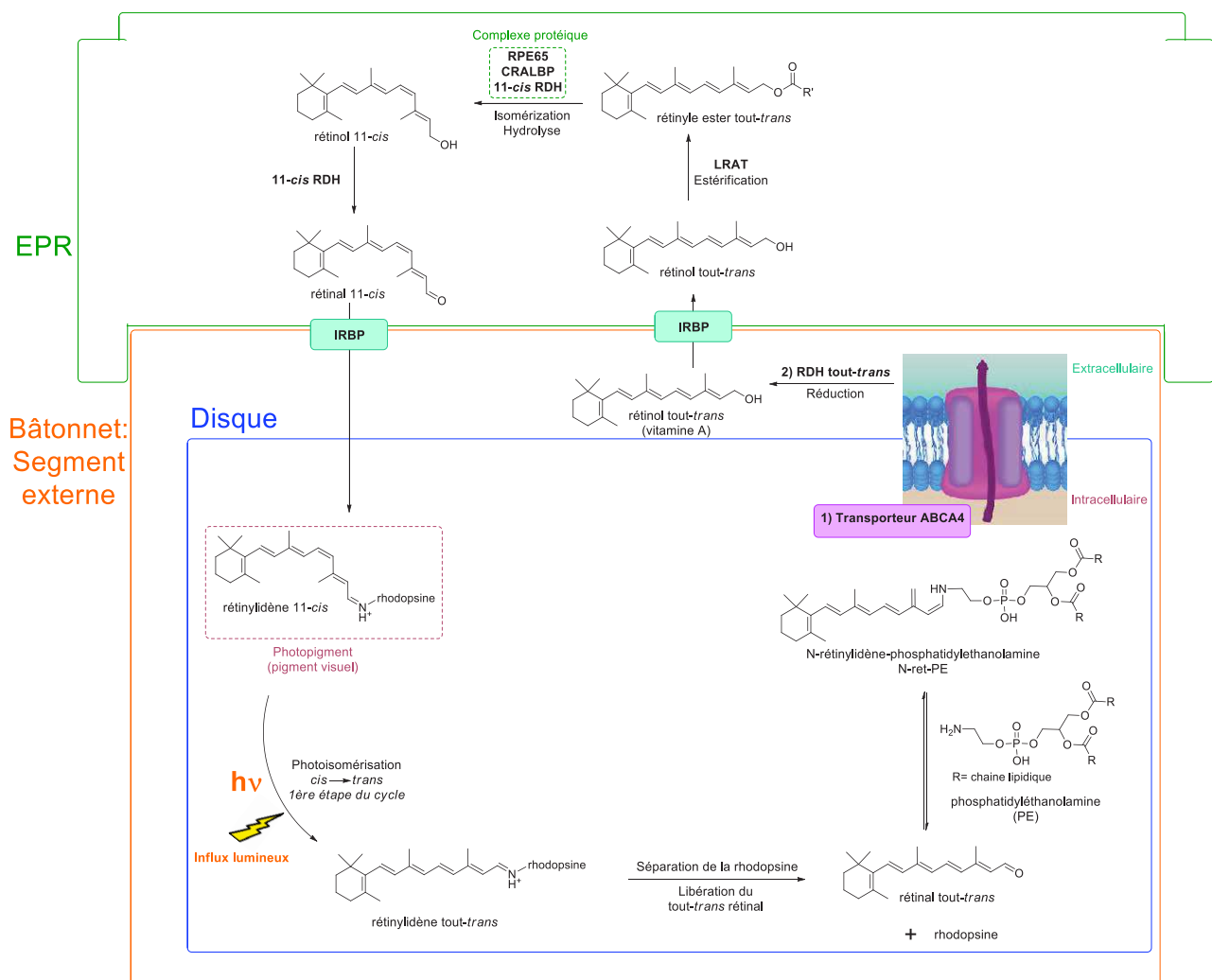


Figure 18 : Biochimie du cycle visual dans les photorécepteurs (bâtonnets).

Description détaillée du cycle visuel des photorécepteurs (bâtonnets) :

Dans le segment externe des disques des bâtonnets (**Figure 18**), l'action de la lumière sur le photopigment cause la photoisomérisation du rétinylidène 11-*cis*enrétinylidène tout-*trans*. Cette isomérisation conduit à sa séparation de la rhodopsine, libérant ainsi le rétinol tout-*trans*. Ce dernier se condense à la phosphatidyléthanolamine (PE), présente dans la couche phospholipidique constitutive de la membrane des disques, pour former une base de Schiff correspondant au N-rétinylidène-phosphatidyléthanolamine (N-ret-PE). La N-ret-PE, jouant le rôle de substrat, est ensuite prise en charge par le transporteur membranaire ABCA4 (ATP-binding cassette, sub family A, member 4). Le rôle important de ce transporteur est détaillé dans ce paragraphe puisqu'une mutation de ce dernier intervient dans les causes du développement de dégénérescence maculaire d'ordre génétique, correspondant à la maladie de Stargardt. Il correspond à une protéine transmembranaire située dans la bicouche lipidique du segment externe des photorécepteurs. C'est un transporteur permettant la clairance du rétinol tout-*trans* (sous forme de N-ret-PE) de l'espace intra-discal ("intracellulaire" sur la **Figure 18**) vers le compartiment cytoplasmique ("extracellulaire" sur la **Figure 18**) du photorécepteur. Ensuite, ce dernier est réduit en rétinol tout-*trans* (vitamine A) par l'enzyme RDH tout-*trans* (retinal dehydrogenase) ou RDH 8. Il est par la suite pris en charge par l'IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein) et intègre l'EPR dans lequel il est estérifié en rétinyle ester tout-*trans* par la LRAT (lecithin-retinol acyl transferase). Le complexe protéique faisant intervenir la RPE 65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa), la CRALBP (cellular retinal binding protein), et la RDH 11-*cis* (ou RDH 5) permet une isomérisation *trans/cis* de la position 11 et une hydrolyse de l'ester formant ainsi le rétinol11-*cis*. Finalement, ce dernier est oxydé par la RDH 11-*cis* (ou RDH 5) en rétinol11-*cis*. Il est enfin réintégré au sein du photorécepteur *via* l'IRBP pour régénérer le photopigment par liaison à la rhodopsine, et ainsi fermer la boucle du cycle visuel en étant à nouveau isomérisable sous l'action de l'influx lumineux.

I.1.4. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

L'EPR est une monocouche cellulaire protectrice et nourricière des photorécepteurs, épaisse de 10 à 20 μm , qui est insérée entre la rétine neurale et la choroïde. Elle repose sur un tissu conjonctif appelé la membrane de Bruch (**Figure 19**).

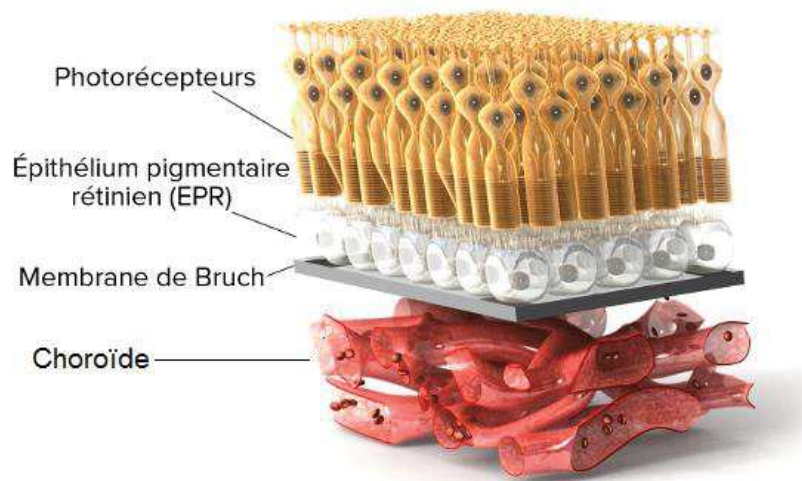


Figure 19 : Localisation de l'EPR, tissu protecteur et nutritif de la rétine.

Les cellules de l'EPR sont liées entre elles par des jonctions serrées qui permettent de former la barrière hémato-rétinienne externe entre la rétine et la choroïde (circulation sanguine). L'EPR possède plusieurs fonctions importantes au sein de la rétine.

- Il constitue le tissu nourricier des photorécepteurs en participant à 90% des apports nécessaires à leur survie et leur fonctionnement *via* une régulation du transport de nutriments et d'oxygène provenant de la choroïde.
- Il contribue également au maintien de l'alignement des photorécepteurs, à la phagocytose de l'extrémité de leur segment externe⁷⁹ et au recyclage du pigment visuel des photorécepteurs.
- Les cellules pigmentées constitutives de l'EPR contiennent de la mélanine permettant d'absorber les radiations UV et ayant une action antioxydante.⁸⁰

Finalement, l'EPR est un élément essentiel au maintien de l'homéostasie générale de la rétine⁸¹ participant ainsi à son intégrité structurale et fonctionnelle. Ainsi, un dysfonctionnement de l'EPR engendre des conséquences délétères sur les fonctions rétinienne, entraînant une altération de la vision. La dégénérescence de l'EPR intervient notamment dans la physiopathologie de certaines rétinopathies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou la maladie de Stargardt.

I.2. Description et Origine de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la maladie de Stargardt

I.2.1. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie dégénérative rétinienne chronique, évolutive et invalidante, débutant en général après l'âge de 50 ans.⁸² Cette dernière est caractérisée par une perte progressive de la vision centrale entraînant ainsi une baisse d'acuité visuelle, à travers une légère déformation de certains objets et à des difficultés de lecture par exemple. A un stade plus avancé des taches noires apparaissent dans le champ de vision central et la vision est déformée (**Figure 20**).



Figure 20 : Différence entre la vision d'un patient sain et d'un patient atteint de DMLA.

La DMLA est la première cause de malvoyance après 50 ans dans les pays industrialisés. La prévalence mondiale de la maladie est de 8% après 55 ans, soit environ 1,5 million de personnes en France. Cette prévalence globale augmente avec l'âge, en effet celle-ci est égale à 1% avant 55 ans et progressivement à 25% après 75 ans. En 2020, il est estimé que 196 millions de personnes seront concernées par cette maladie. Cette dernière possède une origine multifactorielle, et ses facteurs de risque, principalement liés à l'âge, peuvent également être à la fois génétiques et environnementaux (consommation de tabac par exemple). Du fait du vieillissement de la population mondiale, la prévalence pourrait considérablement augmenter dans les prochaines décennies.

La DMLA atteint de manière sélective la macula (région centrale de la rétine, **Figure 13**) en provoquant une dégénérescence des photorécepteurs *via* une altération des cellules de l'EPR. Trois formes sont décrites dont une forme précoce et deux formes évolutives :

- La forme précoce ou maculopathie liée à l'âge (MLA) au stade précoce (environ 40% des cas). Ce stade n'est pas ou peu symptomatique. Il est caractérisé par une altération de l'EPR et/ou des dépôts de drusen (dépôts amorphes) dans le fond de l'œil. Une MLA peut évoluer vers une des deux formes dites "évolutives", mais ce n'est pas systématique.

Les formes évolutives correspondent à deux formes de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) :

- La forme atrophique appelée également "sèche" (environ 80% des cas), caractérisée par une altération de l'épithélium pigmentaire entraînant la dégénérescence et donc l'atrophie des photorécepteurs et ainsi un amincissement de la macula. L'impact sur la vision est inévitable mais la progression de la pathologie est lente. De plus, l'apparition de drusen peut être également présente, observable dans le fond de l'œil (**Figure 21**). D'un point de vue biochimique, cette forme est également caractérisée par l'accumulation de pigments bruns lipidiques fluorescents et photo-toxiques, appelés "granules de lipofuscine", présents au niveau de l'EPR et accumulés au cours du vieillissement.⁸³ Ainsi la dégénérescence de l'EPR entraîne celle des photorécepteurs.
- La forme exsudative appelée également "humide" (environ 20% des cas), caractérisée par le développement de néovaisseaux choroïdiens, localisés sous la macula et responsables d'œdèmes ou encore d'hémorragies rétinienne (**Figure 21**). L'évolution de cette forme peut être très rapide, faisant perdre la vision centrale en quelques semaines ou mois.

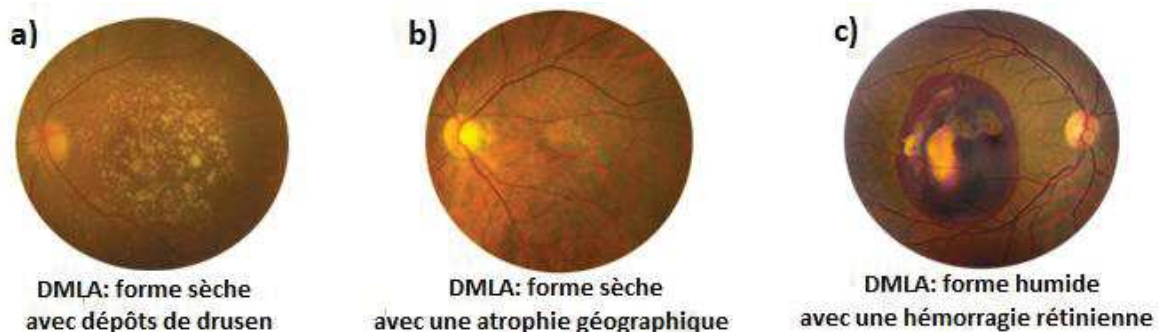


Figure 21 : Photographie du fond de l'œil de patients atteint de DMLA, a) et b) forme sèche, c) forme humide.⁸⁴

Il existe actuellement des traitements permettant de réduire la progression de la forme humide de la DMLA, à travers la destruction de la membrane néovasculaire choroïdienne (comme par exemple un traitement chirurgical, ou anti-VEGF (vascular endothelial growth factor)...). Les patients atteints de DMLA humide peuvent prétendre à un traitement adapté, ce qui n'est pas le cas de ceux atteints par la forme sèche. En effet, Il n'existe actuellement aucun traitement médical sur le marché ayant démontré son efficacité dans la forme sèche de la DMLA, dont l'évolution se fait inexorablement vers une cécité totale du patient. Dans ce contexte, la prévention et le développement de traitements efficaces sont devenus depuis quelques années un enjeu majeur de santé publique, et font l'objet de cette thèse.

I.2.2. La maladie de Stargardt (de type 1, juvénile récessive)

La maladie de Stargardt,² également appelée dystrophie maculaire de Stargardt ou dégénérescence maculaire juvénile est une maladie dégénérative rétinienne aiguë caractérisée par une altération progressive (dystrophie, **Figure 22**) de la macula et ainsi une perte de la vision centrale.⁸⁵ Elle correspond à la dystrophie maculaire héréditaire la plus fréquente chez l'enfant. Sa prévalence est de 1/20 000 à 1/30 000 quels qu'en soit le sexe et la géographie. Cette dernière débute chez l'adolescent ou l'adulte jeune, fille ou garçon, sans circonstances déclenchantes particulières. Deux symptômes majeurs sont présents : une baisse d'acuité visuelle et une sensibilité à la lumière importante.⁸⁶

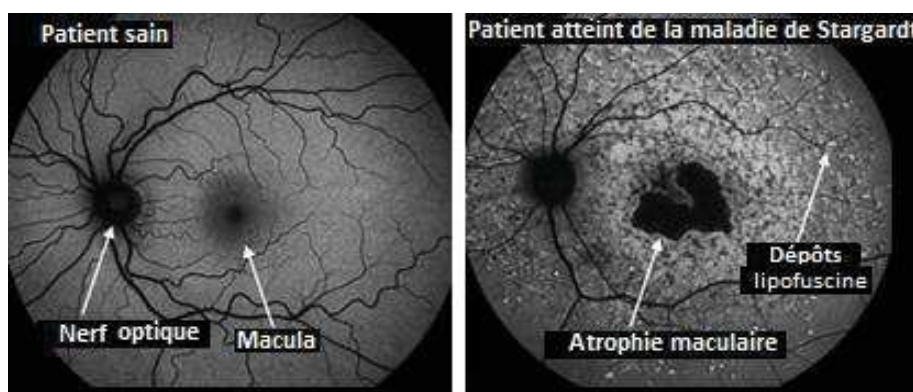


Figure 22 : Photographie du fond de l'œil d'un patient sain (à gauche) et d'un patient atteint de la maladie de Stargardt. (alkeuspharma.com)

Cette maladie possède un point commun avec la forme sèche de la DMLA. En effet, elle représente également une atrophie de la macula *via* la dégénérescence des photorécepteurs et de l'EPR, avec présence de dépôts de lipofuscine (**Figure 22**). A la différence de la DMLA, cette

dégénérescence maculaire est essentiellement consécutive à des mutations dans le gène codant pour le transporteur ABCA4, ayant une importance primordiale dans le cycle visuel, impliqué dans la régénération du pigment visuel (Partie I, chapitre II, I.1.3.).

I.2.3. Physiopathologie de ces deux maladies : un mécanisme de dégénérescence commun lié au stress oxydant et carbonylé

D'une manière générale, l'œil est un terrain sensible, prédisposé à subir des dommages liés au stress oxydant. En effet, la rétine, de par son exposition fréquente à la lumière, sa consommation importante en oxygène, et sa haute teneur en AGPI, est beaucoup plus sensible au stress oxydant et au phénomène de photo-oxydation.⁵ Ce dernier peut ainsi être à l'origine d'une altération chronique ou aiguë de la rétine, et constituer une menace pour la vision centrale. Chez un modèle murin, les effets délétères d'une exposition trop importante à la lumière ont été mis en évidence par Noell *et al.*⁸⁷ à travers l'étude des dommages irréversibles engendrés sur l'EPR et les photorécepteurs. De plus, le stress oxydant intervient de manière importante dans le cas de la DMLA, *via* la formation d'EOR, entraînant des dommages oxydants cellulaires conséquents.⁸⁸

L'étiologie des rétinopathies telles que la forme sèche de la DMLA et la maladie de Stargardt, a mis en évidence la présence d'une physiopathologie commune liée au cycle visuel. En effet les mécanismes biochimiques concernés dans leur physiopathologie font intervenir la combinaison des stress oxydant et carbonylé dans la transformation du rétinol tout-*trans*. Le rétinol tout-*trans*, une molécule essentielle du cycle visuel, peut être considéré comme un stresseur carbonylé de par la réactivité de sa fonction aldéhyde électrophile (partie I, chapitre I, paragraphe II.2.2.2.) et présente une toxicité directe et indirecte.

Maeda *et al.*⁸⁹ ont mis en évidence que la cytotoxicité directe du rétinol tout-*trans*, présente de manière dose-dépendante et accentuée en présence de lumière, pouvait être une des causes de développement de dystrophie maculaire. Le mécanisme biochimique de toxicité du rétinol tout-*trans* peut être liée à sa propriété de poison mitochondrial, activant ainsi l'apoptose cellulaire. De plus, le rétinol tout-*trans* peut également promouvoir l'activité de la NADPH oxydase (NOX), responsable d'une surproduction intracellulaire d'EOR.⁹⁰ En outre, les dommages causés par le stress photo-oxydant semblent être accentués en présence du rétinol tout-*trans*. En effet, ce dernier est un potentiel pro-photosensibilisant pouvant générer, en présence d'oxygène et de

lumière, des EOR tels que l'oxygène singulet, l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène entraînant un stress oxydant et ainsi des dommages sur les lipides, protéines et l'ADN⁹¹ de la cellule.

La toxicité indirecte du rétinol tout-*trans* est liée à sa métabolisation en dérivés cytotoxiques lipidiques, par le biais d'un mécanisme faisant intervenir un double stress oxydant et carbonylé (**Figure 23**).

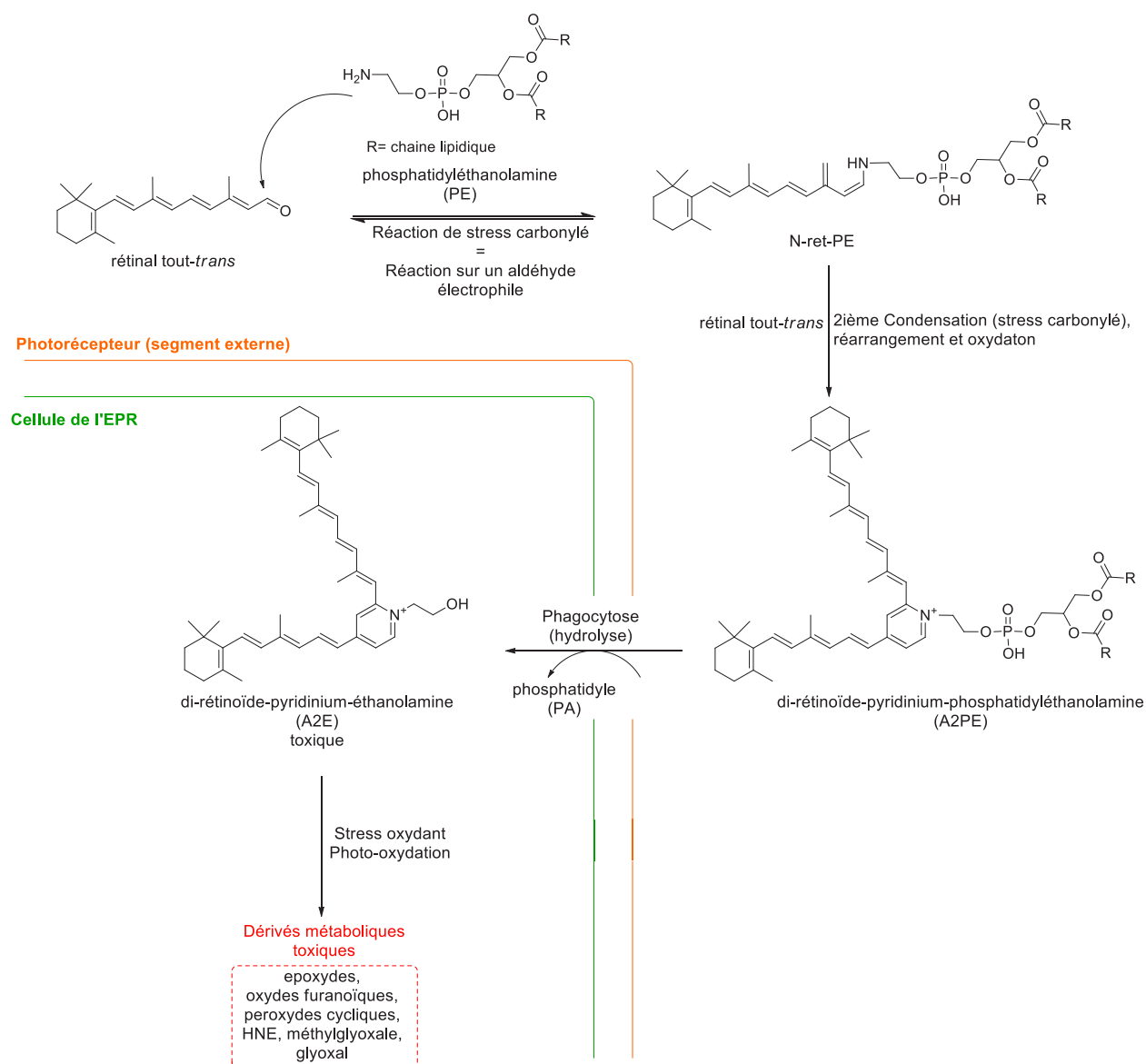


Figure 23 : Formation de l'AE2 et dérivés toxiques au sein des cellules de l'EPR à partir du rétinol tout-*trans*.

En effet, Le rétinol tout-*trans* s'accumule sous plusieurs formes toxiques de manière anormale (en échappant au cycle visuel) au sein des photorécepteurs. Cette accumulation est progressive au cours du temps dans le cas de la DMLA. Concernant la maladie de Stargardt, une accumulation importante et rapide a lieu, liée à un défaut du transporteur ABCA4 (consécutif à une mutation génétique) (**Figure 18**). Le rétinol tout-*trans* s'accumule alors sous forme de N-ret-PE, à l'intérieur des photorécepteurs (segment externe) par attaque nucléophile de la PE provenant des phospholipides⁹² sur la fonction aldéhyde du rétinol tout-*trans*(réaction de type stress carbonylé). Une autre attaque nucléophile ensuite lieu entre la N-ret-PE et une deuxième molécule de rétinol tout-*trans*. Après condensation, réarrangement et oxydation, une molécule de di-rétinoïde-pyridinium-phosphatidyléthanolamine(A2PE) s'accumule dans les photorécepteurs. Les segments externes des photorécepteurs étant continuellement renouvelés par phagocytose des cellules de l'EPR, l'A2PE est hydrolysé lors de cette dernière en di-rétinoïde-pyridinium-éthanolamine, appelé A2E. A noter que la production de ce dernier est également présente chez le patient sain car il s'agit d'une fuite normal du cycle visuel (de l'ordre de 10%).

L'accumulation de l'A2E est présente au niveau des cellules de l'EPR car la phagocytose exercée par ces dernières ne permet pas de le dégrader. Il agit comme un détergent et présente donc une toxicité propre, en altérant l'intégrité des membranes cellulaires et entraînant ainsi des dommages irréversibles.⁹³ De plus, l'A2E, très sensible à la photo-oxydation,⁹⁴ peut former *via* cette dernière des radicaux (par transfert électronique) ou de l'oxygène singulet (par transfert d'énergie à O₂) sensibilisant d'autant plus l'EPR au stress oxydant.⁹⁵ Il peut également exercer un effet toxique indirect par le biais de l'ensemble des métabolites issus de son oxydation : des époxydes, oxydes furanoïques, peroxydes cycliques, HNE, MG, etc.⁹⁶ (Figure 23), dérivés carbonylés toxiques et photo-toxiques à l'origine de la dégénérescence des cellules de l'EPR. D'autres dérivés *bis*-rétinoïdes et dimères du rétinol sont également formés par le même type de mécanisme, tels que l'iso-A2E, l'iiso-A2E, l'A2PE (après hydrolyse incomplète), l'A2-GPE ou le dimère du rétinol tout-*trans*⁹⁷ (**Figure 24**).

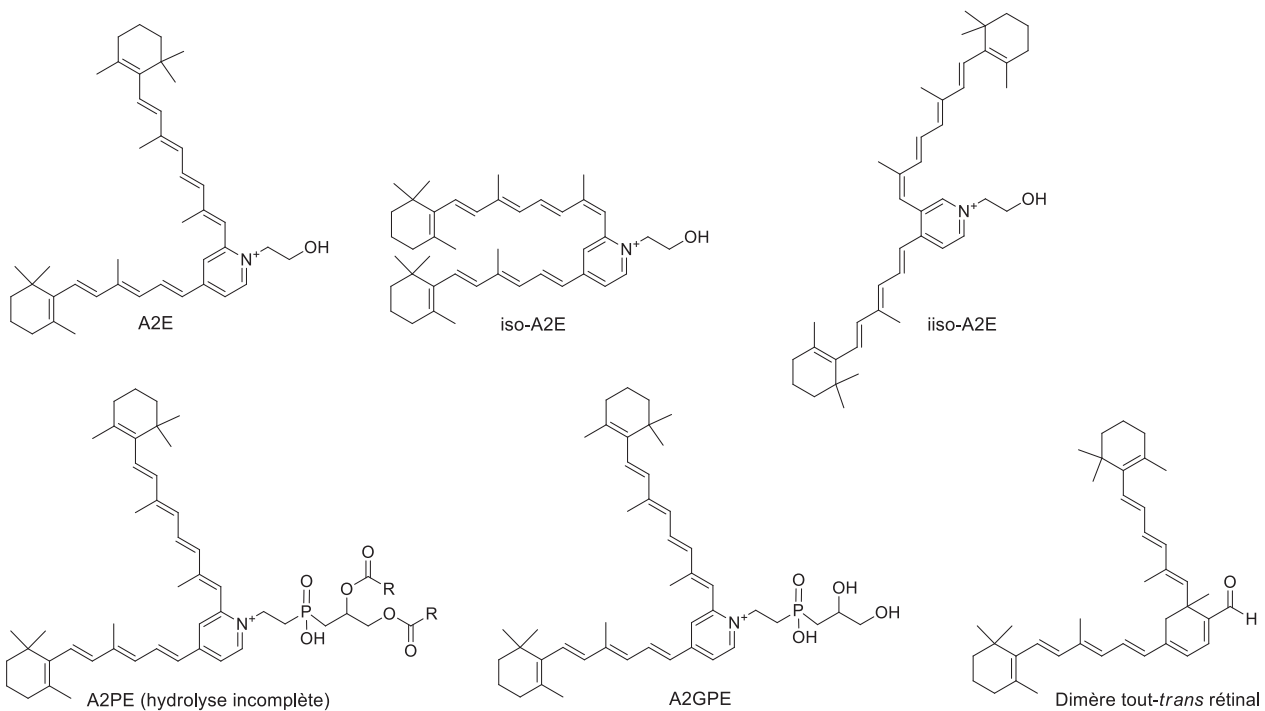


Figure 24 : Dérivés toxiques bis-rétinoïdes et dimères du rétinol constitutifs de la lipofuscine, caractéristique de la DMLA et la maladie de Stargardt.⁹⁷

Ainsi, l'accumulation de l'A2E et ses métabolites entraîne la dégénérescence des cellules de l'EPR^{3b} et par la suite celle des photorécepteurs. L'A2E est un constituant majeur des dépôts de lipofuscine, caractéristiques des dystrophies maculaires énoncées précédemment.

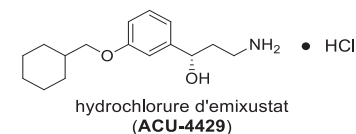
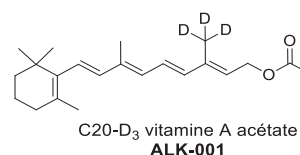
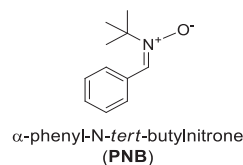
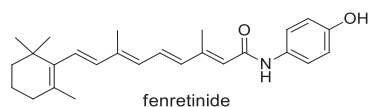
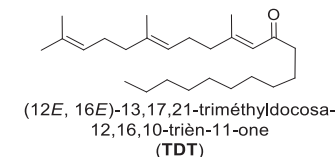
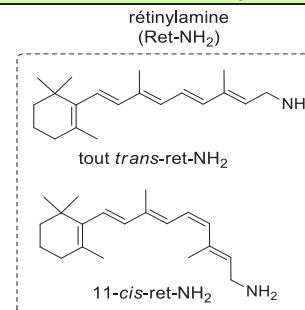
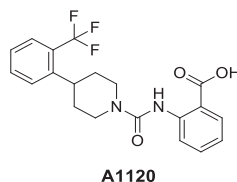
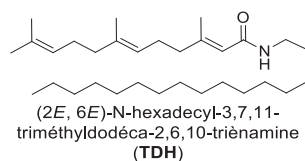
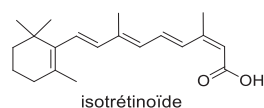
Malgré un mécanisme physiopathologique commun, les deux maladies rétinienne énoncées présentent cependant une différence : la forme sèche de la DMLA est une pathologie chronique, tandis que la maladie de Stargardt est considérée comme plus aiguë. En effet, dans le cas de la DMLA, l'accumulation de la lipofuscine est progressive dans le temps. Lorsque l'accumulation est trop importante, l'EPR n'a plus la possibilité de faire face à cette dernière et dégénère, entraînant la perte des photorécepteurs. Dans le cas de la maladie de Stargardt, les effets sont précoces et sévères de par l'accumulation rapide du rétinol tout-*trans*, entraînant une dégénérescence directe des photorécepteurs mais également celle de l'EPR *via* la formation importante et rapide d'A2E (suivi de sa photo-oxydation).

A ce jour, la DMLA atrophique et la maladie de Stargardt ne présentent aucun traitement thérapeutique sur le marché. Seul des traitements en cours d'essais cliniques sont en développement. (www.clinicaltrials.gov)

II. Traitements thérapeutiques actuels et conclusion (Tableau 5 récapitulatif)

Les traitements thérapeutiques précédemment étudiés ou en cours d'évaluation pour la forme sèche de la DMLA et la maladie de Stargardt peuvent être décomposés en trois axes : la pharmacologie, la thérapie génique et la transplantation cellulaire. N'ayant pas d'information sur "le" traitement qui pourra être le plus efficace, il est important de concentrer les efforts de la recherche dans ces 3 axes différents. En effet, la pharmacologie pourrait agir en tant que soin préventif et curatif tandis que la thérapie génique interviendrait de manière plus importante en soin curatif. La transplantation cellulaire pourrait s'effectuer en tant que soin curatif et également en soin palliatif, lorsque l'atrophie maculaire est à un stade très avancée.

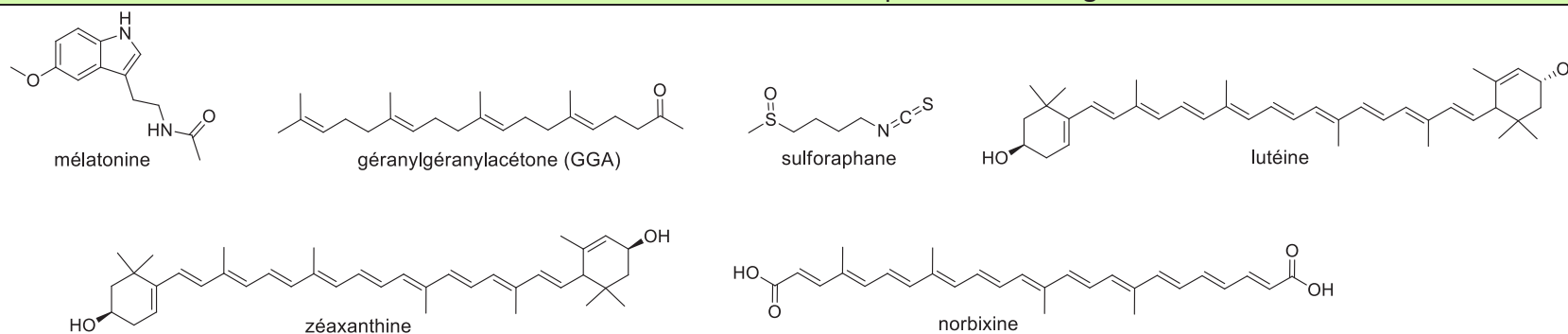
Le **Tableau 5** suivant résume, de manière non exhaustive, les principaux traitements thérapeutiques précédemment envisagés mais n'ayant pas abouti à une AMM (autorisation de mise sur le marché), et les traitements actuellement en cours d'essais cliniques.

Axe 1 : Pharmacologique⁹⁷⁻⁹⁸
Action sur le cycle visuel (ralentissement, diminution des bis-rétinoïdes)


Molécules	Cible thérapeutique potentielle	Phase d'avancement
Isotrétinoïde (Roaccutane®) ⁹⁹	Cible : RPE65 et les RDH	Testé en modèle murin
Rétinylamine (Ret-NH ₂) ¹⁰⁰	Cible : RPE65 et tout- <i>trans</i> rétinol libre	Testé en modèle murin
fenretinide ¹⁰¹	Cible : RBP (responsable du transport sanguin du rétinol jusqu'à l'œil)	Phase II pour la forme sèche de la DMLA (étude terminée mais non poursuivie)
TDH ⁹⁷	RPE65	Recherche exploratoire
TDT ⁹⁷	RPE65	Recherche exploratoire
PNB ⁹⁷	RPE65	Recherche exploratoire
A1120 ⁹⁷	Cible : RBP (responsable du transport sanguin du rétinol jusqu'à l'œil)	Recherche exploratoire
ACU-4429 ¹⁰²	RPE65 et piégeage du rétinol tout- <i>trans</i>	Phase IIb/III pour la forme sèche de la DMLA (étude récemment terminée, résultats non encore publiés)
ALK-001 ¹⁰³	Diminution de la formation de N-ret-PE et de la formation d'A2E	Phase II pour les deux maladies

Les composés testés et développés ayant une activité sur le cycle visuel (axe pharmacologique) ont montré dans certains cas une toxicité, une inefficacité ou un ralentissement trop important du cycle visuel (insensibilité à la lumière du jour par exemple). A ce jour, seul ACU-4429 et ALK-001 sont en cours d'étude. La deuxième partie développée pour l'axe pharmacologique correspond à une potentialisation des mécanismes de protections endogènes, grâce à des composés antioxydants (directs ou indirects). Parmi ces composés, des traitements utilisant les polyphénols ont été envisagés.

Potentialisation des mécanismes de protection endogènes

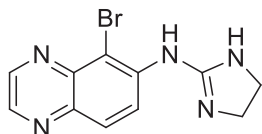


Molécules	Effet direct ou indirect	Protections rapportées et phase d'avancement
mélatonine ¹⁰⁴	Augmentation de l'activité de la SOD ou de la glutathion S transférase	Protection des disques externes contre les radicaux libres
thiorédoxine ¹⁰⁵	Diminution du stress photo-oxydant et préservation des photorécepteurs	
GGA ¹⁰⁶	Régulation positive du système thiorédoxine	Amélioration de la fonction phagocytaire de l'EPR (meilleure dégradation des dérivés bis-rétinoïdes) et protection des photorécepteurs
sulforaphane ¹⁰⁷	Protection de la fonction rétinienne et diminution de l'apoptose	Activation de la glutathion S transférase et de la thiorédoxine réductase

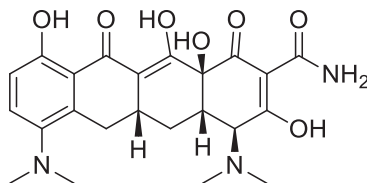
Potentialisation des mécanismes de protection endogènes (suite)		
<p>polyphénols :</p> <p>anthocyanes¹⁰⁸, flavonoïdes (myricétine¹⁰⁹, quercétine¹¹⁰), resvératrol¹¹¹</p>	<p>Diminution des mécanismes de toxification de l'A2E (antioxydant)</p> <p>Potentielle conservation du "nucleophilic tone" par l'activation de la voie Keap1/Nrf2/ARE</p>	<p>Protection de l'EPR contre la photo-oxydation et le stress oxydant</p>
<p>Supplémentations : compléments alimentaires de composition suivante :</p> <ul style="list-style-type: none"> • vitamine E, C, et A ; • caroténoïdes xanthophylles¹¹² (lutéine et zéaxanthine) ; • oligoéléments (Zn, Cu) ; • AGPI ω3 : EPA et DHA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés spécifiques de la lutéine et zéaxanthine : inhibition de la photo-oxydation de l'A2PE et de l'A2E • Propriétés générales des autres composés : protection de l'EPR contre la photo-oxydation et le stress oxydant 	<p>Étude AREDS2 (Age Related Eye Disease Study), phase III (étude complétée) en prévention et protection contre la DMLA.¹¹³ Formulation commercialisée sous les noms de :</p> <ul style="list-style-type: none"> • PreserVision Eye Vitamins AREDS 2Formula Soft Gels® (Bausch + Lomb, Madison, NJ) ; • Lipotriad Visionary® (Lipotriad LLC, Edison, NJ)
<p>norbixine¹¹⁴ (Macuneos®)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Filtration de la lumière bleue responsable de la toxification de l'A2E et réduction de l'A2E dans les cellules de l'EPR • Activation de défense antioxydante enzymatique supposée (<i>via</i> la voie Keap1/Nrf2/ARE) 	<ul style="list-style-type: none"> • Détoxification de l'A2E¹¹⁴ • Activité antioxydante et anti-inflammatoire Phase IIb (étude en cours)
<p>peroxydase de raifort (ou Horseradish Peroxidase (HRP))¹¹⁵</p>	<p>Correspond à une source exogène. Dégradation enzymatique de l'A2E (constitutif de la lipofuscine) présent dans l'EPR</p>	

Les études AREDS2 ont abouti à la commercialisation d'un mélange de compléments alimentaires. Malgré des résultats positifs sur la prévention et la protection contre la DMLA, cette supplémentation comporte certaines limites.¹¹³ En effet, les patients avaient déjà reçu une supplémentation multivitaminique avant de participer à l'étude AREDS2. De plus, durant cette dernière, ils recevaient une alimentation équilibrée et adaptée, qui pouvait également avoir des conséquences sur les résultats de l'étude.

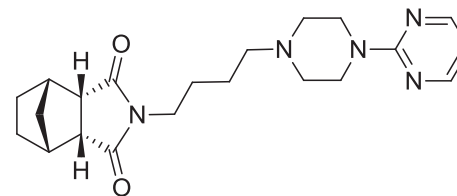
Autres molécules testées Phase II ou III pour la DMLA



brimonidine



minocycline



tandospirone (AL-8309B)

Molécules	Mode d'action et essais cliniques
brimonidine ¹¹⁶	Neuroprotection (effet sur des récepteurs synaptiques) ; phase II (étude en cours)
minocycline ¹¹⁶	Neuroprotection (inhibition de caspase) ; phase II (étude en cours)
AL-8309B ¹¹⁷	Évaluation de la diminution de la dystrophie maculaire ; phase III (étude terminée, traitement inefficace)
lampalizumab ¹¹⁶ (fragment de liaison antigène)	Inhibition du facteur D intervenant dans la cascade du complément, impliquée dans la pathogénèse de l'atrophie géographique; en phase III (étude en cours)

Axe 2 : thérapie génique	
Description	Phase d'avancement
<p>StarGen™</p> <p>Vecteur lentivirus comportant le gène ABCA4 et pouvant ainsi le libérer dans les cellules pour remplacer le gène défectueux responsable de la maladie de Stargardt⁸⁵</p>	Phase I/II (étude en cours)
<p>AAV2.sCD59</p> <p>Inhibition d'un complexe (par le facteur CD59) responsable de la perte d'intégrité membranaire pour la forme sèche de la DMLA¹¹⁶</p>	Phase I (étude en cours)
Axe 3 : Transplantation cellulaire	
Description	Phase d'avancement
<p>Transplantation subrétinale de cellules souches embryonnaires humaines dérivées en EPR (correspond aux "human embryonic stemCells-derived RPE" (hESC-RPE)¹¹⁸</p>	Phase I/II (étude en cours)
<p>Transplantation de cellules souches pluripotentes induites (correspond aux "induced pluripotent stem cells" (iPSCs))¹¹⁸</p>	Phase I (étude en cours)

Tableau 5 : Récapitulatif des traitements thérapeutiques précédemment étudié ou en cours d'évaluation (liste non exhaustive).

Pour conclure, ce tableau récapitulatif des différents traitements en cours de développement met en évidence les différentes cibles thérapeutiques. En effet, il est important de réduire les mécanismes physiopathologiques intervenant dans ces maladies, notamment l'accumulation du rétinol tout-*trans* conduisant à des métabolites délétères (A2E et autre) par le biais du stress oxydant et carbonylé. Les 2 derniers dérivés développés dans l'axe pharmacologique vont d'ailleurs dans cette direction en ayant pour cible le rétinol tout-*trans* ou la formation d'A2E. Les composés développés au sein du laboratoire et dans le cadre de ces travaux de thèse s'inscrivent dans l'axe pharmacologique et ont pour objectif de limiter les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les dégénérescences maculaires. Ainsi, des dérivés polyphénoliques appelés lipophénols ont été développés pour leur double action anti stress oxydant et carbonylé.

**Partie II : Les applications
thérapeutiques des lipophénols
polyinsaturés ω 3**

Introduction

Dans le cadre de la recherche de traitement de la forme sèche de la DMLA et de la maladie de Stargardt, des composés de type "lipophénolique" ont été synthétisés et développés au sein du laboratoire afin de combattre à la fois les stress oxydant et carbonylé observés dans la physiopathologie de la dégénérescence maculaire. La définition chimique d'un composé lipophénolique, ou lipophénol, correspond à un composé pouvant être divisé en deux parties : une partie polyphénolique et lipidique, toutes deux liées par une liaison chimique covalente pouvant correspondre à une liaison éther, ester, amide ou carbone-carbone. Ces composés peuvent être naturellement présents dans les plantes ou obtenus de manière synthétique. Dans le cadre de ces travaux, nous avons travaillé sur le développement d'un lipophénol à base de DHA, acide gras oméga-3, majoritairement présent dans le tissu rétinien afin de vectoriser le polyphénol au sein des cellules visuelles. Seul les lipophénols d'origine naturelle ou synthétique composé d'AGPI oméga-3 et présentant une activité anti-stress oxydant seront donc présentés dans ce chapitre bibliographique.¹¹⁹

Chapitre I. Les lipophénols ω 3 d'origine naturelle et synthétique

I. Intérêt des deux composantes d'un lipophénol

Le développement des lipophénols au sein du laboratoire est basé sur des travaux préliminaires¹²⁰ montrant l'intérêt des deux composantes au sein d'une même molécule, la partie lipidique et la partie polyphénolique. Les composés correspondant à des polyphénols couplés à des AGPIoméga-3 ont fait l'objet d'une recherche bibliographique et seront rapportés dans ce paragraphe. Les AGPI oméga-3 présentent des effets bénéfiques sur la santé,¹²¹ les plus communs des AGPI étant l'acide α -linoléique (ALA, C18:3), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) (**Figure 25**).

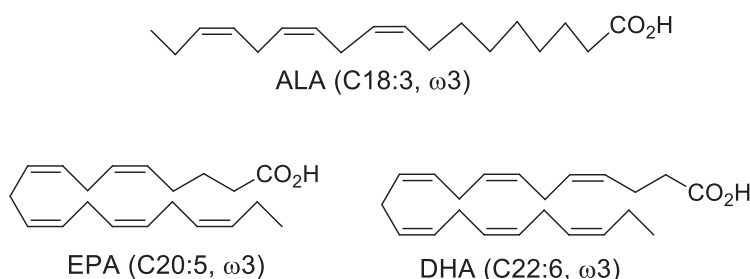


Figure 25 : AGPI oméga-3 : l'acide α -linoléique (ALA, C18:3), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6).

Chez l'homme, l'ALA est qualifié "d'acide gras essentiel", composé indispensable à l'organisme, ce dernier n'étant pas capable de le synthétiser, il doit être apporté par l'alimentation. L'organisme est alors capable de le transformer en EPA ou DHA mais en faible proportion, c'est pourquoi ces derniers doivent également être apportés par l'alimentation. Ils présentent également plusieurs intérêts thérapeutiques, notamment dans la réduction de l'inflammation, et peuvent diminuer les risques de maladies chroniques comme le cancer, l'arthrose ou les maladies cardiaques. De plus, ils sont impliqués dans les fonctions cognitives¹²² (neurotransmission, diminution de la neuro-inflammation, ...) du fait de leur concentration importante dans le tissu cérébral. Le DHA notamment joue un rôle central dans la constitution de la rétine et les fonctions rétinienne.⁵

Nous pouvons supposer que les avantages du couplage entre ces deux composantes peuvent être multiples. En effet, le couplage entre un composé polyphénolique hydrophile et un AGPI oméga-3 permettrait d'augmenter la lipophilie du polyphénol, et d'améliorer sa pénétration dans les cellules ainsi que sa biodisponibilité. En outre, la conjugaison avec un AGPI permettrait d'améliorer la solubilité dans le sang grâce à la capacité de liaison des lipides avec l'albumine du

sérum humain.¹²³ La vectorisation des lipophénols pourrait également être favorisée au niveau de tissus spécifiques, tels que la rétine ou le cerveau, dans lesquels le DHA et l'EPA s'accumulent et sont naturellement présents en concentration importante.^{122, 124} Malheureusement, l'inconvénient majeur des AGPI reste leur susceptibilité à l'oxydation, notamment au mécanisme de peroxydation lipidique (partie I, chapitre I, paragraphe II.2.2.). Leur liaison avec un composé polyphénolique, dont le potentiel antioxydant important a déjà été détaillée dans la partie I (chapitre I, paragraphe I.3.2.), permettrait de limiter la peroxydation lipidique de l'AGPI et ainsi d'éviter la formation des métabolites délétères d'oxydation des lipides. De plus, l'estérification de dérivés polyphénoliques avec un AGPI serait également une alternative pour masquer leur fonction hydroxyle, permettant ainsi de réduire leur biotransformation et leur élimination. En outre, la présence d'un AGPI conjugué contribuerait à l'amélioration des propriétés antioxydantes du polyphénol dans un milieu lipidique dans lequel il serait plus soluble. Selon la pathologie étudiée, un effet synergique entre l'AGPI et le lipophénol pourrait être observé. Dans ce cas, la partie lipidique du lipophénol permettrait non seulement la libération de ce dernier dans les tissus ciblés mais posséderait également une activité propre à celle des AGPI oméga-3 (incluant l'activité de leurs métabolites).

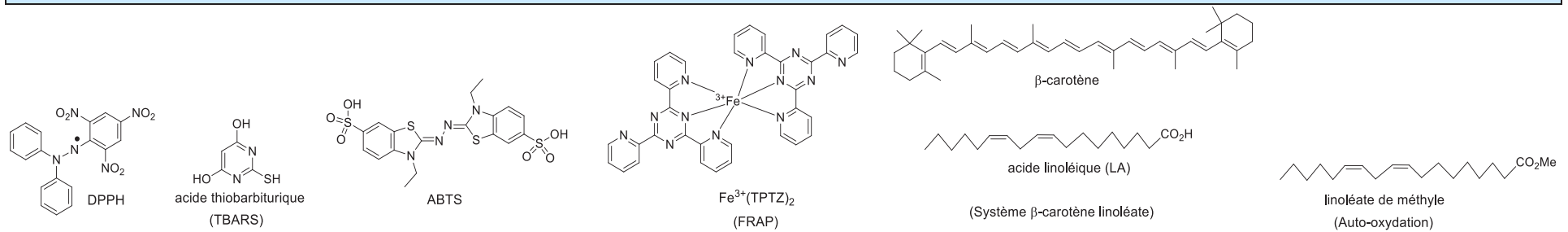
II. Lipophénols ω 3 naturels et synthétiques : potentiels antioxydants

La plupart des lipophénols ω 3 que l'on trouve dans la littérature ont été développés pour deux principales raisons : (1) pour augmenter l'effet de conservation des matrices alimentaires lipidiques contre l'oxydation ;^{120b, 125} (2) pour augmenter la faible perméabilité cellulaire des polyphénols, mais également leur faible solubilité et biodisponibilité (mises en évidence dans le domaine dermocosmétique, nutritionnel ou pour des applications thérapeutiques). Plusieurs types de tests ont été décrits pour évaluer la capacité antioxydante d'un lipophénol, permettant parfois de la comparer au polyphénol de départ. Cependant, il n'existe pas à ce jour de lipophénols étudiés et développés pour réduire le stress carbonylé, à l'exception des travaux du laboratoire.

II.1. Descriptions succinctes des tests d'évaluation de la capacité antioxydante des lipophénols ω 3

De nombreux tests *in vitro* (en tube à essais ou sur des cellules, **Tableau 6**) sont disponibles pour détecter, quantifier et comparer les activités antioxydantes et la capacité de certains composés à protéger un substrat de l'oxydation. Malheureusement aucun de ces tests n'est

universel. Les résultats obtenus par ces différents tests ne vont pas dépendre uniquement de l'activité directe du composé phénolique étudié, mais de plusieurs paramètres qui sont à prendre en considération lors de la comparaison des activités antioxydantes de différents composés. En effet, la capacité antioxydante d'un polyphénol ou d'un lipophénol dépendra également de sa solubilité, celle du substrat à protéger de l'oxydation, et donc de la nature lipophile ou hydrophile du milieu utilisé pour réaliser les essais. Ainsi, la comparaison des capacités antioxydantes obtenues par deux méthodes différentes, seront difficilement comparables.¹²⁶ Plusieurs tests sont rapportés dans la littérature pour évaluer les capacités antioxydantes des lipophénols et sont présentés dans le **Tableau 6**.

Test *In vitro* sans cellule

Type de test

Méthode d'analyse (quelques exemples)

DPPH
(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)
Initiateur de radicaux

1) Évaluation par résonance paramagnétique électronique (RPE) de la formation des radicaux libres (électrons célibataires), via la mesure d'un signal dont l'intensité est proportionnelle à leur formation.
2) Mesure de l'absorbance du DPPH (à 517 nm).¹²⁷

TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)

Mesure de l'absorbance (532-535 nm) ou d'intensité de fluorescence (excitation à 532 nm et émission à 554 nm) du composé issu de la condensation entre l'acide thiobarbiturique et le MDA.¹²⁸ Le MDA peut être formé lors de la peroxydation lipidique et correspond à une "substance réagissant" avec le TBA.

ABTS
(acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique))

Mesure de l'absorbance du radical ABTS^{*+} (à 734 nm). Le terme de TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) peut être employé pour cette mesure, lorsque le trolox est pris comme standard.¹²⁷

FRAP
(ferric reducing antioxidant power)

Suivi colorimétrique de la réduction du complexe $\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2$ (tripirydyltriazine) incolore en complexe $\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2$ bleu (absorbance à 593 nm) réalisé à pH faibles. Cela correspond à une mesure de la capacité réductrice de l'antioxydant (proportionnelle à la quantité de complexe (Fe^{2+} -TPTZ) formée).¹²⁹

Système β -carotène
linoléate

Mélange d'acide linoléique et de β -carotène. Mesure de l'absorbance (à 470 nm) du β -carotène, diminuée lorsque ce dernier est dégradé par oxydation thermique du mélange, entraînant une peroxydation lipidique du LA.^{120b}

Auto-oxydation du linoléate de méthyle

Mesure de la formation des peroxydes formés après oxydation lipidique (*via* une méthode iodométrique).¹³⁰

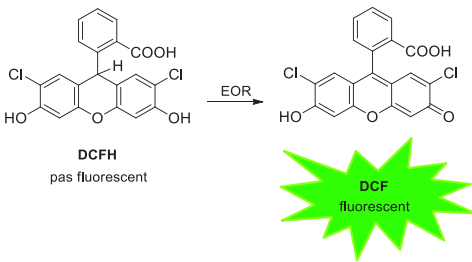
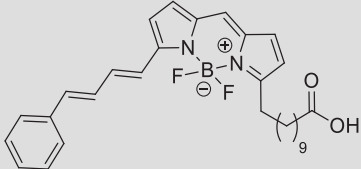
Test en culture cellulaire		
Type de test	Formule chimique	Méthode d'analyse (quelques exemples)
CAA (cellular antioxidant activity)	<p>DCFH/DCF (2',7'-Dichlorofluoresceine)</p>  <p>DCFH pas fluorescent</p> <p>DCF fluorescent</p>	Mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde, proportionnelle à la présence d'EOR (réaction avec la sonde, cette dernière ayant au préalable traversé la membrane cellulaire). ¹³¹
CLPAA (cellular lipid peroxidation antioxidant activity)	<p>C11-BODIPY^{581/591} (bore-dipyrométhène)</p> 	Mesure d'une intensité de fluorescence grâce à la sonde, cette dernière s'incorporant dans les membranes cellulaires. La mesure obtenue est proportionnelle au mécanisme de peroxydation lipidique s'effectuant dans la membrane des cellules. ¹³¹

Tableau 6 : Les différents tests utilisés dans la littérature pour évaluer les capacités antioxydantes d'un lipophénol.

Les tests effectués *in vitro* mais sans la présence de cellule ne permettent malheureusement pas de prendre en compte l'éventuel clivage enzymatique de la liaison (souvent de type ester) entre le polyphénol et l'AGPI, pouvant être à l'origine d'un rétablissement ou d'une augmentation de l'activité antioxydante par la libération d'une fonction polyphénolique.

II.2. Lipophénols ω 3 présentant une capacité antioxydante

L'activité antioxydante des lipophénols est très souvent comparée à celle des polyphénols non couplés à l'AGPI, et souvent évaluée *via* un test de piégeage de radicaux initiés par le DPPH. Tous les lipophénols oméga-3 rapportés dans la littérature montrent une activité antioxydante, mise en évidence par le test de piégeage des radicaux avec le DPPH.^{120b, 125, 127, 129a, 132} Il n'y a, pour l'instant, pas de corrélation concrète entre l'introduction de la partie lipidique et l'augmentation ou la diminution de la capacité de piégeage des radicaux de la partie polyphénolique. Les différentes activités antioxydantes des lipophénols mises en évidence vont dépendre de son caractère lipophile (important pour le test utilisé), de la nature de l'AGPI et du polyphénol, mais également de la position de l'accrochage du lipide.

II.2.1. Activité des lipophénols d'origine synthétique

Les évaluations des capacités antioxydantes de plusieurs lipophénols, obtenus de manière synthétique, sont rapportées dans la littérature.

D'après les travaux de Zhong *et al.*^{132a} les lipophénols composés d'EGCG tétra esters d'EPA ou de DHA **1 (Schéma 39)**, obtenus après couplage avec un chlorure d'acide gras suivi d'une séparation par HPLC-préparative (high performance liquid chromatography), possèdent une meilleure activité antioxydante dans le test au DPPH, comparé à l'EGCG libre. Les auteurs suggèrent que la partie lipidique du lipophénol lui confère un caractère lipophile plus important, améliorant l'accessibilité au radical lipophile DPPH comparé au flavonoïde libre plus hydrophile. De plus, il est également suggéré que l'acylation des positions 3', 5', 3'' et 5'' pourrait réduire la densité électronique de la liaison oxygène/hydrogène des hydroxyles en positions 4' et 4'', permettant ainsi d'augmenter la capacité de piégeage des radicaux libres au niveau de ces positions.

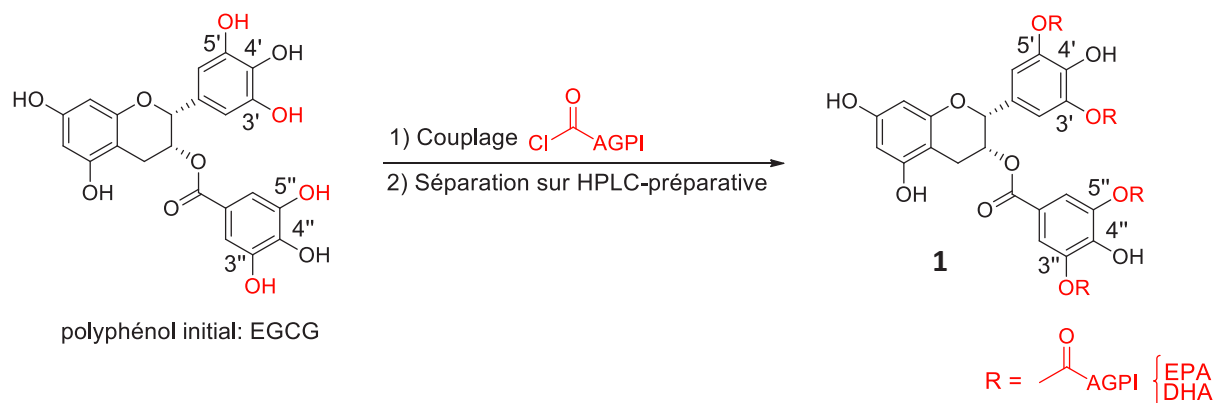


Schéma 39 :EGCG tétra esters d'EPA ou de DHA d'origine synthétique et évalués lors du test DPPH.^{132a}

A l'inverse, la quercétine (penta, tetra, et tri) couplée à l'ALA par une liaison ester¹²⁷ **2** (**Schéma 40**) (obtenue après couplage avec le chlorure d'ALA et purification), présentent une activité antioxydante moins importante comparée à la quercétine libre, dans les tests DPPH (IC_{50} : $4,72 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour la quercétine contre $107,26 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les triesters) et ABTS (TEAC : $1930 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour la quercétine contre $1,33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les triesters). Cependant, les triesters pour lesquels l'hydroxyle en positions 5 et 3 sont libres présentent une meilleure activité antioxydante que le penta-ester présentant uniquement l'hydroxyle en position 5 libre. Ce travail met en évidence l'importance de la présence de la fonction hydroxyle libre (ici en position 3) afin de conserver une activité antioxydante. Il est également présenté dans ce travail que l'activité antioxydante des AGPI couplés à la quercétine augmente avec le nombre d'insaturation de l'AGPI.

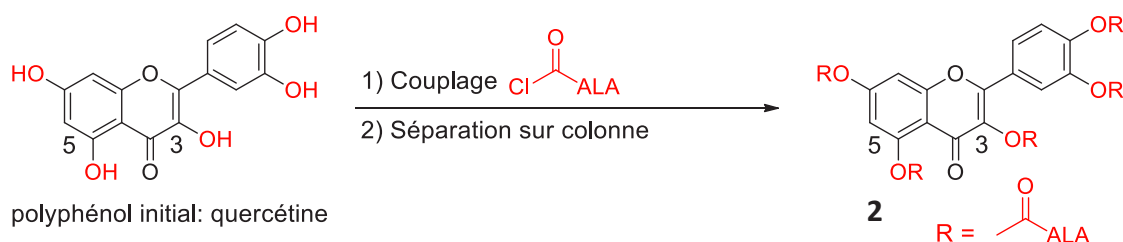


Schéma 40 : Quercétines penta, tetra, et triesters d'ALA d'origine synthétique et évaluées lors des tests DPPH et ABTS.¹²⁷

De manière similaire, le DHCA (acide dihydrocaféique) libre présente une meilleure capacité antioxydante (62%), dans le test de piégeage des radicaux DPPH, comparé à celle de son conjugué lipidique (19%, ALA-acyle glycérol **3**, **Schéma 41**).^{132b} Ce dernier est obtenu *via* une

transésterification catalysée par une lipase en présence du DHCA et du triacycle glycérol d'ALA provenant d'huile de lin.

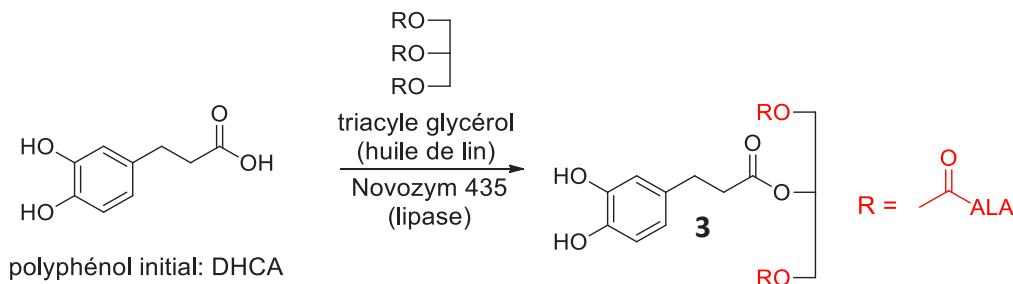
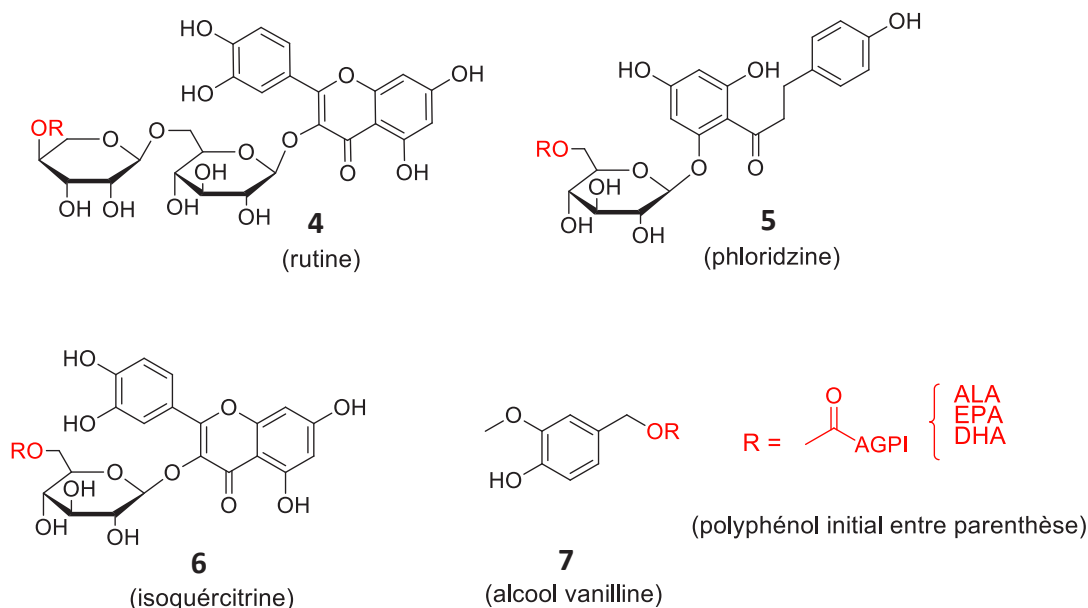


Schéma 41 : DHCA lipidique ALA-acyle glycérol d'origine synthétique et évalué lors du test DPPH.^{132b}

Une observation comparable est rapportée par Mbatia *et al.*¹²⁵ avec les dérivés (**Schéma 42**) ALA, EPA et DHA esters de vanilline **7**, pour lesquels la capacité de piégeage des radicaux dans le test DPPH est plus faible comparée à l'alcool vanillique libre. Une augmentation importante de l'hydrophobicité pourrait impacter la solubilité des AGPI ester de vanilline dans le milieu utilisé pour ce test. Similairement avec les dérivés AGPI (**Schéma 42**) de la rutine **4**, de la phloridzine **5** et de l'isoquercitrine **6**, des composés présentant l'AGPI lié à la partie carbohydrate (n'étant pas considérée comme une partie importante de la molécule pour la capacité antioxydante), seuls les AGPI esters de la rutine **4** présentent une activité antioxydante similaire¹²⁵ ou légèrement plus faible^{120b} dans le test DPPH. Les activités antioxydantes des AGPI (ALA, EPA et DHA) esters de la phloridzine **5** et l'isoquercitrine **6** (**Schéma 42**), mises en évidence avec les tests DPPH et FRAP sont quant à elles moins élevées que celles des polyphénols libres correspondant.^{129a} Selon les auteurs, cet effet pourrait être attribué à la gêne stérique occasionnée par l'AGPI puisque le nombre de doubles liaisons semble avoir un impact sur l'évolution de la capacité antioxydante.



Synthèse générale des quatre dérivés polyphénoliques:

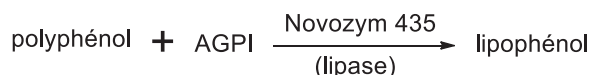


Schéma 42 : Lipophénols d'origine synthétique et évalué lors du test DPPH (composés **4**, **5**, **6** et **7**), FRAP (composés **5** et **6**), TBARS (composés **4** et **7**), linoléate β -carotène (composé **4**), huile de tournesol (composé **4**).^{120b, 125}

Dans les tests effectués en milieu lipidique, des résultats différents peuvent être obtenus. En effet, l'ALA ester de rutine **4** présente une meilleure inhibition de la peroxydation lipidique que la rutine, similaire à celle du BHT,^{120b} évaluée dans le système linoléate β -carotène. Cette limitation est proche de celle obtenue avec le dérivé palmitate ou stéarate de la rutine. Des résultats comparables sont mis en évidence dans les travaux de Viskupicova *et al.*,^{120b} montrant que l'hydrophobicité a un impact sur la capacité antioxydante des dérivés lipophiles de la rutine **4** dans des systèmes lipidiques alimentaires (huile de tournesol) : une meilleure protection est observée pour des acides gras à longue chaîne (C16 à C18) comparé à ceux possédant une chaîne plus courte (C4 à C10) (non représentés sur le **Schéma 42**). Dans ce cas, le nombre d'insaturation pour les AG de chaîne C18 ne présente aucune influence sur l'activité.

En fonction de la matrice lipidique utilisée pour mettre en œuvre le test antioxydant, les résultats peuvent différer : lors du test de protection de l'oxydation d'acyles glycérols enrichis en

AGPI dans un milieu lipophile (émulsion d'huile de poisson) évalué *via* le test TBARS, les AGPI esters de rutine 4 présentent cette fois une capacité antioxydante inférieure à celle du BHT mais supérieure à celle de α -tocophérol lipidique.¹²⁵

Tous ces dérivés sont obtenus par réaction de la lipase Novozym 435 en présence du polyphénol et de l'AGPI.

II.2.2. Activité des lipophénols d'origine naturelle

D'après la littérature, certains lipophénols d'origine naturelle ont également été évalués pour leur capacité antioxydante (**Figure 26**).

Le linoléate de Z-p-coumaryle **8**, isolé au niveau des épluchures de pomme (de type annurca), présente une activité antioxydante similaire (50%) comparé à son analogue linoléate concernant l'inhibition de peroxyde dans le test d'auto-oxydation du linoléate de méthyle.^{130a}

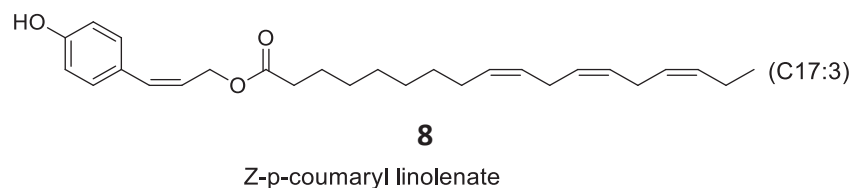


Figure 26 : Lipophénol d'origine naturelle présentant une activité antioxydante dans le test d'auto-oxydation du linoléate de méthyle.^{130a}

L'EPA chromone **9**, isolé d'une algue brune (*Zonaria spiralis*), et dont la synthèse totale a été décrite par Mohamed *et al.* en 5 étapes à partir de L'EPA ester d'éthyle (**Schéma 43**), protège des cellules HepG2 contre la peroxydation lipidique (test CLPAA), et contre les EOR (test CAA).¹³¹ Son activité est similaire à celle de la quercétine dans le test CLPAA (respectivement IC_{50} : 14 and 10 μ M) mais moins importante dans le test CAA (respectivement IC_{50} : 160 and 71 μ M).

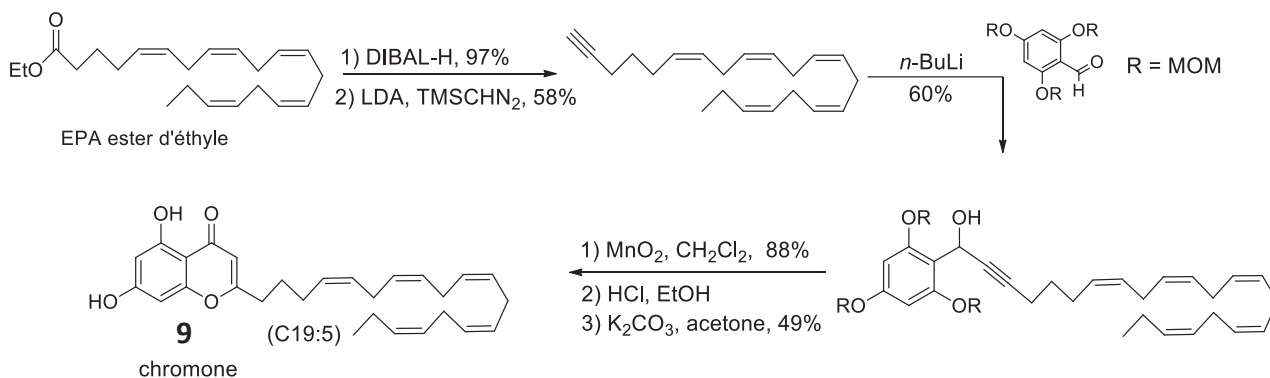


Schéma 43 : Synthèse totale du chromone **9**, isolé de *Zonaria spiralis*, et présentant des activités antioxydantes dans les tests CLPAA et CAA.¹³¹

II.2.3. Conclusion et observation sur l'activité antioxydante des lipophénols ω 3

La plupart des résultats obtenus avec le test DPPH montrent une baisse de la capacité de piégeage des radicaux libres du lipophénol comparé au polyphénol libre. Cependant, différentes expériences effectuées sur des suspensions microsomales, dans des systèmes d'émulsion semblent contredire cette observation. En effet, la capacité antioxydante du lipophénol comparé au polyphénol libre paraît être maintenue, et voire meilleure dans un système biologique ou dans un milieu alimentaire. Des tests *in vitro* et cellulaires spécifiques sont nécessaires pour répondre totalement à l'interrogation portant sur l'activité antioxydante des lipophénols, et doivent être choisis en fonction du domaine d'application visé.

L'intérêt de l'utilisation des lipophénols à des fins thérapeutiques réside dans la combinaison des capacités antioxydante de la partie polyphénolique et lipidique, la potentielle amélioration de la biodisponibilité du polyphénol couplé à un AGPI, et la synergie d'action entre les deux molécules. Dans le cadre de notre étude visant à développer des molécules actives contre les stress oxydant et carbonylé dans les pathologies rétiniennes, des lipophénols ont été préalablement synthétisés au sein du laboratoire. Leurs évaluations *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier le phloroglucinol-*O*iPr-ODHA comme molécule d'intérêt.

Chapitre II. Utilisation de lipophénols contre les stress oxydant et carbonylé, dans le cadre des maladies rétiniennees

I. Résultats précédents de l'équipe: activité du phloroglucinol, partie polyphénolique du lipophénol

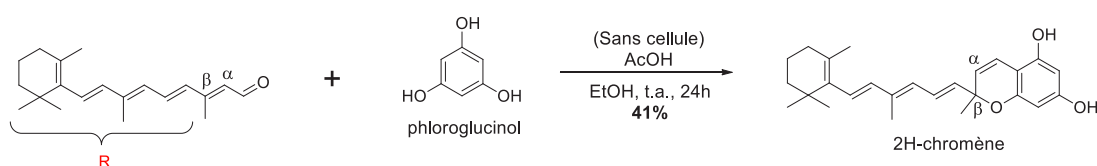
La capacité antioxydante des polyphénols^{43, 133} et leur capacité à piéger des espèces carbonylés électrophiles toxiques (potentiel anti-stress carbonylé) sont deux propriétés justifiant leur développement dans le cadre des maladies rétiniennees. Un polyphénol de la famille des phlorotanins, le phloroglucinol a précédemment été sélectionné au sein du laboratoire, pour son activité antioxydante,¹³⁴ mais également pour son activité contre la neurodégénérescence. En effet, le phloroglucinol, en plus de son activité antioxydante a également été décrit pour atténuer des déficits au niveau des fonctions motrices et cognitives sur des animaux modèles des maladies de Parkinson et Alzheimer.¹³⁵ De plus, sa capacité anti-stresseur carbonylé a également été mise en évidence en condition physiologique, notamment au niveau des composés α -dicarbonylés (methylglyoxal)⁹⁷ et du piégeage des aldéhydes α,β -insaturés (comme le 4-HNE (4-hydroxynonéal) ou l'acroléine)⁷¹ (partie I, chapitre I, paragraphe 3.2.1. et 2.). Cette double activité en fait donc un candidat de choix pour réduire les stress oxydant et carbonylé dans les pathologies rétiniennees. Cependant, à cause de sa faible biodisponibilité, un dérivé lipophénolique a dû être développé au sein du laboratoire afin d'augmenter son activité.

La biodisponibilité de certains polyphénols au sein du tissu rétinien a été évaluée grâce à des tests de perméabilité *in vitro*.¹³⁶ Liu *et al.* décrivent un modèle utilisé permettant de mimer la barrière hémato-rétinienne (BHR), correspondant à la combinaison de cellules de l'EPR (lignée ARPE-19) cultivées sur une plaque comportant un polymère perméable. La BHR présente une meilleure perméabilité pour les acides phénoliques (acides gallique et coumarique), de que pour les flavonoïdes (lutéoline, quercétine, *epi*-catéchine), et même, les anthocyanines. Le phloroglucinol n'a pas été testé dans cette étude.

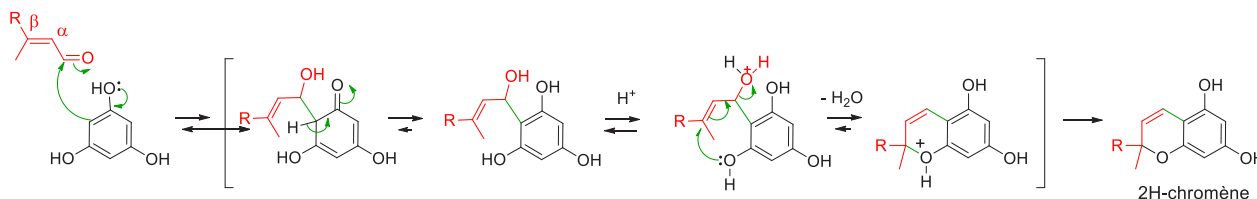
I.1. Propriété anti-stress carbonylé du phloroglucinol *in vitro* dans un système sans cellule

I.1.1. Capacité anti-stress carbonylé du phloroglucinol mise en évidence lors des travaux préliminaires

Le phloroglucinol possède une capacité anti-stress carbonylé contre le rétinol tout-*trans*⁴ (**Schéma 44**). Comme présenté dans la partie I (chapitre II, paragraphel.2.3.) de ce manuscrit, ce dernier s'accumule de manière anormale, de façon chronique ou aiguë dans le cadre des rétinopathies visées, la forme sèche de la DMLA et la maladie de Stargardt, et conduit à la formation d'A2E toxique après photo-oxydation.



Mécanisme proposé pour la formation du 2H-chromène:



Structures de types chromènes alternatives, n'ayant pas été isolées:

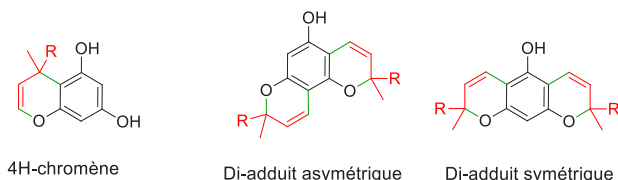


Schéma 44 : Mise en évidence de l'activité anti-stress carbonylé du phloroglucinol contre le rétinol tout-*trans* à travers la formation du 2H-chromène.⁴

Cette capacité de piégeage du rétinol tout-*trans* a été mise en évidence en incubant ce dernier en présence d'1 éq. de phloroglucinol à température ambiante, dans l'éthanol acidifié par de l'acide acétique. La formation du 2H-chromène, produit de condensation du rétinol tout-*trans* et du phloroglucinol, est observée après 24 h de réaction. Ce dernier est obtenu *via* une C-addition 1,2 du carbone libre, présent sur le motif résorcinol du phloroglucinol, sur le rétinol tout-*trans* suivi d'une O-addition intramoléculaire sur la double liaison du benzyle alcool allylique. Le produit secondaire correspondant au régioisomère 4H-chromène n'est pas observé dans ces conditions, probablement dû à l'encombrement stérique du carbone en position β de la double liaison évitant

ainsi l'addition 1,4 de type Michaël. De plus, le 2H-chromène présente également un motif résorcinol, lui permettant en théorie de pouvoir réagir avec une autre molécule de rétinol tout-*trans*. Cependant, aucun di-adduit symétrique ou asymétrique n'est isolé dans ces conditions.

I.1.2. Inhibition de la formation de l'A2E dans un système sans cellule

Le bis-rétinoïde A2E, principal constituant de la lipofuscine, est un composé caractéristique des maladies rétiniennees évoquées. Son accumulation importante suivie et sa photo-oxydation conduit à la formation de dérivés toxiques entraînant la dégénérescence de l'EPR (partie I, chapitre II, paragraphe I.2.3.). Cet A2E est formé physiologiquement à partir du rétinol tout-*trans* en présence d'une molécule de phosphatidyléthanolamine ou éthanolamine¹³⁷ (**Schéma 45**). La première étape correspond à une réaction de type stress-carbonylé entre le rétinol tout-*trans* et une molécule de phosphatidyléthanolamine conduisant à la molécule **10** issu de cette condensation. Ensuite, l'équilibre tautomérique permet la formation de la N-ret-PE **11** (si R= phospholipide), suivi d'une deuxième condensation avec le rétinol tout-*trans* conduisant à l'ammonium **12**. Une réaction de type Diels-Alder (cycloaddition [4+2]) permet de former l'adduit **13**, dont l'oxydation et l'hydrolyse (effectuée au cours de la phagocytose) conduit à l'A2E.

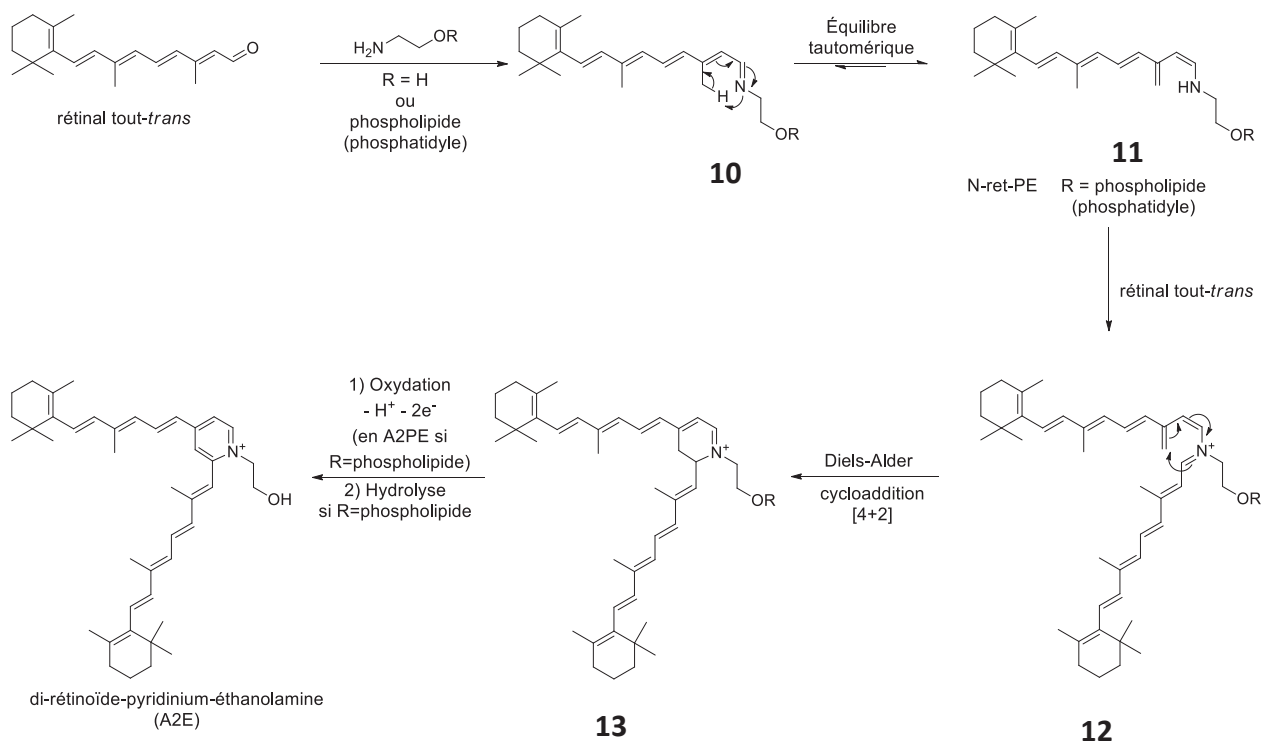


Schéma 45 : Mécanisme de formation de l'A2E à partir du rétinol tout-*trans*.¹³⁷

Ce mécanisme de formation permet de mettre en évidence les étapes nécessaires à la formation de l'A2E, nécessitant l'action de deux molécules de rétinol tout-*trans*. Le piégeage de ce dernier, lorsqu'il est présent en excès, par une molécule exogène pourrait ainsi limiter la formation de l'A2E. De ce fait, des expériences de compétition *in vitro*, sans présence de cellules ont été menées⁷³ pour étudier la capacité de piégeage du rétinol tout-*trans* par le phloroglucinol en présence d'éthanolamine (**Schéma 46**).

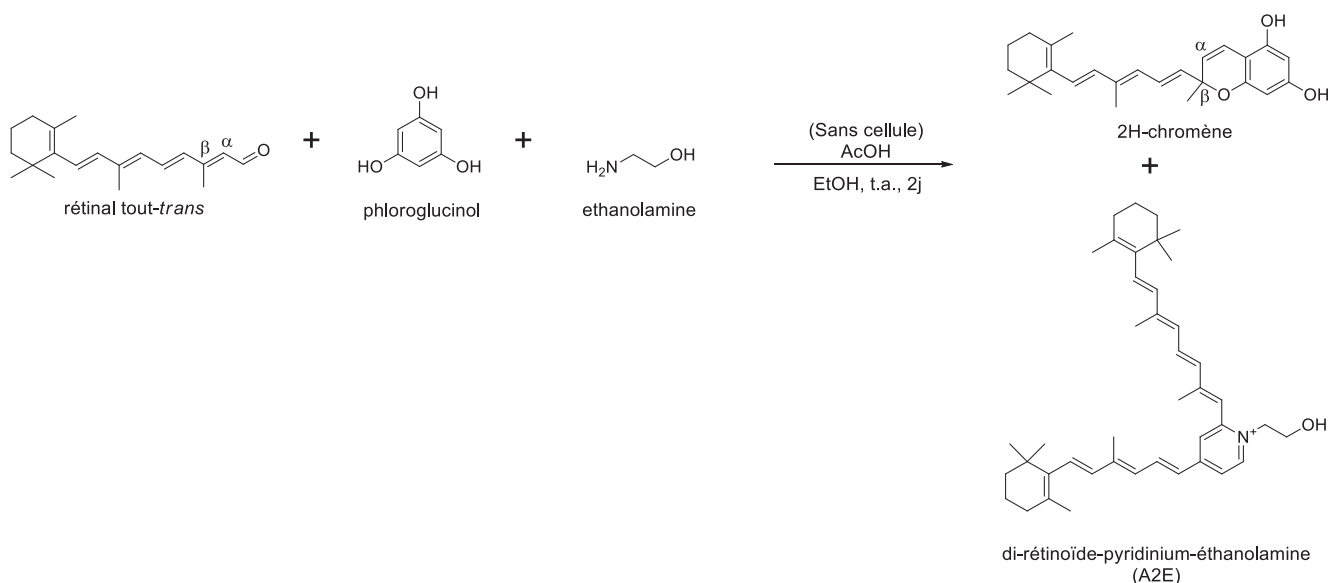


Schéma 46 : Compétition du piégeage du rétinol tout-*trans* par le phloroglucinol ou l'éthanolamine⁷³

Essais	Equivalent de rétinol tout- <i>trans</i>	Equivalent d'éthanolamine	Equivalent de Phloroglucinol	A2E dosé (nmol) (moyenne ± SEM)	2H-chromène (nmol) (moyenne ± SEM)
1	1	1	0	1833 ± 303	0
2	1	1	1	49 ± 19	10 ± 4
3	1	1	2	8 ± 7	318 ± 25

Tableau 7 : Résultats de compétition du piégeage du rétinol tout-*trans* par le phloroglucinol et l'éthanolamine, obtenus par quantifications⁷³ de l'A2E et du 2H-chromène par HPLC-UV

Les résultats obtenus (**Tableau 7**) ont montré une réduction de la synthèse d'A2E en présence d'1 ou 2 éq. de phloroglucinol. Les auteurs suggèrent que la fonction carbonyle électrophile du rétinol tout-*trans* est préférentiellement attaquée par le phloroglucinol comparé à l'éthanolamine, conduisant à une réduction significative de la production d'A2E durant ces essais.

I.2. Propriétés protectrices contre les stress oxydant et carbonylé du phloroglucinol sur les cultures primaires d'EPR et de photorécepteurs

Les propriétés protectrices du phloroglucinol ont été évaluées sur des cellules de l'EPR ou de photorécepteurs, issu de cultures primaires de rat.⁷³ Ces cultures sont dites primaires car elles proviennent directement d'un tissu, obtenu après sacrifice de l'animal. Plusieurs types de test ont été effectués pour mettre en évidence les propriétés protectrices du phloroglucinol en présence d'un stresseur carbonylé ou oxydant.⁷³

I.2.1. Limitation par le phloroglucinol de la cytotoxicité induite par un stresseur carbonylé et oxydant en culture primaire

L'effet de la pré-incubation du phloroglucinol sur les cultures primaires de l'EPR, suivi de l'incubation des stresseurs chimiques, soit le rétinol tout-*trans* (atRAL, stresseur carbonylé), soit le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, stresseur oxydant), a été évalué grâce à un test de survie cellulaire (MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (**Figure 27**).

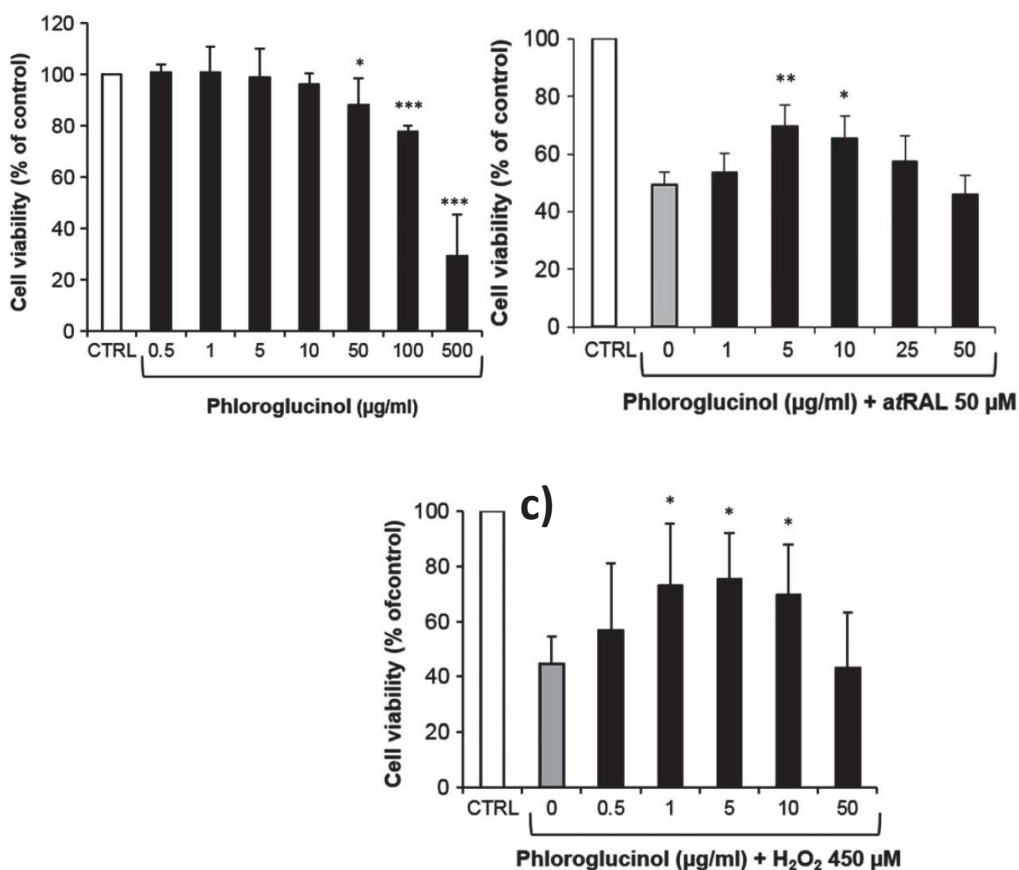


Figure 27 : Évaluation de l'effet protecteur du phloroglucinol : incubation des cultures primaires d'EPR avec le phloroglucinol a) sans stresseur chimique, b) avec H₂O₂ (450 µM), c) avec le rétinol tout-*trans* (atRAL) (50µM).⁷³

En présence de rétinol tout-*trans* (50 μM , **Figure 27, b**), la survie cellulaire passe de $49 \pm 9\%$ (sans phloroglucinol) à $70 \pm 7\%$ lorsque les cellules ont été pré-incubées avec 5 $\mu\text{g/ml}$ (40 μM) de phloroglucinol (**Figure 27, b**). Avec le traitement en présence H_2O_2 (450 μM , **Figure 27, c**), la survie cellulaire passe de $45 \pm 10\%$ (sans phloroglucinol) à $76 \pm 16\%$ avec la même incubation de phloroglucinol des cellules. Ainsi, la pré-incubation des cultures primaires de l'EPR par le phloroglucinol a permis une protection contre le rétinol tout-*trans* (atRAL) et H_2O_2 avec une efficacité du même ordre de grandeur.

De plus, l'effet du phloroglucinol en présence de rétinol tout-*trans* (atRAL) sur des cultures primaires de photorécepteurs cette fois-ci, a été également évalué grâce à un test de survie cellulaire (**Figure 28**).

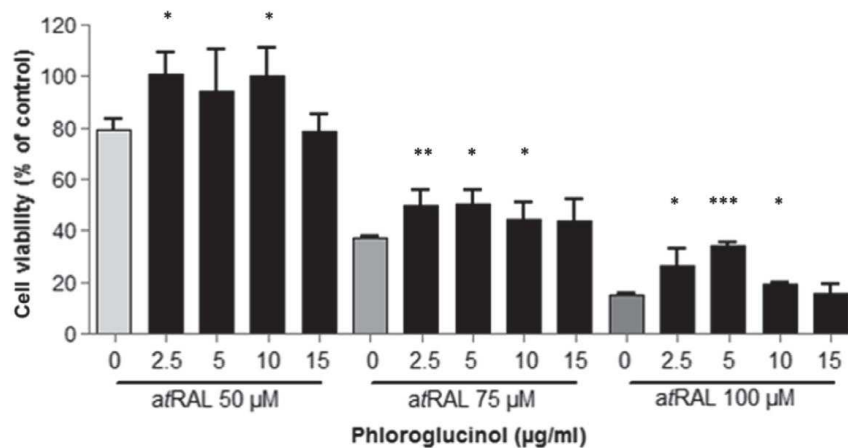


Figure 28 : Évaluation de l'effet protecteur du phloroglucinol : incubation des cultures primaires de photorécepteurs avec le phloroglucinol et le rétinol tout-*trans* (atRAL à 25, 50 et 75 μM).⁷³

Le phloroglucinol montre un effet protecteur et ce pour plusieurs concentrations en rétinol tout-*trans*, jusqu'à 100 μM . La protection des photorécepteurs a également été mise en évidence *via* la conservation des cellules de rhodopsine (la rhodopsine-IR⁺ (immunoréactivité)) évaluée par immunofluorescence.

Pour conclure, le phloroglucinol a montré dans cette étude un effet protecteur contre le stress oxydant (H_2O_2). De plus, il a montré une protection contre le rétinol tout-*trans* (atRAL) non seulement au niveau des cultures primaires de l'EPR mais également sur les photorécepteurs.

I.2.2. Activité anti-stress oxydant et carbonylé du phloroglucinol en culture primaire

I.2.2.1. Limitation des EOR induites par H₂O₂

La capacité du phloroglucinol à piéger les EOR a été évaluée grâce à une sonde fluorescente, le DCFDA (2',7'-dichlorofluorescine diacetate, **Tableau 6**), permettant de quantifier la formation d'EOR (**Figure 29**) au sein des cultures primaires de l'EPR.

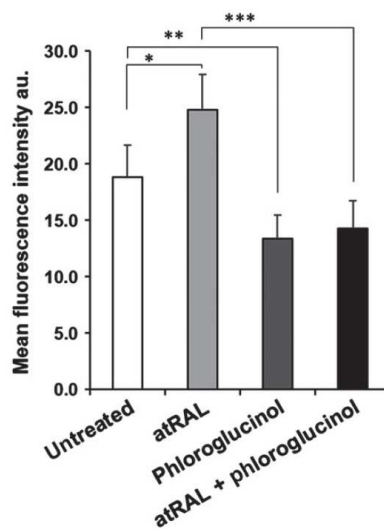


Figure 29 : Limitation de la production des EOR par le phloroglucinol : incubation des cultures primaires d'EPR avec le phloroglucinol (50 µg/ml) et le rétinol tout-*trans* (atRAL) (25 µM) puis mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde DCFDA.⁷³

L'incubation des cellules en présence de rétinol tout-*trans* (atRAL à 25 µM) montre une augmentation significative de la formation d'EOR (intensité de fluorescence plus élevée) dans ces conditions, comparé aux cellules non traitées. L'incubation avec le phloroglucinol (50 µg/ml) et le rétinol tout-*trans* (atRAL) montre une diminution de l'intensité de fluorescence associée à une réduction de la formation d'EOR.

I.2.2.1. Réduction des concentrations en rétinol tout-*trans*

Les cultures primaires de l'EPR ont été traitées par le rétinol tout-*trans* (atRAL à 25 µM), avec ou sans incubation du phloroglucinol (50 µg/ml) (**Figure 30**). Le rétinol tout-*trans* libre est ensuite analysé et quantifié dans le milieu de culture et le lysat cellulaire par HPLC afin d'évaluer sa disparition en présence du phloroglucinol.

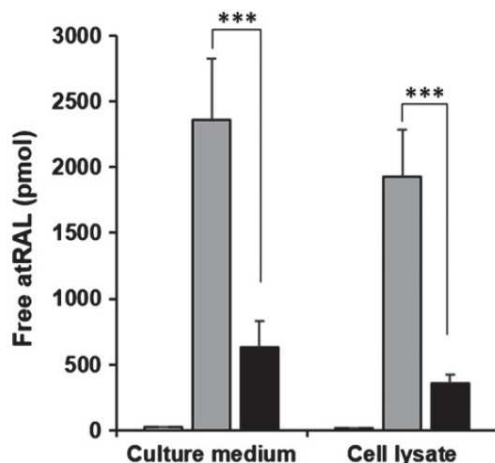


Figure 30 : Piégeage du rétinol tout-*trans* (atRAL) : incubation des cultures primaires d'EPR avec le rétinol tout-*trans* (atRAL) (25 μ M) (rectangles gris) ou co-incubation avec le phloroglucinol (50 μ g/ml) (rectangles noirs) suivi de la quantification du rétinol tout-*trans* (atRAL) libre par HPLC-UV dans le milieu de culture (à gauche) et le lysa cellulaire (à droite).⁷³

Les données montrent clairement une diminution du rétinol tout-*trans* libre dans les deux échantillons analysés en présence du phloroglucinol. Un contrôle avec une co-incubation du rétinol tout-*trans* avec le phloroglucinol dans le milieu de culture, sans cellule a également été effectué. Ce dernier ne montre aucun piégeage du rétinol tout-*trans*, sous entendant que la présence des cellules est indispensable pour le piégeage, faisant probablement intervenir un compartiment intracellulaire à identifier et présentant un pH acide (nécessaire pour le piégeage, comme mis en évidence dans la partie II, chapitre II, I.1.1.).

Malgré des résultats *in vitro* encourageant le phloroglucinol présente des limitations dans le traitement de ces maladies de par sa faible solubilité en milieu lipidique et sa pauvre biodisponibilité. Par analogie avec certains travaux rapportés dans la littérature sur les polyphénols naturels,^{120c, 132a, 138} les propriétés du phloroglucinol ont pu être améliorées en couplant ce dernier avec une partie lipidique, probablement en augmentant sa biodisponibilité et sa pénétration cellulaire. La conception d'un lipophénol basé sur le motif du phloroglucinol a donc été développée dans le cadre des maladies rétiniennees visées. Une amélioration de l'efficacité a également été apportée en étherifiant les hydroxyles du phloroglucinol afin de moduler la nucléophilie du cycle aromatique.

II. Mise en évidence d'un lipophénol lead : le phloro-OiPr-ODHA 17

Le choix de la partie lipidique⁵ à coupler au phloroglucinol s'est porté sur un acides gras polyinsaturé : l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, ω 3) (**Figure 31**). Ce dernier a été choisi pour plusieurs raisons :

- Il représente 50% des AG présents dans la membrane des photorécepteurs (segments externes),⁵ ainsi une vectorisation au sein des tissus rétiniens grâce aux systèmes de transport du DHA pourrait être envisageable.
- Une supplémentation en DHA des tissus rétiniens défectueux serait un avantage car ce dernier est essentiel pour la fonction visuelle comme le montre une étude clinique récente menée par Sears et *coll.* sur la forme sèche de la DMLA.¹³⁹

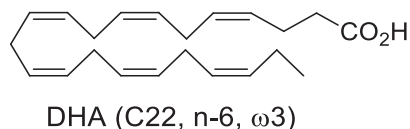


Figure 31 : Structure de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, ω 3).

II.1. Évaluation in vitro, en lignée cellulaire de l'EPR (ARPE-19), de l'activité protectrice des lipophénols contre un stresseur carbonylé (rétinal tout-trans)

L'évaluation biologique rapportée⁴ des lipophénols développés (**Figure 32**) et synthétisés au sein du laboratoire a été réalisée sur une lignée cellulaire de l'EPR : les ARPE-19 (**Tableau 8**). Une lignée cellulaire correspond à une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division.

Lors de cette étude une alkylation du phloroglucinol a également été réalisée afin d'augmenter le caractère nucléophile du phloroglucinol et son potentiel piégeage du rétinol tout-*trans*.

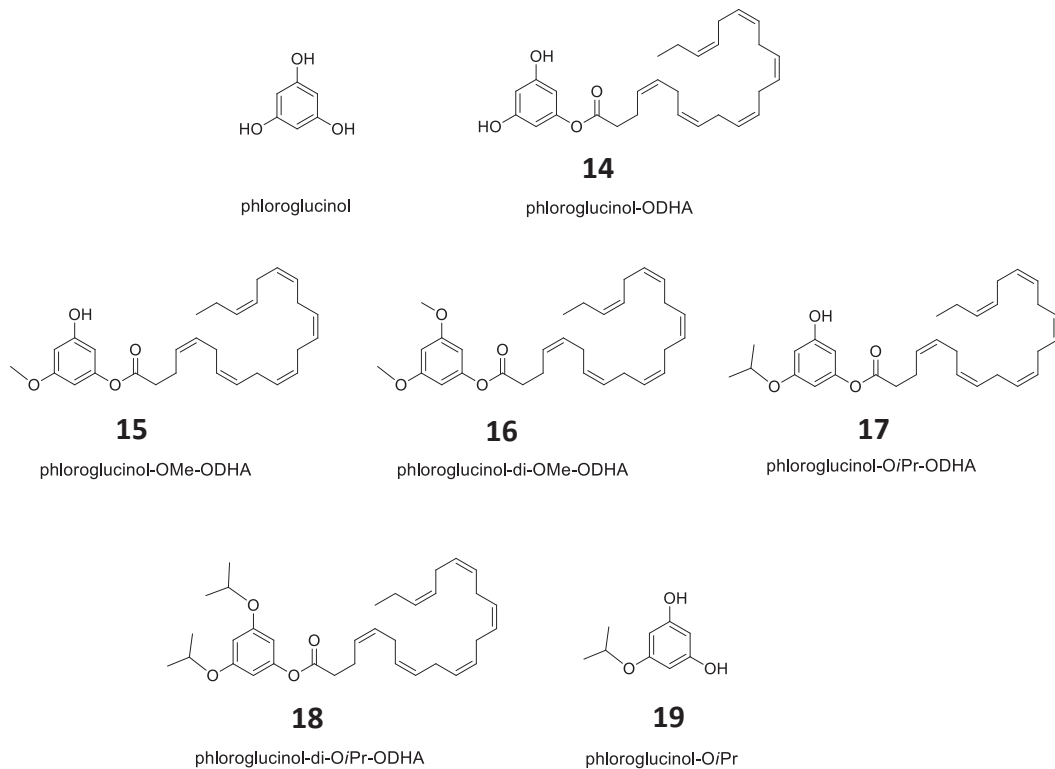


Figure 32 :Les lipophénols du phloroglucinol synthétisés et testés⁴ sur la lignée cellulaire ARPE-19.

Ces tests *in vitro* ont été réalisés par évaluation de la survie cellulaire (test MTT) *via* un traitement préalable avec le lipophénol (à 10 ou 40 μM), suivi d'un stress carbonylé toxique caractérisé par un traitement au rétinol tout-*trans* (noté AtR) (25 μM). Les résultats ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'alkylation et de la liaison à un AGPI, permettant d'augmenter considérablement la protection vis à vis du rétinol tout-*trans*.

Survie cellulaire (%) : Cellules non traitées (contrôles) 100		AtR 29,1 \pm 5,4	
Essais	Composés	Survie cellulaire à 10 μM (%)	Survie cellulaire à 40 μM (%)
1	phloroglucinol	35,5 \pm 3,3	41,6 \pm 9,2
2	14	25,8 \pm 3,7	21,9 \pm 3,8
3	15	32,6 \pm 3,7	44,9 \pm 1,9
4	16	26,5 \pm 4,5	26,2 \pm 2,5
5	phloroglucinol-OiPr-ODHA 17	43,2 \pm 7,5	66,8 \pm 8,6
6	18	31,9 \pm 1,3	45,7 \pm 3,3
7	19	30,6 \pm 1,2	32,7 \pm 1,8
8	DHA	23,5 \pm 2,7	7,3 \pm 5,0
9	DHA + 19	29,0 \pm 1,7	10 \pm 2,6

Tableau 8 : Évaluation de la survie cellulaire : effet protecteur des lipophénols sur la lignée cellulaire ARPE-19 en présence du rétinol tout-*trans* (noté AtR) (25 μM).⁴

Le traitement des cellules avec 25 μM de rétinol tout-*trans* toxique ont réduit la survie cellulaire à environ 40 % par rapport aux cellules contrôle non traitées. Le phloroglucinol présente une faible activité de protection à 40 μM (essai 1), avec un gain de +10 % d'augmentation de survie cellulaire. L'incorporation d'une seule chaîne de DHA sur le motif phloroglucinol (le phloroglucinol-ODHA n°14, essai 2 ne permet pas d'augmenter la survie cellulaire. L'incorporation d'une fonction méthyle au niveau d'une position hydroxyle (phloroglucinol-OMe-ODHA n°15, essai 3 ne permet pas d'améliorer l'activité de protection du phloroglucinol. La meilleure protection (**Tableau 8, essai 5**), associée à environ 70% de survie cellulaire à 40 μM (augmentation de +30% par rapport au phloroglucinol) est obtenue pour le phloroglucinol-*OiPr*-ODHA n°17, possédant un groupement *isopropyle* sur une des fonctions phénoliques, et est confirmée par un effet dose-réponse (**Figure 33**).

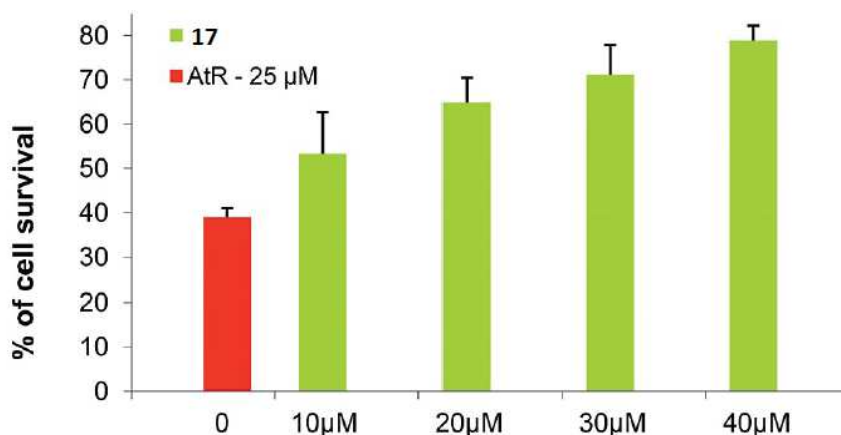


Figure 33 : Évaluation de la survie cellulaire : effet protecteur du phloroglucinol-*OiPr*-ODHA n°17 sur la lignée cellulaire ARPE-19 en présence du rétinol tout-*trans* (noté AtR) (25 μM).⁴

Une activité inférieure (essai 6) est obtenue pour le dérivé di-isopropylylé, le phloroglucinol-di-(*OiPr*)-ODHA n°18, comparé au composé 17 (**Tableau 8, essai 5**). Pour valider l'activité du lipophénol phloroglucinol-*OiPr*-ODHA n° 17, un mélange de DHA et de phloroglucinol-*OiPr* n°19 (**Tableau 8, essai 7**) a été évalué dans les mêmes conditions (pré-traitement des cellules). Ce mélange présente une toxicité tout comme le traitement par le DHA seul (**Tableau 8, essais 8**), alors que le phloroglucinol-*OiPr* n°19 ne présente aucune activité. Ce résultat tend à confirmer de manière certaine que le potentiel cytoprotecteur est obtenu grâce à l'introduction du DHA, lié de manière covalente (liaison ester) sur le phloroglucinol mono-isopropylylé. L'explication de la protection obtenue par le composé lead 17 comparé à son analogue sans DHA, le phloroglucinol-*OiPr* n°19, peut être liée à l'augmentation de la lipophilie et de la pénétration membranaire, mais

également à l'action du DHA pouvant faciliter l'orientation du phloroglucinol en l'amenant à proximité du rétinol tout-*trans* et faciliter ainsi la formation du 2H-chromène. Cependant, cette détoxification du rétinol tout-*trans* n'est pas observée avec le composé sans groupement isopropyle correspondant au phloroglucinol-ODHA **14** (Tableau 8, essai 2). A ce jour le mécanisme d'action du phloroglucinol-*OiPr*-ODHA n°**17** pourrait passer soit par une protection effectuée de manière directe, par réaction du motif phloroglucinol sur le rétinol tout-*trans* pour former le 2H-chromène, ou de manière indirecte via l'activation des systèmes de défense enzymatique cellulaire.

II.2. Évaluation in vitro, en lignée cellulaire de l'EPR (ARPE-19), de la capacité antioxydant (piégeage d'EOR) du composé lead **17**

Au vu des résultats précédent sur le piégeage du rétinol tout-*trans*, l'évaluation du potentiel anti-stress oxydant du composé lead, le phloroglucinol-*OiPr*-ODHA n°**17**, a été effectuée grâce à l'utilisation de la sonde fluorescente, le DCFDA, utilisée pour étudier la formation des EOR en milieu cellulaire (Figure 34).

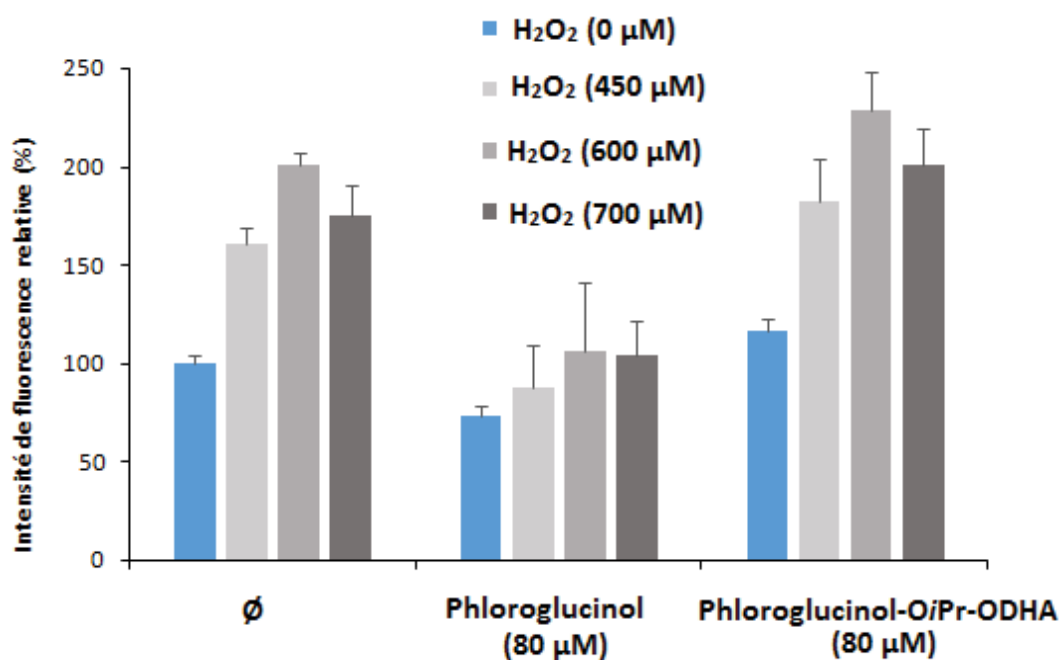


Figure 34 : Piégeage des EOR : Incubation des cellules ARPE-19 avec le phloroglucinol, ou le phloroglucinol-*OiPr*-ODHA n°**17** (80 μM), et avec traitement à H₂O₂ (450, 600 et 700 μM), puis mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde DCFDA.

En présence de phloroglucinol, l'intensité de fluorescence diminue correspondant à une limitation de production ou un piégeage d'EOR, confirmant ainsi les effets antioxydants de ce polyphénol sur le modèle cellulaire ARPE-19. Malheureusement, le potentiel antioxydant du composé lead, le phloroglucinol-OiPr-ODHA n°17, apparaît dans cet essai relativement faible voire inexistant.

Le stress oxydant joue un rôle central dans la physiopathologie des maladies rétiniennees visées. En effet, le stress oxydant est un des deux mécanismes central dans la DMLA et la maladie de Stargardt entraînant la dégénérescence de la macula. Afin de développer un dérivé actif sur le double stress oxydant et carbonylé impliqué dans la formation et la toxicité de l'A2E, il apparaît primordial d'améliorer les propriétés antioxydantes de la molécule lead 17. L'objectif de ces travaux de thèse est donc d'apporter une amélioration nécessaire et indispensable vis à vis des propriétés antioxydantes du composé lead 17, tout en conservant son activité vis à vis du stress carbonylé.

II.3. Évaluation *in vivo* de l'activité protectrice du composé lead 17

Le composé Lead, le phloroglucinol-OiPr-ODHA 17, est actuellement en cours de test *in vivo* au sein de l'équipe du Dr. Philippe Brabet (INM, Montpellier) au travers d'injections IV (en complexation avec la BSA) sur des souris correspondant à des animaux modèles de la maladie de Stargardt (ABCA4 KO). Dans ce modèle, les animaux subissent une injection avec le composé lead (Figure 35), suivi d'une exposition à la lumière, puis une remise dans l'obscurité. L'éblouissement à la lumière induit dans ces souris ABCA4 KO, une dégénérescence des photorécepteurs en 5 jours. Les résultats obtenus montrent une protection du tissu rétinien des souris traitées avec le composé lead 17 *via* une préservation fonctionnelle et structurale de la rétine.

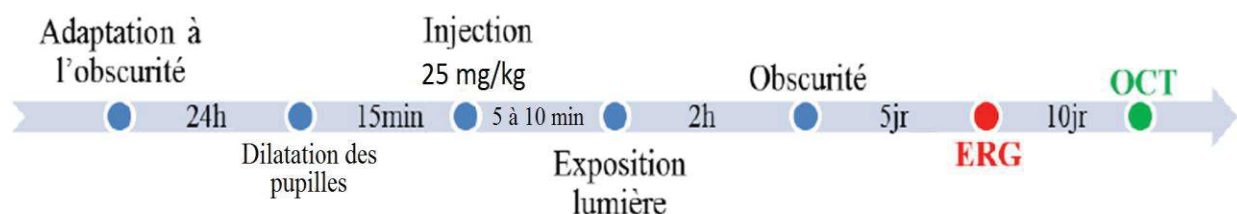


Figure 35 : Protocole d'exposition des souris ABCA4 KO dans le but d'évaluer l'effet protecteur du phloroglucinol-OiPr-ODHA n°17 sur l'intégrité structurale et fonctionnelle de la rétine.

La préservation de l'intégrité de la rétine par le composé lead **17** a été évaluée par différentes techniques : l'ERG (électrorétinogramme), l'OCT (tomographie par cohérence optique) et des coupes histologiques. L'ERG (électrorétinogramme) correspondant à un examen électrophysiologique qui permet d'analyser la réponse électrique (μV) de la rétine à des stimuli lumineux a mis ainsi en évidence la conservation de l'intégrité fonctionnelle de la rétine (grâce au traitement avec une quantité de 25 mg/kg du composé **17**). L'OCT, correspondant à une technique qui utilise un laser à rayons infrarouges (IR, $\lambda = 860 \pm 90 \text{ nm}$) pour cartographier la rétine en profondeur, et les coupes histologiques permettant d'effectuer une exploration anatomique de la rétine ont permis de montrer une préservation de la couche des photorécepteurs grâce à ce même pré-traitement par le composé lead **17**.

Conclusion

Les propriétés antioxydantes des lipophénols oméga-3 décrites dans la littérature apparaissent contrastées et dépendent de la matrice étudiée. Ce résultat s'observe également avec l'activité antioxydante du phloroglucinol-O/Pr-ODHA17, développé au sein du laboratoire.

Au vu des résultats *in vitro* et *in vivo* prometteur de ce lipophénol, l'objectif est d'améliorer son activité antioxydante. En effet, son potentiel anti-stress carbonylé a été prouvé *in vitro* en présence de concentrations toxiques de rétinol tout-*trans* grâce à une protection des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. La limitation de la dégénérescence des photorécepteurs par ce composé est également en cours d'étude *in vivo* sur un modèle murin ABCA4 KO. Malheureusement, cette molécule lead présente des propriétés antioxydantes faibles, qui pourraient être améliorées, et une fonction AGPI hautement oxydable. En effet, les limitations possibles des propriétés antioxydantes du lipophénol pourraient également être associées à une potentielle toxicité du DHA. En effet, cet AGPI sensible à l'oxydation pourrait, *via* un mécanisme de peroxydation lipidique, conduire à la formation de métabolites délétères (ECR énoncé dans la partie I, chapitre I, paragraphe II.2.2.). Cet effet du DHA met en évidence son paradoxe présenté dans la partie suivante. Ainsi l'objectif de ce travail de thèse serait de synthétiser un DHA moins sensible à la peroxydation lipidique, afin de réduire sa potentielle toxicité, et d'augmenter son caractère antioxydant. Une solution rapportée dans la littérature sur les AGPI de type ALA (C18:3, ω 3) et LA (C18 :2, ω 6) a été mise en évidence : l'incorporation de deutériums au niveau des positions oxydables *bis*-allyliques permettrait de contrer le mécanisme de peroxydation lipidique au sein des membranes et de limiter la toxicité des AGPI en condition d'oxydation, apportant ainsi une amélioration à la molécule lead.

**Partie III : Conséquences de la
peroxydation lipidique de lipophénol
conjugué au DHA et intérêt des AGPI
deutérés**

Chapitre I. La peroxydation lipidique du DHA

I. Introduction

Le stress photo-oxydant, très présent au sein de l'œil, engendre la production d'EOR *via* les réactions photochimiques ou par l'action de la machinerie métabolique. En effet, les photorécepteurs présentent un métabolisme aérobie très développé, se traduisant par une consommation importante de O₂ et ainsi par une haute activité mitochondriale, également responsable de la production d'EOR. Le renouvellement de leur segment externe, grâce à la phagocytose effectuée par les cellules de l'EPR, permet d'éliminer une partie des lipides et des protéines oxydés. Ce mécanisme de détoxification peut subir un dysfonctionnement lors d'une exposition accrue à la lumière par exemple.⁵ De plus, cette production importante d'EOR au sein de l'œil, ayant pour origine une exposition aux radiations, aux produits chimiques ou au tabac, peut être responsable du dysfonctionnement mitochondrial à l'origine de l'apoptose des cellules de l'EPR ou des photorécepteurs.¹⁴⁰ Dans le cas de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de la maladie de Stargardt, le stress oxydant intervient lors de la formation de l'A2E. Ce dernier est ensuite transformé en dérivés toxiques *via* un stress photo-oxydant.

Les acides gras polyinsaturés sont sensibles à l'oxydation, de par leur position *bis*-allyliques oxydables, et peuvent former un certain nombre de métabolites délétères (HHE, HNE, ...) comme évoqué dans la partie I (chapitre I, paragraphe II.2.2.). Un AGPI particulier, le DHA, a été utilisé pour développer un lipophénol capable de réduire les stress oxydant et carbonylé au sein du tissu rétinien. Cet oméga-3 représente 25% et 50% des acides gras totaux constitutifs respectivement de la rétine et des phospholipides estérifiés formant les segments externes des photorécepteurs.⁵ Il représente donc un paradoxe au sein de la rétine puisqu'il est indispensable à son bon fonctionnement mais son caractère hautement oxydable peut le rendre délétère. L'action cytotoxique du DHA peut être présente dans certaines conditions de stress oxydant, particulièrement important au sein de l'œil. Ainsi, limiter ce stress et ses conséquences sur les lipides constitue un enjeu thérapeutique important dans le cadre des maladies rétinienues évoquées précédemment. La solution envisageable pour réduire ce stress correspondait à l'utilisation d'AGPI deutérés.

II. Le paradoxe de l'oxydation du DHA

Le rôle du DHA dans les maladies réiniennes dégénératives reste controversé. La concentration de DHA diminue dans le plasma et les segments externes chez des patients atteints par ces maladies, suggérant qu'un lien de cause à effet est présent. Plusieurs hypothèses sont alors formulées expliquant l'origine de la diminution de la concentration en DHA :⁵

- une cause directe de la dégénérescence de la rétine,
- une réponse s'adaptant à l'augmentation du stress oxydant métabolique, l'objectif étant de réduire la possible peroxydation lipidique et ainsi la formation de métabolites délétères,
- une augmentation de la peroxydation lipidique présente dans la rétine, le consommant directement.

La supplémentation en DHA dans le cadre de la DMLA a fait l'objet de plusieurs études. En modèle animal elle semble être bénéfique car liée à la réduction des risques de cette maladie.¹⁴¹ Dans le cas de l'étude clinique sur l'homme menée par *Sears et coll.*¹³⁹, une supplémentation quotidienne en AGPI oméga-3 durant 6 mois a montré une amélioration de l'acuité visuelle sur des patients atteints de la forme sèche de la DMLA. Les quantités d'AGPI oméga-3 supplémentées correspondent à 3,4g d'EPA et 1,6g de DHA. Néanmoins, l'étude clinique AREDS2 menée durant plusieurs années (environ 6 ans) sur des patients atteints de DMLA, correspondant à une supplémentation quotidienne en EPA (650 mg) et DHA (350 mg) n'a pas montré d'améliorations significatives. De plus, une autre étude récente menée sur l'homme (supplémentation de 100 à 200 mg d'EPA et DHA en dose quotidienne) ne reporte pas d'effet significatif direct¹⁴² sur la réduction de la progression de cette maladie.

III. Effets bénéfiques du DHA

Le DHA est un acide gras indispensable au fonctionnement du cerveau et de la rétine pour les mammifères.

III.1.1. Rôle au sein de la rétine

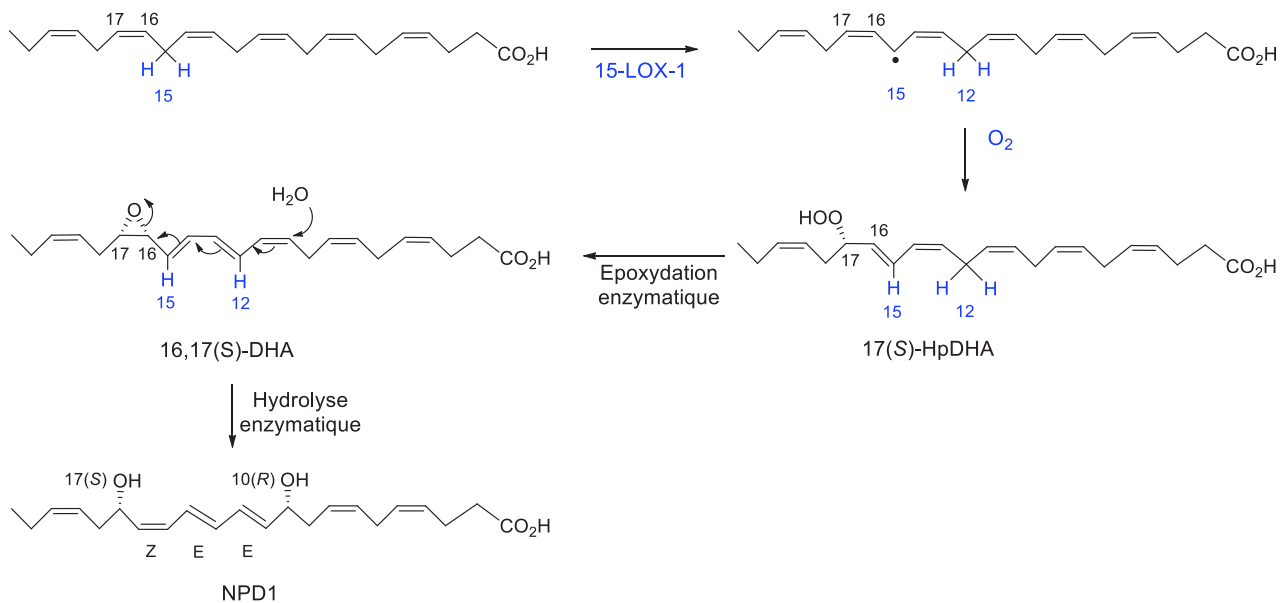
Le DHA a tout d'abord un rôle déterminant au niveau des propriétés biophysiques de l'environnement membranaire des photorécepteurs, permettant notamment le fonctionnement correct du cycle visuel.⁵ Il est aussi essentiel au bon développement post-natal des photorécepteurs. De plus, au sein de la rétine, un mécanisme de recyclage du DHA vers les

photorécepteurs est présent après leur phagocytose par les cellules de l'EPR. Cet AGPI est également responsable de l'activation de voies de signalisation intracellulaire pour protéger les photorécepteurs et moduler leur voie apoptotique. Le DHA présente, d'une manière générale, un rôle antioxydant au sein de la rétine,¹⁴³ à travers l'activation d'enzymes antioxydantes. A titre d'exemple, German *et al.* ont montré une augmentation de l'activité de la GPx (glutathion peroxydase) et la diminution de la formation d'EOR en présence du DHA en culture cellulaire de photorécepteurs, lors d'un stress oxydant initié par H₂O₂.⁵ De plus, les travaux de Lluís *et al.* ont mis en évidence une augmentation des activités de la SOD et de la GPx en modèle murin¹⁴⁴ lors d'une supplémentation en DHA, liée à la diminution des EOR et à la limitation de l'accumulation des protéines oxydées.

III.1.2. Oxydation enzymatique du DHA : cas particulier de la neuroprotectine D1 (NPD1)

L'oxydation enzymatique du DHA permet la formation du 10,17-docosatriène, découvert en 2003 par Serhan *et al.*¹⁴⁵, et renommée neuroprotectine D1 (NPD1) (**Schéma 47**) en 2004 de par son activité biologique neuroprotectrice.¹⁴⁶ En effet, cette dernière présente des activités de neuroprotection,¹⁴⁷ de désactivation des voies de signalisation pro-apoptotique, mais également des activités antioxydantes au sein des cellules rétinienne. De plus, elle possède une action contre l'inflammation¹⁴⁸ puisqu'elle appartient à la famille des médiateurs pro-résolvines ayant une activité anti-inflammatoire¹⁴⁹ (en anglais : anti-inflammatory specialized proresolving mediators ou SPM). Elle constitue le premier médiateur neuroprotecteur du DHA ayant été identifié. La NPD1 présente une large gamme d'activités biologiques, non uniquement restreintes au système nerveux, c'est pour cette raison qu'elle est parfois renommée protectine 1 (PD1) dans certains travaux.

La NPD1 est biosynthétisée à partir du DHA (**Schéma 47**) par la 15-LOX-1 *via* l'abstraction d'un hydrogène *bis*-allylique en position 15 formant l'hydroperoxyde 17(S)-HpDHA. Son époxydation conduit à l'époxyde 16,17(S)-DHA, dont l'hydrolyse permet d'accéder à la NPD1.



L'équipe de Bazan reporte plusieurs fonctions importantes de la NPD1 au sein du tissu rétinien.⁶ Au sein des cellules de l'EPR, la synthèse et la libération de la NPD1 peuvent être induites grâce aux neurotrophines,¹⁵⁰ correspondant à des facteurs de croissance essentiels à la conservation de l'intégrité de la rétine, ainsi qu'à la survie des photorécepteurs. L'augmentation de la disponibilité endogène du DHA pour les cellules de l'EPR, pouvant être présente lors de la phagocytose régulière des segments externes des photorécepteurs, entraîne la biosynthèse de la NPD1 par la 15-LOX-1. Les cellules de l'EPR, qui modulent l'assimilation, la conservation et la libération du DHA au sein des photorécepteurs, présentent également un groupement de phospholipides riches en DHA servant de précurseurs pour la synthèse de la NPD1. Cette production de la NPD1 est également liée à une réponse endogène générée par le stress oxydant, comme rapporté en culture cellulaire d'ARPE-19. De plus, les cellules de l'EPR présentant une déficience en 15-LOX-1 sont d'autant plus sensibles à l'apoptose en présence d'un stress oxydant. Ceci s'explique par un défaut de signalisation cellulaire, activé habituellement par la NPD1.

Après phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'EPR, ces dernières sont protégées par la NPD1 *via* une action de diminution des voies cellulaires pro-apoptotique, comme rapporté en culture cellulaire d'ARPE-19¹⁵¹ ou de photorécepteurs.¹⁵² De plus, la NPD1 diminue également la production de lipofuscine¹⁵³ (A2E) induite par un stress oxydant, restore l'intégrité des cellules de l'EPR et leur lien avec les photorécepteurs. L'activité

anti-apoptotique et anti-inflammatoire de la NPD1 pourrait être liée en partie à sa capacité à moduler l'expression de gènes responsables de la production de protéines pro-apoptotique et inflammatoire suite à un stress oxydant.

La NPD1 et 15-LOX-1 humaine ne sont pas commercialement disponibles. Trois synthèses multi-étapes de la NPD1 sont reportées dans la littérature.¹⁴⁶ et ont permis son utilisation dans de nombreux travaux. Cependant puisqu'aucun accès par voie enzymatique n'est actuellement développé, elle n'est pas commercialement accessible.

A noter également qu'un autre métabolite, la protectine DX (PDX), peut être formé (**Schéma 48**) via l'action consécutive de deux réactions de type lipoxygénase sur le DHA en position 15 puis en position 12.¹⁴⁹

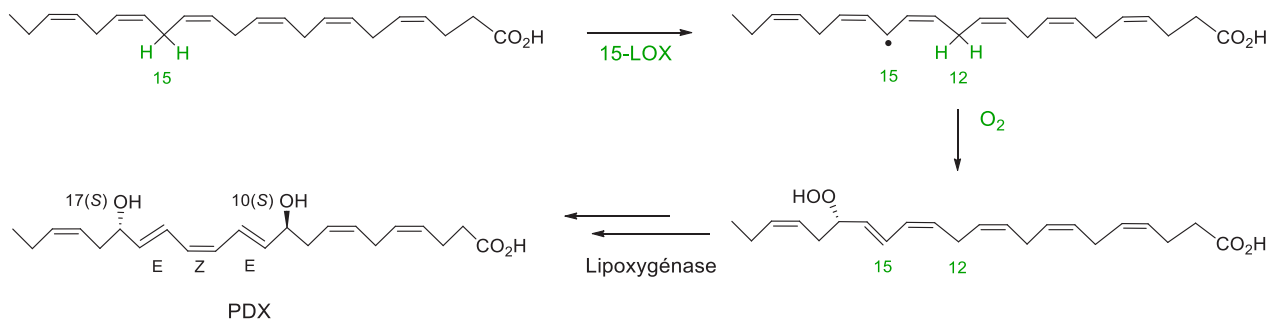


Schéma 48 : Oxydation enzymatique du DHA en PDX.¹⁴⁹

Cette dernière présente une activité biologique bénéfique sur les cellules de l'EPR d'après les travaux de Dai *et al.*,¹⁵⁴ à travers une activité anti-inflammatoire et anti-stress oxydant, de par la diminution de la formation d'EOR, l'activation de la SOD et par l'augmentation de la capacité totale antioxydante intracellulaire.¹⁵⁴

Il est également important de noter qu'une confusion est régulièrement effectuée dans la littérature entre la NPD1 et la PDX. En effet certains articles reportent une activité suite à l'évaluation de la "NPD1" qui est en réalité mise en évidence pour la PDX commerciale.¹⁴⁶

III.1.2. Oxydation radicalaire du DHA : les neuroprostanes

L'oxydation radicalaire du DHA *in vivo* peut générer des isoprostanoïdes communément appelés neuroprostanes (NeuroPs).¹⁵⁵ Ce sont des biomarqueurs spécifiques de la peroxydation lipidique du DHA et peuvent présenter des activités biologiques.¹⁵⁶ Elles sont produites *via* l'oxydation radicalaire du DHA, la première étape correspondant à l'abstraction d'un hydrogène en position *bis*-allylique. Le groupe le Morrow et Roberts¹⁵⁷ fut un des premiers à identifier les NeuroPs *in vivo*, mettant également en évidence l'activité biologique de la 14-A₄-NeuroP (**Figure 36**), notamment en tant que médiateur anti-inflammatoire sur des lignées cellulaires murines de macrophage.

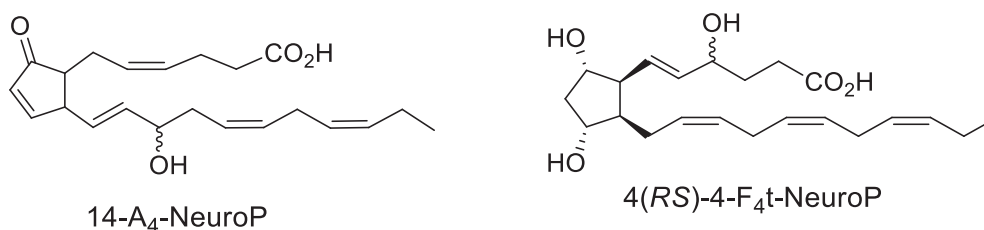


Figure 36 : Métabolites formés lors de l'oxydation radicalaire du DHA.

Des études plus récentes sur l'activité des NeuroP ont été menées sur le système cardiovasculaire.¹⁵⁶ Il est suggéré que l'oxydation du DHA en 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP (**Figure 36**) soit impliquée dans la limitation de l'arythmie ischémique induite dans des souris possédant un infarctus du myocarde. Dans des conditions de stress oxydant présent dans les maladies ischémiques, la 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP serait responsable de l'activité anti-arrhythmique¹⁵⁸ *via* une interaction avec un récepteur de la ryanodine (RyR2) permettant sa protection contre les EOR formées.¹⁵⁹ Le Guennec *et al.* ont également mis en évidence *in vitro*, sur des cellules isolées ventriculaires de souris, les propriétés anti-arrhythmiques¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ de la 4(RS)-4-F_{4t}-NeuroP. A ce jour aucune étude ne montre d'activité des NeuroPs sur le tissu rétinien.

IV. Aspect négatif du DHA

Le DHA possédant 5 positions *bis*-allyliques, est d'autant plus sensible à l'oxydation radicalaire comparé aux autres AGPI présents dans la rétine. De plus, sa concentration importante au sein de ce tissu augmente la sensibilité rétinienne face aux dommages oxydatifs.⁵

La peroxydation lipidique du DHA (oméga-3), entraîne la formation de stresseurs carbonylés comme le 4-hydroxy-hex-2-éanal (HHE, **Schéma 49**). Son mécanisme de formation¹⁶¹ est similaire à celui responsable de la formation du *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) provenant des AGPI oméga-6, *via* l'abstraction d'un hydrogène en position C18 et C15 suivi par la formation d'hydroperoxydes en C20 et C16.

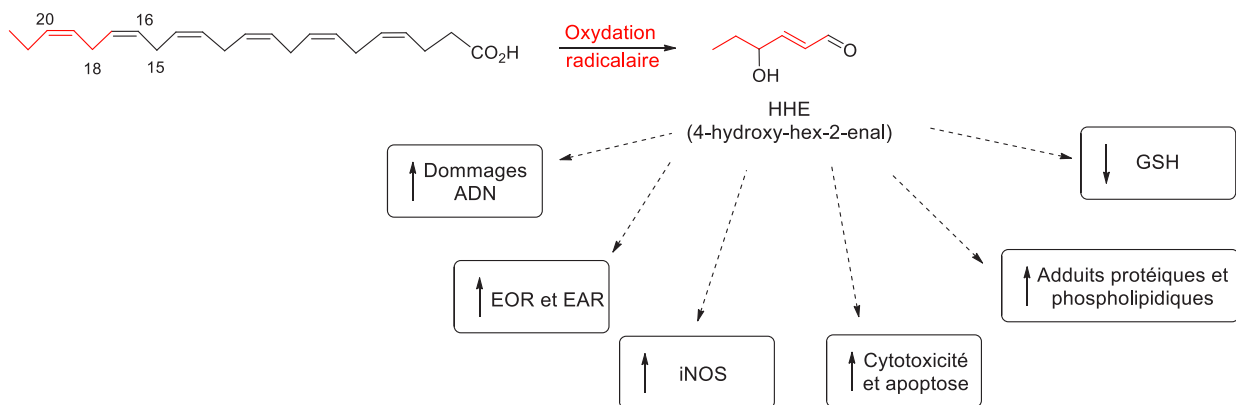


Schéma 49 : Peroxydation lipidique du DHA : formation du HHE et effets biologiques.¹⁶²

Ce type d'aldéhyde peut être impliqué dans des réactions de substitution nucléophile en présence de certains composants cellulaires, comme l'ADN ou les protéines, formant des ALE (advanced lipoxidation endproducts) causant ainsi des dommages irréversibles.¹⁶² Ses effets biologiques sont caractérisés,¹⁶¹ par exemple, par une augmentation de la production d'EOR et d'EAR, une diminution de la GSH, et une cytotoxicité (**Schéma 49**). De plus, cet aldéhyde, évalué en culture cellulaire sur la lignée ARPE-19 présente une toxicité liée à une induction de l'apoptose.¹⁶³ Cependant, le mécanisme de défense cellulaire activé en présence de HHE semblerait également être impliqué dans la stimulation de défense antioxydante via l'activation de la voie¹⁶⁴ Keap1/Nrf2/ARE.

L'oxydation radicalaire du DHA (**Schéma 50**) peut également conduire à la formation de dérivés de type HOHA (acide 4-hydroxy-7-oxohept-5-énoïque).¹ L'initiation de cette peroxydation lipidique s'effectue de manière la plus probable via l'abstraction d'hydrogènes en position 6, ou 6 et 9 (**Schéma 50**). Ces aldéhydes α,β -insaturés, réagissent ensuite avec les résidus protéiques ϵ -amino lysine pour former les composés 2- ω -carboxyéthylpyrroles (adduit CEP). Ces derniers sont impliqués dans l'induction de l'angiogenèse au sein de la rétine, une conséquence pathologique associée aux stades avancés de la DMLA,¹ mais peuvent également être reliés à la réponse inflammatoire en présence d'un stress oxydant¹⁶⁵ et constituent des marqueurs du stress oxydant au sein de cette maladie.¹⁶⁶

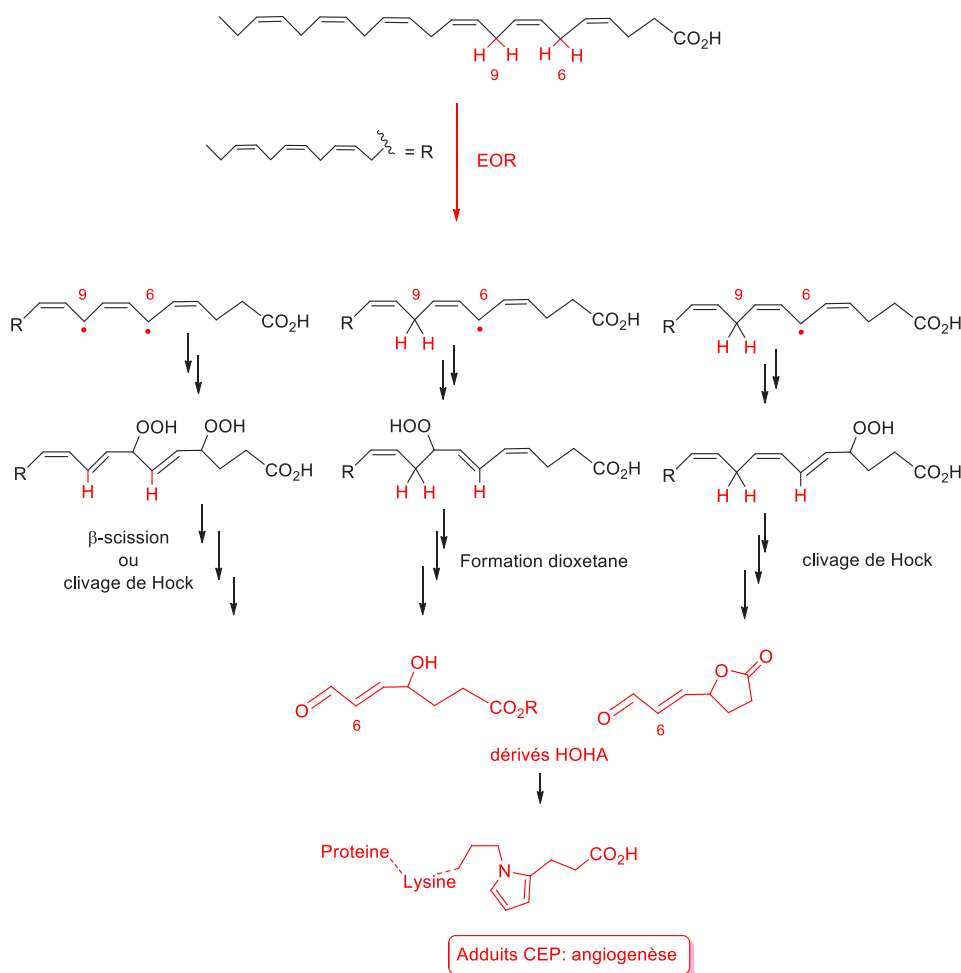


Schéma 50 : Peroxydation lipidique du DHA : les différentes voies possibles de formation^{65, 167} des dérivés HOHA (4-hydroxy-7-oxo hept-5-énoic acid) et CEP (2- ω -carboxyéthylpyrroles).

De manière plus exhaustive, le mécanisme suivant de formation du dérivé HOHA peut être proposé, impliquant l'abstraction d'hydrogènes en positions 6 et 9 (**Schéma 51**).

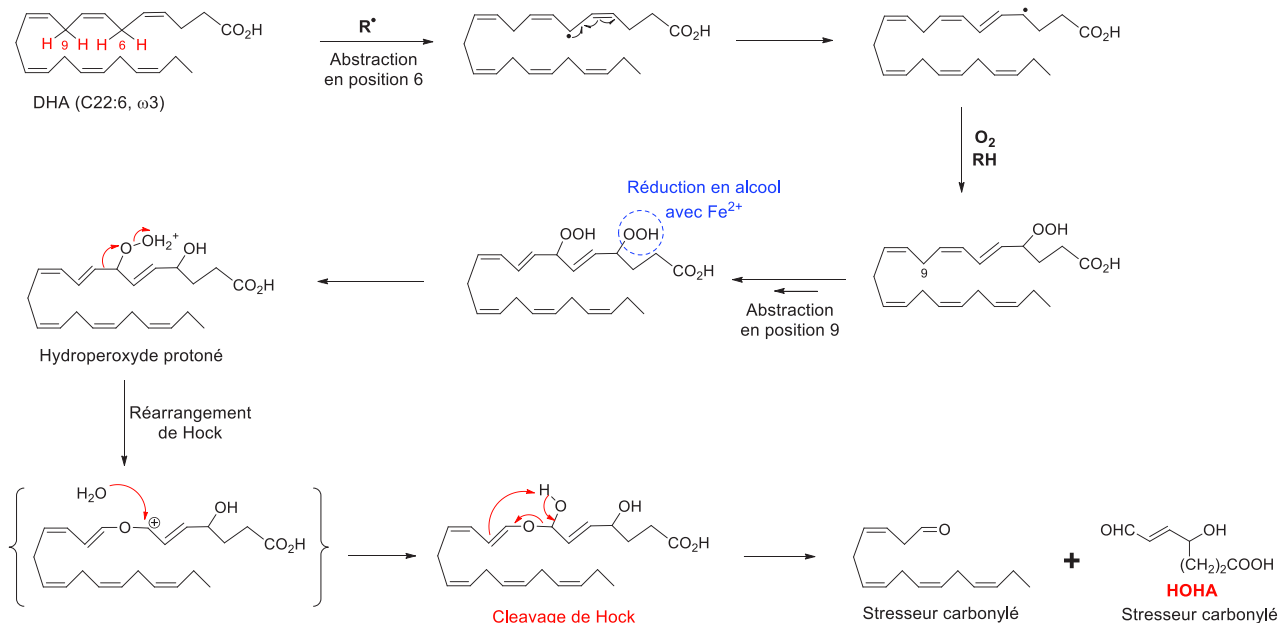


Schéma 51 : Proposition de mécanisme pour la formation des dérivés HOHA.

Tout d'abord deux hydroperoxydes sont formés préalablement *via* l'abstraction d'un hydrogène en positions *bis*-allyliques 6 et 9 par un radical. Un des deux hydroperoxydes peut être réduit en alcool en présence de Fe²⁺, tandis que l'autre est protoné permettant le réarrangement de Hock.⁶⁵ La dernière étape correspond au clivage de Hock conduisant au dérivé HOHA. Dans ce mécanisme les positions *bis*-allyliques 6 et 9 sont impliquées dans les premières étapes, et semblent donc jouer un rôle important dans la toxicité du DHA en condition oxydante, au sein du tissu rétinien.

V. Conclusion

Le paradoxe du DHA au sein des maladies rétinienne se traduit par la présence de plusieurs effets biologiques. Des dommages superficiels en condition de stress photo-oxydant peuvent entraîner l'activation de défense du DHA de manière directe ou indirecte (NPD1). Cependant, des conditions de stress accrues, vont conduire au développement d'un stress oxydant, capable d'entraîner une peroxydation lipidique avancée du DHA. Sa métabolisation en composés toxiques (peroxydes et aldéhydes réactifs (HHE, HOHA) sera alors responsable de dommages irréversibles et toxiques pour le tissu rétinien.

La toxicité du DHA couplé au lipophénol peut donc être présente dans certaines conditions d'oxydation *via* la formation des composés délétères présentés précédemment. La diminution de la sensibilité du DHA face à la peroxydation lipidique est un aspect important à améliorer et à développer dans le cadre des maladies rétinienne. Cette amélioration du DHA, pourrait être apportée par l'incorporation de deutérium en positions bis-allyliques, mais ne devra pas empêcher son oxydation enzymatique en NPD1, métabolite antioxydant important responsable d'un effet bénéfique du DHA.

Chapitre II. Action des deutériums en positions *bis*-allyliques sur la limitation de la peroxydation lipidique des AGPI

Dans le cadre de ces travaux de thèse, et en vue de l'amélioration de l'activité antioxydante du dérivé lipophénolique lead (le phloroglucinol-*O*iPr-ODHA (**17**)) précédemment étudié au sein du laboratoire (partie II, chapitre II, paragraphe II) et de la diminution de la sensibilité du DHA à l'oxydation radicalaire, nous nous intéressons aux AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques. Dans les travaux de Shchepinov *et coll.*, certains AGPI deutérés ont montré une action protectrice contre l'effet de la peroxydation lipidique, et seront présentés dans ce chapitre.

I. Mécanisme d'action des AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques

I.1. Effet cinétique isotopique primaire

Les EOR oxydent les substrats biologiques par un mécanisme impliquant l'abstraction d'un hydrogène (étape cinétiquement limitante).¹⁶⁸ Les sites sensibles à l'oxydation de ces biomolécules peuvent être protégés en présence d'isotope plus "lourds", en remplaçant l'hydrogène labile par un atome de deutérium (²H ou D) ou un carbone ¹²C par un ¹³C. Les matrices cellulaires deviennent plus résistantes et stables en présence d'EOR, grâce à l'incorporation d'acides aminés, de lipides et constituant d'acides nucléiques enrichit en ces isotopes (**Schéma 52**). Cette résistance au stress oxydant est ainsi due à un effet dit "isotopique".¹⁶⁸

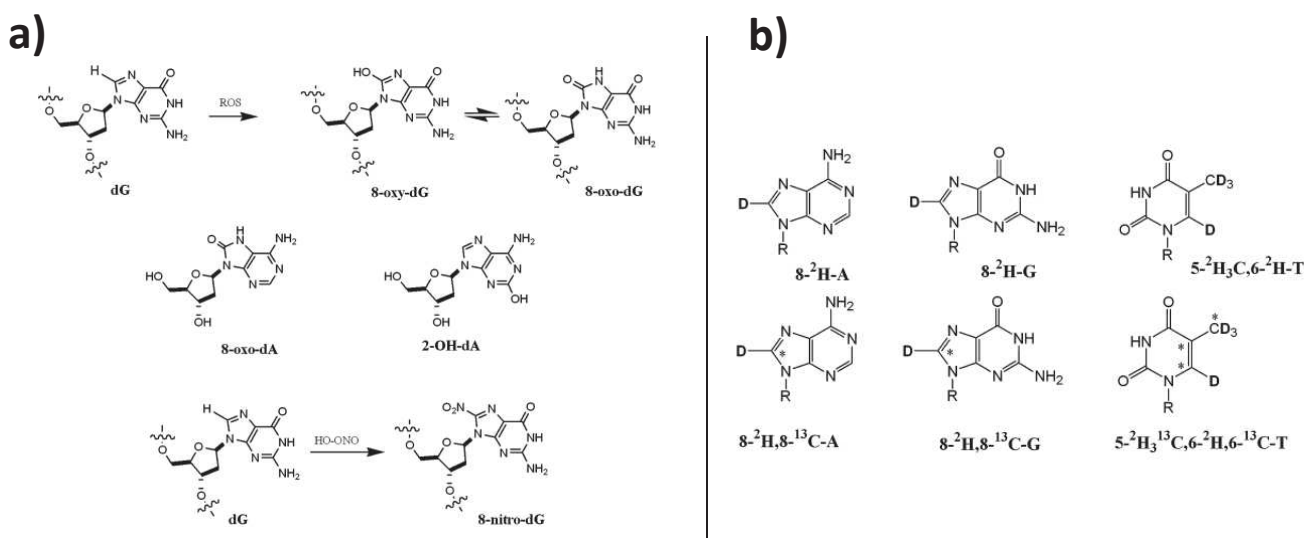


Schéma 52 : a) Modifications des nucléos(t)ides puriques par action des EOR et ENR ;

b) nucléosides (A : adénosine, G : guanosine, et T : thymidine) protégés de l'oxydation par incorporation d'atome de D, ou de ¹³C (marqué par *).¹⁶⁸

La présence de cet "effet cinétique isotopique" (ECI) nécessite au préalable une explication théorique succincte des différents paramètres impliqués dans cet effet. Les isotopes sont composés du même élément chimique, mais diffèrent par leur masse atomique à travers leur nombre de nucléons, et plus particulièrement leur nombre de neutrons. La fréquence de vibration d'une liaison chimique entre deux atomes dépend de leur masse. Pour des atomes ayant la même configuration électronique (même élément chimique) ce paramètre de vibration sera différent uniquement si ce sont des isotopes différents, et donc si leur masse est différente. Ce paramètre aura ainsi une influence sur la vitesse de la rupture de la liaison dans laquelle ils sont impliqués : les isotopes plus "lourds" forment des liaisons plus fortes. Cela correspond à l'effet cinétique isotopique primaire (ECIP), communément utilisé pour élucider des mécanismes et des étapes cinétiquement limitantes lors de réactions chimiques ou biochimiques. Ainsi la vitesse de la réaction correspondant au clivage du lien C-H est 5 à 10 fois (20 pour certains cas) supérieure à la vitesse associée à la rupture de la liaison C-D. Ce phénomène s'explique par la différence de masse atomique entre les deux isotopes, l'atome de deutérium étant deux fois plus lourd que l'atome d'hydrogène. La différence de vitesse est d'autant plus importante en présence d'un atome de tritium (^3H ou T). Cette effet est également présent en comparant les vitesses de rupture des liaisons $^{12}\text{C-H}$ et $^{13}\text{C-H}$, mais reste plus faible¹⁶⁹ comparé à celui du deutérium car l'isotope ^{13}C est seulement 1,08 fois plus lourd que l'isotope ^{12}C .

L'abstraction d'un hydrogène est l'étape cinétiquement limitante lors de l'initiation et la propagation du mécanisme de peroxydation lipidique. L'oxydation effectuée par des EOR permet ainsi d'évaluer l'ECI lors du remplacement d'un hydrogène par un atome de deutérium. Les substrats cellulaires présentant des atomes de deutérium sur les positions les plus labiles sont donc plus résistants à l'oxydation. Shchepinov *et coll.* ont étudié cette effet en utilisant certains AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques.

1.2. Effet sur les AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques : vitesse d'abstraction de l'hydrogène comparé à celle du deutérium

L'ECI a été étudié en utilisant des AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques, tels que l'acide linoléique (LA) et l'acide linoléique (ALA), et en les comparant à leurs analogues naturels (**Figure 10**).

ALA: acide α -linoléique (C18:3, ω 3)

LA: acide linoléique (C18:2, ω 6)

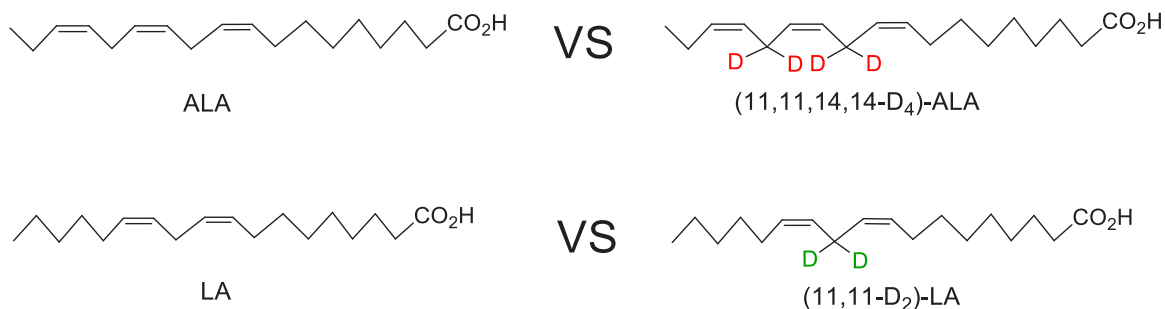


Figure 37 : Acide linoléique et linoléique deutérés étudiés lors de l'évaluation de l'ECI (utilisation du système TMP).

Cette étude a été menée par Lamberson *et al.*¹⁷⁰, en évaluant la vitesse d'abstraction des hydrogènes et des deutériums en présence d'un radical tocophéryle, en solution. Cette oxydation, *via* un système impliquant le tocophérol (en anglais : tocopherol mediated peroxydation (TMP)), constitue l'étape cinétiquement limitante (**Schéma 53**) lors de la peroxydation des lipides présents dans les lipoprotéines de basse densité, un procédé ayant un lien avec des maladies de l'artère coronaire entre autre.

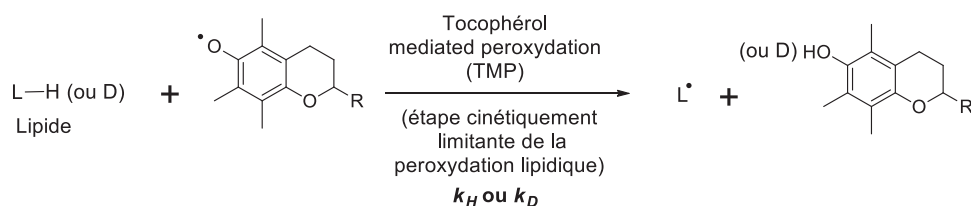


Schéma 53 :Étape cinétiquement limitante de l'oxydation des lipides par le radical tocophéryle permettant d'évaluer l'ECI.¹⁷⁰

Il a été montré que la substitution des hydrogènes au niveau des positions *bis*-allyliques par des deutériums réduit considérablement la vitesse d'abstraction, donc d'oxydation, par le radical

tocophéryle. En effet, la vitesse d'arrachage de l'atome de deutérium est environ 36 fois moins importante que celle de l'hydrogène pour les deux AGPI : ($E_{CI} = k_H/k_D = 36$).¹⁷⁰

Cette mise en évidence de la résistance des AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques a également été démontrée par Tikhonov *et al.*,¹⁷¹ via l'évaluation de l'acide linoléique deutéré (sous forme d'ester d'éthyle ou méthyle). En présence d'hydroperoxyde de *tert*-butyle (*t*BuOOH) ou d'hydroperoxyde de cumène (CumOOH), la protection face à l'oxydation est 3 fois plus importante grâce à l'incorporation d'atomes de deutérium.

L'intérêt de l'utilisation d'AGPI deutérés (LA et ALA) afin de limiter la peroxydation lipidique et ses dégâts cellulaires, a ensuite été évalué dans des modèles biologiques visant à réduire la peroxydation lipidique, associé à certaines pathologies.

II. Protection des AGPI deutérés en milieu biologique

II.1. Résultats biologiques *in vitro*

L'intérêt de l'incorporation des deutériums a été évalué *in vitro* par l'équipe de Shchepinov *et coll.*, grâce à différents AGPI deutérés (LA et ALA, **Figure 38**). Les modèles cellulaires utilisés sont des levures, de type *Saccharomyces cerevisiae*,^{7a-c} mais également des cellules de mammifère,^{7c} les myoblastes H9C2 (cellules cardiaques), subissant un stress oxydant entraînant une peroxydation lipidique.

ALA: acide α -linoléique (C18:3, ω 3)

LA: acide linoléique (C18:2, ω 6)

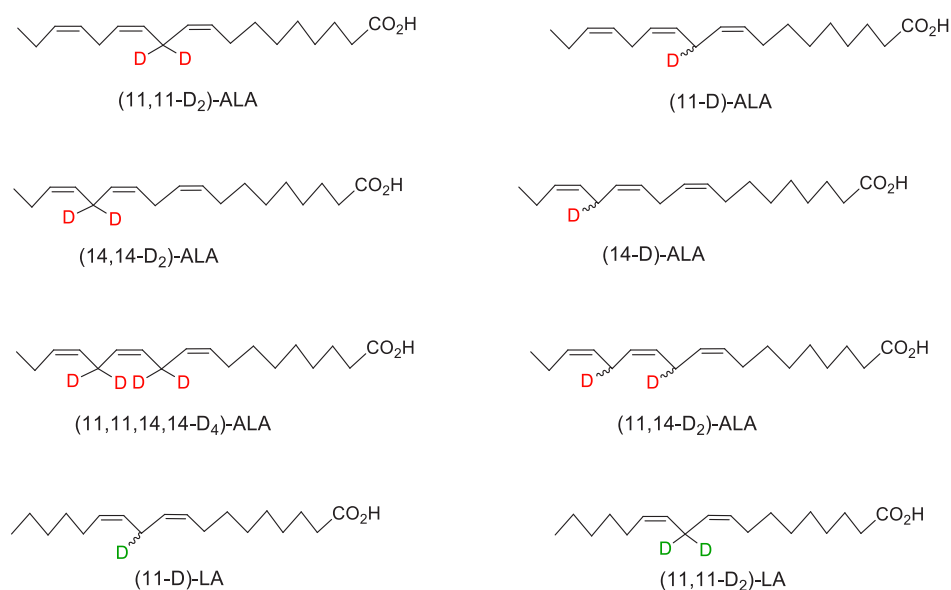


Figure 38 : Acide linoléique et linoléique deutérés étudiés par Shchepinov *et al.*

Dans le cas des myoblastes,^{7c} le stress oxydant est induit par traitement au *t*BuOOH, ou l'acide etacrynique ou en présence de l'ion ferreux (Fe^{2+}), entraînent une diminution des fonctions bioénergétiques des mitochondries. Les prétraitements avec le (11,11- D_2)-LA et le (11,11,14,14- D_4)-ALA, voir même avec un mélange des AGPI naturels/deutérés (80/20 ou 50/50) permet de préserver la fonction respiratoire mitochondriale, protégeant ainsi les cellules.

Dans le cas des levures de type *Saccharomyces cerevisiae*,^{7a-c} le traitement avec du CuSO_4 permet d'engendrer une peroxydation lipidique chez les levures non mutées ou dites "sauvages". Pour ces dernières la peroxydation lipidique est évaluée grâce à une sonde fluorescente spécifique : le C11-BODIPY.¹⁷² Pour les levures dites "mutées", une mutation est présente conduisant à la sensibilisation de ces dernières à la présence d'AGPI. Celle-ci correspond à une déficience d'une coenzyme Q (Coq3 Δ , Coq7 Δ et Coq9 Δ), qui est un antioxydant efficace permettant de limiter la peroxydation lipidique³⁹ (**Schéma 54**).

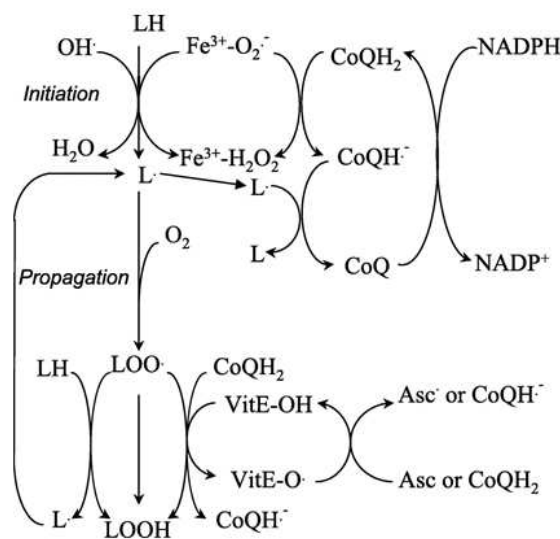


Schéma 54 : Effet de la coenzyme Q sur la peroxydation lipidique.³⁹

La mutation de ces levures est donc très spécifique puisqu'elles sont essentiellement sensibilisées à la peroxydation lipidique induite par leur supplémentation en AGPI. Ce mécanisme d'autoxydation est donc central dans la toxicité des AGPI dans ce cas. La comparaison entre les AGPI naturels et deutérés est ainsi réalisée sur des levures "sauvages" non mutées et mutées. Plusieurs résultats sont obtenus concernant la viabilité des levures et le niveau de peroxydation lipidique :

- Pour les levures mutées Coq3 Δ : une meilleure viabilité des levures est obtenue en présence des AGPI deutérés (comparés aux naturels) suivants : (11,11-D,H)-LA ; (11,11-D₂)-LA, (11,11-D₂)-ALA ; (14,14-D₂)-ALA et (11,11,14,14-D₄)-ALA (à 200 μ M).^{7a, 7b} La viabilité cellulaire augmente avec le pourcentage d'AGPI deutérés lorsque les cellules sont traitées avec un mélange AGPI naturels/deutérés (50/50 ou 80/20). Pour l'évaluation de cette toxicité, les cellules ne sont pas traitées au CuSO₄. En effet la simple supplémentation en AGPI et la mutation de ces cellules permet d'observer un mécanisme de peroxydation lipidique suffisamment important pour induire une toxicité. Il a également été montré grâce à la sonde C11-BODIPY^{581/591} que la peroxydation lipidique est diminuée avec les composés deutérés toujours par rapport aux AGPI naturels.
- Pour les levures "sauvages" : la peroxydation lipidique est induite avec un traitement au CuSO₄. Une limitation de ce mécanisme est obtenu dans les mêmes proportions pour les composés : (11,11-D,H)-LA et (11,11-D₂)-LA comparé au LA naturel,^{7b} mettant en évidence que le remplacement d'un seul des hydrogènes en position *bis*-allylique est suffisant pour engendrer une protection.
- Pour les levures Coq7 Δ et Coq9 Δ : une meilleure viabilité est obtenue en présence de (11,11,14,14-D₄)-ALA comparé au ALA naturel.^{7a}
- Pour les levures Coq9 Δ : une meilleure viabilité est obtenue (dans l'ordre croissant) en présence de (14,14-D,H)-ALA ; (11,11-D,H)-ALA ; (11,14-D₂)-ALA et (14,14-D₂)-ALA ; (11,11,14,14-D₄)-ALA comparé au ALA naturel. Et également pour (11,11-D₂)-LA et étonnamment une meilleure survie est obtenue pour le composé (9,10,12,13-D₄)-LA (deutération sur toutes les positions vinyliques).

Pour conclure, les levures possédant une mutation de coenzyme Q montrent une sensibilité accrue à la présence d'AGPI naturels (ALA et LA). Cette sensibilité est diminuée en présence d'AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques. Le mécanisme principal intervenant dans la toxicité des d'AGPI naturels correspondrait à une peroxydation lipidique. Cette supposition est confirmée grâce à la sonde fluorescente C11-BODIPY^{581/591} (spécifique de la peroxydation lipidique) qui a permis de mettre en évidence une diminution de la peroxydation lipidique en présence d'AGPI deutérés comparés à l'utilisation d'AGPI naturels.

Pour finir, les levures "sauvages" (non mutées) ne sont pas sensibles à la présence d'AGPI naturels (à la concentration utilisée) sans induction d'oxydation. Seule la peroxydation lipidique,

induite par du CuSO_4 , est évaluée dans ce cas. Cette dernière est limitée en présence d'AGPI deutérés comparés aux naturels.

II.2. Mécanisme supposé au sein des membranes cellulaires

L'étape d'initiation de la peroxydation lipidique correspond à l'abstraction d'un hydrogène en positions *bis*-allyliques d'un AGPI (**Figure 39**), suivi de la formation du radical peroxyde permettant l'auto-oxydation lipidique.^{7a}

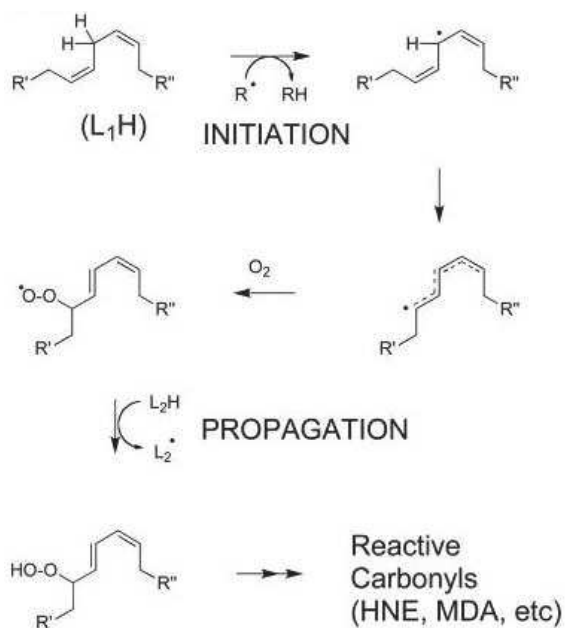


Figure 39 : Rappel sur la peroxydation lipidique^{7a}

Cette auto-oxydation, ou propagation de la peroxydation lipidique au sein des membranes cellulaires, entraîne leur dénaturation (**Figure 39**), ainsi que la formation d'espèces carbonylées réactives (HNE, HHE,...). Le mécanisme de protection des membranes cellulaires par les AGPI deutérés a été proposé par l'équipe de Shchepinov^{7b} (**Figure 40**).

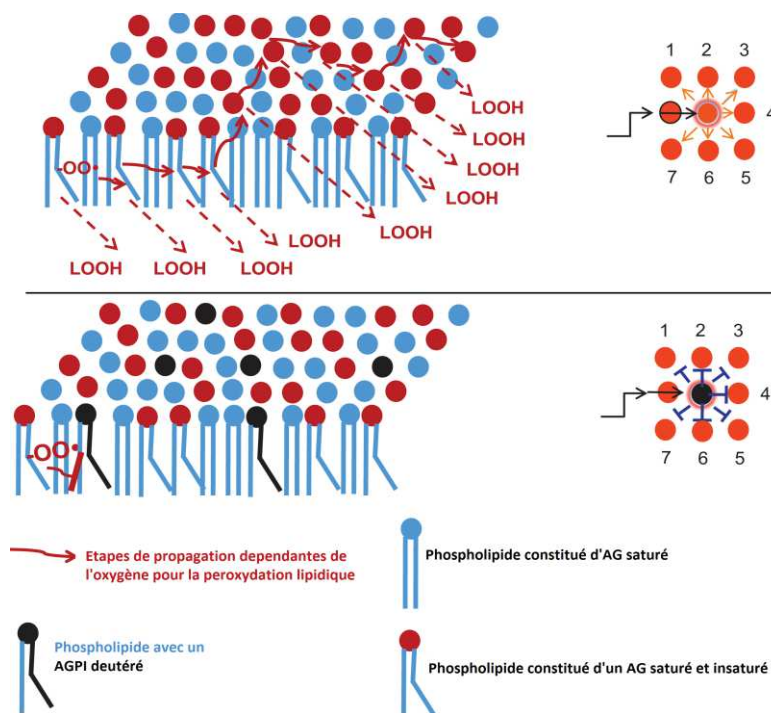


Figure 40 : Effet des AGPI deutérés sur la protection des membranes de la peroxydation lipidique^{7b}

L'AGPI deutéré jouerait le rôle de barrière en bloquant la propagation de l'oxydation et ainsi en limitant la peroxydation lipidique, *via* une protection des AGPI non deutérés environnants. Dans certains cas, la présence de seulement 20% d'AGPI deutérés^{7b, 7c} serait suffisante pour limiter ce mécanisme.

II.3. Évaluations biologiques *in vivo* des AGPI deutérés

L'équipe de Shchepinov *et coll.* a également observé un effet positif d'une supplémentation en AGPI deutérés, de type acide linoléique et linoléinique ((11,11-D₂)-LA et (11,11,14,14-D₄)-ALA) sur la réduction de l'athérosclérose en modèle murin.^{7d} L'oxydation des lipoprotéines est une étape déterminante dans le développement de cette maladie artérielle chronique. La protection observée après supplémentation en AGPI deutérés est liée à leur capacité à limiter la peroxydation lipidique et le taux de cholestérol dans le plasma des souris. Un des effets bénéfiques observé est également une perte de poids. L'utilisation de ces AGPI deutérés constituerait ainsi une voie prometteuse pour la lutte contre les maladies cardiovasculaires.

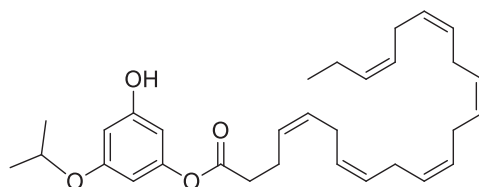
II.4. Développements précliniques des AGPI deutérés

Plusieurs modèles précliniques sont en cours d'évaluation par la société rétrotope *et coll.* pour mettre en évidence l'intérêt des AGPI deutérés. Ces modèles concernent des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, Alzheimer, la rétinopathie diabétique ou d'autres myopathies. Plusieurs causes sont à l'origine de ces maladies, notamment une perte de fonction mitochondriale résultant de la toxicité engendrée par une peroxydation lipidique. Cette dernière peut ainsi être limitée en présence d'AGPI deutérés.

Une preuve de concept a été validée par l'entreprise rétrotope *et coll.* sur une maladie caractérisée par la présence d'une peroxydation lipidique importante : l'ataxie de Friedreich. Le mécanisme biochimique de cette maladie fait intervenir la frataxine, une protéine, sous-exprimée entraînant la présence d'ion Fe^{2+} et Fe^{3+} à la surface des mitochondries. Ces derniers entraînent un dysfonctionnement mitochondrial, *via* des réactions associées au stress oxydant (réaction de Fenton notamment), et *in fine* une mort cellulaire. L'acide linoléique deutéré modifié (nommé RT001) fait l'objet d'étude clinique pour cette maladie, validée pour la phase I et en cours d'essais pour la phase IIa.

Conclusion et objectifs des travaux de thèse

Comme annoncé dans la partie II (chapitre II), l'objectif de ces travaux de thèse est d'apporter une potentielle amélioration au composé lead, le phloroglucinol-*O*iPr-ODHA **17** (**Figure 41**), préalablement mis en évidence au sein du laboratoire.⁴

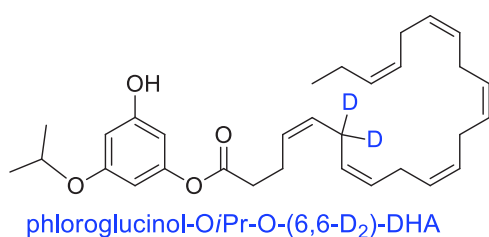


phloroglucinol-*O*iPr-ODHA (molécule lead) **17**

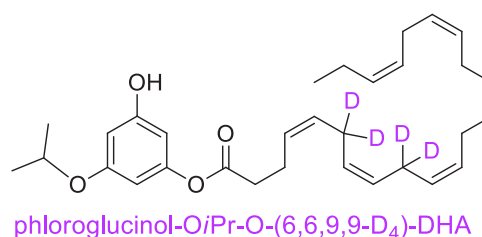
Figure 41 : Composé lead mis en évidence par des travaux antérieurs : le phloroglucinol-*O*iPr-ODHA**17**.⁴

Cette amélioration vise à augmenter le pouvoir antioxydant du lipophénol **17**, de limiter la formation de métabolites délétères provenant de l'oxydation radicalaire du DHA, tout en conservant son activité contre les stressés carbonyles.

La synthèse de lipophénols, similaires à la molécule lead **17** (**Schéma 55**) mais présentant des atomes de deutérium en positions *bis*-allyliques sur le DHA (partie lipidique) a donc été envisagée : le phloroglucinol-*O*iPr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) et phloroglucinol-*O*iPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**).



20



21

Schéma 55 : Lipophénols cibles à synthétiser : le phloroglucinol-*O*iPr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) et le phloroglucinol-*O*iPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**).

L'incorporation des deutériums a été choisie en positions 6 et 6/9 du DHA, afin de limiter (**Schéma 56**) la formation de certains métabolites issus de la peroxydation lipidique de cet oméga-3, pouvant être responsables d'une toxicité en condition oxydante accrue. Ainsi, la formation des dérivés HOHA, nécessitant l'abstraction d'hydrogène en positions *bis*-allyliques 6, ou 6 et 9, est sensée être limitée par la présence des deutériums, bloquant ainsi l'obtention des adduits CEP.

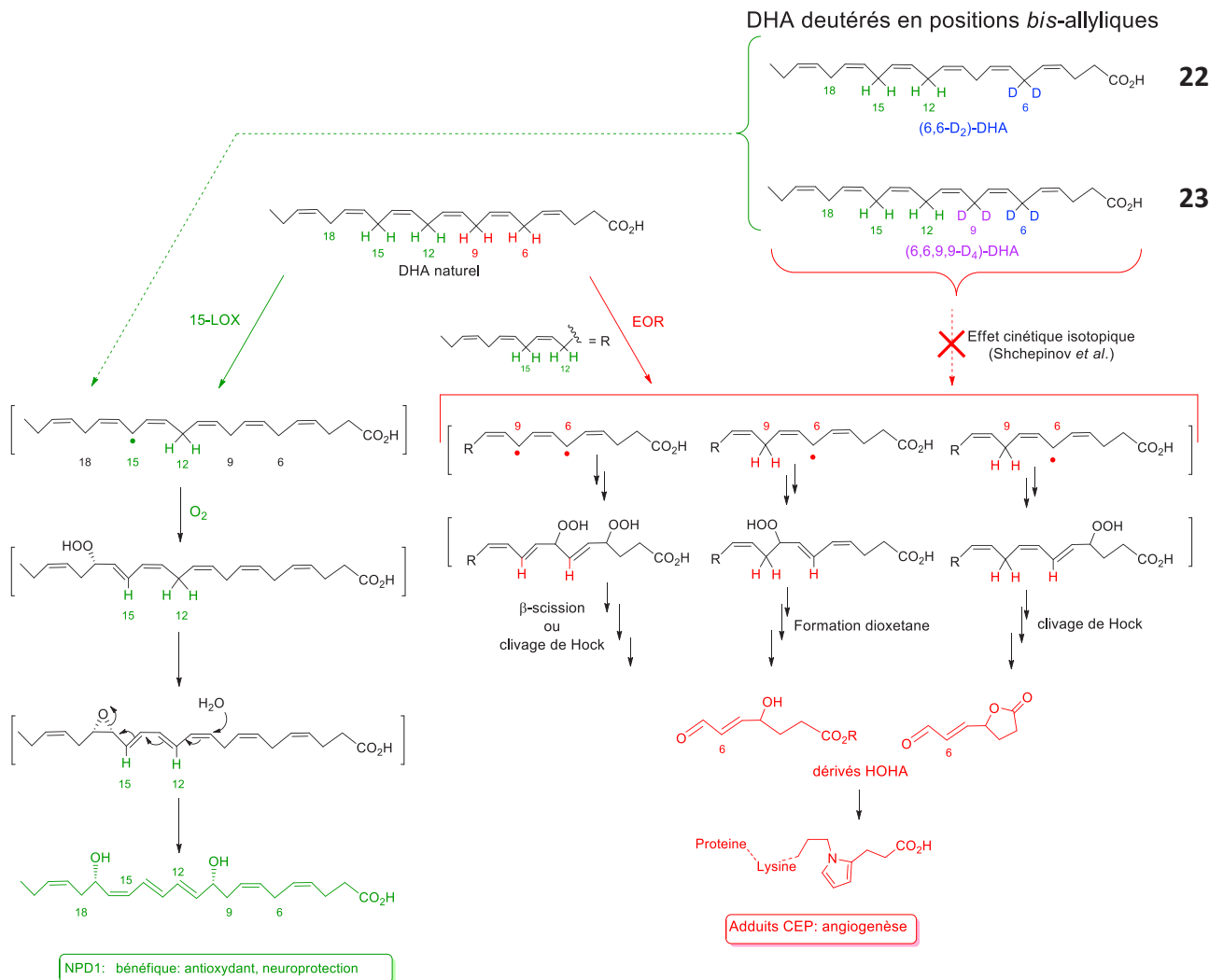


Schéma 56 : Métabolites bénéfiques ou délétères pouvant être formés par oxydation enzymatique ou radicalaire du DHA naturel et des DHA deutérés : le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**).

Le design de ces composés deutérés en position *bis*-allylique a été effectué, non seulement en fonction de l'implication de la position *bis*-allylique dans la métabolisation en dérivés toxiques, mais également dans le but de conserver l'oxydation enzymatique du DHA en neuroprotectine par les lipoxygénases (partie III, chapitre I, paragraphe III) (abstraction d'hydrogènes en positions 15 et 12). Les synthèses des deux lipophénols deutérés ainsi que les

deux DHA deutérés correspondants sont envisagées en vue d'étudier l'influence de l'incorporation des deutériums, sur une ou deux positions *bis*-allyliques, par rapport au DHA naturel, en culture cellulaire, et en condition d'oxydation enzymatique ou radicalaire. L'objectif étant de diminuer la toxicité de cet acide gras en condition oxydante et d'évaluer sa capacité, ainsi que celle du lipophénol, à limiter la peroxydation lipidique dans la lignée cellulaire de l'EPR, les ARPE-19. Une comparaison entre les deux analogues deutérés sera également effectuée afin d'étudier l'impact de l'incorporation des deutériums sur une ou deux positions *bis*-allyliques.

Partie IV : Synthèses des DHA et lipophénols deutérés

Introduction

Les synthèses d'analogues deutérés de la molécule lead sont présentées dans cette partie. L'objectif est d'obtenir les deux lipophénols deutérés suivants : phloroglucinol-*O*iPr-*O*-(6,6- D_2)-DHA (**20**) et phloroglucinol-*O*iPr-*O*-(6,6,9,9- D_4)-DHA (**21**) (**Schéma 57**). Les enjeux synthétiques présents pour l'obtention de ces derniers résident dans la synthèse des DHA deutérés correspondants.

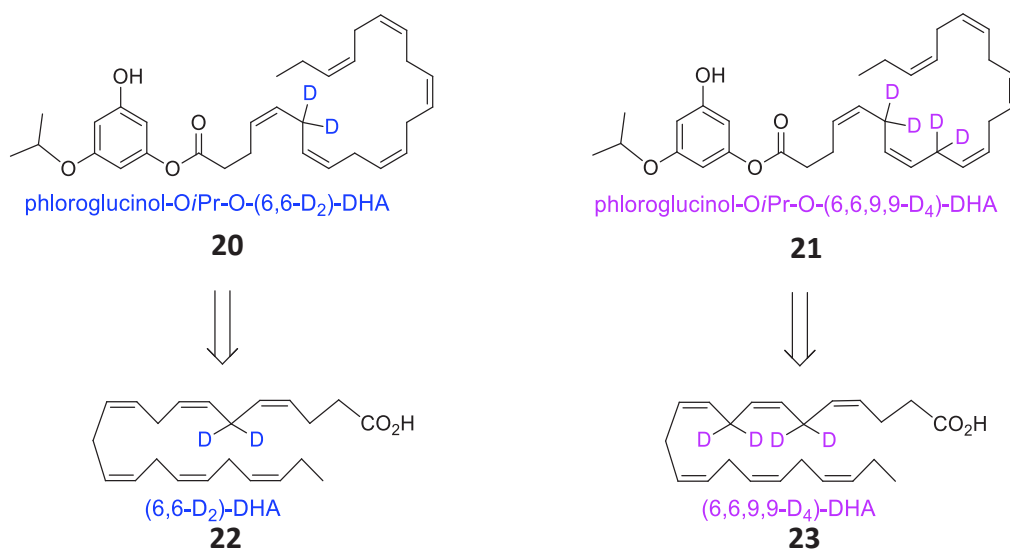


Schéma 57 : Lipophénols cibles à synthétiser : phloroglucinol-*O*iPr-*O*-(6,6- D_2)-DHA (**20**) et phloroglucinol-*O*iPr-*O*-(6,6,9,9- D_4)-DHA (**21**) et leur DHA, (6,6- D_2)-DHA (**22**) et (6,6,9,9- D_4)-DHA (**23**) associés.

Les différentes méthodes de deutération décrites en synthèse organique seront présentées dans une première partie et seront suivies par la description des synthèses d'AGPI deutérés en position *bis*-allylique déjà rapportées dans la littérature. Cette partie finira ensuite par la présentation des travaux de synthèse ayant permis d'accéder aux composés **20**, **21**, **22** et **23**.

Chapitre I. Méthodes de deutération et synthèse d'AGPI deutérés

L'atome de deutérium a été découvert en 1931 par Urey, lui permettant d'obtenir le prix Nobel de Chimie en 1934.

I. Les différentes méthodes de deutération

Plusieurs méthodes de deutération existent pour obtenir des composés organiques deutérés. En effet, l'incorporation des deutériums peut s'effectuer de plusieurs manières : par échange proton/deutérium, par réduction via des réactifs deutérés, par réaction de composés deutérés de faible poids moléculaire ou grâce à l'utilisation de micro-organismes. Les méthodes de deutération sur des composés comportant un cycle aromatique (sur le cycle ou à proximité) ont été développées de manière importante, cependant ces composés ne présentent pas d'intérêt dans le cadre de notre étude pour la synthèse d'AGPI deutérés. Dans ce paragraphe, seules les méthodes de deutération de composés linéaires seront présentées.

I.1. Échanges proton/deutérium (H/D)

Différents types de catalyse existent pour réaliser ces échanges selon la nature des substrats à deutérer et des catalyseurs utilisés. Cette catalyse peut être basique, réalisées en présence de métaux de transition ou de carbène N-hétérocyclique (NHC).

I.1.1 Catalyse basique

Des échanges H/D spécifiques ou non spécifiques peuvent avoir lieu selon l'acidité des protons présents en α du groupement électro-attracteur.¹⁷³ La spécificité est présente selon cet ordre : $C=O > CN > CO_2^-$, ainsi les cétones et les aldéhydes possédant des protons énolisables sont de meilleurs substrats pour cet échange H/D, qui peut s'effectuer en conditions basiques. Pour le cas des esters et acides carboxyliques, cet échange s'effectue en conditions basiques plus fortes que pour les cétones et les aldéhydes.¹⁷⁴ Des deutériums sont ainsi introduits en position géminal avec cette méthode.

Le tableau suivant (**Tableau 9**) résume les conditions pouvant être appliquées en fonction des substrats, en condition basique et en présence de composés deutérés (source de deutériums) :

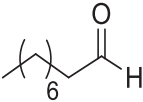
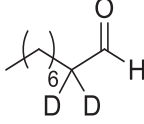
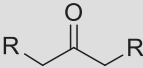
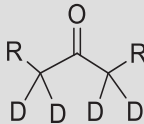
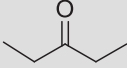
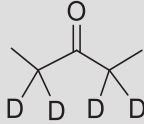
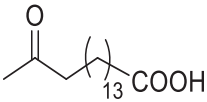
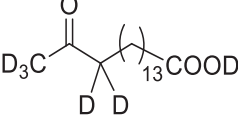
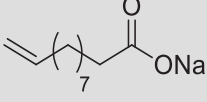
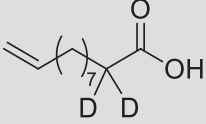
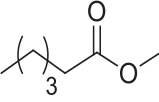
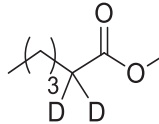
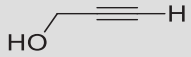

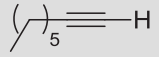
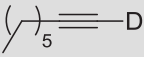
Substrats	Réactifs	Produits	Rendements (%)
	pyridine/D ₂ O ¹⁷⁵		48
	NaOD/MeOD ¹⁷⁴		n.d.
	Na ₂ CO ₃ /D ₂ O ¹⁷⁶		93
	NaOD /D ₂ O (puis DCl/D ₂ O) ¹⁷⁷		n.d.
	NaOD /D ₂ O ¹⁷³		80
	NaOMe/MeOD ¹⁷⁴		n.d.
	K ₂ CO ₃ /D ₂ O, micro-onde ¹⁷⁶		60
	NaOD/D ₂ O ¹⁷⁶		76

Tableau 9 : Échanges H/D en catalyse basique.¹⁷³⁻¹⁷⁷

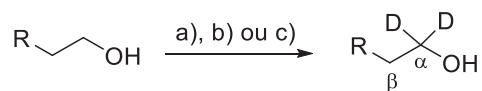
Les alcynes vrais peuvent également être deutérés en condition basique, cette étape suivi d'une réduction totale en alcane en présence de D₂ (partie IV, chapitre I, paragraphe 1.2.1.) permet l'accès à des composés pentadeutérés.

I.1.2. Catalyse avec les métaux de transition

L'utilisation de métaux de transition correspond à un autre type de catalyse permettant l'échange H/D.

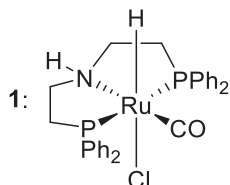
La deutération géminal en α des alcools a été développée avec l'utilisation de catalyseur au ruthénium (**Tableau 10**). Il peut être supporté sur charbon, comme décrit par Maegawa *et al.*,¹⁷⁸ ou comporter des ligands "pincer" d'après les travaux de Chatterjee¹⁷⁹ et Zhang.¹⁸⁰ Cependant ces méthodes présentent quelques limitations par rapport à la sélectivité des positions deutérées, puisque l'échange H/D peut aussi être effectué sur le carbone en β de la fonction alcool. Le taux d'incorporation des deutériums est dans ce cas difficilement maîtrisé, surtout pour les synthons de petites tailles. De plus, les conditions appliquées (base forte et haute température) restent assez drastiques et peuvent être limitantes pour la synthèse de composés sensibles.

Equation générale de la réaction de deutération:

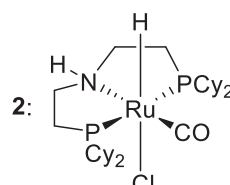


a) 5% Ru/C, H₂
D₂O, 80°C (ref. 178)

b) **1** (0,2 mol%), KO^tBu (0,5 mol%)
D₂O, 80 à 100°C (ref. 179)



c) **1 ou 2** (0,2 mol%), NaOH (10 mol%)
D₂O, 120°C (ref. 180)



Substrats	Conditions	Deutération α ; β (%)	Rendements (%)
	c) 1	94 ; 92	n.d.
	b) c) 2	94 ; 9 93 ; 5	n.d. n.d.
	c) 1	93 ; 1	n.d.
	b)	94 ; 12	n.d.
	b)	92 ; 12	n.d.
	b)	92,5 ; 10	n.d.
	a)	99 ; --	88
	a)	100 ; --	95
	b)	95,5 ; --	n.d.
	a)	100 ; --	100
	a)	98 ; --	78
	a)	97% 99 ; 99	89

Tableau 10 : Échanges H/D en α d'alcools, catalysés par des complexes au ruthénium.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Un autre métal de transition peut également être rapporté dans la littérature pour effectuer des échanges H/D. En effet, des complexes à l'iridium peuvent catalyser plusieurs types d'échanges H/D, au niveau de positions vinyliques¹⁸¹ ou en positions énolisables¹⁸² (**Schéma 58**).

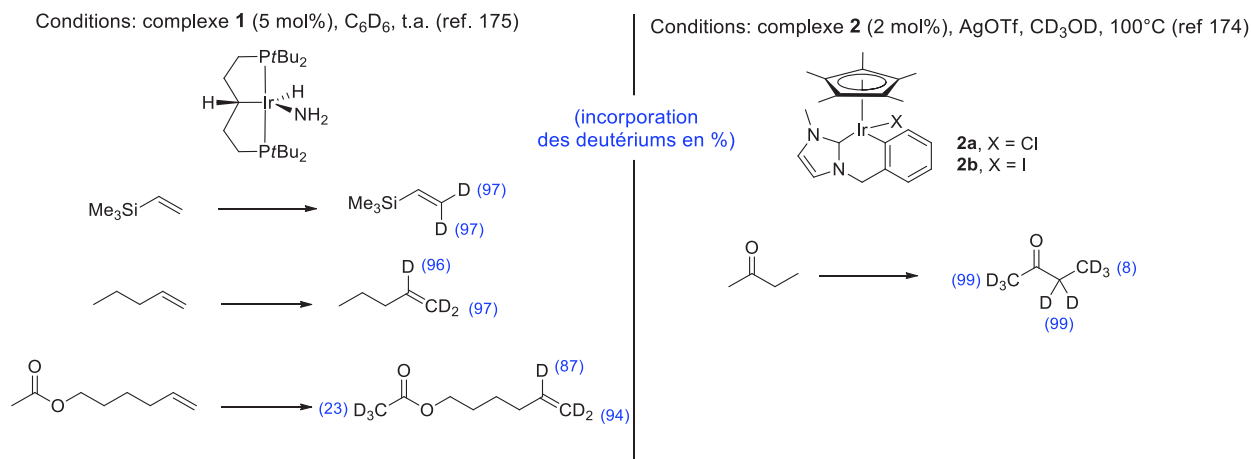


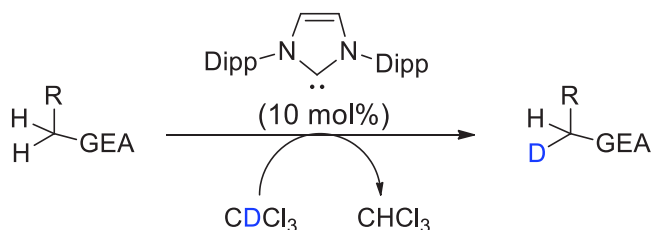
Schéma 58 :Échanges H/D en α d'alcools, catalysés par des complexes à l'iridium.¹⁸¹⁻¹⁸²

La diversité des substrats, potentiellement utilisables dans le cadre de notre synthèse, reste assez restreinte pour ces catalyses. De plus la sélectivité des positions deutérées est assez limitante.

I.1.3. Catalyse avec un système NHC

Un autre type d'échanges H/D existe, sans utilisation d'une catalyse basique ou de métaux de transition, correspondant à la catalyse en présence de NHC (N-Hétérocyclique Carbène).

Cette catalyse a été récemment développée par Perez *et al.*¹⁸³ avec le catalyseur NHC 1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidène (IDipp) (**Schéma 59**), sur des composés "pseudo-acides" (pKa, DMSO =14-19) pour l'échange de proton en α d'un groupement électro-attracteur (GEA). Les meilleurs résultats sont obtenus pour le diméthylmalonate (**Tableau 11**).

**Schéma 59** : Échanges H/D catalysé par le composé NHC(IDipp : 1,3-bis(2,6-diisopropylphényl)imidazol-2-ylidène).¹⁸³

Substrats	pKa, DMSO	Produits et résultats
	15.6	
	16.7	 Monodeutération à 100%
	12	 Monodeutération à 67%
	29.5	Pas de deutération
	32.5	Pas de deutération

Tableau 11 : Résultats rapportés lors des échanges H/D catalysé par le composé NHC.¹⁸³

Le pKa requis pour une deutération optimale est compris entre 14 et 19, il reste assez contraignant en termes d'utilisation de substrat.

Pour conclure, les échanges H/D sont essentiellement basés sur l'acidité des protons en α de fonctions électroattractrices (carbonyle, alcool, nitro ou cyano). Ces méthodes ouvrent l'accès à des composés mono- ou di-deutérés correspondant à une deutération partielle liée à un échange H/D incomplet. Selon les composés deutérés à synthétiser, cela peut être un avantage comme un

inconvenient. De plus, la limite de ces méthodes réside, dans certains cas, sur le manque de sélectivité des positions deutérées (par exemple en position β pour le cas des alcools).

I.2. Réduction en présence de source de deutérium

Les méthodes de deutération par réduction de fonction chimique est un moyen efficace pour obtenir des composés mono-, di- voire tri-deutérés sur des positions précises avec un taux d'incorporation de deutérium élevé.

I.2.1. Réduction catalytique des triples et doubles liaisons en présence de D_2

La réduction des triples et doubles liaisons en présence du gaz D_2 et en présence d'un catalyseur permet d'incorporer au minimum deux deutériums sur la molécule finale (Schéma 60 et **Schéma 61**). Pour une réduction totale en composé saturé, l'utilisation d'un catalyseur hétérogène classique d'hydrogénation, comme le palladium supporté sur charbon, ne permet pas d'obtenir un composé final isotopiquement pur.¹⁷⁴ L'utilisation d'autres catalyseurs homogènes ou hétérogènes est préconisée pour palier à cette limitation. Les réductions mises en œuvre avec ces catalyseurs peuvent être totales ou partielles selon le catalyseur utilisé.

Les réductions totales de triples et doubles liaisons peuvent s'effectuer avec des catalyseurs au rhodium comme le catalyseur homogène de Wilkinson correspondant au *tris*(triphenylphosphine)chlororhodium $((Ph_3P)_3RhCl)^{184}$ ou les catalyseurs hétérogènes comme le rhodium supporté sur alumine (Rh/alumine)¹⁸⁵ et le catalyseur d'Adams correspondant au dioxyde de platine $(PtO_2)^{176, 185}$ (**Schéma 60**). Ces méthodes permettent d'introduire deux atomes de deutérium en position géminale et sur deux carbones différent après réduction de triples liaisons, ou deux atomes de deutérium en position vicinale après réduction de doubles liaisons.

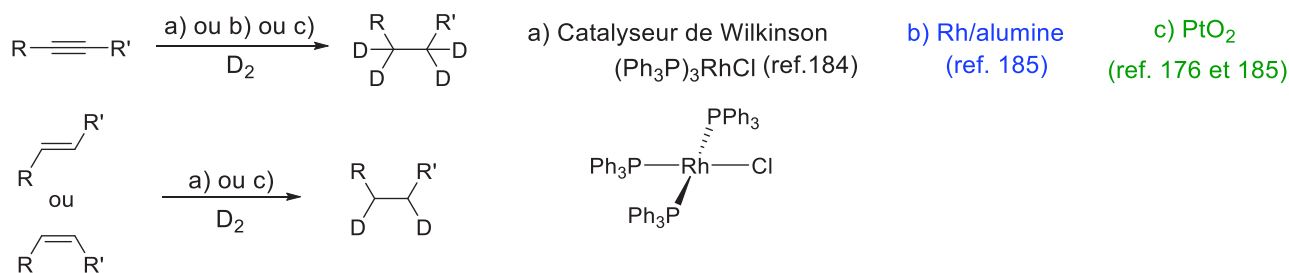
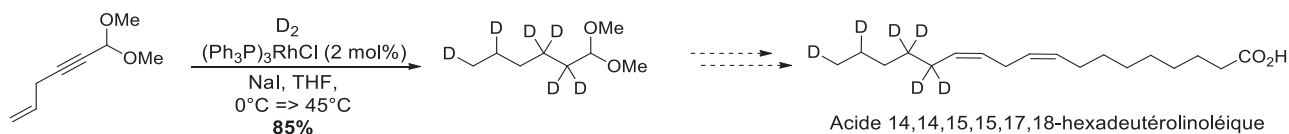
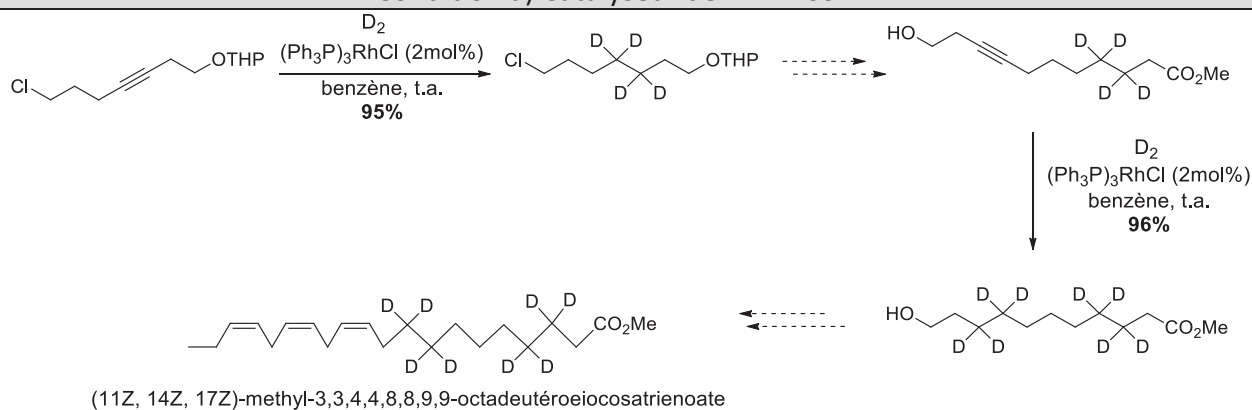
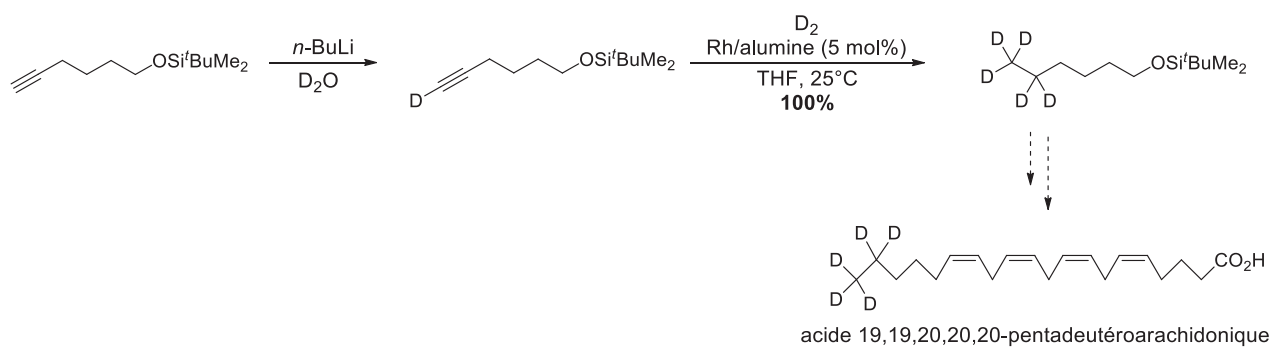
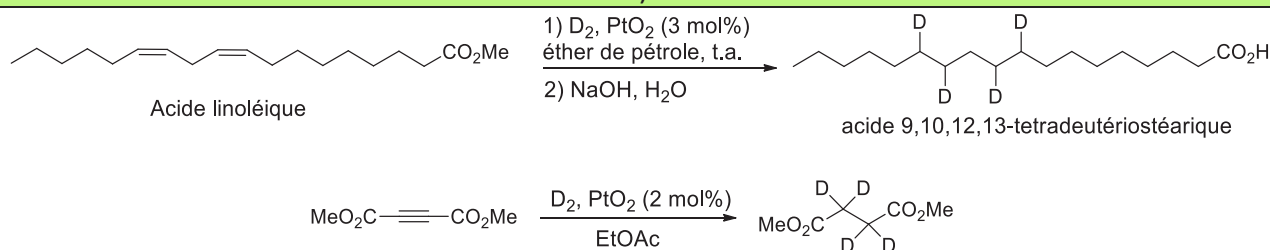
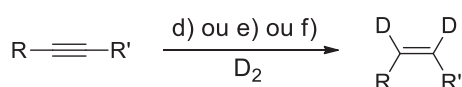

Condition a) Catalyseur de Wilkinson¹⁸⁴

Condition b) Rh/alumine¹⁸⁵

Condition c) PtO_2 ^{176, 185}


Schéma 60 : Deutération par réduction de triples et doubles liaisons en présence de D_2 et produits finaux deutérés de la stratégie de synthèse.^{176, 184-185}

Les réductions partielles de triples liaisons en doubles liaisons sont souvent utilisées pour obtenir des AGPI deutérés en positions vinyliques (**Schéma 61**). Au vue de la stéréochimie *cis* des doubles liaisons des AGPI, seules les réductions *syn*-sélectives seront évoquées dans cette partie. Les catalyseurs de Lindlar (palladium sur carbonate de calcium : Pd/CaCO₃), Rosenmund (palladium sur sulfate de baryum : Pd/BaSO₄) ou de Brown (Nickel (II) diacétate en présence de borohydrure de sodium NaBH₄ : Ni-P2) ont été utilisés pour cette réduction d'alcynes en alcènes deutérés respectivement par Rackoff *et al.*,¹⁸⁶ d'Ippolito *et al.*¹⁸⁷ et Oger *et al.*¹⁸⁸ afin de réaliser la synthèse d'AGPI ou de leurs métabolites deutérés. Un poison comportant une fonction amine est utilisé pour chaque catalyseur afin d'éviter la sur-réduction en alcane.

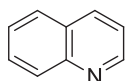


a) Catalyseur de Lindlar
Pd/CaCO₃ (ref. 180)

b) Catalyseur de Rosenmund
Pd/BaSO₄ (ref. 181)

c) Catalyseur de Brown (Ni-P2)(ref. 182)
Ni(OAc)₂ · 4H₂O
NaBH₄

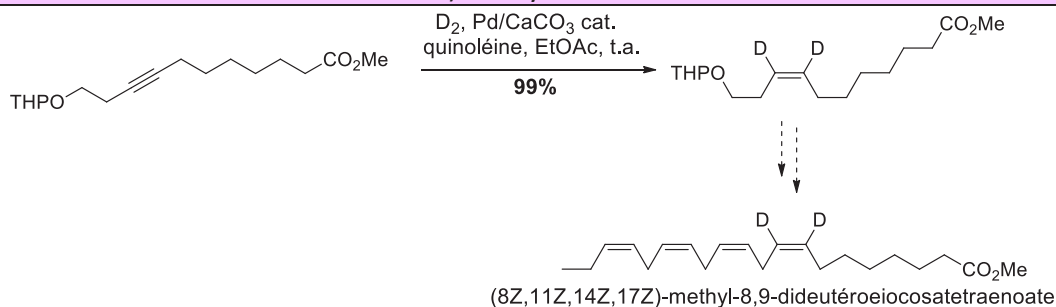
poison commun pour a) et b):



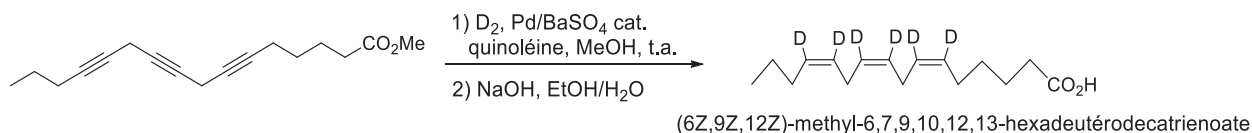
quinoléine

poison: H₂N-CH₂-CH₂-NH₂
éthylène diamine

Condition a) catalyseur de Lindlar¹⁸⁶



Condition b) catalyseur de Rosenmund¹⁸⁷



Condition c) catalyseur de Brown¹⁸⁸

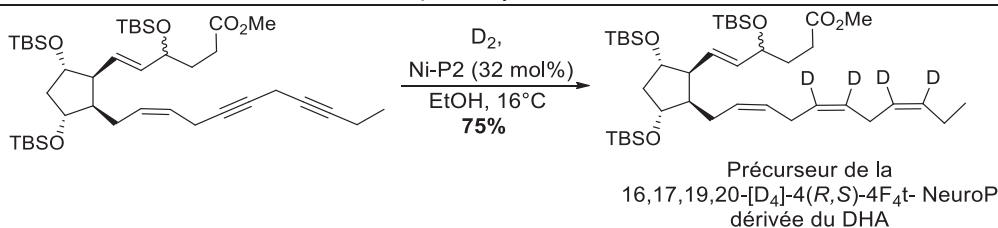


Schéma 61 : Deutération par réduction de triples liaisons en doubles liaisons en présence de D₂ et produits finaux deutérés de la stratégie de synthèse.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

I.2.2. Réduction par deutéroboration puis solvolyse

La réduction de triples et doubles liaisons est également possible par une deutéroboration en présence d'un réactif boré deutéré suivie d'une solvolyse.

La deutéroboration de triple et double liaison *syn*-sélective suivie d'une deutérolyse en présence d'un solvant protique deutéré (MeOD, MeCO₂D ou EtCO₂D) permet l'incorporation de deutériums en position vicinale. Plusieurs types de réactifs borés deutérés ont été décrits dans la littérature :

- L'action du réactif disiamylborane, le bis(3-méthyl-2-butyl)borane), généré à partir du 2-méthyl-2-butène et de l'agent réducteur NaBD₄ en présence de trifluorure de bore diétherate (BF₃.Et₂O), permet de réduire les triples liaisons en doubles liaisons après une méthanolyse finale en présence de MeOD (**Schéma 62**).¹⁷⁵

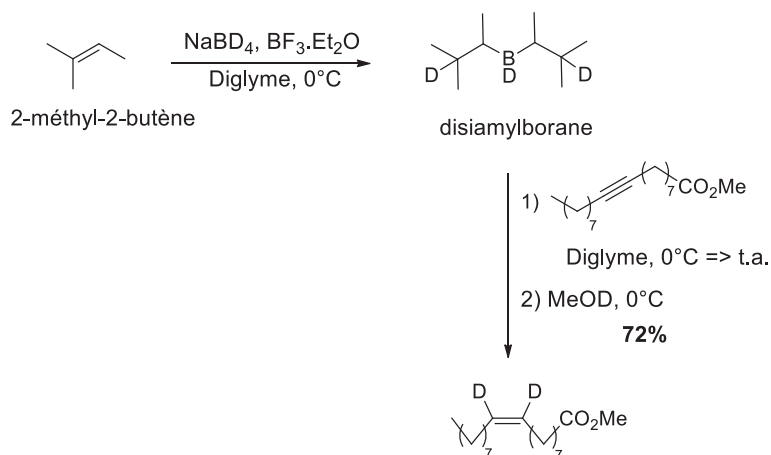


Schéma 62 : Réduction de triples liaisons en doubles liaisons avec le système 2-méthyl-2-butène/NaBD₄/ BF₃.Et₂O puis MeOD.¹⁷⁵

- L'utilisation du réactif BD(Cys)₂ (bis(2-deuteriocyclohexyl)borane-B-D₁) suivie d'un traitement à l'acide méthanoïque deutéré (MeCO₂D) peut également être utilisé pour obtenir un polyène deutéré en positions vinyliques (**Schéma 63**).¹⁸⁹

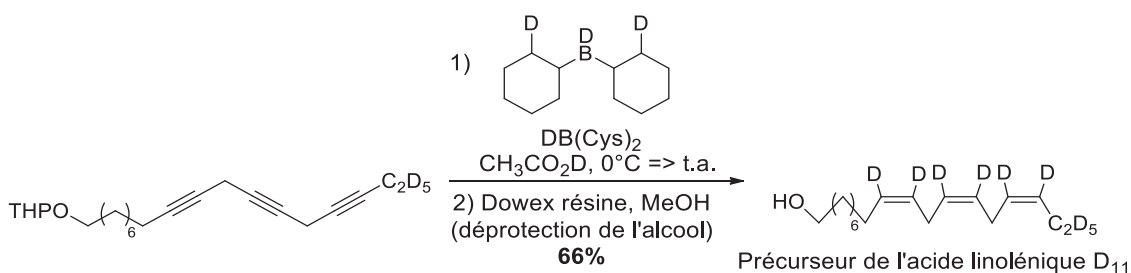


Schéma 63 : Réduction de triples liaisons en doubles liaisons avec DB(Cys)₂/CH₃CO₂D.¹⁸⁹

- Il est également possible d'effectuer une deutération de doubles liaisons en présence de diborane deutéré B_2D_6 et d'acide acétique deutéré $EtCO_2D$ (**Schéma 64**).^{176, 190}

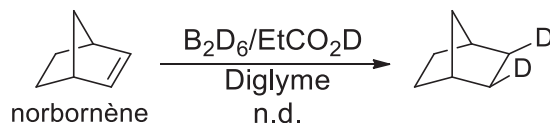


Schéma 64 : Réduction de doubles liaisons en simples liaisons avec $B_2D_6/EtCO_2D$.^{176, 190}

I.2.3. Réduction en présence de deutères

La réduction de fonction chimique en présence de deutères est également un moyen d'incorporer des deutériums sur une molécule.

Plusieurs composés commercialement disponibles peuvent être utilisés comme sources de deutères et permettent d'obtenir des composés deutérés avec une pureté isotopique acceptable (supérieure à 97%)¹⁷⁴ (**Schéma 65**).

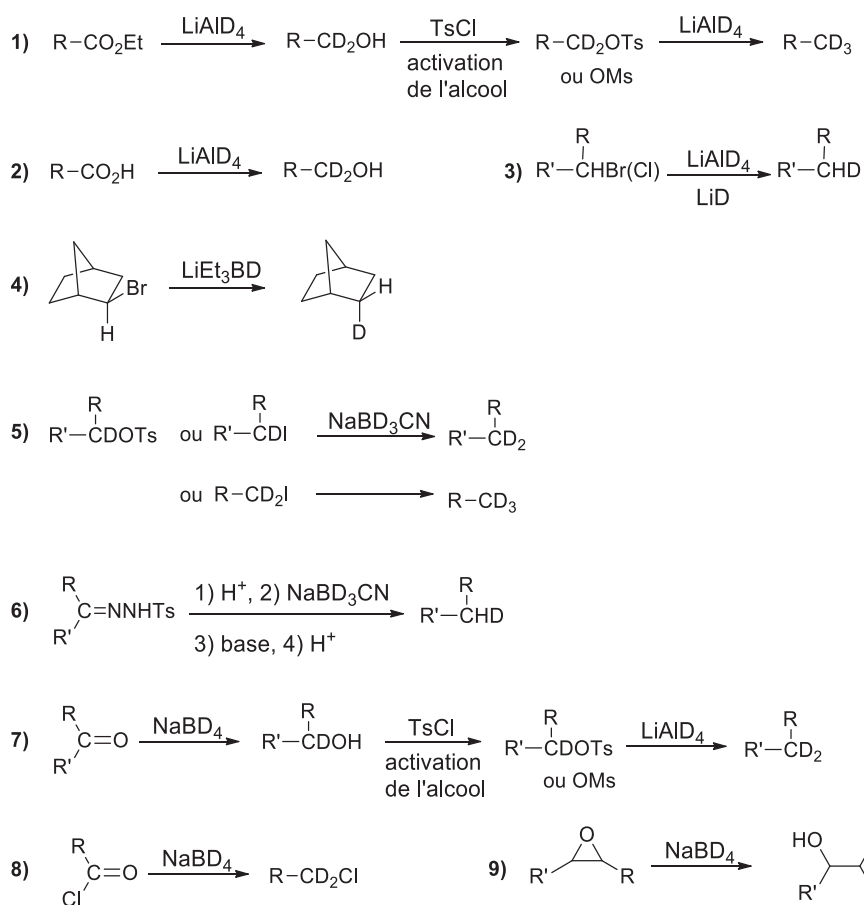


Schéma 65 : Exemple de deutération par réduction de fonction chimique avec des deutères.^{174, 176, 191}

Remplacer l'hydrure de lithium aluminium LiAlH_4 par le deutéru de lithium aluminium LiAlD_4 pour la réduction d'une fonction ester (**Schéma 65**, réaction 1)¹⁷⁴ ou d'un acide carboxylique (**Schéma 65**, réaction 2)^{191a} permet d'obtenir un alcool di-deutéru en position géminale. Le LiAlD_4 a notamment été utilisé pour la synthèse d'AG deutéré par Tulloch *et al.*^{191c} (**Schéma 66**). Dans cette stratégie, l'oxydation en acide carboxylique (**Schéma 66**, oxydation de Jones : CrO_3) ou en aldéhyde (oxydation de Sarett : $^{192} \text{CrO}_3$, pyridine) de l'alcool deutéré en position α , n'est pas bloquée par la présence de ces deutériums.

Le LiAlD_4 peut également être engagé dans une réaction de substitution nucléophile sur un alcool activé avec un groupement tosylo (Ts) ou mésylo (Ms) permettant l'incorporation d'un deutérium supplémentaire, et la synthèse de composés deutérés en position terminale. Cette même réaction sur un composé bromé ou chloré peut être effectuée en présence de LiAlD_4 et de deutéru de lithium LiD (**Schéma 65**, réaction 3), ou encore avec le triéthylborodeutéru de lithium LiEt_3BD (**Schéma 65**, réaction 4)¹⁷⁶. Le cyanoborodeutéru de sodium NaBD_3CN est utilisé pour la substitution de dérivés iodés (**Schéma 65**, réaction 5)¹⁷⁴, ou d'alcools activés par un groupement Ts,¹⁷⁴ et également dans des réactions d'amination réductrice décrites par Westerman *et al.*^{191b} (**Schéma 65**, réaction 6). La réduction de fonction carbonyle de type cétone, aldéhyde et chlorure d'acide peut être effectuée en présence de NaBD_4 (**Schéma 65**, réaction 7 et 8) de manière chimiosélective, en préservant les éventuelles fonctions esters présentes dans la structure de la molécule. Ce réactif peut également être utilisé pour l'ouverture d'époxyde (**Schéma 65**, réaction 9).¹⁹²

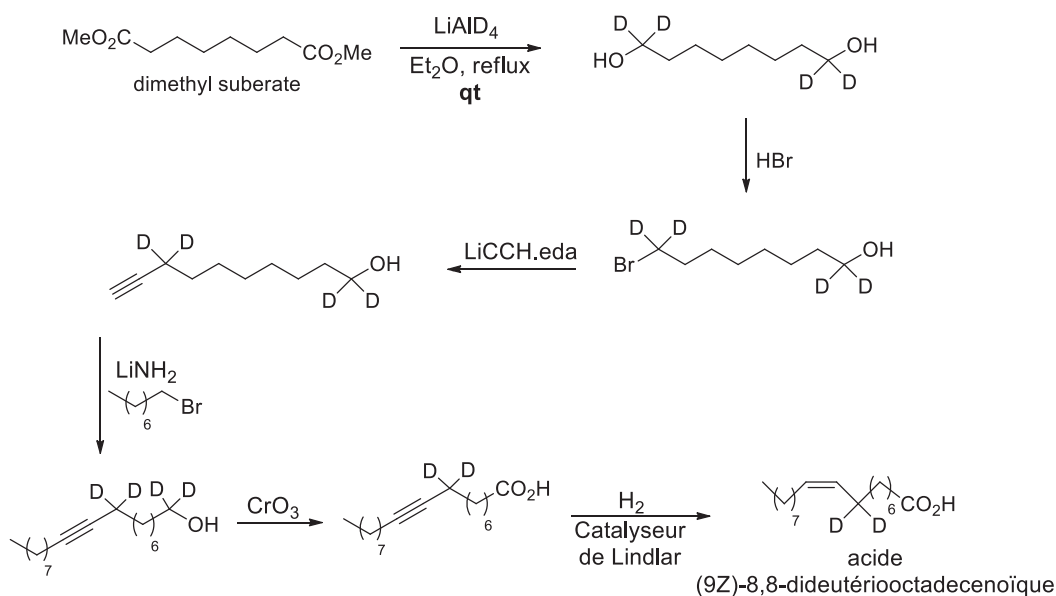


Schéma 66 : Synthèse rapportée de l'acide (9Z)-8,8-didéutérooctadécénoïque.^{191c}

I.2.4. Réduction en présence de D₂O

L'oxyde de deutérium (D₂O) peut être engagé dans les réactions de deutération en tant que source de deutérium totale ou partielle. Selon le type de réactif mis en jeu différentes fonctions peuvent être réduites.

Tout d'abord la réduction *syn*-sélective de triples liaisons en doubles liaisons est possible en présence d'un métal en quantité stœchiométrique ou catalytique.

- Le complexe isopropoxyde de titane Ti(O*i*Pr)₄ peut être utilisé en milieu homogène et en quantité stœchiométrique par rapport à l'alcyne à réduire, en présence d'un réactif de Grignard *i*PrMgBr suivi d'un traitement avec D₂O, pour conduire à l'alcène deutéré en position vinylique (**Schéma 67**). Cette réaction présente des limitations par rapport à l'utilisation du réactif de Grignard, incompatible avec des fonctions sensibles comme les ester.¹⁹³

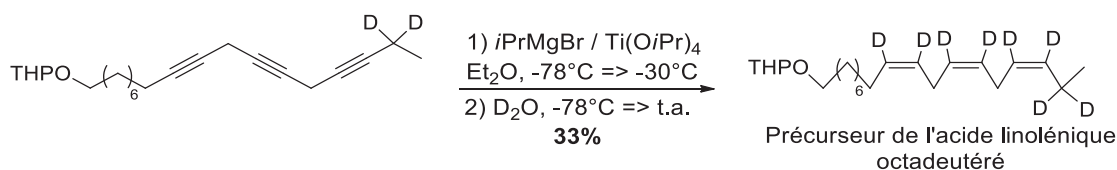


Schéma 67 : Deutération par réduction de triples liaisons en doubles liaisons avec *i*PrMgBr/Ti(O*i*Pr)₄ et D₂O.¹⁹³

- L'utilisation du catalyseur hétérogène AuNPore (nanoporeux) a été plus récemment développée par Yan *et al.*¹⁹⁴ (**Schéma 68**). Deux sources de deutérium sont utilisées pour cette réduction : D₂O et le deutérophénylsilane PhMe₂SiD. Le DMF, solvant de la réaction, joue ici un rôle important en libérant des amines *in situ*, permettant ainsi d'éviter l'adsorption d'atome d'hydrogène à la surface du catalyseur et la sur-réduction de l'alcène.

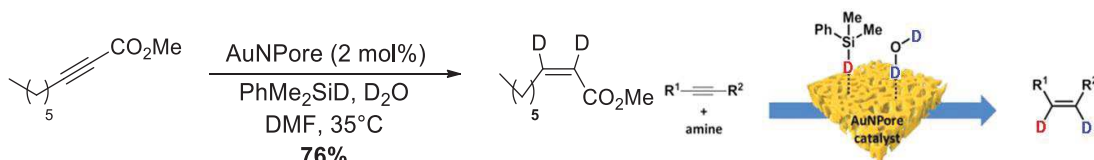


Schéma 68 : Deutération par réduction de triples liaisons en doubles liaisons par le catalyseur AuNPore, PhMe₂SiD, D₂O dans le DMF.¹⁹⁴

Une réduction des doubles liaisons en simples liaisons peut s'effectuer en présence d'hydrazine-d₄ deutérate (N₂D₄, D₂O) permettant l'accès à des composés possédant des deutériums en position vicinale (**Schéma 69**).¹⁷⁵

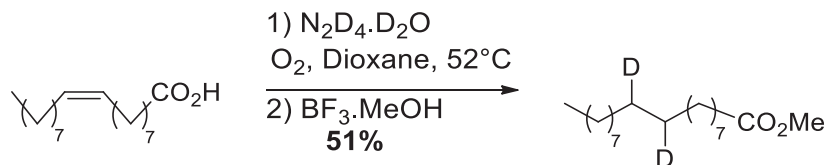


Schéma 69 : Deutération par réduction de doubles liaisons en simples liaisons avec N₂D₄, D₂O.¹⁷⁵

Le traitement de composé chloré en présence de Zn-D₂O permet une déhalogénéation et l'introduction de deutérium géminal en bout de chaîne (**Schéma 70**, réaction 1). L'acide acétique CH₃COOD est également utilisé comme source de deutérium pour une déhalogénéation/deutération en position α de la fonction ester (**Schéma 70**, réaction 2).¹⁹⁵

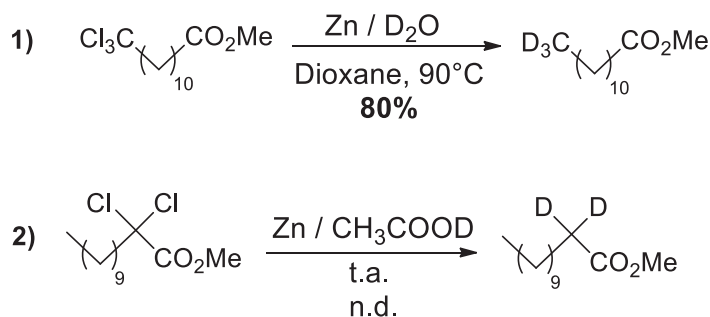


Schéma 70 : Deutération par déhalogénéation/deutération de composé chloré 1) en bout de chaîne et 2) en α de la fonction ester.¹⁹⁵

Le zinc est également utilisé dans la réduction de composé carbonylé de type Clemmensen. Elle peut être effectuée avec le système Zn(Hg) en présence du chlorure de deutérium DCl dans l'éthanol deutéré C₂H₅OD (**Schéma 71**). L'incorporation de six deutériums au lieu de deux est observée par Rakoff *et al.*¹⁷⁵ et s'explique par la facilité d'échange des protons en α de la fonction carbonyle en milieu acide.

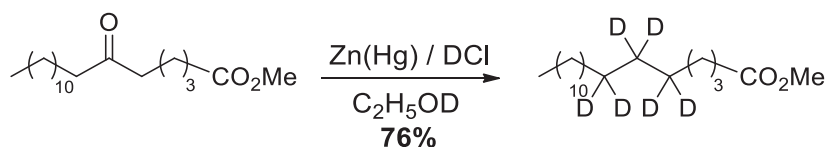


Schéma 71 : Deutération par réduction de Clemmensen en présence de Zn(Hg), DCl dans C₂H₅OD.¹⁷⁵

Pour finir, l'utilisation d'iodure de samarium (SmI_2) en large excès et en présence de D_2O permet de réduire plusieurs types de fonctions :

- la réduction d'acides carboxyliques en présence de SmI_2 et d'une base (Et_3N), conduit à des alcools α deutérés dans les travaux de Szostak *et al.*¹⁹⁶ (**Schéma 72**) ;

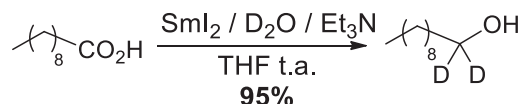


Schéma 72 : Deutération par réduction d'acides carboxyliques avec $\text{SmI}_2 / \text{D}_2\text{O} / \text{Et}_3\text{N}$.¹⁹⁶

- la réduction de doubles liaisons en simples liaisons (**Schéma 73**) en α de fonction acide (**Schéma 73**, réaction 1) ou amide (**Schéma 73**, réaction 2, *via* un mécanisme d'élimination/réduction) a été décrite par Concelon *et al.*,¹⁹⁷ donnant des composés deutérés en positions vicinales.

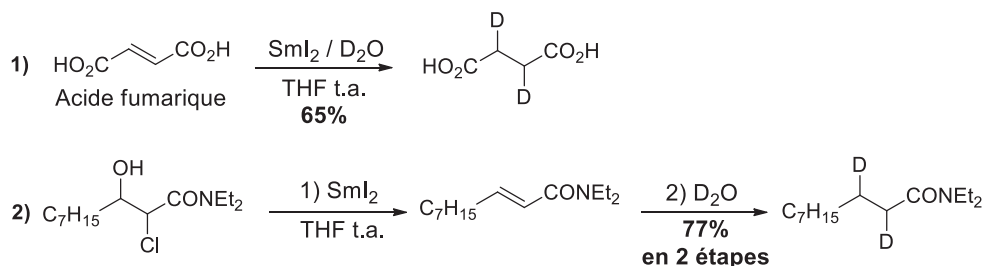


Schéma 73 : Réduction en α de fonctions acides carboxyliques et amides avec $\text{SmI}_2 / \text{D}_2\text{O}$.¹⁹⁷

I.3. Réactions avec des réactifs deutérés de faible poids moléculaire

Des réactifs deutérés de faible poids moléculaire sont utilisées pour incorporer des atomes de deutérium au sein d'une molécule *via* une réaction d'homologation.

- Une substitution nucléophile par un acétylure peut être effectuée sur le trideutéroiodométhane (CD_3I) (**Schéma 74**) conduisant à un carbone deutéré en position terminale¹⁷³. La triple liaison obtenue peut ensuite être hydrogénée en alcène via le système catalytique Ni-P2.

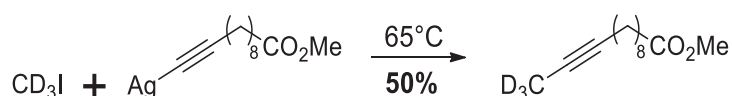


Schéma 74 : Homologation et incorporation de deutérium en présence de CD_3I .¹⁷³

- L'attaque nucléophile sur du paraformaldéhyde deutéré $(CD_2O)_n$ est également possible grâce à un alcyne vrai préalablement déprotoné par un réactif de Grignard. Une homologation est ainsi effectuée conduisant également à l'incorporation d'une fonction alcool au sein de la molécule (**Schéma 75**).¹⁷⁵

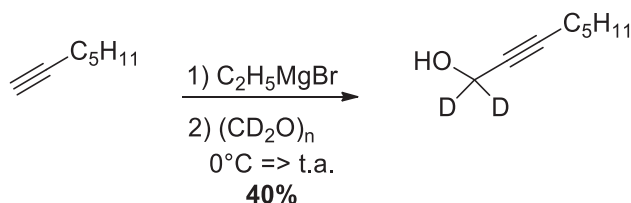


Schéma 75 : Formation d'alcool deutéré en position α par une homologation en présence de $(CD_2O)_n$.¹⁷⁵

- L'alkylation du deutérodiazoacétate d'éthyle (N_2CDCO_2Et) par le triheptynylborane, suivi d'une deutérolyse en présence de D_2O peut conduire à un ester propargylique deutéré en position géminal (**Schéma 76**).¹⁹⁸ Le réactif deutéré N_2CDCO_2Et peut être synthétisé *via* un échange H/D entre le diazoacétate d'éthyle (N_2CHCO_2Et) et le mélange D_2O - Et_2O biphasé, catalysé par du carbonate de potassium.

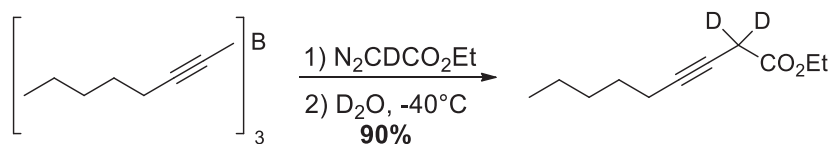
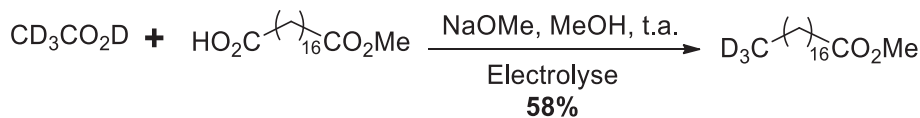


Schéma 76 : Formation d'ester propargylique deutéré en position géminal par réaction du triheptynylborane sur N_2CDCO_2Et en présence de D_2O .¹⁹⁸

- L'acide acétique mono-deutééré CD_3CO_2D peut être engagé dans la réaction de couplage anodique de Kolbé afin d'introduire les atomes de deutérium en bout de chaîne¹⁷³ (**Schéma 77**). Cette dernière correspond une électrolyse oxydante entraînant la décarboxylation des acides carboxyliques formant des radicaux R^\bullet . Ces derniers réagissent entre eux de manière aléatoire *via* des réactions de terminaison. Dans l'exemple décrit par Tulloch *et al.*¹⁷³, le produit désiré est issu de la réaction de couplage entre les radicaux $^\bullet CD_3$ et $^\bullet CH_2(CH_2)_{17}CO_2Me$. Les homocouplages sont évités en utilisant un des deux réactifs en excès. A noter également qu'il n'y a pas d'échange H/D en α de la fonction ester lors de

cette réaction. Ce type de couplage anodique était une des premières méthodes mise en œuvre pour la synthèse d'AGPI deutérés en position terminale.¹⁷⁴



Couplage anodique de Kolbé

Schéma 77 : Couplage anodique de Kolbé entre un acide carboxylique et $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}$.¹⁷³

- Enfin, le diméthylsulfate hexa-deutééré $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$ peut servir d'agent de méthylation à partir de fonction alcool appauvrie en électrons (**Schéma 78**). Ainsi l'hexafluoroisopropanol est transformé en éther deutéré en milieu basique.¹⁷⁶

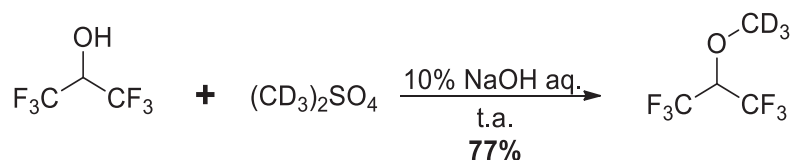


Schéma 78 : Obtention d'éther deutéré en présence de $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$.¹⁷⁶

I.4. Utilisation de micro-organisme pour la biosynthèse d'AG deutérés

I.4.1. Culture cellulaire en milieu D_2O

Certains AG sont biosynthétisés au sein des micro-organismes lors de leur croissance et leur prolifération en milieu biologique aqueux. Ils peuvent ainsi devenir des "machines de production" d'AG deutérés lorsque l'eau, composant essentiel du milieu de culture, est remplacée par de l'oxyde de deutérium (D_2O). Plusieurs types de micro-organismes peuvent être utilisés pour ce type de synthèse.

L'algue *Seenedesmus obliquus* a été utilisé par Graff *et al.*¹⁹⁹ pour produire des AG totalement deutérés (dits perdeutérés) après leur culture dans du D_2O contenant des sels inorganiques. Elles sont cultivées sous une atmosphère d'air avec 5% de CO_2 en présence de lumières fluorescentes et d'une agitation magnétique. Elles sont ensuite récoltées par centrifugation, resuspendues dans du D_2O , puis portées à ébullition pour désagréger les parois cellulaires. Après une extraction liquide/liquide (L/L), les acides gras sont finalement estérifiés. S'en suit une première purification par chromatographie sur Florisil (MgSiO_3) et un fractionnement par chromatographie sur couche mince sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent permettant de séparer les AG selon leur degré d'insaturation. Les différentes fractions obtenues sur la plaque de silice sont récupérées

séparément après prélèvement de la silice, et extraction à l'éther de pétrole. Un dernier fractionnement est effectué grâce à une chromatographie préparative en phase liquide (CPL) pour séparer les AG en fonction de leur longueur de chaîne.

La composition suivante en AG totaux (libres, estérifiés, phospholipides, triglycérides,...) (**Tableau 12**) a été préalablement déterminée sur le mélange brut, sans purification intermédiaire. Le pourcentage des isomères de chaque AGI a également été étudié.

Fatty acid	Isomer	Per cent of fraction	Per cent of total fatty acids
16:1	$\Delta 7$	64.5	2.9
	$\Delta 9$	35.5	1.6
16:2	$\Delta 3,6$	50.8	6.2
	$\Delta 7,10$	49.2	6.0
16:3	$\Delta 7,10,13$	99.0	1.6
18:1	$\Delta 9$	85.8	7.6
	$\Delta 11$	14.2	1.2
18:2	$\Delta 9,12$	99.0	30.7
18:3	$\Delta 9,12,15$	99.0	1.8

Tableau 12 : AG deutérés obtenus après culture de l'algue *Seenedesmus obliquus* dans D₂O.¹⁹⁹

L'acide gras perdeutééré essentiellement biosynthétisés par ces algues est l'acide linoléique (C18 :2, $\omega 6$, $\Delta 9,12$) perdeutééré.

Plus récemment la culture de levure *Pichia pastoris* a été mise en œuvre dans un milieu contenant du D₂O et du glycérol D₈ comme source de deutérium²⁰⁰ pour la synthèse d'AGPI perdeutéérés. Les phospholipides présents au sein des membranes sont extraits et analysés grâce à une extraction similaire à celle de Folch.²⁰¹ Une comparaison des différents AG obtenus est effectuée entre le milieu H₂O et D₂O (**Figure 42**), montrant que l'AG (C18 :1, $\omega 6$) est majoritairement formé en milieu D₂O au détriment de l'AG (C18:3, $\omega 6$).

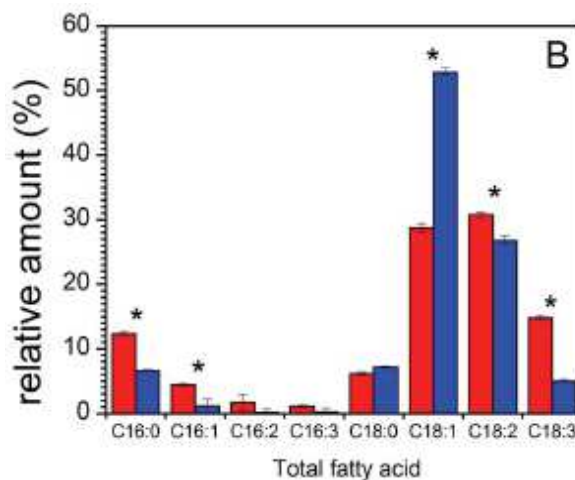
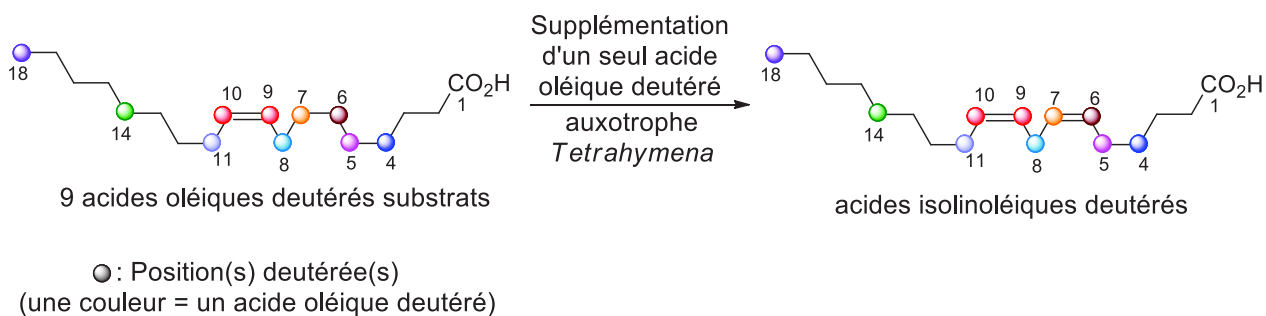


Figure 42 : Distribution totale des AG pour la culture des levures *Pichia pastoris* à 30 °C, en rouge dans un milieu H₂O et en bleu dans D₂O.²⁰⁰

Pour conclure, malgré leur efficacité, l'inconvénient majeur de ces biosynthèses réalisées en milieu D₂O est la deutération totale des AGPI, et le manque de spécificité des positions deutérées.

I.4.2. A partir d'AGPI deutérés *via* une supplémentation de micro-organisme et métabolisation

La biosynthèse d'acides isolinoléiques (C18:2, ω9) deutérés par des voies métaboliques de micro-organismes, a été rapportée dans la littérature (**Figure 43**).²⁰² Cette dernière a été réalisée *via* l'oxydation enzymatique d'acides oléiques (C18:1, ω9) deutérés préalablement synthétisés. Les micro-organismes utilisés pour cette réaction sont des auxotrophes d'AGPI issu de l'espèce protozoaire *Tetrahymena*. Ils possèdent une mutation qui limite l'activité des désaturases Δ9 et Δ12, sans affecter l'activité de la désaturase Δ6. Ces derniers ont été supplémentés en acides oléiques deutérés durant leur culture, formant après métabolisation et action de la désaturase Δ6, les acides isolinoléiques deutérés correspondant (**Figure 43**), ne présentant pas d'insaturation supplémentaire au niveau de la position 12 mais uniquement sur la position 6.



Site of deuteration	Total yield (mg) of fatty acid	Yield (mg) of D-fatty acid	Purity (%)	Deuteration (%)
C ₄ ○	78	20	96.5	26
C ₅ ○	111	33	98.9	30
C ₆ ○	75	4	99.2	~5
C ₇ ○	98	37	> 99.5	38
C ₈ ○	75	21	99.0	28
C ₉ —C ₁₀ ○	101	35	99.5	35
C ₁₁ ○	105	ND	> 99.5	ND ^c
C ₁₄ ○	138	48	99.6	35
C ₁₈ ○	120	25	99.5	21

Figure 43 : La série d'AGPI deutérés obtenus après supplémentation de micro-organisme auxotrophe *Tetrahymena*. Le % de deutération est déterminé par RMN ¹³C (résonance magnétique nucléaire).^{202b}

Environ 100 mg d'acides isolinoléiques deutérés sont obtenus pour chaque culture avec un taux élevé de deutération de 30% en moyenne (cf. tableau, **Figure 43**). La perte de deutérium durant cette biosynthèse correspond à une limitation de cette méthode pour l'obtention d'AGPI deutérés.

Pour conclure, différentes méthodes de deutérations de molécules existent dans la littérature, elles permettent l'incorporation d'atomes de deutérium en bout de chaîne, en position géminale et vicinale. Les micro-organismes permettent une deutération totale du substrat. Certaines de ces méthodes ont été privilégiées pour la synthèse d'AGPI deutérés en positions *bis*-allyliques et seront décrites dans le paragraphe.

II. Synthèses d'acides gras polyinsaturés deutérés en position(s) *bis*-allylique(s) décrites dans la littérature

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéressons aux AGPI de type oméga-3 tel que le DHA, deutérés en positions *bis*-allyliques. L'étude bibliographique qui suit retrace donc les synthèses d'AGPI deutérés uniquement dans ces positions.

II.1. Synthèse énantiosélective de l'acide 13(*S*)-deutéroarachidonique mono-deutérés en positions *bis*-allyliques rapportée par Peng *et al.*

La synthèse de l'acide 13(*S*)-deutéroarachidonique **(a)** (**Schéma 79**) a été réalisée par Peng *et al.*¹⁹² afin d'étudier le mécanisme de métabolisation de l'acide arachidonique en prostaglandine catalysée par la prostaglandine H synthase (PGHS) durant son activité cyclo-oxygénase. La première étape de ce mécanisme correspondrait à l'abstraction de l'hydrogène *pro-S* sur le carbone en position 13. Cet hydrogène a donc été remplacé par un atome de deutérium pour cette étude.

La stratégie de synthèse mise en œuvre permettant d'obtenir le squelette carboné de l'acide arachidonique (**Schéma 79**), comporte comme étape clé une réaction d'oléfination de Wittig, réalisée à partir de l'ylure provenant du sel de phosphonium **(c)** et de l'aldéhyde deutéré **(b)**. Ce dernier est synthétisé également via une réaction d'oléfination de Wittig entre les synthons **(d)** et **(e)** provenant respectivement de l'époxyde diol **(f)** et de l'acroléine.

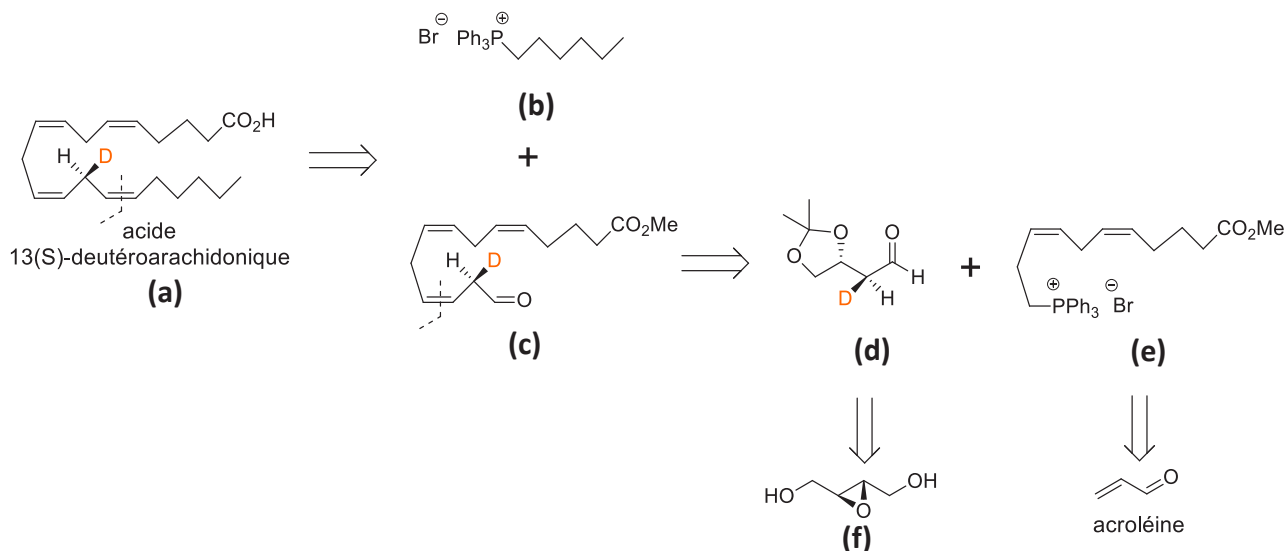


Schéma 79 : Schéma rétrosynthétique de l'acide 13(S)-deutéroarachidonique.¹⁹²

Tout d'abord, le sel de phosphonium (**e**) est préparé en 9 étapes à partir de l'acroléine (**Schéma 79**). Après sa conversion en sel de phosphonium (**g**) utilisé comme agent d'homologation à 3 carbones, il est engagé dans une réaction de Wittig avec l'aldéhyde (**h**) préparé en 2 étapes à partir de la δ -valérolactone. L'acétonide (**i**) est déprotégé en aldéhyde puis est engagé de nouveau dans une réaction de Wittig en présence du sel de phosphonium (**g**) pour conduire à l'aldéhyde (**j**) après déprotection. Ce dernier est réduit en alcool en présence NaBH_4 , puis transformé en dérivé bromé dans les conditions d'Appel et finalement en sel de phosphonium (**e**) en présence de PPh_3 .

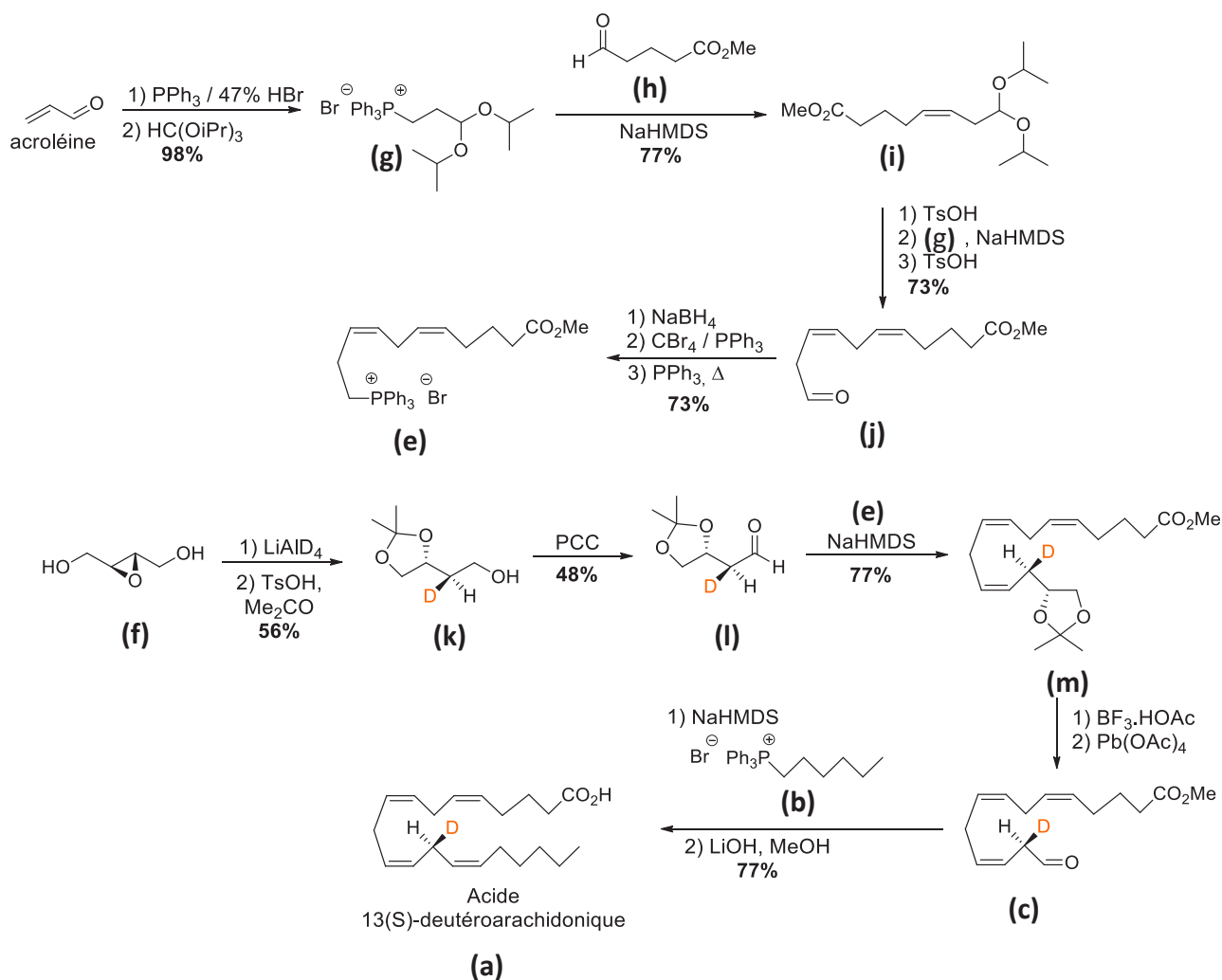


Schéma 80 : Synthèse énantiosélective de l'acide 13(S)-deutéroarachidonique réalisée par Peng *et al.*¹⁹²

L'incorporation de l'atome de deutérium est réalisée pendant la synthèse de l'aldéhyde **(l)**, synthétisé en 3 étapes à partir de l'époxyde diol **(f)**. L'ouverture de ce dernier en présence de LiAlD_4 permet l'incorporation de l'atome de deutérium, avec inversion de Walden. Les alcools géminaux primaires et secondaires obtenus sont ensuite protégés avec un groupement acétone pour obtenir le composé **(k)**. L'oxydation de l'alcool non protégé en présence de chlorochromate de pyridinium (PCC) permet d'accéder à l'aldéhyde **(l)**. L'oléfination entre l'aldéhyde **(l)** et l'ylure provenant du sel de phosphonium **(e)** conduit à l'ester deutéré **(m)**. Une déprotection de l'acétone en milieu acide suivie d'une oxydation du diol en présence de Pb(OAc)_4 forme l'aldéhyde **(c)**, engagé finalement dans une réaction de Wittig avec l'ylure issu du sel de phosphonium **(b)**. Une saponification finale permet d'obtenir l'acide 13(S)-deutéroarachidonique **(a)**. Son analogue 13(R) est également synthétisé par Peng *et al.*,¹⁹² les composé **(e)** et **(k)** étant des intermédiaires communs.

Cette stratégie de synthèse utilisant l'ouverture de l'époxyde en présence de LiAlD_4 , permet l'incorporation d'un seul atome de deutérium en position *bis*-allylique.

II.2. Synthèses d'acides linoléiques, arachidoniques, et α -linoléiques deutérés en positions *bis*-allyliques par Shchepinov *et al.*

Les AGPI deutérés LA, ALA et Ara (acide arachidonique ; C20:4, ω 6) mono ou di-deutérés en positions *bis*-allyliques (**Schéma 63**) ont été synthétisés et développés afin d'étudier l'impact de l'incorporation de un ou deux atomes de deutériums sur la limitation de la peroxydation lipidique.^{7a-c, 203} (partie III, chapitre II). Des synthèses racémiques sont rapportées pour le LA et l'ALA mono-deutérés en positions *bis*-allyliques, contrairement à la synthèse énantiosélective décrite par Peng *et al.*¹⁹²

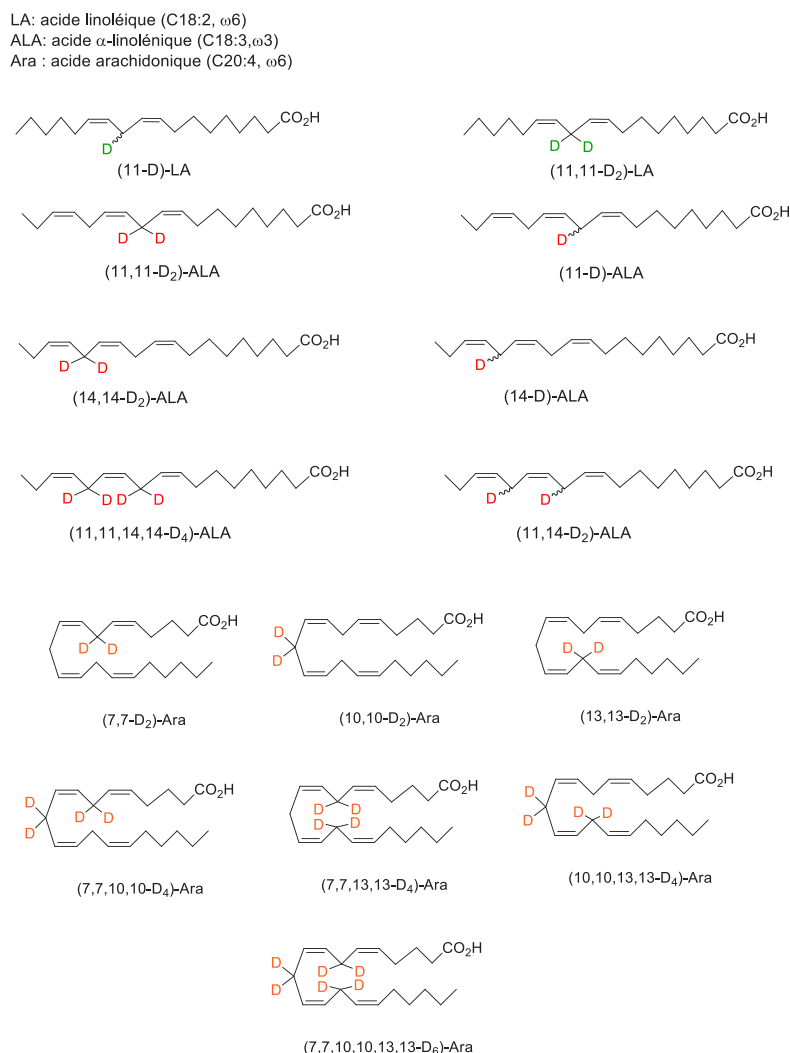


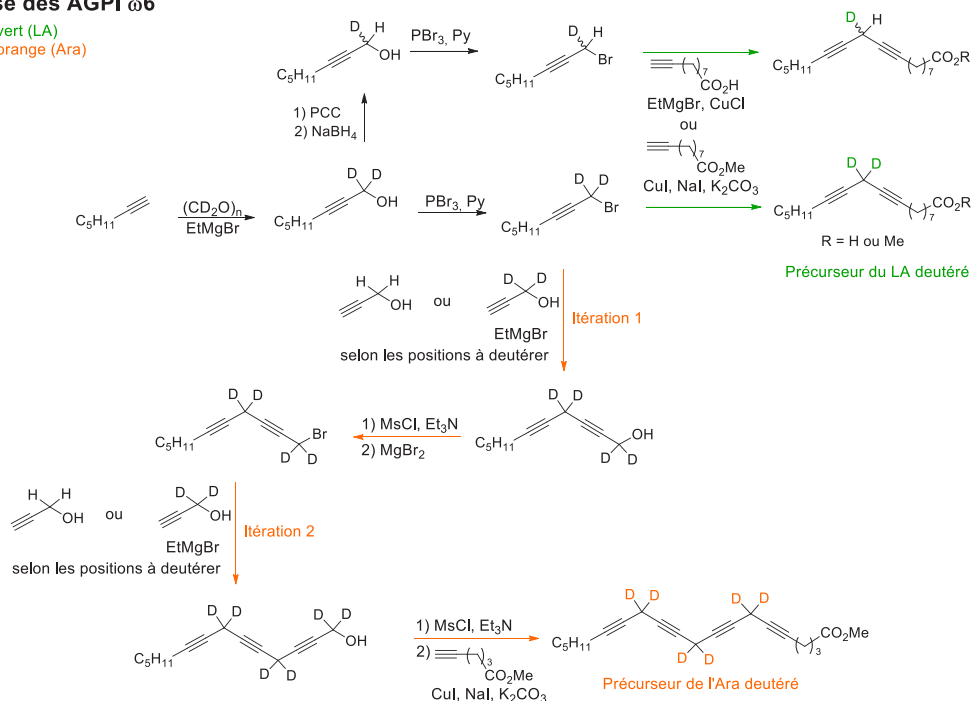
Figure 44 : AGPI deutérés en position *bis*-allylique et synthétisés : LA, ALA et Ara.^{7a-c, 203}

La synthèse du LA di-deutééré en position *bis*-allylique (**Schéma 63**) a été décrite dans un premier temps par Tucker *et al.*²⁰⁴ Cette synthèse a grandement inspirée celle des AGPI deutérés possédant une chaîne plus longue et/ou un nombre d'insaturations supplémentaires comme l'Ara ou l'ALA.²⁰³

La stratégie de synthèse appliquée est une approche polyacétylénique²⁰³ (**Schéma 81** et **Schéma 82**), permettant de reconstruire entièrement les squelettes d'AGPI (les chaînes C18 à 20) en utilisant des *C*-alkylations itératives *via* l'action d'un alcool propargylique acétylure sur un dérivé bromé propargylique électrophile (**Schéma 81**). L'incorporation des deutériums est réalisée en fonction de la position à deutérer, par action d'un acétylure sur du paraformaldéhyde deutéré.

Synthèse des AGPI ω 6

voie 1: en vert (LA)
voie 2: en orange (Ara)



Synthèse de l'AGPI ω 3

voie 3: en rouge (ALA)

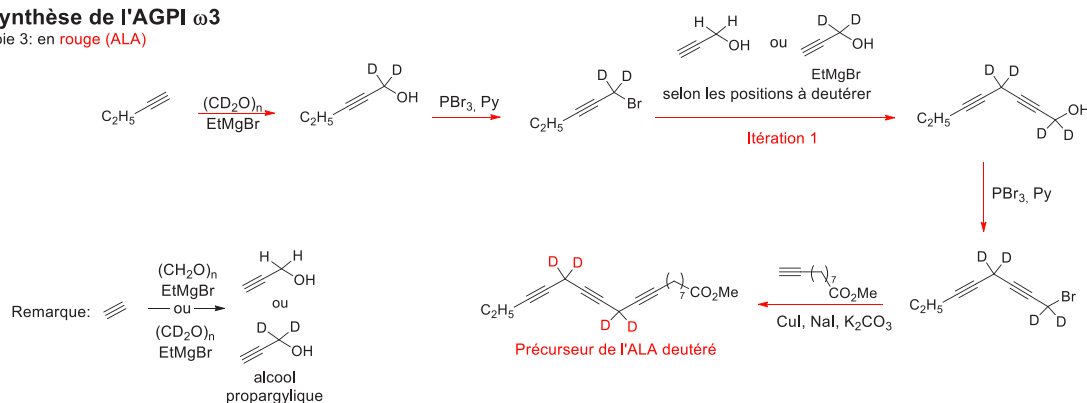


Schéma 81 : Obtention des précurseurs LA, Ara et ALA mono- ou di-deutéérés en positions *bis*-allyliques.^{7a-c, 203}

L'itération zéro de cette stratégie permet d'accéder au dérivé LA deutéré (**Schéma 81**, voie verte). L'incorporation des deutériums s'effectue durant la première étape de cette synthèse par l'attaque nucléophile de l'hept-1-yne sur du paraformaldéhyde deutéré $(CD_2O)_n$, formant ainsi l'alcool di-deutééré. L'analogue mono-deutééré peut être synthétisé en deux étapes à partir de l'alcool di-deutééré, en effectuant une réaction d'oxydation en présence de PCC formant l'aldéhyde mono-deutééré, suivi d'une réduction en alcool grâce au $NaBH_4$. Les alcools mono- ou di-deutééré obtenus sont directement transformés en dérivés bromés en présence de tribromure de phosphore PBr_3 , ou activés par un groupement Ms puis bromés en présence de $MgBr_2$. Ensuite, deux méthodes sont possibles pour obtenir le diyne :

- une attaque nucléophile sur le dérivé bromé par un alcyne préalablement déprotoné par $EtMgBr$ en présence de $CuCN$ en quantité catalytique, ce dernier permet de diminuer le pK_a de l'alcyne vrai et facilite la formation de l'acétylure. Cette première méthode est rapportée par Tucker *et al.* ;²⁰⁴
- un couplage de type Caruso entre le dérivé bromé et un alcyne ester, en présence de CuI en excès, de NaI et en milieu basique (K_2CO_3) afin de former l'acétylure.

Pour cette synthèse, le couplage de Caruso est préférentiellement choisi par l'équipe de Shchepinov *et al.*^{7a-c, 203} car les conditions mises en œuvre sont compatibles avec la présence d'un ester, ce qui n'est pas le cas pour la première condition qui fait intervenir un réactif de Grignard. Ainsi cette stratégie permet d'accéder au squelette carboné complet C18 du LA. Le couplage de Caruso est donc utilisé en fin de synthèse pour obtenir le squelette carboné complet des AGPI.

Dans une autre synthèse décrite par Shchepinov *et al.*, la construction progressive et itérative des chaînes carbonées de l'Ara (**Schéma 81**, voie orange) et de l'ALA (**Schéma 81**, voie rouge) est effectuée avec une homologation à 3 carbones successive. Cette dernière est effectuée en présence de l'alcool propargylique deutéré ou non (selon la sélection des positions *bis*-allyliques à deutérer), engagé dans une substitution nucléophile sur un dérivé bromé propargylique. Deux itérations de ce type sont nécessaires afin d'obtenir le motif ω_6 de l'Ara, en partant de l'hept-1-yne (**Schéma 81**, voie orange, itération 1 et 2) et une itération est nécessaire pour l'ALA (**Schéma 81**, voie rouge, itération 1), avec comme produit de départ le but-1-yne

permettant de former le motif $\omega 3$. Leurs chaînes carbonées finales sont obtenues, comme pour le LA avec un couplage de Caruso réalisé en présence de l'alcyne ester correspondant.

Ainsi les polyynes obtenus sont ensuite engagés dans une hydrogénation de Rosenmund (Pd/BaSO₄ et quinoléine), comme décrite par Tucker *et al.*,²⁰⁴ ou de Brown (Ni-P2).^{7a-c, 203}

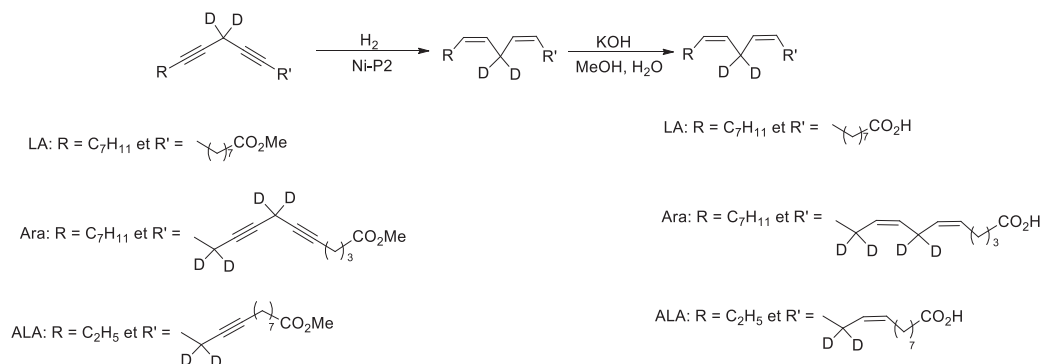


Schéma 82 : Étapes finales des synthèses du LA, de l'Ara et de l'ALA mono- ou di-deutérés en positions *bis*-allyliques.^{7a-c, 203}

Le catalyseur de Brown est préférentiellement utilisé pour les synthèses effectuées par Shchepinov *et al.*^{7a-c, 203}. Suite à cette hydrogénation, une purification intermédiaire sur silice/AgNO₃ permet d'éliminer les sous-produits de sur-réduction. Finalement une saponification permet d'obtenir l'AGPI souhaité.

La méthode d'incorporation des atomes de deutérium décrite ici est basée sur une homologation/deutération effectuée grâce à une petite molécule deutérée : le paraformaldéhyde deutéré (CD₂O)_n. La limitation de cette stratégie réside dans le besoin de recréer le squelette entier de l'AGPI à deutérer. Intéressés par la deutération des positions *bis*-allyliques de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C₂₂:6, $\omega 3$), nous nous sommes inspirés des travaux de Shchepinov *et al.* pour l'incorporation des deutériums, en évitant de reconstruire entièrement le squelette C₂₂ étape par étape, et en nous basant sur une stratégie de synthèse convergente. Les DHA obtenus seront ensuite couplés au phloroglucinol-O*i*Pr pour former le composé lead deutéré.

Chapitre II. Synthèse des DHA deutérés et lipophénols deutérés

I. Stratégies de synthèse

I.1. Synthèse rapportée du lipophénol non deutéré

La synthèse de la molécule lead phloroglucinol-*O*iPr-ODHA a été développée et publiée par le laboratoire.⁴ Le schéma synthétique (**Schéma 83**) suivant a été mis en œuvre pour obtenir cette molécule :

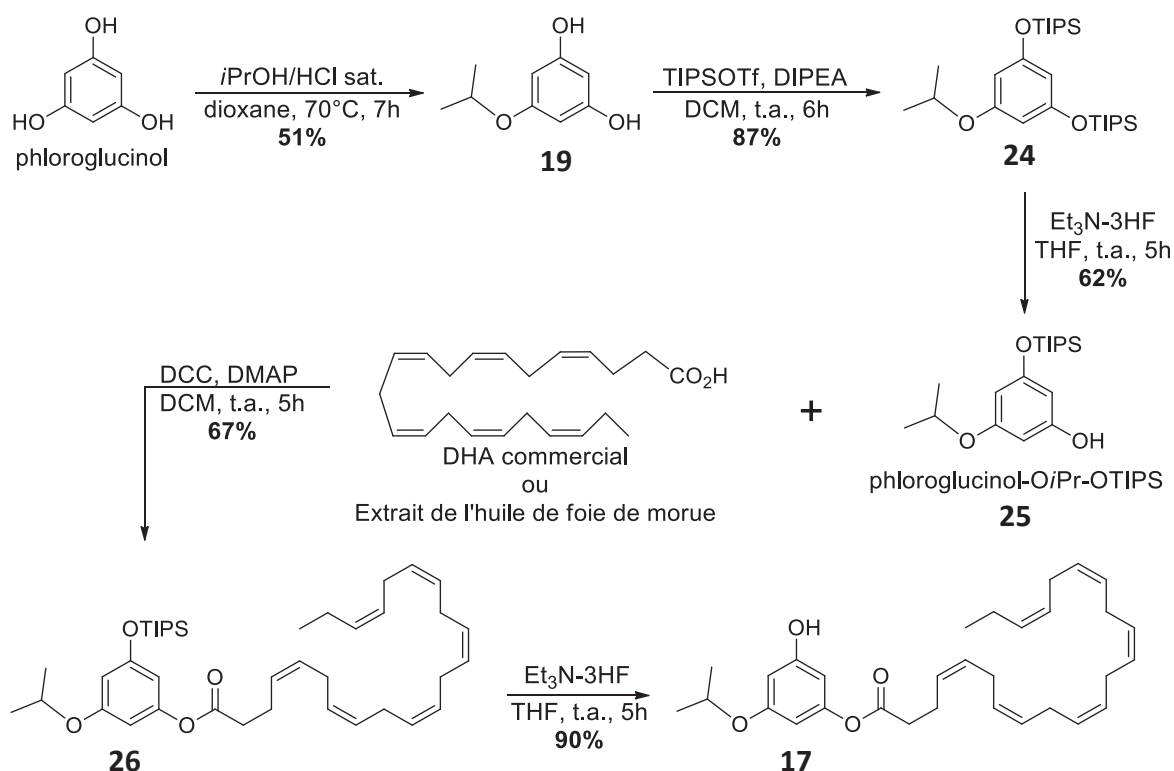


Schéma 83 : Synthèse du phloroglucinol-*O*iPr-ODHA non deutéré **17**.⁴

Tout d'abord le dérivé phloroglucinol propylé monoprotégé par un groupement triisopropylsilyle (TIPS), le phloroglucinol-*O*iPr-OTIPS **25**, est obtenu en 3 étapes à partir du phloroglucinol commercial. La seule difficulté de cette synthèse est située au niveau des réactions de monoalkylation et monoprotection réalisées sur le phloroglucinol, dérivé symétrique, présentant des groupements hydroxyles avec des réactivités identiques. Le phloroglucinol est dans un premier temps mono *isopropylé* en présence d'*isopropanol* (*iPrOH*) en milieu acide fort (HCl saturé) afin d'obtenir le dérivé *isopropyle* **19**. La monoalkylation est effectuée avec un rendement de 51%, avec de faibles proportions de dérivés di- et tri-*isopropylés*. La monoprotection est

ensuite effectuée en 2 étapes : une protection complète des hydroxyles par des groupements TIPS formant le composé **24**, suivie d'une monodéprotection douce en présence de triéthylamine trifluorure ($\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$) permettant d'accéder au phloroglucinol-*OiPr*-OTIPS **25** avec un rendement de 54% en deux étapes. Le passage par l'intermédiaire **24** est inévitable puisqu'une monoprotection réalisée à partir de **19** ne conduit qu'à 25% du phénol **25**. Finalement, la synthèse de ce dernier est effectuée en 3 étapes à partir du phloroglucinol avec un rendement global de 27%. Le phloroglucinol-*OiPr*-OTIPS **25** est ensuite engagé dans une réaction de couplage avec le DHA naturel, commercialement disponible ou extrait de l'huile de foie de morue, en présence de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), conduisant au produit couplé **26** avec un rendement de 67%. Une étape finale de déprotection du groupement TIPS du dérivé **26** permet d'obtenir le phloro-*OiPr*-ODHA **17** non deutéré, avec un rendement global de 16% en 5 étapes.

Ces étapes précédemment validées au sein du laboratoire seront utilisées pour la synthèse des analogues deutérés du lipophénol **17** : le phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6- D_2)-DHA (**20**) et phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6,9,9- D_4)-DHA (**21**). L'enjeu synthétique du travail présenté ici réside dans l'obtention des DHA deutérés correspondant : le (6,6- D_2)-DHA (**22**) et le (6,6,9,9- D_4)-DHA (**23**) (**Schéma 57**). Deux dérivés sont envisagés, possédant une ou deux positions *bis*-allyliques deutérées afin d'évaluer l'impact de la deutération par comparaison de leurs activités biologiques.

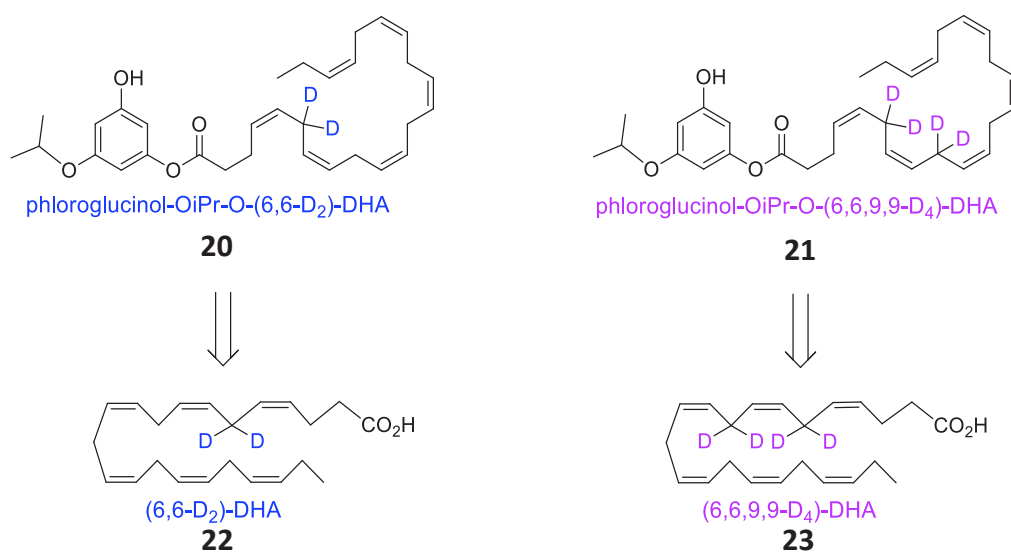


Schéma 57 : Lipophénols cibles à synthétiser : phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6- D_2)-DHA (**20**) et phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6,9,9- D_4)-DHA (**21**) et leur DHA, (6,6- D_2)-DHA (**22**) et (6,6,9,9- D_4)-DHA (**23**) associés.

I.2. Schéma rétrosynthétique des DHA deutérés : (6,6-D₂)-DHA (**22**) et le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**)

Les schémas rétrosynthétiques suivants (**Schéma 84**) ont été mis en évidence pour la synthèse des DHA deutérés **22** et **23**. Ils sont relativement similaires et comportent des étapes clés et des intermédiaires communs.

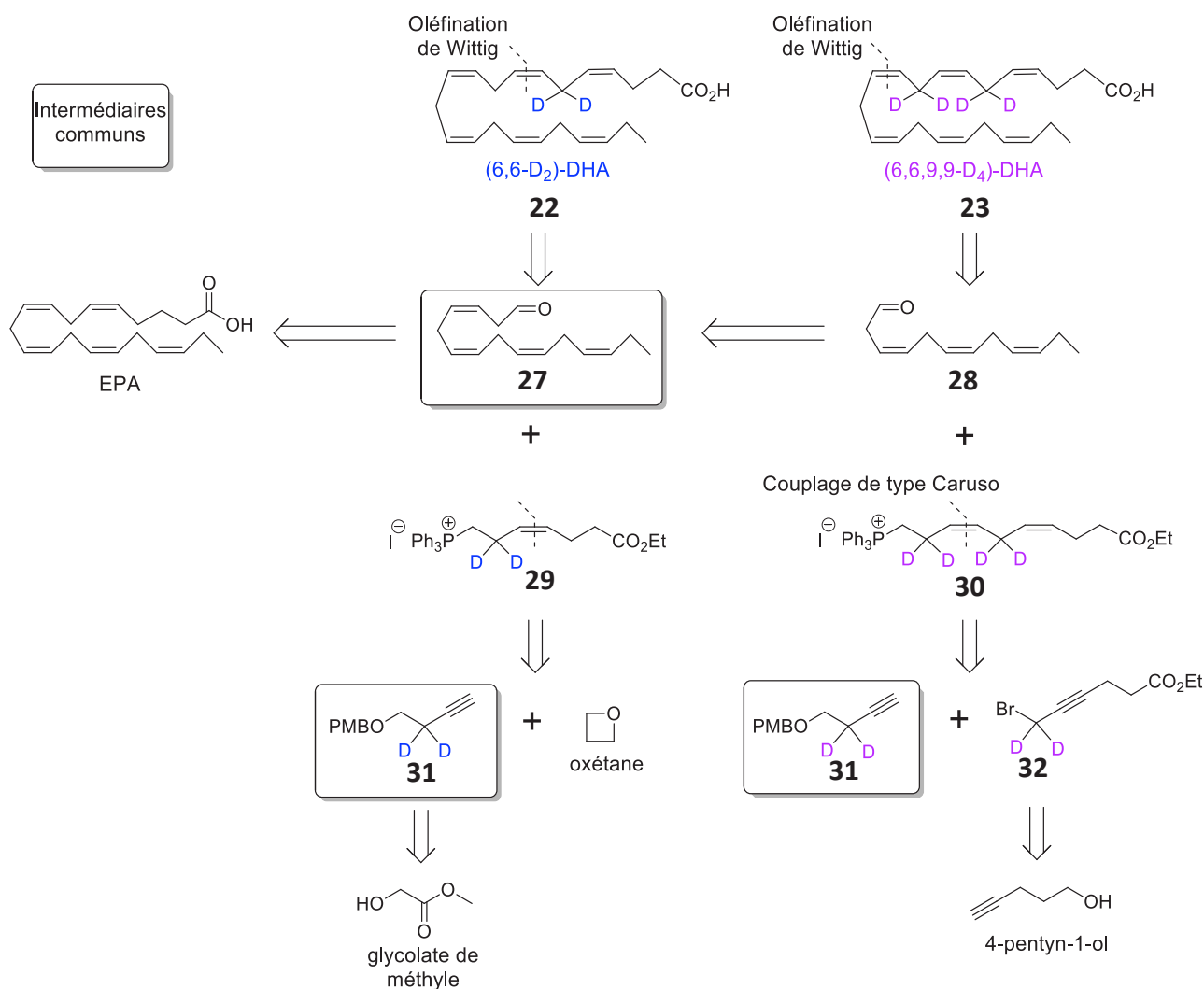


Schéma 84 : Schéma rétrosynthétique des DHA deutérés **22** et **23**.

L'étape clé qui permettrait d'accéder au squelette des DHA deutérés est une oléfine de Wittig réalisée entre les ylures provenant des sels de phosphonium di-deutérisés **29** et tétra-deutérisés **30**, et les aldéhydes **27** et **28** respectivement. Les deux aldéhydes **27** et **28** pourraient être obtenus à partir de l'EPA, l'aldéhyde **27** étant un intermédiaire commun aux deux synthèses. Les sels de phosphonium présentent également un intermédiaire commun, l'alcyne vrai deutéré **31** qui serait

synthétisé à partir du glycolate de méthyle *via* une réduction en présence de deutéruure de lithium aluminium (LiAlD_4) permettant d'incorporer les atomes de deutérium. Le *paramethoxybenzyle* (PMB) apparaît comme un groupement protecteur de choix pour protéger l'alcool de l'alcyne **31** au vue des paramètres de stabilité. En effet, ce dernier doit être stable : lors de la réaction de réduction au LiAlD_4 (des essais avec des groupements silylés de type *tert*butyldiphénylsilyle TBDPS précédemment ayant échoué), en conditions basiques (en présence de *n*-butyle lithium, triéthylamine ou carbonate de calcium) et en conditions acides forts (oxydation de Jones). Ensuite, le sel de phosphonium di-deutérué **29** pourrait quant à lui être obtenu grâce à une attaque nucléophile de l'alcyne **31** sur l'oxétane permettant une homologation à trois carbones. Le sel de phosphonium tétra-deutérué **30** pourrait être synthétisé grâce à un couplage de type Caruso entre l'alcyne **31** et le dérivé bromé propargylique deutéré **32**. Ce dernier proviendrait d'une attaque nucléophile d'un dérivé du 4-pentyn-1-ol sur du paraformaldéhyde deutéré $(\text{CD}_2\text{O})_n$ permettant l'incorporation des atomes de deutérium et une homologation à un carbone. Les différentes étapes de synthèses et leur optimisation seront présentées dans le chapitre suivant.

II. Synthèse des intermédiaires clés nécessaires à la réaction d'oléfination de Wittig permettant l'accès aux DHA deutérés 22 et 23

II.1. Synthèse des aldéhydes **27** et **28**

Les deux aldéhydes **27** et **28** sont obtenus à partir d'un autre acide gras polyinsaturé : l'acide eicosapentaénoïque (EPA, $\text{C}_{20:5}$, ω_3). Ce dernier, un oméga-3, est extrait de l'huile de foie de morue ou peut être commercialement disponible, en grande quantité et à faible coût, sous forme d'ester éthylique.

II.1.1. Obtention de l'EPA

L'EPA est obtenu de deux manières différentes : soit par saponification²⁰⁵ d'une solution commerciale d'EPA sous forme d'ester éthylique, soit par extraction de l'huile de foie de morue commerciale.²⁰⁶

La première méthode est une saponification classique (**Schéma 85**) en présence d'un excès de lithine (LiOH) permettant d'obtenir l'EPA de manière quantitative, avec une bonne pureté sans aucune purification.

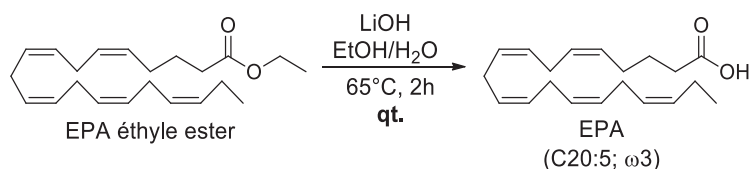


Schéma 85 : Saponification de l'EPA éthyle ester pour obtenir l'EPA.

La deuxième méthode consiste à extraire l'EPA de l'huile de foie de morue. Cette dernière comporte plusieurs types d'acides gras, saturés, mono et polyinsaturés présents sous forme de triglycérides (**Tableau 13**).

Nom de l'acide gras (AG)	Nomenclature	% en acides gras totaux
<i>Acides gras saturés</i>		
Acide myristique	C14 :0	2,0-6,0
Acide pentadécanoïque	C15 :0	ND-0,5
Acide palmitique	C16 :0	7,0-14,0
Acide stéarique	C18 :0	1,0-4,0
<i>Acides monoinsaturés</i>		
Acide palmitoléique	C16 :1 (ω 7)	4,5-11,5
Acide vaccénique	C18 :1 (ω 7)	2,0-7,0
Acide oléique	C18 :1 (ω 9)	12,0-21,0
Acide eicosénoïque	C20 :1 (ω 9)	5,0-17,0
Acide eicosénoïque	C20 :1 (ω 11)	1,0-5,5
Acide érucique	C22 :1 (ω 9)	ND-1,5
Acide cétoléique	C22 :1 (ω 11)	5,0-12,0
<i>Acides polyinsaturés</i>		
Acide linoléique	C18 :2 (ω 6)	0,5-3,0
Acide α -linoléique	C18:3(ω 3)	ND-2,0
Acide stéaridonique	C18 :4 (ω 3)	0,5-4,5
Acide arachidonique	C20:4 (ω 6)	ND-1,5
Acide eicosatétraénoïque	C20:4 (ω 3)	ND-2,0
Acide eicosapentaénoïque	C20:5 (ω3)	7,0-16,0
Acide hénéicosapentaénoïque	C21 :5 (ω 3)	ND-1,5
Acide docosapentaénoïque	C22 :5 (ω 3)	0,5-3,0
Acide docosahexaénoïque	C22:6 (ω 3)	6,0-18,0

Tableau 13 : Composition en acides gras de l'huile de foie de morue déterminée par chromatographie en phase gazeuse.²⁰⁷

L'extraction de l'EPA^{206a} comporte plusieurs étapes (**Schéma 86**).

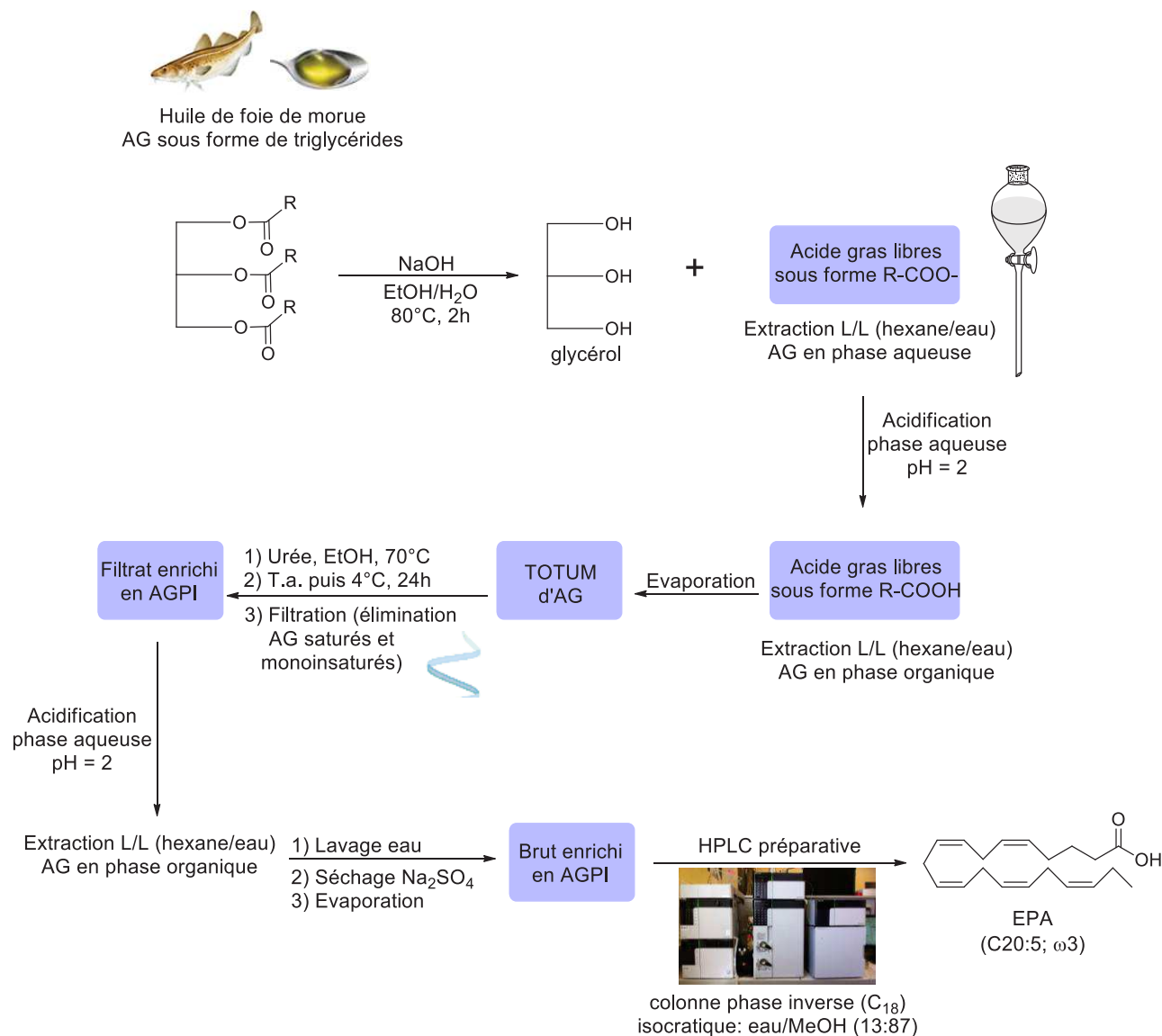


Schéma 86 : Étapes d'extraction de l'EPA à partir de l'huile de foie de morue.

Dans un premier temps l'huile de foie de morue commerciale est saponifiée en présence d'hydroxyde de sodium NaOH pour libérer les acides gras présents initialement sous forme de triglycérides. Ensuite une extraction liquide/liquide permet de séparer les acides gras (sous forme carboxylate) des produits insaponifiables (comme le glycérol). La phase aqueuse contenant les acides gras est acidifiée, et une autre extraction liquide/liquide est effectuée conduisant au totum d'acide gras, obtenu après évaporation du solvant organique. Un traitement par cristallisation en présence d'urée^{206b} est ensuite réalisé et permet d'éliminer les acides gras saturés et

monoinsaturés après filtration. Cette technique est basée sur la différence de conformation spatiale des acides gras selon leur degré d'insaturation. En effet, l'urée cristallisant sous forme d'hélice crée une cavité dans laquelle vont préférentiellement complexer les acides gras saturés et monoinsaturés du fait de leur structure linéaire. Les acides gras polyinsaturés (DHA et EPA entre autres) adoptant une conformation non linéaire et plus volumineuse ne sont pas piégés dans cette cavité. Le mélange enrichi en DHA et EPA est ensuite purifié par HPLC semi-préparative.^{206c} L'EPA est ainsi récupéré avec une bonne pureté (90%) validée en RMN. Il est possible d'obtenir 1,3 g d'EPA à partir de 7 g d'huile de foie de morue, correspondant à un rendement d'extraction de 19%.

II.1.2. Synthèse de l'aldéhyde **27**

L'aldéhyde **27**, commun aux deux synthèses, est obtenu à partir de l'EPA (**Schéma 87** et **Schéma 88**).

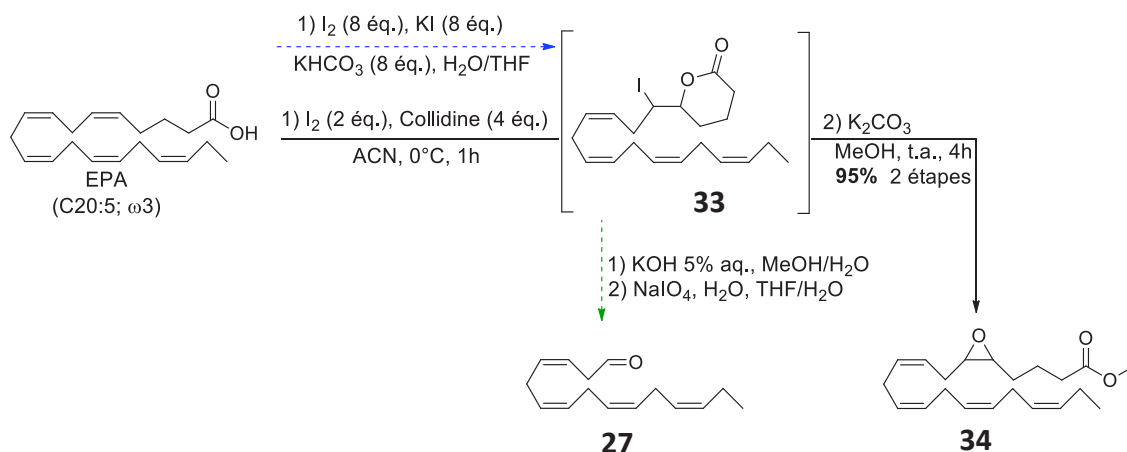


Schéma 87 : Synthèse de l'aldéhyde **27**.

La première étape correspond à la formation d'une iodolactone **33** à partir de l'EPA en milieu basique et en présence d'iode. Le mécanisme de formation de cette iodolactone fait intervenir un intermédiaire comportant un pont iodonium au niveau de la double liaison en position 5, suivi d'une ouverture par le carboxylate formé en milieu basique. Cette régio-sélectivité est expliquée par la stabilité de l'iodolactone formée, comportant un cycle à 6 stable. Tout d'abord, le protocole rapporté par Jakobsen *et al.*^{205a} été testé (**Schéma 87**, flèche bleue) avec de larges excès (8 équ.) d'iode, d'iodure de potassium (KI) et d'hydrogénocarbonate de potassium (KHCO₃). Ces conditions, décrites pour l'obtention d'une iodolactone à partir du DHA, ont conduit

à un rendement faible et à des difficultés de purification. Le protocole décrit dans la publication d'Itoh *et al.*²⁰⁸ a été privilégié pour obtenir la iodolactone **33** à partir de l'EPA en présence de γ -collidine et de 2 éq. d'iode. Ensuite, les conditions décrites par Langseter *et al.*²⁰⁹ ont été testées (**Schéma 87**, flèche verte) pour obtenir l'aldéhyde **27** à partir de la iodolactone **33**, en procédant à l'ouverture de cette dernière en milieu basique suivie de sa coupure oxydante en présence de periodate de sodium (NaIO_4). Seuls des produits de dégradation ont été obtenus avec ces essais. Enfin le protocole mis en œuvre par Jakobsen *et al.*²⁰⁵ a été retenu : La iodolactone **33**, engagée sans purification intermédiaire, est ouverte grâce à une méthanolyse en milieu basique suivie d'une substitution de l'iode par l'oxygène en α pour former l'époxyde **34**. Finalement, l'époxyde ester intermédiaire **34** est obtenu en deux étapes à partir de l'EPA avec un rendement de 95%.

L'aldéhyde **27** final est ensuite obtenu en trois étapes one-pot²¹⁰ (**Schéma 88**).

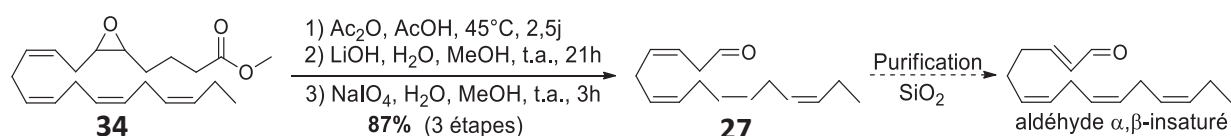


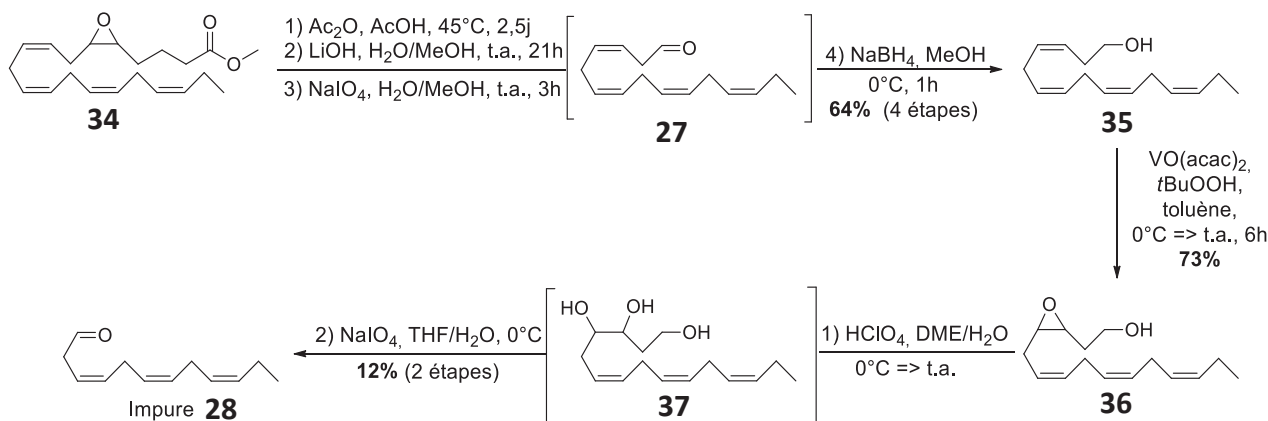
Schéma 88 : Obtention de l'aldéhyde **27** à partir de l'époxyde ester **34**.

La première étape correspond à une acétylation en présence d'anhydride acétique (Ac_2O) dans l'acide acétique (AcOH) conduisant à l'ouverture de l'époxyde ester **34**. L'intermédiaire di-acétylé obtenu n'est pas isolé mais directement engagé dans la réaction de saponification qui suit pour former le diol vicinal. Ce dernier subit ensuite une coupure oxydante en présence de NaIO_4 pour former l'aldéhyde **27**, avec un rendement de 87% en 3 étapes one-pot. Une purification de l'aldéhyde sur colonne chromatographique conduit à sa transformation en l'aldéhyde α, β insaturé (**Schéma 88**) suite à une réaction d'isomérisation. Pour pallier à ce problème, des lavages finaux successifs avec des solutions aqueuses saturées en bicarbonate de sodium (NaHCO_3), de chlorure de sodium (NaCl) et d'eau, ainsi qu'une filtration sur "plug" de célite ont été mis au point et permettent d'obtenir l'aldéhyde **27** avec une pureté satisfaisante afin d'être engagé dans la réaction d'oléfination de Wittig.

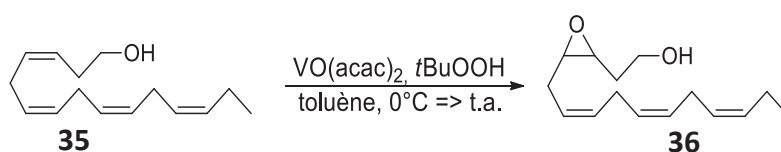
Finalement les optimisations réalisées sur la synthèse de l'aldéhyde **27** ont permis d'aboutir à un composé pur avec un rendement de 83% en 5 étapes. La montée en échelle de cette synthèse a été validée sur 5 g d'EPA de départ.

II.1.3. Synthèse de l'aldéhyde **28**

Les conditions réactionnelles décrites par Wang *et al.*,²¹¹ permettant d'accéder en 4 étapes à l'aldéhyde **28** à partir de l'aldéhyde **27**, ont été testées (Schéma 89).

Schéma 89 : Synthèse de l'aldéhyde **28**.

L'alcool homoallylique **35** est obtenu en 4 étapes one-pot à partir de l'époxyde **34**, l'aldéhyde **27** représente l'intermédiaire final de la synthèse, qui est ensuite réduit en présence de borohydrure de sodium (NaBH_4) avec un rendement global de 64%. L'époxydation de l'alcool homoallylique **35** en présence d'hydroperoxyde de *tert*butyle (*t*BuOOH), et d'acétylacétonate de vanadyle $\text{VO}(\text{acac})_2$ en quantité catalytique, donne l'époxyde alcool **36**. Plusieurs temps de réaction ont été testés afin d'optimiser cette réaction (Tableau 14).



Temps de réaction (h)	Rendements (%)
4	55
5	63
6	73
10	63
20	39

Tableau 14 : Temps d'époxydation de l'alcool homoallylique **35** et rendement en époxyde **36**.

La durée optimale de cette réaction est de 6 h. Une augmentation du temps de réaction à plus de 10 h engendre une chute rapide du rendement.

L'époxyde alcool **36** ainsi obtenu est ensuite ouvert en présence d'acide perchlorique HClO_4 pour former le triol **37** intermédiaire comme décrit par Wang *et al.*²¹¹ (Schéma 89). Ce dernier est engagé sans purification, à cause de sa faible stabilité, dans la coupure oxydante qui suit en présence de NaIO_4 pour former l'aldéhyde **28**. Ces conditions ont permis d'obtenir l'aldéhyde **28** avec un rendement relativement faible de 12% et une pureté non acceptable pour être engagé dans la réaction d'oléfination de Wittig. De même que pour l'aldéhyde **27**, ce dérivé ne peut pas être purifié sur colonne chromatographique à cause de sa dégradation.

D'autres conditions réactionnelles ont donc été testées, très proches de celles utilisées pour obtenir l'aldéhyde **27** (Schéma 90).

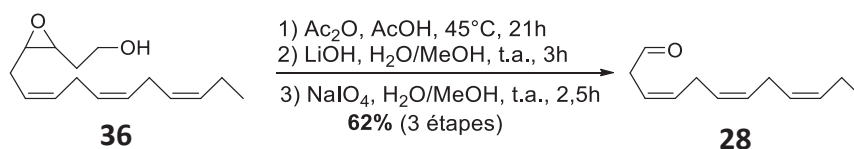


Schéma 90 : Synthèse de l'aldéhyde **28** en 3 étapes one-pot à partir de l'époxyde alcool **36**.

L'époxyde alcool **36** est engagé dans une réaction d'acétylation en présence de Ac_2O dans l'acide acétique conduisant à son ouverture. L'intermédiaire obtenu n'est pas purifié mais directement engagé dans la réaction de saponification, réalisée avec de la lithine, afin de former le triol correspondant. Ce dernier subit enfin une coupure oxydante en présence de NaIO_4 pour former l'aldéhyde désiré **28**. Ces 3 étapes one-pot ont fait l'objet d'une importante optimisation dans le but d'obtenir un aldéhyde final avec une pureté acceptable et pouvant être engagé dans la réaction d'oléfination de Wittig. La difficulté de cette synthèse réside dans l'impossibilité de purification finale de l'aldéhyde sur colonne chromatographique, obtenu après trois étapes réalisées one-pot.

Le tableau suivant (Tableau 15) rassemble une partie des différents essais effectués pour obtenir l'aldéhyde **28**. La pureté de l'aldéhyde est estimée par RMN ^1H par comparaison d'un aldéhyde "pur" et "impur", en fonction des intégrations correspondant aux signaux des protons terminaux méthyliques ($-\text{CH}_3$) et en fixant la valeur de l'intégration du proton de l'aldéhyde à 1 h. En effet, l'intégration associée au signal du $-\text{CH}_3$ est supérieure dans le cas d'un aldéhyde "impur" comparée à celle obtenue pour l'aldéhyde "pur" (car les signaux des impuretés sont superposées à

ceux de l'aldéhyde). Un exemple de spectre RMN d'aldéhyde considéré comme "pur" (a) et comme "impure" (b) sont présentés dans la **Figure 45**.

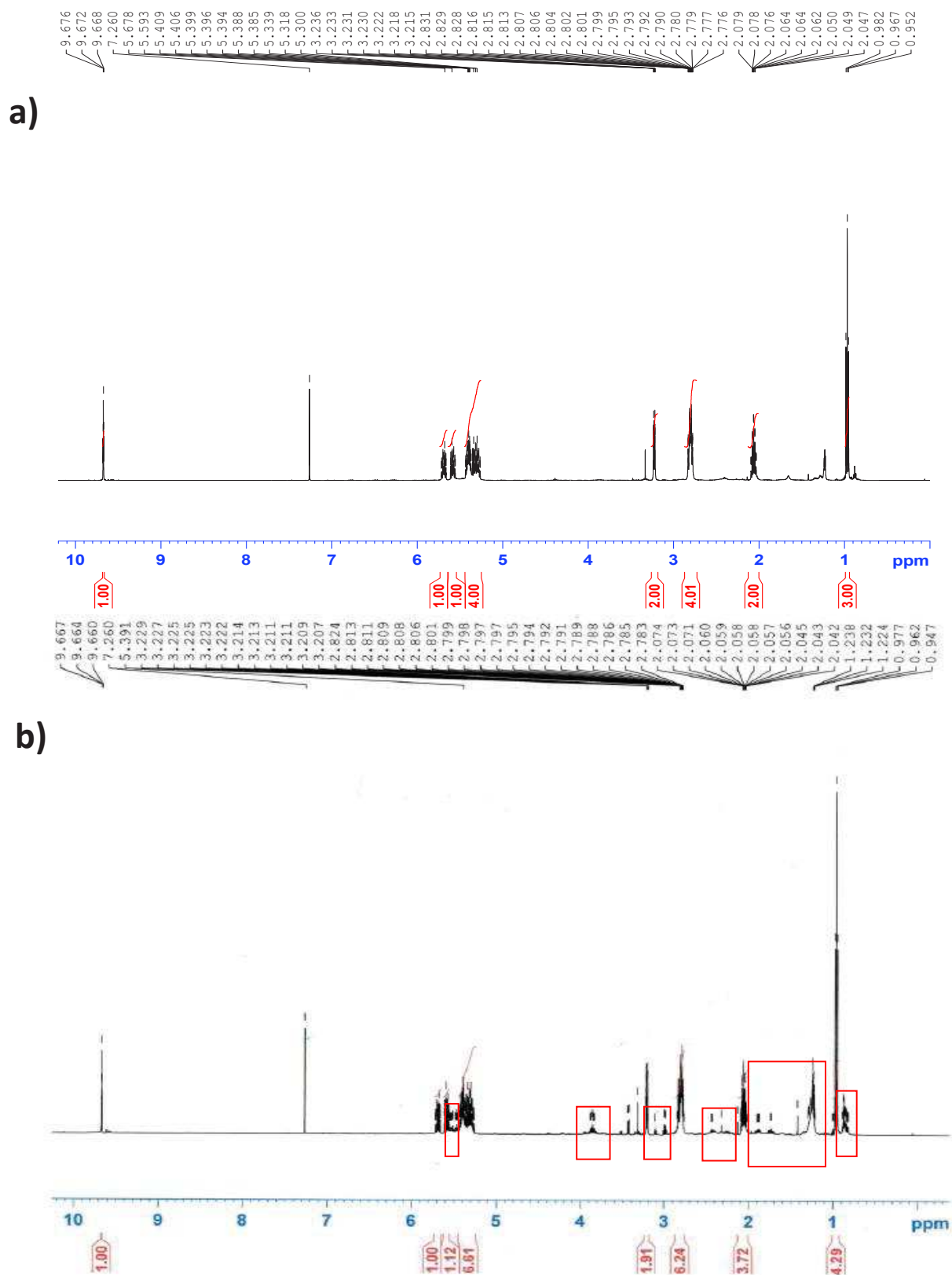


Figure 45 : Spectre RMN ^1H de l'aldéhyde considéré comme a) "pur" et b) "impur"
(les signaux attribués aux impuretés sont indiqués dans les rectangles rouges).

Dans le cas de l'aldéhyde "pur" la valeur de l'intégration des protons $-CH_3$ est égale à 3H, tandis que pour l'aldéhyde "impure" elle est égale à 5H. La pureté de l'aldéhyde dit "impure" est ainsi estimée à environ 70%.

Essais	Époxyde alcool de départ (conservé à -80°C sous Argon)	Ac ₂ O/AcOH temps	Saponification		Coupure oxydante éq. NaIO ₄	Rendements (%)	Pureté
			temps	éq. LiOH			
1	13j	21 h	22h	2.6	1.7	50	pur
2	1 mois et 11j	18h	5h	3.4	1.7	70	impur
3	8j	20h	21 h	2.6	1.7	55	pur
4	1 mois et 7j	3 j	21 h	2.6	1.7	20	impur
5	4j	15h	23h	2.6	0.9	56	pur
6	7j	3j	23h	2.6	0.9	76	impur
7	14j	3j	1j	2.6	0.9	6	impur tri-OAc récupéré
8	3j	23h	2.5h	2.6	1.7	62	pur

Pour tous les essais, les lavages finaux suivants ont été réalisés : NaHCO₃ sat., NaCl sat., H₂O ainsi qu'une filtration finale sur plug de célite. Produit estimé impur quand la pureté estimée en RMN ¹H < 80%.

Tableau 15 : Tableau des différents essais effectués pour obtenir l'aldéhyde **28**.

Au vu des différents essais réalisés il apparaît que la dégradation de l'époxyde alcool **36** dans le temps pourrait être une source d'échec de la réaction. En effet, les essais 1, 3, 5 et 8 (**Tableau 15**), ont permis d'obtenir l'aldéhyde avec une pureté maximale, supérieure à 80%. Ils ont été réalisés à partir d'un époxyde alcool **36** de moins de deux semaines, contrairement aux essais 2 et 4 (**Tableau 15**). Malgré les précautions de conservation prises pour ce dernier, sa pureté à différent temps de conservation a été contrôlée par RMN ¹H et montrait une légère dégradation.

La comparaison des essais 5 et 6 (**Tableau 15**) nous a permis de mettre en évidence l'importance du temps d'acétylation de l'époxyde alcool **36** sur la pureté finale de l'aldéhyde (essai 5 : 15h, essai 6 : 3j). En effet, lors de la réaction d'acétylation, un mélange de dérivés mono- di- et -tri-Oacétylé (OAc) est formé (**Figure 46**). Ces dérivés ont été identifiés grâce à un essai de purification de la réaction d'acétylation.

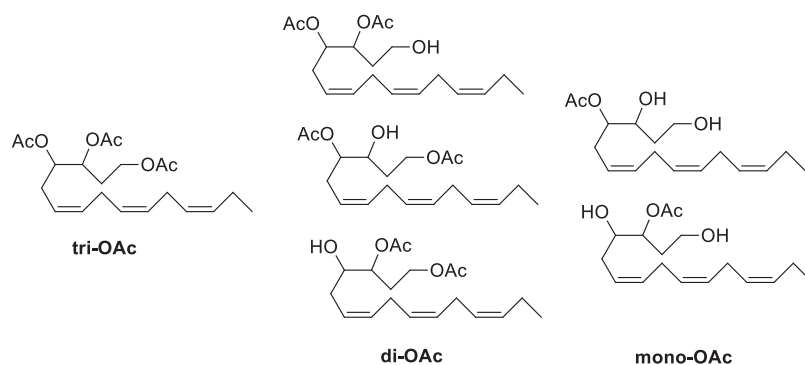


Figure 46 : Intermédiaires isolés après acétalisation de l'époxyde alcool **36**.

Le suivi de la réaction par CCM montre que plus le dérivé tri-OAc est formé en grande quantité plus l'étape de saponification suivante semble être difficile et longue, suggérant une stabilité plus importante de ce dérivé comparé au mono-OAc et di-OAc. Ce résultat a été confirmé avec l'essai 7 (**Tableau 15**) où le composé tri-OAc a pu être isolé après purification sur colonne chromatographique.

Le temps d'acétylation a été réduit à moins de 24 h, limitant ainsi la formation du tri-OAc (**Tableau 15**, essai 8). Le temps de la réaction de saponification a également été réduit à 3h, ainsi que le nombre d'éq. de LiOH (**Tableau 15**, essai 8), limitant la formation des produits de dégradation possible.

L'étape d'oxydation, correspondant à la coupure du triol formé, a également été étudiée. Le nombre d'éq. en NaIO₄ semble avoir peu d'impact sur l'obtention du produit final (**Tableau 15**, essais 1 et 5), l'utilisation d'1.7 éq. d'NaIO₄ a donc été maintenue pour réaliser cette coupure oxydante. L'utilisation du BAIB (bis(acetoxy)iodobenzène)²¹²a également été testé pour réaliser cette étape d'oxydation. Malgré l'obtention du produit final, le BAIB résiduel ne pouvant pas être éliminé sans effectuer de purification sur colonne chromatographique, ce réactif n'a pas été retenu.

Finalement, l'essai 8 (**Tableau 15**) présente les meilleures conditions pour réaliser la synthèse de l'aldéhyde **28** à partir de l'époxyde alcool, les conditions optimales sont les suivantes:

- L'époxyde alcool **36** doit être synthétisé au maximum 3 jours avant d'être engagé en réaction.
- Le temps d'acétylation ne doit pas dépasser les 21 h et une purification intermédiaire des composés n'est pas nécessaire,

- La saponification peut être réalisée en 3 h avec 2.6 éq. de LiOH.
- La coupure oxydante peut également être réalisée en 2.5 h avec 1.7 éq. d'NaIO₄.

Finalement l'aldéhyde **28** a été synthétisé en 10 étapes à partir de l'EPA avec un rendement global de 27%. Sa synthèse a été validée sur 100 à 200 mg d'époxyde alcool de départ **36**. Lors de la montée en échelle utilisant environ 1g d'époxyde, la pureté de l'aldéhyde est apparue moins importante.

Pour conclure, les synthèses des aldéhydes **27** et **28** ont fait l'objet d'une importante optimisation dans le but d'obtenir des produits bruts avec une pureté suffisante pour être engagés dans la réaction d'oléfination de Wittig.

II.2. Synthèses des sels de phosphonium di-deutééré **29** et tétra-deutééré **30**

Les schémas rétrosynthétiques suivants (**Schéma 91**) ont été mis en évidence pour la synthèse des sels de phosphonium deutérés **29** et **30**, utilisés par la suite pour la réaction d'oléfination de Wittig.

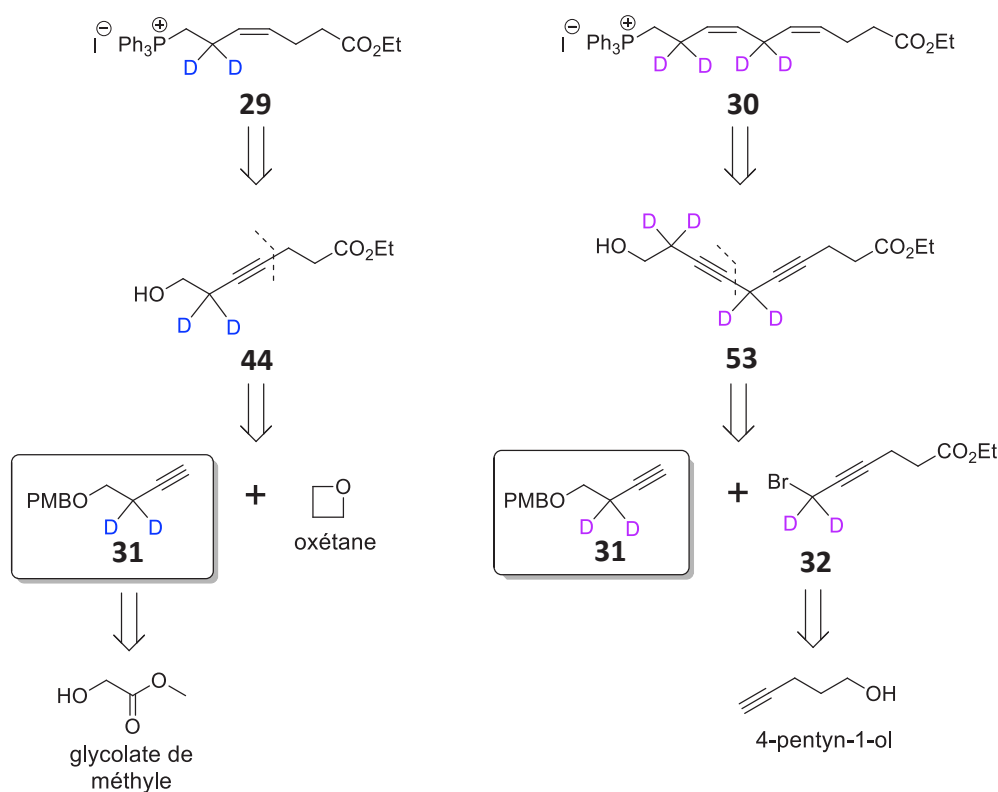


Schéma 91 : Schéma rétrosynthétique des sels de phosphonium di-deutééré **29** et tétra-deutééré **30**.

Les sels de phosphonium présentent un intermédiaire commun, l'alcyne vrai deutéré **31** qui serait synthétisé à partir du glycolate de méthyle *via* une réduction en présence de LiAlD_4 permettant d'incorporer les atomes de deutérium. Cet intermédiaire permettrait d'obtenir tout d'abord l'ester deutéré **44**, puis le sel de phosphonium di-deutééré **29** présentant des atomes de deutérium en position α de la fonction triphénylphosphonium. La position *bis*-allylique deutérée du sel de phosphonium tétra-deutééré **30** pourrait être obtenue à partir du diyne **53**, pouvant provenir d'une réaction de couplage de type Caruso entre l'alcyne vrai deutéré **31** et le dérivé propargylique deutéré **32**. Ce dernier proviendrait d'une attaque nucléophile d'un dérivé du 4-pentyn-1-ol sur du $(\text{CD}_2\text{O})_n$. A noter que nous avons choisi de synthétiser des esters éthyliques pour l'alcyne **44** et le diyne **53** en vue de palier aux possibles problèmes de transestérification pouvant intervenir lors de la réaction d'hydrogénation effectuée dans l'éthanol en présence de NaBH_4 . En effet, ce dernier peut être utilisé aussi bien comme agent réducteur qu'agent de transestérification, comme décrit par Padhi *et al.*²¹³.

II.2.1. Synthèse de l'alcyne terminal deutéré **31**, intermédiaire commun aux synthèses des deux sels de phosphonium **29** et **30**

Le schéma de synthèse suivant (**Schéma 92**) a été utilisé pour obtenir l'alcyne terminal deutéré **31**, un intermédiaire commun aux synthèses des deux sels de phosphonium deutérés **29** et **30**.

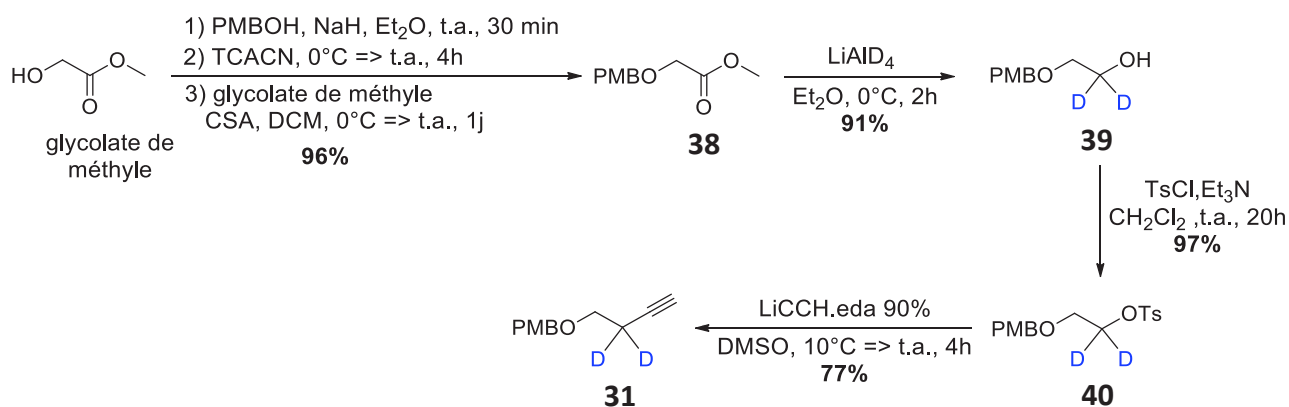


Schéma 92 : Synthèse de l'alcyne terminal deutéré **31**.

Le glycolate de méthyle est d'abord protégé par un groupement *paramethoxybenzyle* (PMB) conduisant à l'alcool protégé **38**. La première étape de cette protection correspond à une attaque nucléophile de l'alcool 4-méthoxybenzyle (PMBOH) préalablement déprotoné par

l'hydrure de sodium (NaH), sur le trichloroacétonitrile (TCACN) formant un intermédiaire carboxymidate. Ce dernier subit ensuite une attaque nucléophile du glycolate de méthyle en milieu acide (acide camphorsulfonique : CSA), formant l'alcool protégé **38** avec un rendement de 90%. L'incorporation des atomes de deutérium est ensuite effectuée grâce à une réduction²¹⁴ de l'ester intermédiaire **38** en alcool **39** à l'aide de LiAlD_4 commercialement disponible. La protection au PMB permet ainsi de différencier les deux alcools pour les étapes qui suivent. L'alcool intermédiaire **39** mono-protégé est activé²¹⁵ par un groupement tosylo (Ts) en présence de chlorure de tosylo (TsCl) et de triéthylamine (Et_3N) formant l'intermédiaire **40** avec un rendement de 97%. Une substitution nucléophile sur l'alcool activé **40** en présence du complexe acétylure de lithium/éthylène diamine (LiCCH_2eda) permet d'accéder à l'alcyne **31** avec un rendement de 77%. Le rendement global de la synthèse de l'alcyne deutéré **31** est de 61% en 4 étapes à partir du méthyle glycolate. La montée en échelle de cette synthèse a été effectuée sur 8 g de méthyle glycolate. Des batch de maximum 2g de produit de départ ont ensuite été réalisés pour chacune des 3 autres étapes, permettant d'obtenir environ 4g d'alcyne deutéré **31**. La volatilité de certains intermédiaires (**38** et **39**) a constitué une difficulté, demandant des précautions supplémentaires à mettre en œuvre lors de cette synthèse.

L'utilisation de cet alcyne dans la synthèse des sels de phosphonium permet d'introduire les atomes de deutérium sur certaines positions *bis*-allyliques du futur squelette des DHA.

II.2.2. Synthèse du sel de phosphonium di-deutééré **29**

La synthèse du sel de phosphonium di-deutééré **29** est présentée dans ce paragraphe. Cette dernière est décrite dans la littérature par Dayaker *et al.*²¹⁶ pour obtenir un analogue non deutéré, ester de méthyle et avec une stratégie de synthèse utilisant comme groupement protecteur le *tert*-butyldiphénylesilyle (TBDPS).

La synthèse de l'acide deutéré **42**, intermédiaire de synthèse du sel de phosphonium **29** est présentée dans le schéma suivant (**Schéma 93**).

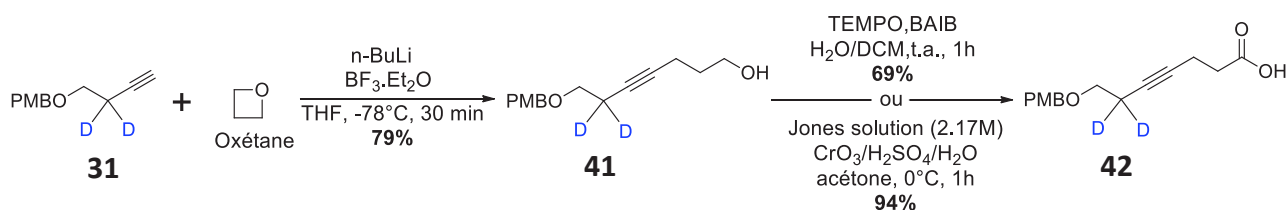


Schéma 93 : Synthèse de l'acide deutéré **42**.

L'homologation de 3 carbones sur le synthon **31** est effectuée *via* une attaque nucléophile de ce dernier, préalablement déprotoné en présence de n-butyllithium (n-BuLi), sur l'oxétane activé à l'aide de l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ favorisant son ouverture. L'alcool deutéré **41** est obtenu avec un rendement de 79%. Ensuite deux types d'oxydation ont été testées pour l'obtention de l'acide **42**, une oxydation de Jones en présence de CrO_3 et utilisant le système TEMPO(2,2,6,6-tetraméthylpiperidine 1-oxyl)/BAIB.²¹⁷ Ces dernières conditions, moins drastiques, ont été utilisées dans l'optique de remplacer l'utilisation du CrO_3 , qui est un composé toxique et nocif pour l'environnement. Cependant, l'oxydation de Jones conduit à un meilleur rendement en acide **42** (98% contre 68% avec le système TEMPO/BAIB), et a donc été retenue pour la montée en échelle de cette synthèse.

L'acide **42** est ensuite estérifié en ester d'éthyle et déprotégé afin de conduire à l'alcool **44** (Schéma 94).

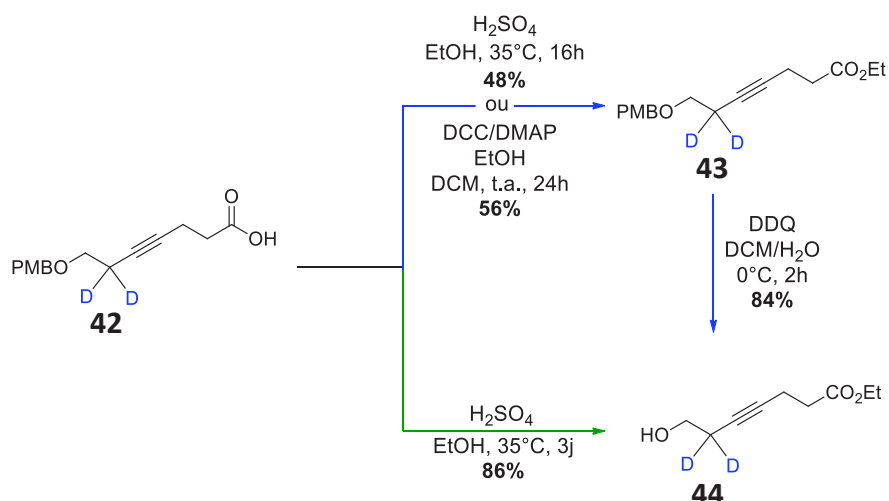


Schéma 94 : Obtention de l'ester éthyle deutéré **44**.

Les premiers essais réalisés (Schéma 94, flèche bleue) en présence d'une catalyse acide H_2SO_4 dans l'éthanol (à 35°C pendant 15h) ou en utilisant des réactifs de couplage (DCC/DMAP) ont conduit à de faibles rendements d'estérification (respectivement 48 et 56%). Dans les conditions de catalyse en milieu acide (H_2SO_4), le faible rendement s'explique par une partielle déprotection du groupement PMB pendant la réaction. La déprotection²¹⁸ de l'ester **43** avec la dichlorodicyanobenzoquinone (DDQ) conduit à un rendement de 84% en alcool **44**. Malgré ce rendement satisfaisant, des essais visant à réaliser la réaction d'estérification de déprotection en 1 seule étape à partir de l'acide **42** ont été effectués. L'estérification suivie de la déprotection est menée one-pot (Schéma 94, flèche verte) en catalyse acide (H_2SO_4) et à 35°C pendant 3 jours, afin

d'obtenir directement l'ester éthylique **44**, dépourvu de la fonction PMB, avec un rendement amélioré de 86%.

Pour finir, le sel de phosphonium di-deutééré **29** est obtenu à partir de l'ester alcool **44** en 3 étapes (**Schéma 95**).

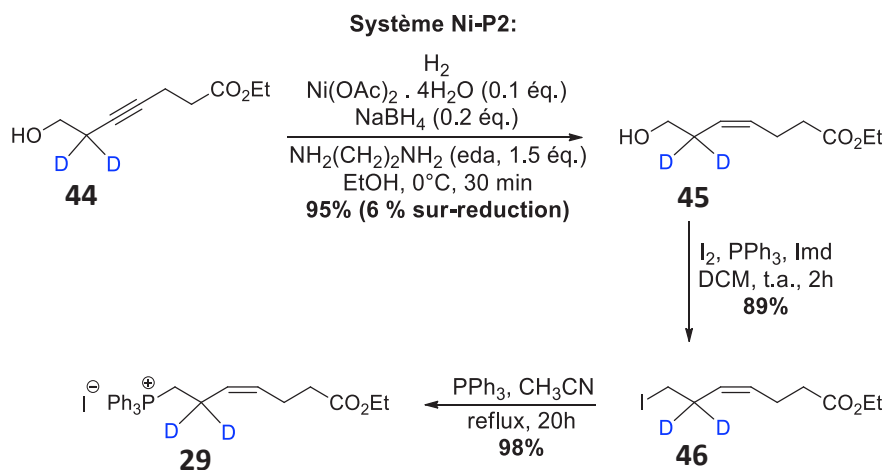


Schéma 95 : Synthèse du sel de phosphonium di-deutééré **29** à partir de l'intermédiaire **44**.

L'hydrogénation de l'alcyne **44** en alcène Z **45** est effectuée grâce au système catalytique Ni-P2²¹⁹. L'acétate de nickel (II) (Ni(OAc)₂) est d'abord réduit en présence de NaBH₄ dans l'éthanol formant le système catalytique "Ni-P2". Le poison du catalyseur utilisé ensuite correspond à de l'éthylène diamine (eda), permettant de réduire sélectivement les alcynes disubstitués en alcènes de configuration (Z), et ceci avec une grande pureté²¹⁹. Dans notre cas, une légère sur-réduction de 6% est obtenue, limitée par une température de réaction fixée à 0°C. Cette dernière est estimée par RMN ¹H (500 MHz) grâce à l'intégration des protons du -CH₂ en position α de l'alcool (**Figure 47**).

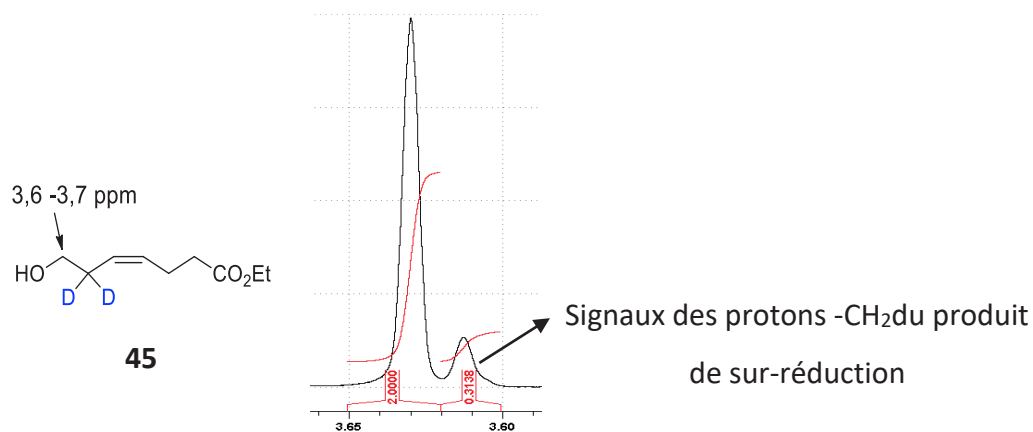


Figure 47 : Mise en évidence par RMN ¹H (500 MHz) du produit de sur-réduction par intégration des signaux des protons -CH₂ en position α de l'alcool.

La suite de la synthèse est réalisée en conservant ce faible pourcentage de produit de sur-réduction qui ne peut pas être éliminé par colonne chromatographique en phase normale.

L'étape suivante correspond à une réaction de type Appel réalisée sur l'alcool **45** en présence d'iode, d'imidazole (Imd) et de triphényle phosphine (PPh₃) conduisant au dérivé iodé **46** avec un rendement de 89%. Ce dernier est enfin converti en sel de phosphonium **29** à l'aide de PPh₃ et en chauffant au reflux de l'acétonitrile conduisant à un rendement de 98%.

Pour conclure, le sel de phosphonium di-deutééré **29** a été obtenu en 6 étapes à partir de l'alcyne deutéré **31** et de l'oxétane, avec un rendement global de 55%. L'optimisation de certaines étapes ont permis d'effectuer une montée en échelle aboutissant à une quantité en sel de phosphonium **29** de l'ordre du gramme.

II.2.3. Synthèse du sel de phosphonium tétra-deutééré **30**

L'alcyne deutéré **31** a également été utilisé pour introduire les deutériums du (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), au niveau du sel de phosphonium tétra-deutééré **30**. Ce dernier pourrait être synthétisé grâce à un couplage de type Caruso entre l'alcyne **31** et le dérivé bromé propargylique deutéré **32** (**Schéma 91**). La synthèse du dérivé bromé propargylique **32** a donc dû être réalisée pour obtenir le motif *bis*-allylique tétra-deutééré présent au niveau du sel de phosphonium.

II.2.3.1. Synthèse du dérivé propargylique bromé deutéré **32**

Le schéma de synthèse suivi pour obtenir le dérivé bromé deutéré **32** est similaire à celui utilisé pour la synthèse de l'analogue non deutéré décrite par Guy et *al.*²²⁰

Tout d'abord, l'alcool propargylique deutéré **49** est synthétisé à partir du 4-pentyn-1-ol en 2 étapes (**Schéma 96**).

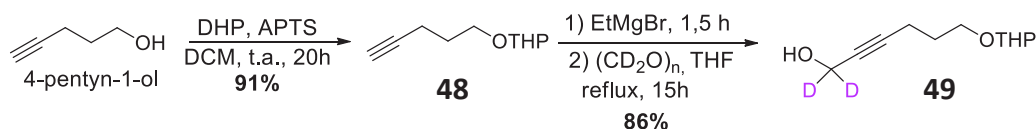


Schéma 96 : Synthèse de l'alcool propargylique deutéré **49**.

La première étape consiste à protéger le 4-pentyn-1-ol commercial avec un groupement dihydropyrane (DHP), réaction catalysée en milieu acide donnant l'alcool protégé **48**. Ensuite, l'incorporation des atomes de deutérium est effectuée grâce à une attaque nucléophile de l'alcyne vrai **48** préalablement déprotoné par le bromure d'éthyle magnésium sur le paraformaldéhyde deutéré commercial $(CD_2O)_n$ donnant l'alcool **49**. Deux lots de réactif de Grignard ont été testés pour cette étape : $EtMgBr$ à 0,9M dans le THF ou à 1,6M dans Et_2O . Pour ce dernier, les rendements obtenus ne dépassent pas les 75% probablement dû à l'utilisation de Et_2O comme solvant (limitant la température utilisée pour le reflux). Le rendement obtenu pour cette étape est de 86% en utilisant $EtMgBr$ à 0,9M dans le THF.

L'alcool **49** est ensuite engagé dans une réaction d'Appel (**Schéma 97**) conduisant au dérivé bromé **50**.

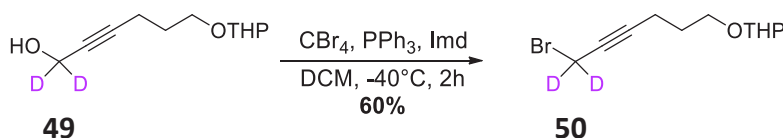


Schéma 97 : Synthèse du dérivé propargylique bromé deutéré **50**.

Pour cette étape, les conditions mises en œuvre diffèrent des travaux de Guy *et al.*²²⁰ où sont utilisés 1,5 éq. de CBr_3 et de PPh_3 , en présence de 0,1 éq. de triéthylamine dans le dibromométhane. L'essai effectué avec ces mêmes conditions sur l'alcool **49** n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité, mais seulement de la dégradation. Nous avons donc suivies les conditions suivantes, décrites par Yadav *et al.*²²¹ utilisant 1 éq. de CBr_3 , 2 éq. de PPh_3 et d'imidazole dans le dichlorométhane. L'excès d'imidazole permet de tamponner le milieu et ainsi de piéger les traces éventuelles d'acide bromhydrique (HBr) formées durant la réaction, capables de déprotéger le groupement THP (tétrahydropyrane). Dans notre cas la réaction est maintenue à -40°C afin d'éviter la dégradation des produits, puisqu'une chute importante du rendement est obtenue lorsque la réaction est réalisée à température ambiante. Le dérivé bromé **50** est obtenu avec un rendement de 60%.

Finalement, L'alcyne protégé **50** est engagé dans 3 étapes (**Schéma 98**) pour obtenir le dérivé bromé souhaité **32**.

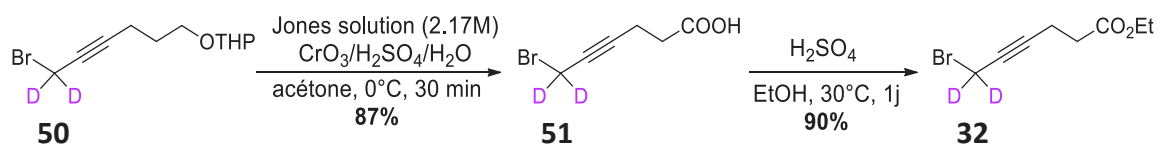


Schéma 98 : Synthèse du dérivé propargylique bromé deutéré **32**.

L'étape de déprotection du groupement THP de l'alcool **50** est réalisée en milieu acide pendant la réaction d'oxydation en acide carboxylique, en présence d'une solution de Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$). L'acide **51** est obtenu avec un rendement de 87%. Deux types d'estérification ont ensuite été testés utilisant deux catalyseurs acides de natures différentes (**Tableau 16**).

masses en produit de départ (51)	Types de catalyseur	Temps de conversion (h)	Rendements (%)
250 mg	Acide de Lewis : $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	16	59
250 mg	Acide de Brønsted : H_2SO_4	6	61
3,135 g	Acide de Brønsted : H_2SO_4	23	90

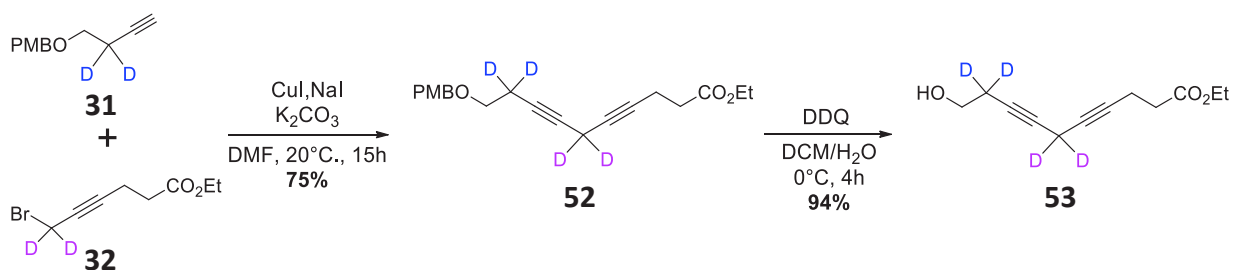
Tableau 16 : Essais d'estérification de l'acide **51**.

Un rendement de 59% est obtenu en utilisant l'acide de Lewis $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, décrit par Guy *et al.*²²⁰ En utilisant un acide de Brønsted comme l' H_2SO_4 un rendement de 61% a été obtenu après 6h de réaction, optimisé à 90% en laissant la réaction pendant 1 jour. L'utilisation d' H_2SO_4 pour former l'ester d'éthyle est la méthode retenue pour la montée en échelle de cette réaction.

Pour conclure, le dérivé bromé propargylique deutéré **32** est synthétisé en 5 étapes à partir du 4-pentyn-1-ol avec un rendement global de 37%. La montée en échelle a été effectuée sur environ 8g de 4-pentyn-1-ol et environ 2g de dérivé bromé propargylique deutéré ont été obtenus.

II.2.3.2. Réaction de couplage entre l'alcyne vrai deutéré **31** et le dérivé propargylique deutéré **32**

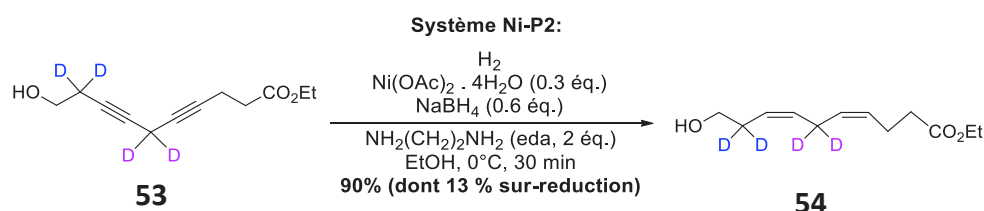
La synthèse du diyne tétra-deutééré **53** est présentée dans le schéma suivant (**Schéma 99**).

Schéma 99 : Synthèse du diyne tétra-deutééré **53**.

La réaction de couplage de type Caruso entre l'alcyne terminal deutéré **31** et le dérivé bromé deutéré **32** est réalisée dans les conditions décrites par Hill *et al.*^{7a} En présence d'iodure de cuivre (CuI) en excès, d'iodure de sodium (NaI) (permettant d'effectuer la réaction de Finkelstein formant le dérivé iodé, meilleur groupement partant), et en utilisant K₂CO₃ comme base afin de former l'acétylure. Le diyne deutéré **52** est obtenu avec un rendement de 75%. A noter que cette réaction semble sensible aux élévations de température puisqu'elle ne fonctionne pas à des températures au-delà de 30°C. Ensuite la déprotection du diyne **52** en condition oxydante douce en présence de DDQ est effectuée pour conduire à l'alcool **53**.

II.2.3.3. Hydrogénation du diyne **53**

L'hydrogénation du diyne **53** en diène **54** a ensuite été menée (Schéma 100) avec le système catalytique Ni-P2 correspondant au catalyseur de Brown.²¹⁹

Schéma 100 : Hydrogénation du diyne **53** en diène **54** avec le système catalytique Ni-P2 après optimisation.

Une optimisation de la réaction (Tableau 17 et Figure 48) a été effectuée dans le but de minimiser la formation des produits de sur-réduction du diène formé. En effet, Il est important de limiter au maximum cette réaction de sur-réduction afin d'éviter une purification délicate des différents produits obtenus. Une méthode mise en œuvre par Hill *et al.*^{7a} utilisant un mélange SiO₂/Ag(NO₃) permettrait de séparer les dérivés selon leur nombre et le type d'insaturation. Ils reportent un rendement de 70% pour un diène structurellement proche de celui attendu. Nous avons préféré optimiser nos conditions réactionnelles afin de limiter au maximum le phénomène de sur-réduction et éviter cette étape de purification sur SiO₂/Ag(NO₃).

Essais	Équivalents en eda (H ₂ N(CH ₂) ₂ NH ₂ : "poison du catalyseur")	Températures	Temps	Résultats		Conversion (%)
				Produit attendu 54 (%)	Produits de sur-réduction (%)	
1	1,5	t.a. (25°C)	3h	46	54	100
2	2	15°C	3h	84	16	100
3	3	0°C	3h	86	14	100
4	3	0°C	30 min	86	13	100

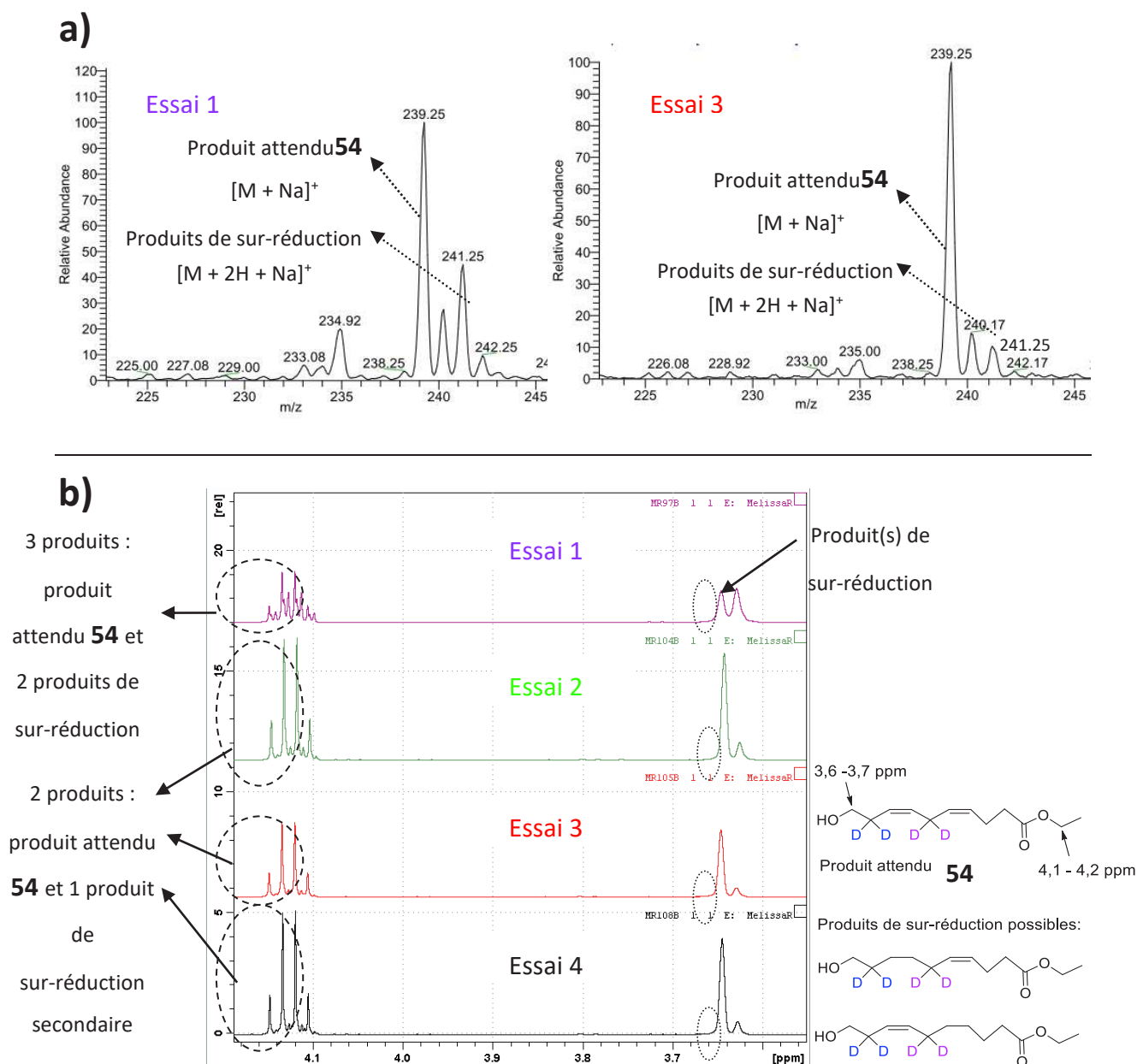
Tableau 17 : Essais d'hydrogénation du diène **53** en diène **54** avec le système catalytique Ni-P2.

Figure 48 : Analyses associées aux différents essais d'hydrogénation (essais 1 à 4) permettant d'identifier (MS) et de calculer le pourcentage (RMN ¹H) des produits de sur-réduction : a) Spectres de masse, obtenu par infusion en électrospray mode + du mélange réactionnel après traitement (essais 1 et 3). b) Analyse RMN ¹H (500 MHz) du mélange réactionnel après traitement (essais 1 à 4).

Au cours de l'optimisation de cette réaction avec le système catalytique Ni-P2 (**Tableau 17**), les produits secondaires ont été identifiés grâce à une analyse par spectrométrie de masse (MS) et à la présence d'un signal $[M + 2H + Na]^+$ confirmant la sur-réduction d'une double liaison (**Figure 48**, a). L'analyse par RMN 1H (500 MHz) (**Figure 48**, b) a permis de calculer la proportion de produit de sur-réduction en utilisant l'intégration des signaux des protons en position α de la fonction l'alcool. La RMN 1H a également permis d'identifier le nombre de produits présents dans l'échantillon grâce aux signaux des protons de la fonction ester éthylique.

Le premier essai d'hydrogénation du diyne **53** en diène **54** a été effectué en suivant les conditions décrites par Guy *et al.*²²⁰ avec le système Ni-P2 (**Tableau 17**, essai 1), utilisant 0,3 éq. d'acétate de nickel, 0,6 éq. de $NaBH_4$ et 1,5 éq. d'éthylène diamine (poison du catalyseur) à température ambiante. Dans ces conditions, les produits de sur-réduction, identifiés grâce à l'analyse par spectrométrie de masse (MS) (**Figure 48**, a. essai 1), ont été obtenus à hauteur de 54%, cette valeur a été estimée grâce à l'analyse RMN 1H du mélange après traitement (**Figure 48**, b. essai 1). Ce premier essai suggère que l'utilisation de seulement 1,5 éq. d'éthylène diamine n'est pas suffisante pour éviter la formation des produits de sur-réduction à 25°C. Dans l'essai 2 (**Tableau 17**), 2 éq. d'éthylène diamine ont été utilisés à une température de 15°C. La formation des produits de sur-réduction, estimés à 16% en RMN 1H (**Figure 48**, b. essai 2), est dans cet essai moins importante. De plus, un seul produit de sur-réduction semble être présent d'après l'analyse RMN 1H .

Lorsque 3 éq. d'éthylène diamine (**Tableau 17**, essais 3 et 4) sont utilisés à 0°C, la formation du produit de sur-réduction semble être faiblement impactée mais reste aux alentours de 10% (**Figure 48**, a) essai 3, et b) essais 3 et 4). L'essai 4 a permis de mettre en évidence que la réaction est complète en 30 min. Malgré le bon rendement obtenu (90% en global et 78% en diène **54**), ce système catalytique présente tout de même des limites. En effet, la montée en échelle de la réaction (quantités en produit de départ supérieures à 200 mg) conduit à une réactivité plus lente et à une hydrogénation parfois partielle des triples liaisons.

Deux autres méthodes d'hydrogénation du diyne **53** en diène **54** ont été testées¹⁹³ et comparées avec le système catalytique de Brown dans le but de limiter la formation du produit de sur-réduction. L'hydrogénation en présence soit du catalyseur de Lindlar²²², soit de Rosenmund²²³ ont été mises en œuvre (**Tableau 18**) et analysées par RMN 1H (**Figure 49**).

Conditions	Quantité de catalyseur	Poison utilisé (éq.)	Températures et temps	Résultats		Conversion (%)
				Produit attendu 54 (%)	Produits de sur-réduction (%)	
a) Pd/CaCO ₃ (Lindlar)	40% (w/w)	quinoléine (2 éq.)	t.a. 2h30 et addition supplémentaire de catalyseur	77	23	100
b) Pd/BaSO ₄ (Rosenmund)	15% (w/w)	quinoléine (1,5 éq.)	0°C 1 h	68	32	100
c) Ni-P2 (Brown)	30 (mol%)	eda (3 éq.)	0°C 30 min	86	13	100

Tableau 18 : Pourcentage de produit de sur-réduction obtenu en utilisant les catalyseurs de catalyseur de a) Lindlar²²², b) Rosenmund²²³ et c) Brown, pour l'hydrogénation du diyne **53** en diène **54**.

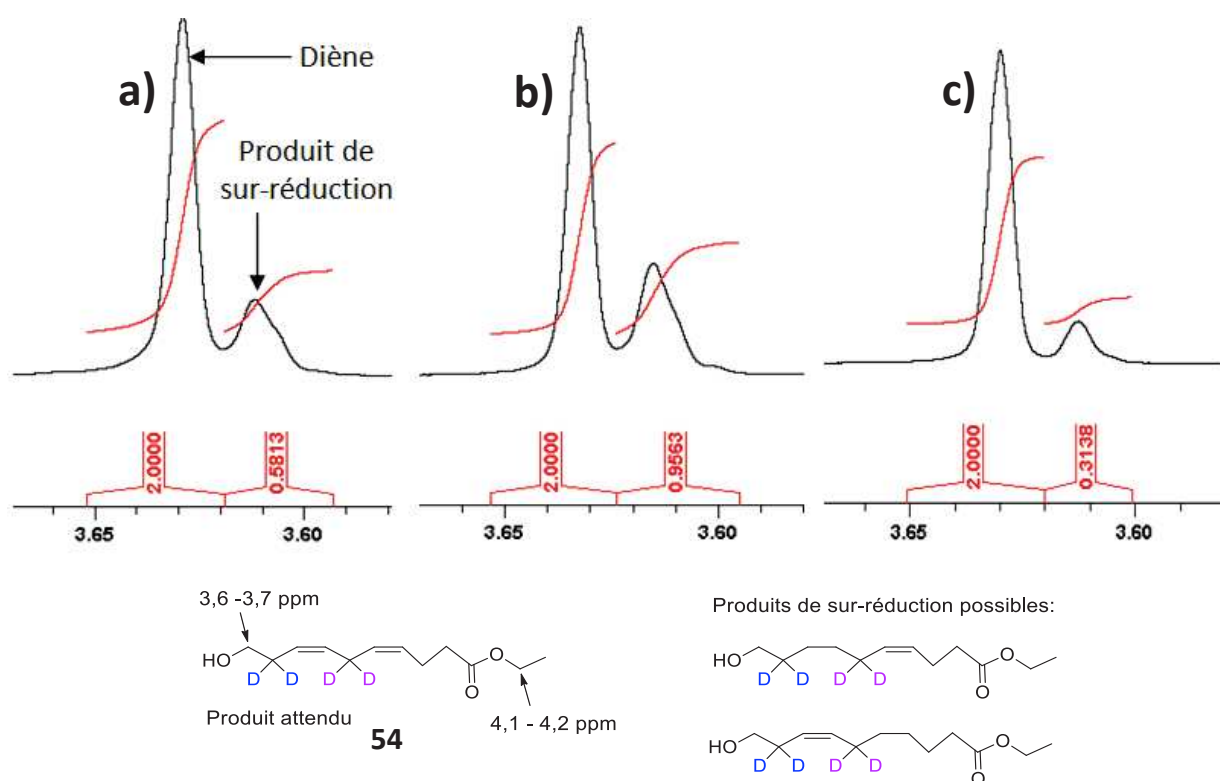


Figure 49 : Mise en évidence des produits de sur-réduction lors de l'utilisation des différents catalyseurs d'hydrogénation du diyne **53** en diène **54** : catalyseur de a) Lindlar²²², b) Rosenmund²²³ et c) Brown par analyse RMN ¹H (500 MHz).

Les catalyseurs de Lindlar et Rosenmund donnent des proportions de sur-réduction plus élevées (23% et 32%, respectivement) comparée au catalyseur de Brown (**Tableau 18** et **Figure 49**). Ce dernier semble être le plus adapté pour réaliser l'hydrogénation de notre substrat avec 14% de formation de produit de sur-réduction.

La suite de la synthèse est réalisée en conservant ce faible pourcentage (entre 10 et 15%) de produit de sur-réduction, qui sera éliminé à la fin de la stratégie de synthèse du DHA deutéré par HPLC préparative.

L'étape finale de synthèse du sel de phosphonium **30** est ensuite réalisée à partir de l'alcool **54** (**Schéma 101**).

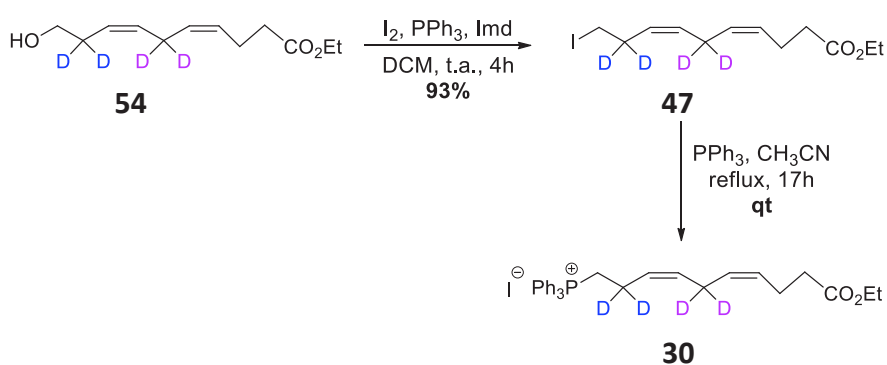


Schéma 101 : Synthèse du sel de phosphonium **30** à partir de l'alcool **54**.

L'alcool **54** est converti en dérivé iodé **47** dans des conditions de type Appel, en présence d'iode et de triphénylphosphine avec un rendement de 93%. Enfin, ce dernier est transformé en sel de phosphonium **30** à l'aide de PPh_3 et en chauffant au reflux de l'acétonitrile de manière quantitative.

Pour conclure, le sel de phosphonium tétra-deutérotétra-éthyle **30** est synthétisé en 5 étapes, à partir de l'alcyne **31** et du dérivé bromé **32**, avec un rendement global de 59%. L'optimisation des différentes conditions réactionnelles ont permis d'effectuer la montée en échelle de cette synthèse, ainsi 1,5 g de sel de phosphonium tétra-deutérotétra-éthyle **30** ont pu être obtenus.

IV. Optimisation du couplage de Wittig

IV.1. Optimisation sur un synthon test

La réaction d'oléfination de Wittig constitue l'étape clé de notre stratégie de synthèse, permettant d'accéder au squelette des DHA deutérés (**Schéma 102**).

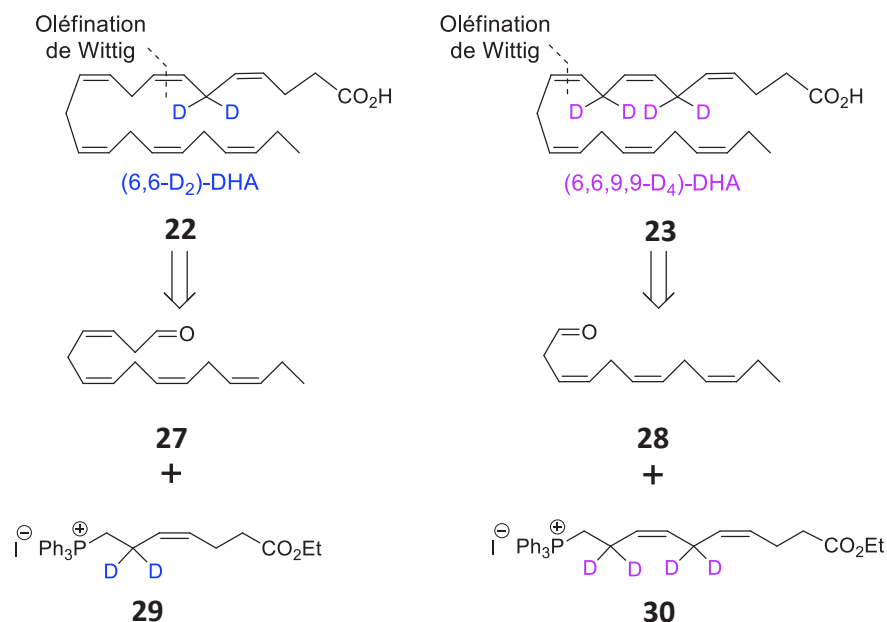


Schéma 102 : Stratégie de synthèse des DHA deutérés **22** et **23**.

L'optimisation de cette oléfination de Wittig a été réalisée en utilisant des conditions similaires à celles décrites par Sandri *et al.*^{184b, 224} (**Schéma 103**).

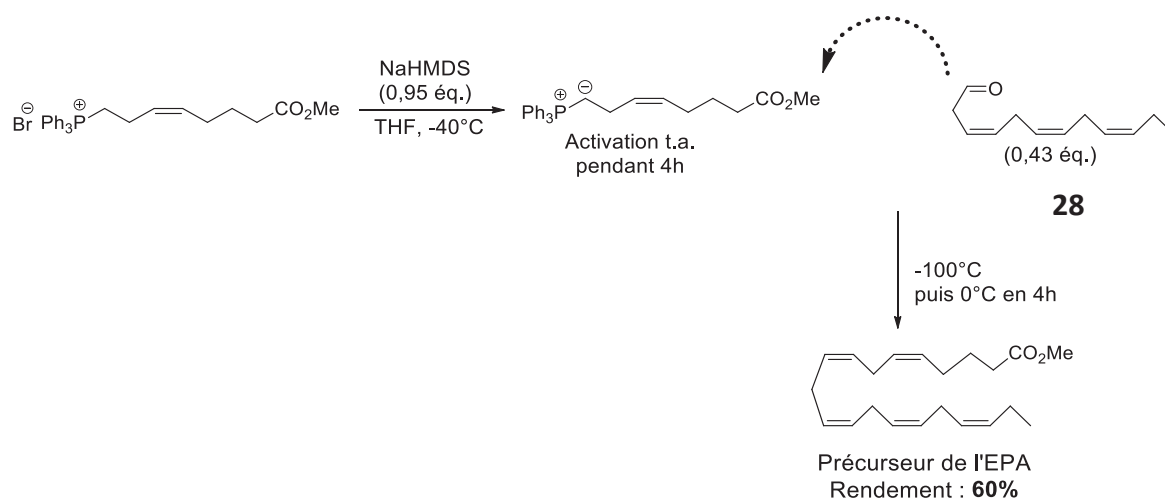


Schéma 103 : Réaction d'oléfination de Wittig en présence de l'aldéhyde **28** réalisée par Sandri *et al.*^{184b, 224}

Dans ce protocole, la formation de l'ylure s'effectue à -40°C en présence de 0,95 éq. de *bis*(triméthylsilyl)amidure de sodium (NaHMDS), suivi d'une activation à température ambiante pendant 4h. L'ylure est ensuite refroidit à -100°C pour l'ajout de l'aldéhyde **28**. La température du mélange réactionnel est remontée à 0°C en 4h. Plusieurs modifications ont été apportées à ce protocole. Les températures, les temps d'activation et l'ordre d'ajout des réactifs ont été fixés en prenant en considération les optimisations des réactions d'oléfination de Wittig préalablement réalisées au sein du laboratoire. Afin de ne pas consommer les sels de phosphoniums deutérés (composés à haute valeur ajoutée) pendant l'étape d'optimisation de cette réaction, nous avons dans un premier temps effectué les essais d'oléfination sur un sel de phosphonium "modèle", l'iodure de (Z)-hex-3-en-1-yltriphenylphosphonium **55** (**Schéma 104**), produit en grande quantité au sein du laboratoire. Ces réactions tests ont été réalisées à partir des aldéhydes **27** et **28**, nous permettant également de mettre en évidence les conditions optimales à utiliser pour engager ces aldéhydes, relativement instables et facilement dégradables, dans une réaction de Wittig.

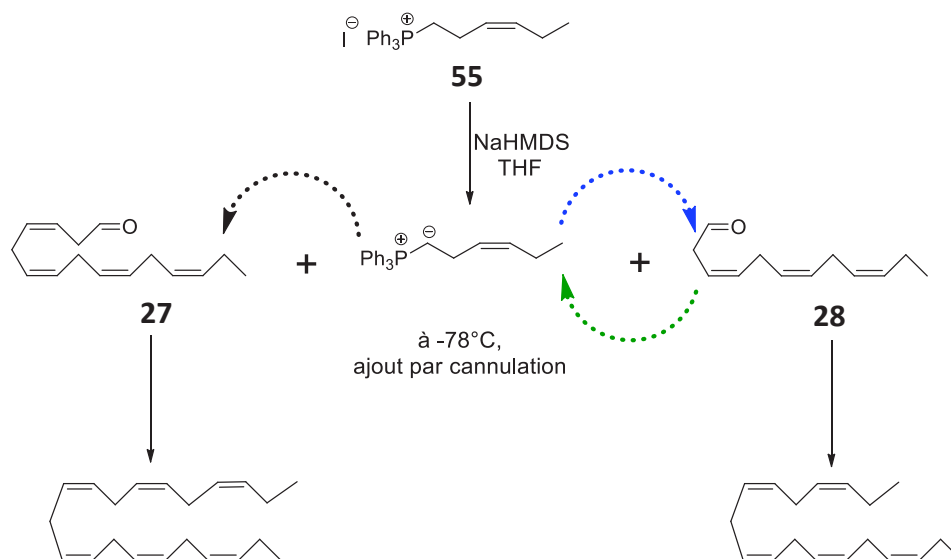


Schéma 104 : Réaction de Wittig test, utilisant le sel de phosphonium non deutéré modèle en présence des aldéhydes **27** ou **28**.

Pour ces essais l'ylure est formé à partir du sel de phosphonium **55** déprotoné en présence de NaHMDS. Cet ylure est ensuite versé à -78°C sur l'aldéhyde ou l'inverse, afin de tester l'impact de l'ordre d'ajout des réactifs. Les différents essais effectués sont résumés dans le tableau suivant (**Tableau 19**).

Essais	Éq. sel de Phosphonium (quantité)	Éq. aldéhyde (quantité, Temps de conservation)	Éq. base	Température activation ylure (durant 30 min)	Température de canulation puis de la réaction (temps)	Rdt (%)
1	1 (231 mg)	0.57 (27) (85 mg, 1 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C → 0°C (2 h)	14
2	1 (231 mg)	0.57 (27) (85 mg, 1 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78° → t.a. (2 h)	53
3	1 (231 mg)	0.57 (27) (85 mg, 1 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (2 h)	40
4	1 (231 mg)	0.57 (27) (85 mg, 1 j))	0.9	-50°C → 0°C	-78°C → t.a. (2 h)	44
5	1 (231 mg)	0.57 (27) (85 mg, 1 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	66
6	1 (231 mg)	0.57 (27) (85 mg, 3 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	37
7	1 (231 mg)	0.95 (27) (139 mg, 3j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (2 h)	23
8	1 (231 mg)	0.95 (27) (139 mg, 1j)	0.9	-50°C v -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	60
9	1 (349 mg)	0.95 (27) (210 mg, 1j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	70
10	1 (142 mg) (réalisé 2 fois)	0.95 (28) (69 mg, 1 j)	1	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	13
11	1 (142mg)	0.95 (28) (69 mg, 1 j) (impure)	1	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	22
12	1 (142 mg)	1.4 (28) (113 mg, 1 j) (pur)	1	-50°C → -20°C	-78°C → t.a. (21 h)	49

Tableau 19 : Mise au point de la réaction de Wittig avec le sel de phosphonium test non deutéré **55** et les aldéhydes **27** ou **28** (en noir ou **bleu** : ylure versé sur l'aldéhyde, en **vert** : aldéhyde versé sur l'ylure)

Pour les premiers essais réalisés à partir de l'aldéhyde **27**, nous avons privilégié la canulation de l'ylure sur l'aldéhyde afin de ne pas risquer de dégrader l'aldéhyde en présence d'un excès de base (NaHMDS). Les essais 1 et 2 (**Tableau 19**) mettent en évidence que la remontée progressive à température ambiante du mélange réactionnelle permet d'obtenir de meilleurs rendements (14% à 53%). L'influence de la température d'activation de l'ylure a été évaluée (-20°C ou 0°C, **Tableau 19**, essais 2,3 et 4) et ne semble avoir aucun impact sur le rendement final.

Au cours des essais 4 et 5 (**Tableau 19**), le temps de réaction après la montée à température ambiante est augmenté de 2h à 21h, et permet une nette amélioration du rendement (44% à 66%).

D'après les essais 5 et 6/7 (**Tableau 19**), la stabilité de l'aldéhyde semble être un facteur primordial pour obtenir un rendement satisfaisant. En effet ce dernier se conserve difficilement malgré toutes les précautions mises en œuvre (-80°C sous Argon). Il apparaît primordial d'engager rapidement l'aldéhyde directement après (ou seulement 1 j après) sa synthèse dans cette réaction de Wittig afin de ne pas faire chuter le rendement. Dans les premiers essais (**Tableau 19**, essais 1 à 6) Le nombre d'éq. de ce dernier était inférieur à celui de l'ylure, similaire aux proportions utilisées dans les travaux de Sandri *et al.*^{184b, 224} D'après les essais 8 et 9 (**Tableau 19**) l'aldéhyde peut être utilisé en quantité presque équimolaire sans affecter le rendement. Finalement, la reproductibilité des conditions optimisées a été confirmée grâce à ces deux derniers essais où un rendement de 60 à 70% a pu être obtenu en utilisant l'aldéhyde **27**.

Les conditions optimisées pour l'aldéhyde **27**, ont été utilisée afin d'engager l'aldéhyde **28** (**Tableau 19**) dans la réaction de Wittig. Malheureusement, l'application de ces conditions optimisées précédemment n'ont pas permis d'obtenir un rendement satisfaisant (13%, **Tableau 19**, essai 10). Les essais 11, 12 sont alors réalisés avec un sens d'ajout différent des réactifs : l'aldéhyde est cette fois-ci versé sur l'ylure. La comparaison des essais 10 et 11 montre que le sens d'ajout des réactifs est un facteur important; en effet un rendement plus élevé est obtenu lorsque l'aldéhyde est versé sur l'ylure. Enfin la comparaison des essais 11 et 12 (**Tableau 19**) suggère encore une fois que la pureté de l'aldéhyde est un facteur limitant pour l'obtention d'un rendement satisfaisant, puisque dans les mêmes conditions le rendement passe de 22 à 49% en utilisant un aldéhyde de pureté maximale (la détermination de la pureté relative de l'aldéhyde **28** est présentée dans le paragraphe II.1.3. de ce chapitre).

A travers tous ces essais réalisés à partir du sel de phosphonium modèle **55**, nous avons mis en évidence l'importance de certains facteurs pour obtenir un rendement satisfaisant et reproductible. Ces facteurs correspondent au sens d'ajout des réactifs (aldéhyde versé sur l'ylure), à la remontée progressive de la température du milieu réactionnel (-78°C à t.a.), au temps de réaction, à l'utilisation d'un excès d'aldéhyde par rapport au sel de phosphonium et à la pureté de l'aldéhyde (doit être supérieur à 80%, estimée par RMN ^1H dans le paragraphe II.1.3.).

Malgré cette pré-optimisation, plusieurs essais de réaction de Wittig ont été effectués en utilisant les sels de phosphonium deutérés **29** et **30**, puisque ces derniers possèdent une structure différente comparée à celle du sel de phosphonium test non deutéré **55**.

IV.2. Résultats de la réaction d'oléfination de Wittig réalisée avec les sels de phosphoniums di-deutééré **29** et tétra-deutééré **30**

Les conditions optimisées dans le paragraphe précédent ont été appliquée aux sels de phosphonium deutérés **29** et **30** (**Schéma 105**) afin d'accéder aux esters de DHA deutérés **56** et **57**.

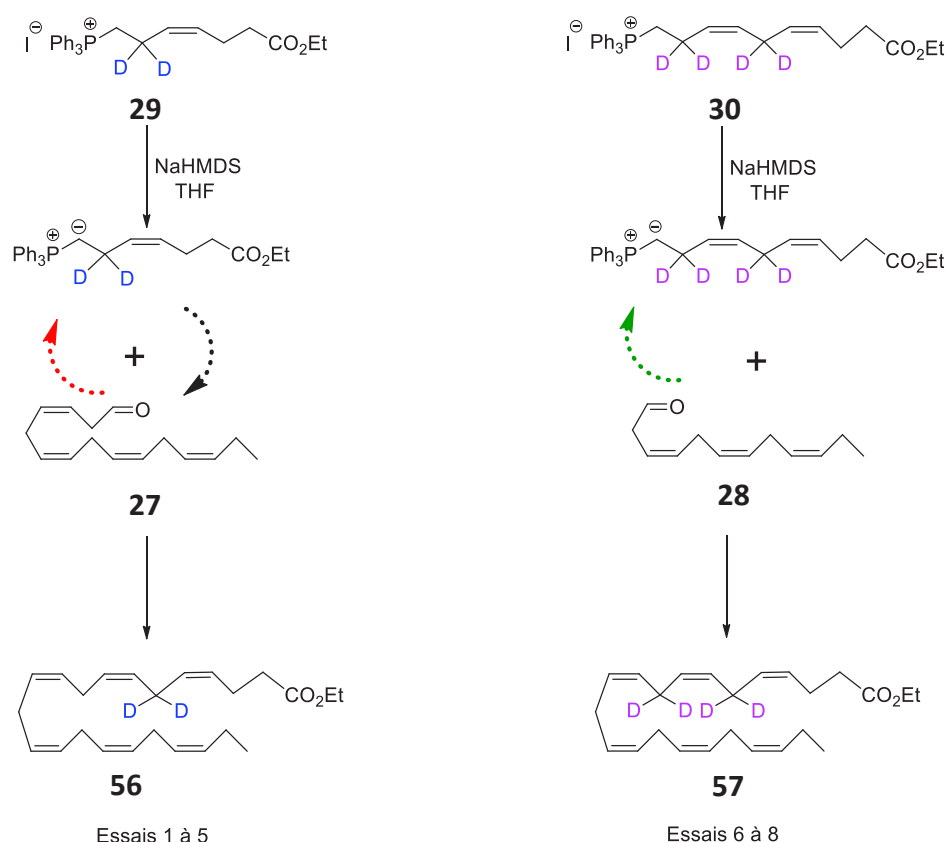


Schéma 105 : Oléfination de Wittig réalisée avec les sels de phosphonium di-deutééré **29** et tétra-deutééré **30**.

Les résultats correspondant aux différents essais effectués sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 20) :

Essais	Éq. sel de Phosphonium (quantité)	Éq. aldéhyde (quantité, Temps de conservation)	Éq. base	Température activation ylure (durant 30 min)	Température de canulation puis de la réaction (temps)	Rdt (%) (produit formé)
1	1 (29) (362 mg)	0.57 (27) (85 mg, 1 j)	0.9	-50°C	-78°C (3 h)	6 (essai réalisé avant optimisation avec sel de P non deutéré) (56)
2	1 (29) (150 mg)	0.57 (27) (33 mg, 1 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	40 (56)
3	1 (29) (554 mg)	0.95 (27) (210 mg, 1 j)	0.9	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	12 (56)
4	1 (29) (200 mg)	0.95 (27) (76 mg, 1 j)	0.95	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	31 (56)
5	1 (29) (548 mg)	1.7 (27) (371 mg, 1 j)	1	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	40 (56)
6	1 (30) (200 mg)	2 (28) (113 mg) 1 j	1	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	17 (57)
7	1 (30) (100 mg)	1.7 (28) (51 mg) 1 j (pur)	1	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	51 (57)
8	1 (30) (150 mg)	1.47 (28) (77 mg) 1 j (pur)	1	-50°C → -20°C	-78°C→t.a. (21 h)	48 (57)

Tableau 20 : Mise au point de la réaction de Wittig avec les sels de phosphoniums di-deutééré **29** et tétra-deutééré **30**, et les aldéhydes **27** et **28** (En noir : ylure versé sur l'aldéhyde en rouge et vert : aldéhyde versé sur l'ylure).

Dans les premiers essais d'oléfination de Wittig entre le sel de phosphonium di-deutééré **29** et l'aldéhyde **27** conduisant à l'ester de DHA **56**, l'ylure formé est canulé sur ce dernier à -78°C (Tableau 20, essais 1 à 3). L'essai 1 a été effectué avant l'optimisation avec le sel de phosphonium

non deutéré **55** présentée dans le paragraphe précédent. Le faible rendement de cet essai confirme que la remontée en température après ajout des réactifs est importante. Les essais 2 et 3 mettent en évidence le problème de reproductibilité de la réaction dans ces conditions. Nous avons donc, comme dans les manipulations sur le sel de phosphonium modèle, inversé le sens d'ajout des réactifs (**Tableau 20**, essais 4 et 5) en canulant l'aldéhyde **27** sur l'ylure précédemment formé à -50°C . D'après ces deux essais, une meilleure reproductibilité de la réaction est obtenue. L'utilisation d'un excès d'aldéhyde permet ici aussi d'augmenter le rendement d'environ 10%. Finalement, le (6,6- D_2)-DHA ester d'éthyle **56** est obtenu avec un rendement de 40%, réaction répétable sur environ 0,5g de sel de phosphonium di-deutééré **29**.

Les conditions optimisées sont ensuite utilisées pour engager le sel de phosphonium tétra-deutééré **30** (**Tableau 20**, essais 6 à 8) dans la réaction d'oléfination de Wittig afin d'accéder à l'ester de DHA **57**. Dans ces essais, un excès d'aldéhyde est versé sur l'ylure précédemment formé. La pureté de l'aldéhyde reste un facteur primordial (**Tableau 20**, essai 6) pour la réussite de la réaction, comme en témoigne l'essai 6 au cours duquel uniquement 17% de rendement sont obtenus. Nous obtenons des résultats reproductibles et des rendements satisfaisants de 51% et 48% (**Tableau 20**, essais 7 et 8) lorsque l'aldéhyde pur est canulé en excès sur l'ylure précédemment formé en présence d'un éq. de NaHMDS. Cette réaction reste reproductible sur faible quantité (100 à 200 mg).

Pour conclure cette oléfination de Wittig, correspondant à la réaction clé des deux stratégies de synthèse de ce travail de thèse, a fait l'objet d'une importante optimisation. Les rendements maximums obtenus sont de 40% et 51% pour le (6,6- D_2)-DHA ester d'éthyle **56** et le (6,6,9,9- D_4)-DHA ester d'éthyle **57**, respectivement.

L'étape de couplage final pour obtenir le motif lipophénol a ensuite été effectuée. Une purification des DHA et des lipophénols deutérés est également nécessaire pour séparer les produits issus de la sur-réduction obtenus durant les étapes d'hydrogénation.

V. Saponification des esters de DHA deutérés **56** et **57**

V.1. Synthèse des DHA deutérés

Les réactions de saponifications finales²⁰⁵ des esters de DHA deutérés **56** et **57** (**Schéma 106**) sont réalisées en présence de LiOH dans un mélange éthanol/eau à 65°C, et conduisent aux DHA correspondant avec un rendement de 77% et 84%, pour le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) respectivement.

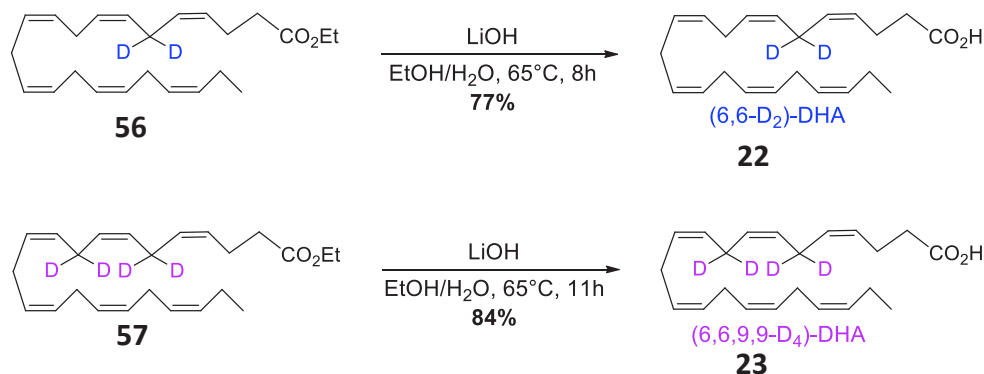


Schéma 106 : Réaction de saponification finale pour la synthèse des DHA deutérés **22** et **23**.

Une purification par HPLC semi-préparative (**Figure 50**), avec colonne phase inverse, système H₂O/acétonitrile) est réalisée afin d'éliminer les produits de sur-réduction obtenus lors de l'hydrogénation de l'alcyne. Cette dernière est menée sur des quantités de DHA ne dépassant pas 30 mg.

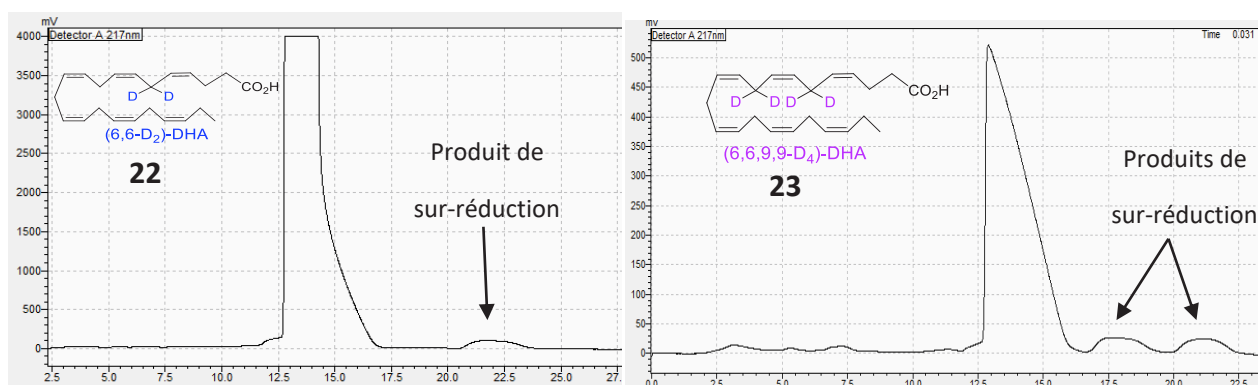


Figure 50 : Chromatogrammes de purification obtenus par HPLC préparative (Shimadzu) lors de la purification des DHA deutérés **22** et **23** (colonne Waters Symmetry Prep™ (C₁₈) 7 μm (7.8x300mm) ; H₂O/acétonitrile, 17 :83 en isocratique ; détection à 217 nm).

Les produits de sur-réduction peuvent être éliminés par cette méthode puisqu'ils possèdent des temps de rétention légèrement plus élevés que pour le DHA (**Figure 50**). Les rendements de purification sont de 87% et 80% pour le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) respectivement.

Ces composés ainsi purifiés (26 mg de (6,6-D₂)-DHA (**22**) et 16 mg de (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) seront utilisés afin d'effectuer des tests *in vitro* dans le but d'évaluer l'effet des deutériums sur la diminution de la toxicité du DHA en condition oxydante et la diminution de la peroxydation lipidique. Les analyses RMN ¹H, ¹³C, UPLC (ultra performance liquid chromatography)/PDA (en anglais : photodiode array) et MS nous permettent de contrôler la composition et la pureté des composés obtenus. Tout d'abord la présence des deutériums est validée non seulement par l'intégration des protons en position *bis*-allylique en RMN ¹H, mais également en RMN ¹³C. En effet, le signal correspondant au carbone lié aux deux deutériums est présent sous forme d'un quintuplet (**Figure 51 et Figure 52**).

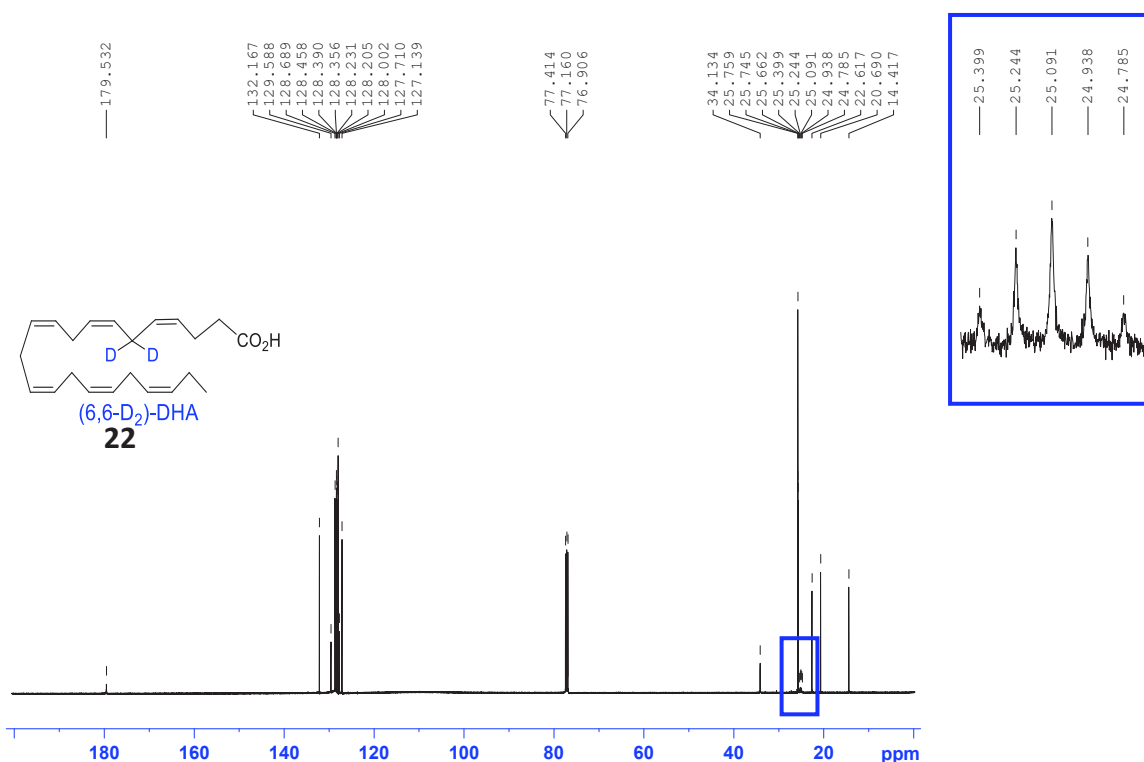


Figure 51: Spectre RMN ¹³C obtenu pour le (6,6-D₂)-DHA(**22**) (500 MHz)

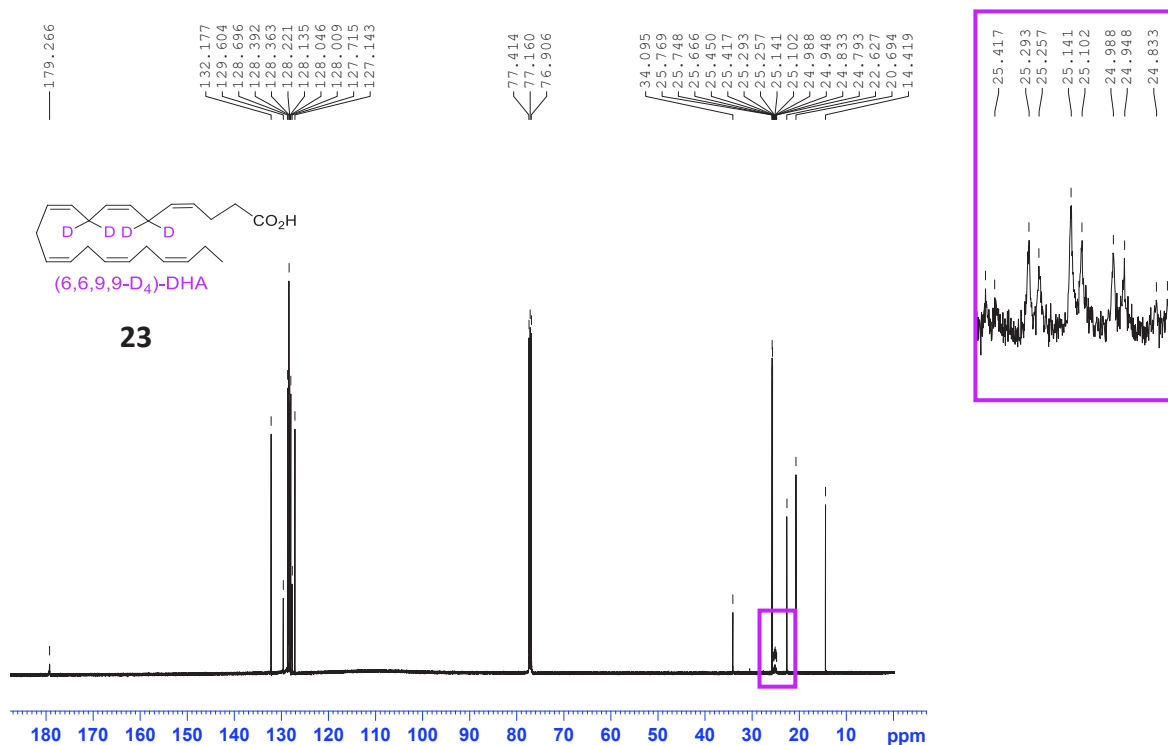


Figure 52 : Spectre RMN ¹³C obtenus pour le (6,6,9,9-D₄)-DHA **23** (500 MHz).

Le spin de l'atome de deutérium étant égal à 1 (contre 1/2 pour l'atome d'hydrogène), la multiplicité du signal du carbone comportant les deux deutériums calculée, selon la formule : $m = 2nI + 1$ (n : nombre d'atomes voisins et I : spin), indique l'obtention théorique d'un quintuplet ($m = (2 \times 2 \times 1) + 1 = 5$).

V.2. Synthèse des lipophénols deutérés

Les DHA deutérés **22** et **23** sont engagés l'étape de couplage avec le phloro-*O*iPr-OTIPS **25** suivi d'une étape de déprotection, afin d'accéder aux phloroglucinol-*O*iPr-ODHA deutérés **20** et **21** (Schéma 107).

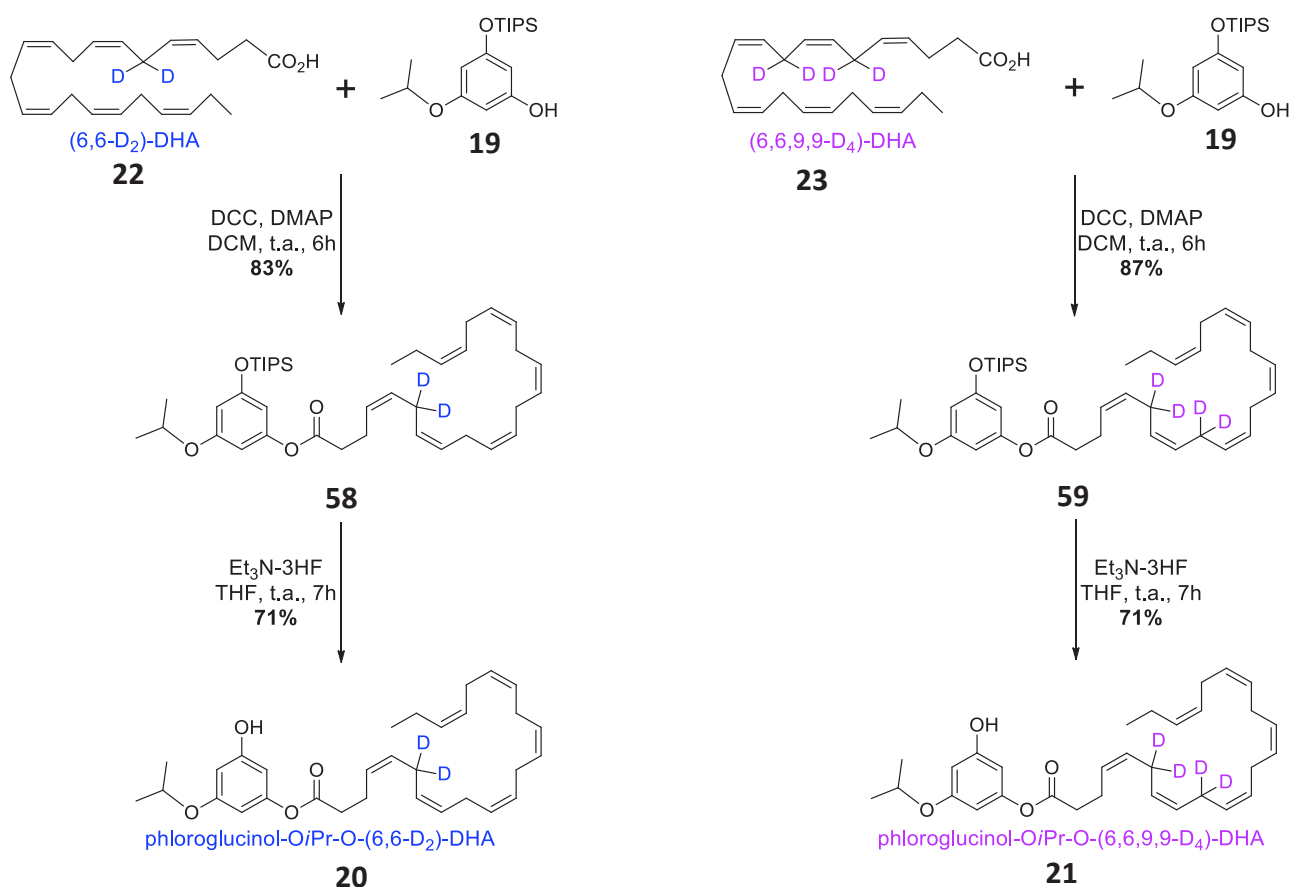


Schéma 107 : Synthèse des phloroglucinol-OiPr-ODHA deutérés **20** et **21**.

Le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) sont couplés avec le phloroglucinol-OiPr-OTIPS **25**, précédemment synthétisé comme décrit dans le paragraphe I.1. de ce chapitre, en présence de DCC et de DMAP, conduisant aux phloroglucinol-OiPr-OTIPS **58** et **59**, suivi d'une déprotection finale du groupement TIPS formant en deux étapes les lipophénols di- et tétra-deutérés **20** et **21**, avec des rendements de 59% et 62% en 2 étapes respectivement. Les produits finaux sont purifiés sur colonne chromatographique suivie d'une purification sur HPLC semi-préparative (avec colonne phase inverse, système H₂O/ACN), permettant d'éliminer, comme dans le cas des DHA deutérés **22** et **23**, les produits de sur-réduction. Ainsi, 60 mg de phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) et 45 mg de phloroglucinol-OiPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**) sont obtenus.

VI. Conclusion et perspectives

Pour conclure nous avons réussi à effectuer les premières synthèses totales des DHA deutérés (6,6-D₂)-DHA (**22**) et (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), ainsi que celles des lipophénols deutérés correspondant, le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) et le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**) en nous basant sur des stratégies de synthèse convergentes comportant des intermédiaires communs.

Les synthèses mises en œuvre pour obtenir le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**), comportant leurs intermédiaires clés et le nombre d'étapes nécessaires à leur synthèse, sont décrites dans le schéma suivant (**Schéma 108**).

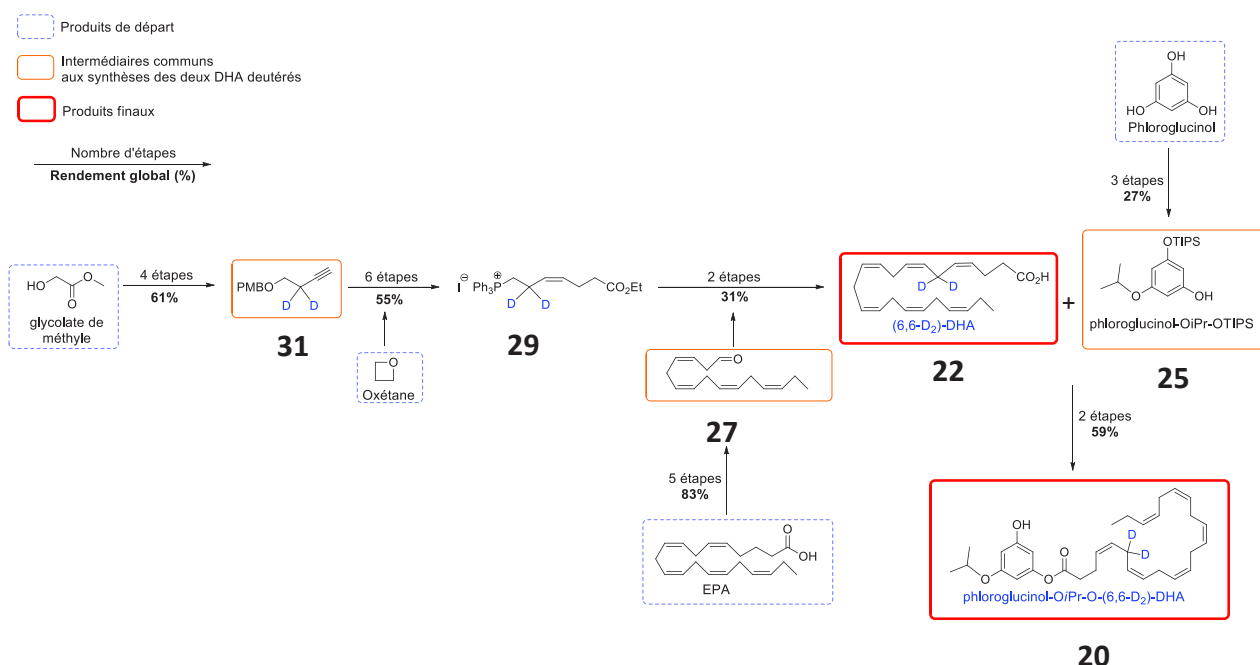


Schéma 108 : Résumé de la synthèse du (6,6-D₂)-DHA (**22**) et du phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**).

Tout d'abord l'alcyne vrai deutéré **31** est synthétisé en 4 étapes à partir du glycolate de méthyle avec un rendement global de la synthèse de 61%. La montée en échelle de cette synthèse a été effectuée sur 8g de méthyle glycolate. Ensuite, le sel de phosphonium di-deutééré **29** a été obtenu en 6 étapes à partir de l'alcyne deutéré **31** et de l'oxétane, avec un rendement global de 55% et une montée en échelle validée sur des quantités de l'ordre du gramme. La synthèse conduisant à l'aldéhyde **27**, faite en parallèle, est effectuée en 5 étapes avec un rendement de 83% et une montée en échelle validée sur 5g d'EPA de départ. La réaction d'oléfination de Wittig,

étape convergente de notre stratégie de synthèse, correspondant à la réaction clé permettant d'obtenir les squelettes du DHA deutéré **22**, a fait l'objet d'une importante optimisation. En effet, cette réaction a préalablement été optimisée sur un synthon test non deutéré en présence de l'aldéhyde **27**. Cette optimisation, suivie de celle effectuée avec le sel de phosphonium di-deutééré **29**, a permis de mettre en évidence l'importance de certains facteurs pour obtenir un rendement satisfaisant et reproductible tels que la remontée en température de la réaction, la pureté de l'aldéhyde, le sens d'ajout des réactifs. Un rendement reproductible de 40% a été obtenu pour cette étape avec une montée en échelle validée sur 500 mg de sel de phosphonium di-deutééré **29**. Une étape finale de saponification permet d'obtenir le (6,6-D₂)-DHA (**22**), avec un rendement global de 31% en 2 étapes. Finalement, le (6,6-D₂)-DHA (**22**) est synthétisé en 12 étapes à partir du glycolate de méthyle avec un rendement global de 10%. Enfin, le phloroglucinol-OiPr-OTIPS **25**, précédemment obtenu en 3 étapes à partir du phloroglucinol avec un rendement global de 27%, est couplé avec le DHA di-deutééré **22** pour former après 2 étapes le phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) avec un rendement de 59%.

Nous avons ainsi obtenu 26 mg de (6,6-D₂)-DHA (**22**) et 60 mg de phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**).

Les synthèses mises en œuvre pour obtenir le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) et le phloroglucinol-OiPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**) ont nécessité un nombre d'étapes supplémentaires comparées à leurs analogues di-deutéérés mais leurs stratégies de synthèse comportent des intermédiaires communs. Les différents intermédiaires clés et le nombre d'étapes nécessaires à leur synthèse, sont décrits dans le schéma suivant (**Schéma 109**).

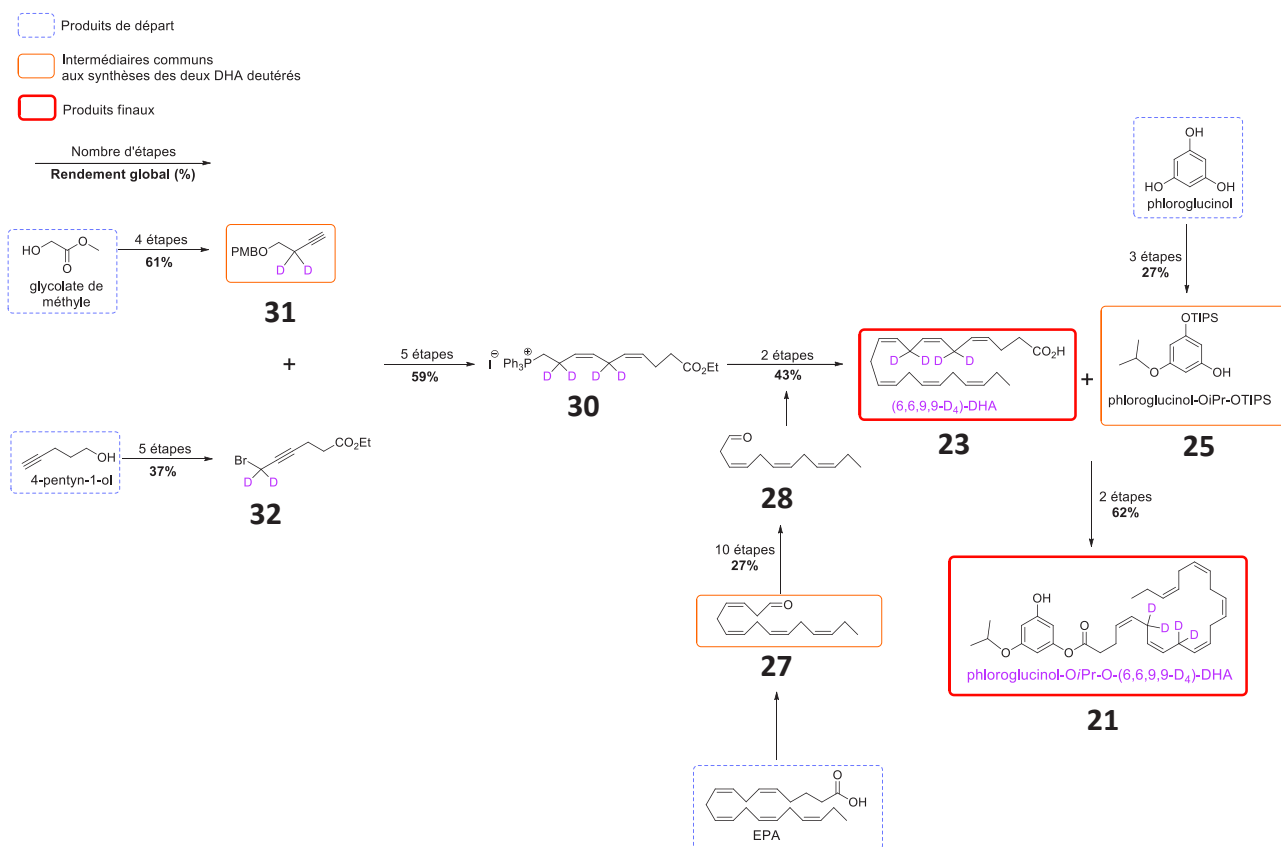


Schéma 109 : Résumé de la synthèse du (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) et du phloroglucinol-OiPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**).

L'alcyne vrai deutéré **31** est un intermédiaire commun aux synthèses des DHA di- et tétra-deutééré **22** et **23**. Le dérivé bromé propargylique deutéré **32** est synthétisé en 5 étapes à partir du 4-pentyn-1-ol avec un rendement global de 37%. La montée en échelle pour cette synthèse a été effectuée sur environ 8g de 4-pentyn-1-ol et environ 2g de dérivé bromé propargylique deutéré ont été obtenus. Ensuite, le sel de phosphonium tétra-deutééré **30** est synthétisé en 5 étapes, à partir de l'alcyne vrai deutéré **31** et du dérivé bromé propargylique deutéré **32**, avec un rendement global de 59% et une montée en échelle permettant d'obtenir 1,5g de produit souhaité. De plus, l'aldéhyde **28** a été synthétisé en 10 étapes à partir de l'EPA avec un rendement global de 27%, avec un intermédiaire commun aux deux synthèses, l'aldéhyde **27**. Sa montée en échelle a été validée sur environ 100 mg en produit souhaité. De même que pour la synthèse du DHA di-deutééré, la réaction d'oléfination de Wittig, a fait l'objet d'une importante optimisation. En effet, cette réaction a préalablement été optimisée sur un synthon test non deutéré en présence de l'aldéhyde **28**. Un rendement reproductible de 51% a été obtenu pour cette étape avec une montée en échelle validée sur 200 mg de sel de phosphonium tétra-deutééré **30**. Une étape finale

de saponification permet d'obtenir le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), avec un rendement global de 43% en 2 étapes. Finalement, le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) est synthétisé en 14 étapes à partir du glycolate de méthyle avec un rendement global de 9%. Enfin, le phloroglucinol-O*i*Pr-OTIPS **25**, également un intermédiaire commun aux deux synthèses, est couplé avec le DHA tétra-deutééré **23** pour former après 2 étapes le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**) avec un rendement de 62%.

Nous avons ainsi obtenu 16 mg de (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) et 45 mg de phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**).

Les deux stratégies de synthèse des DHA deutérés ont été validées et permettent d'accéder à des quantités suffisantes pour l'évaluation biologique des AGPI deutérés et leurs lipophénols. Cependant, quelques limitations ont été observées au niveau de la montée en échelle de la stratégie, notamment pour l'obtention de l'aldéhyde nécessaire à la synthèse du (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), et également pour les réactions d'oléfination de Wittig.

Une autre voie de synthèse envisageable pour l'obtention du (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) serait de mettre en œuvre une autre méthode d'incorporation des deutériums. Cette dernière pourrait correspondre à un échange H/D (**Schéma 110**) comme décrit dans la partie IV, chapitre I, paragraphe I.1.1., basé sur la présence d'un proton énolisable en position α d'une fonction aldéhyde,¹⁷⁵ effectuée en présence de pyridine et d'oxyde de deutérium D₂O. Ainsi l'aldéhyde **27** pourrait être engagé dans cette réaction d'incorporation des deutériums. L'avantage de cette dernière est également lié à l'obtention d'un composé plus résistant à l'isomérisation en aldéhyde α,β insaturé, ayant lieu lors de l'arrachement d'un proton acide en position α de la fonction aldéhydique. Ainsi, une purification intermédiaire pourrait être envisageable, effectuée sans dégradation de l'aldéhyde et permettrait d'engager un composé avec une pureté acceptable pour la réaction d'oléfination de Wittig. Cette stabilisation hypothétique aurait également un fort avantage durant la réaction d'oléfination de Wittig, pendant laquelle l'aldéhyde est versé sur l'ylure.

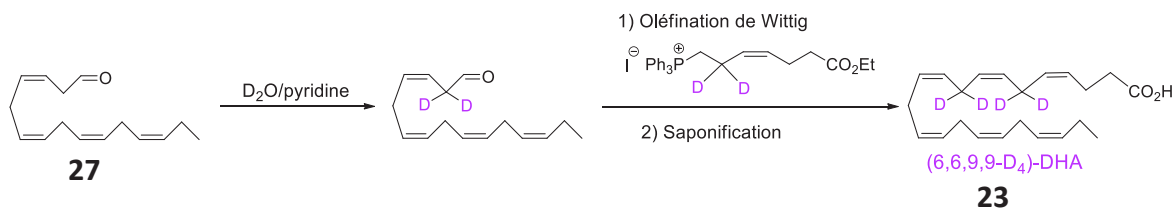


Schéma 110 : Voie alternative à tester pour obtenir le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**).

Cet échange H/D pourrait également être envisagé pour obtenir l'aldéhyde **28** deutéré en position α (**Schéma 111**). Ce dernier pourrait également être purifié de manière plus aisée, et engagé dans la réaction d'oléfine de Wittig en présence de l'ylure provenant du sel de phosphonium tétra-deutérotétraéthyle **30**, permettant ainsi la synthèse d'un DHA hexa-deutérotétraéthyle en positions *bis*-allyliques, le (6,6,9,9,12,12-D₆)-DHA.

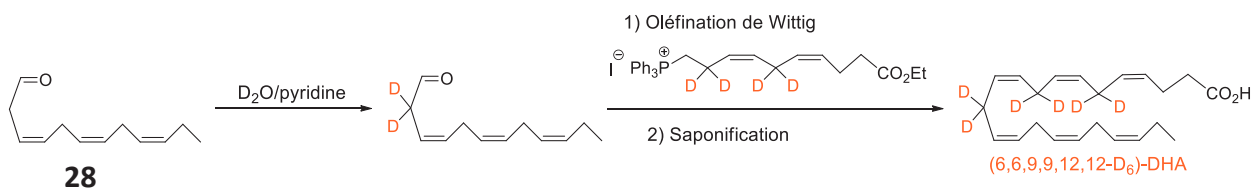
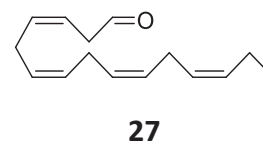
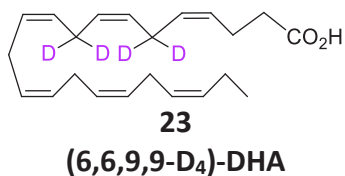
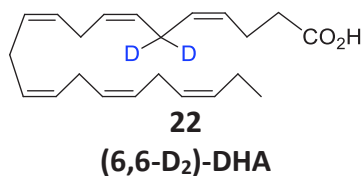
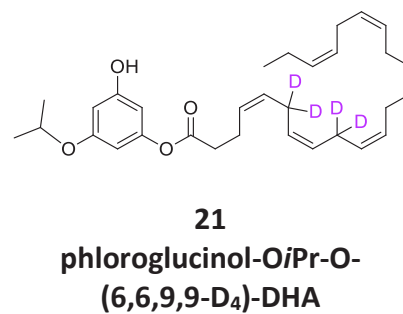
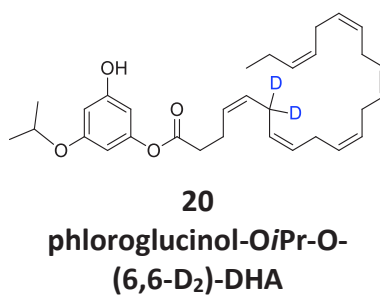
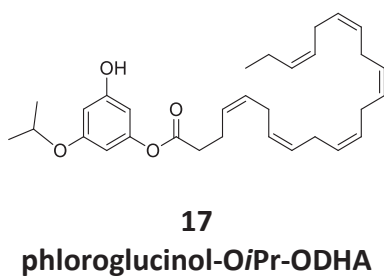
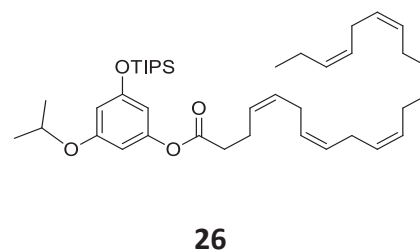
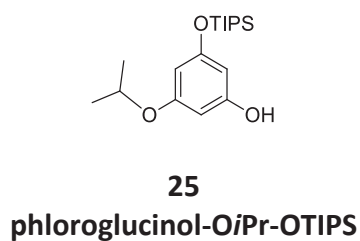
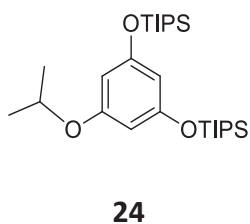
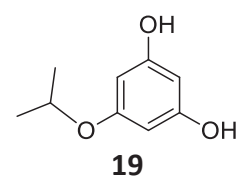
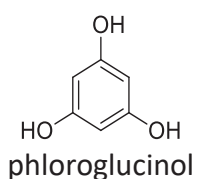
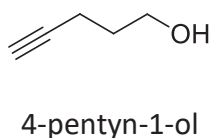
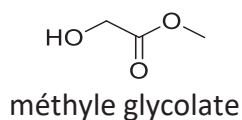
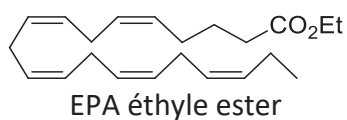
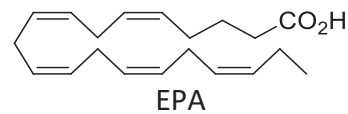
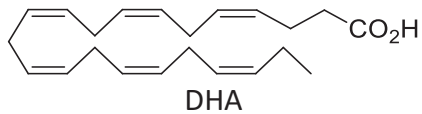
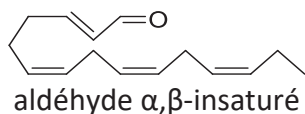
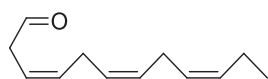


Schéma 111 : Voie alternative à tester pour obtenir le (6,6,9,9,12,12-D₆)-DHA.

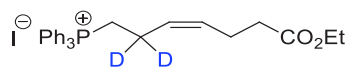
Partie expérimentale

**Structures des intermédiaires de synthèse et produits finaux décrits
dans la partie IV, chapitre II**

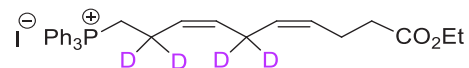




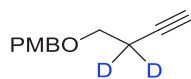
28



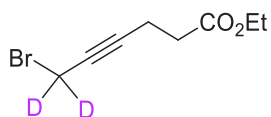
29



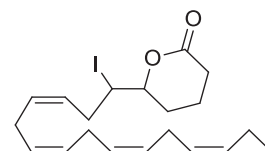
30



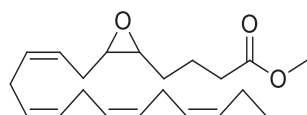
31



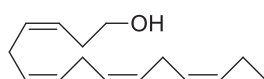
32



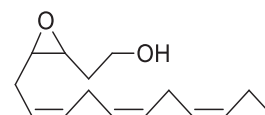
33



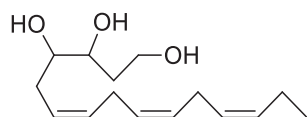
34



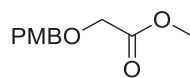
35



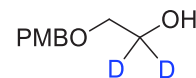
36



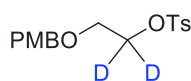
37



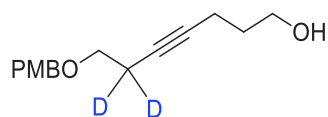
38



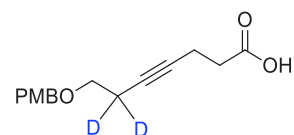
39



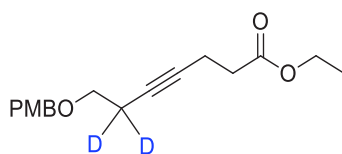
40



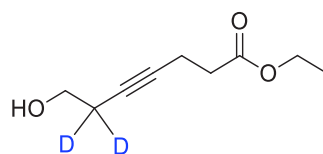
41



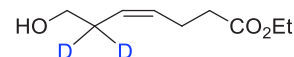
42



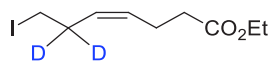
43



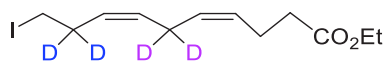
44



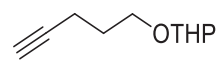
45



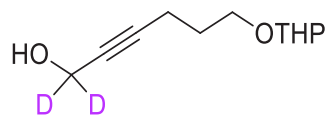
46



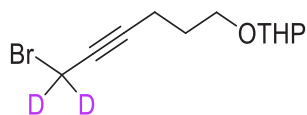
47



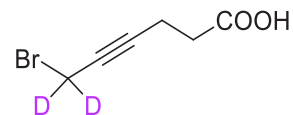
48



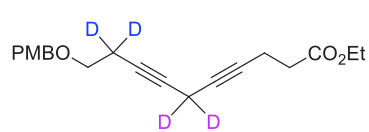
49



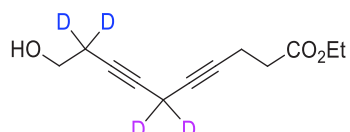
50



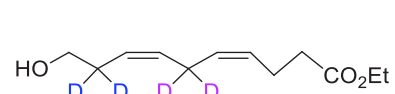
51



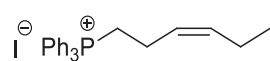
52



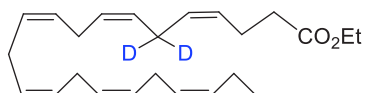
53



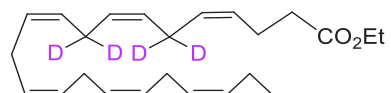
54



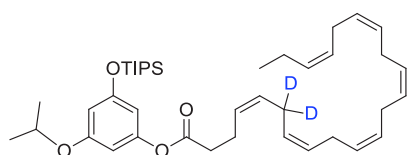
55



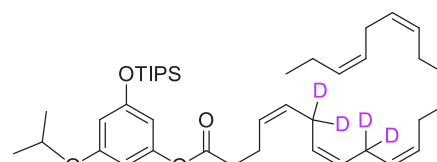
56



57



58



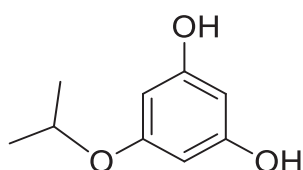
59

General methods

All reactions requiring anhydrous conditions were conducted in oven-dried glassware with magnetic stirring under nitrogen unless mentioned otherwise. Solvents, anhydrous solvents and reagents were used as obtained from the supplier unless otherwise noted. Reactions were monitored by TLC using plates precoated with silica gel 60 (Merck). Reaction components were visualized by using a 254 nm UV lamp, treatment with acidic *p*-anisaldehyde stain followed by gentle heating or with KMNO₄ solution in ethanol. Organic layers were dried with MgSO₄ unless otherwise stated. Column chromatography was performed by using silica gel 40–63 μm. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were obtained at 500MHz. The spectra were recorded in CDCl₃ (internal reference at δ = 7.26 ppm for ¹H NMR and δ = 77.16 ppm for ¹³C NMR) unless otherwise noted. All of the NMR spectra were assigned with the help of 2D NMR techniques (COSY ¹H–¹H, HSQC, and HMBC). The ¹H NMR spectra are reported as follows: chemical shift in ppm [multiplicity, coupling constant(s) *J* in Hz, relative integral]. The multiplicities are defined as follows: br. = broad, m = multiplet, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint. = quintuplet or combinations thereof. Mass spectra and high-resolution mass spectra (HRMS) were measured using ESI or APCI (atmospheric pressure CI) techniques on Q-TOF mass spectrometers.

The high volatility of compounds **31**, **38**, **39** and **48** has to be considered during the different workups of their synthesis.

5-Isopropoxybenzene-1,3-diol : **19**



A freshly prepared saturated solution of dry HCl (gas) in *i*PrOH (32 N, 4 mL) was added to a suspension of phloroglucinol (0.40 g, 3.17 mmol) in dioxane (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. An additional amount of the saturated HCl solution (1 mL) was added, and the mixture was kept at 70°C for 7 h. The solvents were evaporated under vacuum, and the residue was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to give **19** 0.27 mg, 51%) as a white solid. Dialkylated derivative was also isolated (13 %).

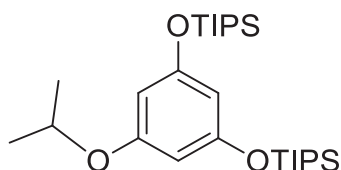
$R_f=0.4$ (CH₂Cl₂/MeOH,95:5) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=5.99-5.96$ (m, 3H, CH_{Ar}), 5.70 (br., 2H, OH), 4.45 (quint., ³J(H,H)=7.5 Hz, 1H, CH_{OiPr}), 1.31 (d, ³J(H,H)=6 Hz, 6H, CH_{3(OiPr)}) ppm ;

¹³C NMR(125 MHz, CDCl₃) : $\delta=160.0, 158.1, 95.8, 95.5, 70.0, 22.0$ ppm ;

HRMS(ESI-TOF) : m/z : calcd. for C₉H₁₁O₃ : 167.0708[M- H]⁻ ; found: 167.0710.

5-Isopropoxy-1,3-bis(triisopropylsilyloxy)benzene : 24



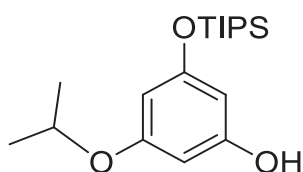
Phloroglucinol-*OiPr* **19** (231 mg, 1.37 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (24 mL). Diisopropylethylamine (617 μ L, 3.60 mmol) and TIPSOTf (969 μ L, 3.60 mmol) were added dropwise to the solution, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h. EtOAc (30 mL) was added to the mixture, and the organic layer was washed with water (15 mL) and brine (15 mL). The organic phase was dried (MgSO₄) and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 99.5:0.5) to give the diprotected phloroglucinol-*OiPr* **24** (573 mg, 87%) as a colourless oil.

$R_f=0.88$ (hexane/EtOAc, 95:5) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=6.07-6.06$ (m, 2 H, CH_{Ar}), 6.04-6.02 (m, 1H, CH_{Ar}), 4.42 (quint., ³J(H,H)=6Hz, 1H, CH_{OiPr}), 1.29 (d, ³J(H,H) = 6Hz, 6H, CH_{3(OiPr)}), 1.26-1.19 (m, 6H,CH_{TIPS}), 1.09 (d, ³J(H,H)=7.5Hz, 36H, CH_{3(TIPS)}) ppm. ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=159.5, 157.7, 105.0, 101.9, 70.2, 22.3,18.2, 12.9$ ppm ;

HRMS (ESI-TOF) : m/z : calcd. for C₂₇H₅₃O₃Si₂ : 481.3527 [M + H]⁺ ; found : 481.3537.

3-Isopropoxy-5-(triisopropylsilyloxy)phenol : 25

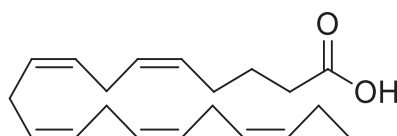
Diprotected phloroglucinol **24** (100 mg, 0.21 mmol) was dissolved in dry THF (6 mL), and $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ (68 μL , 0.42 mmol) was added. The reaction was followed by TLC, and it was stopped so as to limit as much as possible the formation on the fully deprotected derivative. The mixture was stirred for 5 h at room temperature, then EtOAc (15 mL) was added, and the organic layer was washed with water (10 mL) and brine (10 mL). The organic phase was dried (MgSO_4), and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 95:5) to give monoprotected phloroglucinol **25** (42 mg, 62%) as colorless oil. The fully deprotected derivative was also isolated (5 mg, 14%).

$R_f=0.70$ (hexane/EtOAc, 95:5) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=6.04\text{--}5.99$ (m, 3H, CH_{Ar}), 4.87 (br., 1H, OH), 4.44 (sept., $^3J(\text{H,H})=6\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}_{\text{O}i\text{Pr}}$), 1.31 (d, $^3J(\text{H,H}) = 6\text{Hz}$, 6H, $\text{CH}_3(\text{O}i\text{Pr})$), 1.28–1.20 (m, 3H, CH_{TIPS}), 1.10 (d, $^3J(\text{H,H})=7.5\text{ Hz}$, 36H, $\text{CH}_3(\text{TIPS})$) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=159.6, 157.9, 157.0, 100.7, 100.0, 96.6, 70.0, 22.0, 17.9, 12.6$ ppm.

HRMS (ESI-TOF) : m/z : calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{Si}$: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 323.2042 ; found : 323.2045.

(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoic acid: EPA

EPA
($\text{C}_{20:5}$; n-3)

Extraction EPA from Cod Liver Oil:

Commercially sourced cod liver oil (7.00 g, Cooper, France) was dissolved in a mixture of EtOH/ H_2O (95:5, v/v, 35 mL) in the presence of NaOH (2.10 g) under argon atmosphere. The mixture was protected from the light with foil, and heated at 82°C for 2 h. The ethanolic fraction was evaporated, and the residue was dissolved in hexane (40 mL) after heating. Then water (35 mL)

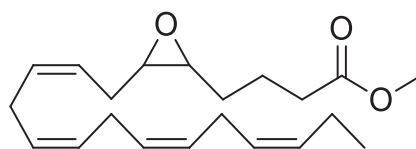
was added to the organic layer, and unsaponifiable material was removed by repeated hexane extractions (4x40 mL) of the aqueous phase. The aqueous phase was acidified to pH = 2 using HCl(aq.) solution (6.0 M). The fatty acids were extracted with hexane (4x35 mL). The organic phase was concentrated under reduced pressure to give the crude fatty acids (6.47 g) as an oil. Urea (19.40 g) and EtOH (80 mL) were added to the crude residue. The mixture was heated at 60–70 °C, protected from the light, until it turned into a clear homogeneous solution. The mixture was then returned to room temperature, and then cooled to 4 °C for 24 h. The resulting crystals were separated from the liquid by filtration. The filtrate was diluted with water (50 mL), and acidified to pH = 4–5 with HCl(aq.) solution (6.0 M). Hexane (100 mL) was added, and the solution was stirred thoroughly for 1 h. The hexane layer containing the liberated fatty acids was separated from the aqueous layer, and washed with water (3x60 mL). The organic phase was dried with Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure to give a crude mixture of AGPI (820 mg), which was purified by preparative HPLC (column Atlantis Prep OBDTM 10 μm (19x250 mm) ; H₂O/MeOH, 13:87 isocratic ; detection 217 nm) to give pure EPA (1.33 g).

Saponification of EPA ethyl ester

A solution of LiOH.H₂O (4.29 g, 102.31 mmol) in 70 mL of H₂O was added to a solution the EPA ethyl ester (5.20 g, 15.74 mmol) in 70 mL EtOH under inert atmosphere. After 2 h at 65°C the reaction was cooled at room temperature and quenched with H₂O (100 mL) and HCl(aq.) (1.0 M) until pH = 2. The aqueous layer was extracted with 4x100 mL of pentane/EtOAc (7:3). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure to give the pure EPA (4.76 g, qt.) as a yellow oil.

$R_f=0.21$ (pentane/EtOAc,8:2) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ=5.42–5.30 (m, 10H, CH), 2.85–2.80 (m, 8H, CH₂(bis-allylic), 2.37 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 2H, CH₂-CO), 2.14–2.05 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CO and CH₂-CH₃), 1.75–1.69 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 0.97 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H, CH₃) ppm.

Methyl 4-(3-((2Z,5Z,8Z,11Z)-tetradeca-2,5,8,11-tetraen-1-yl)oxiran-2-yl)butanoate : 34

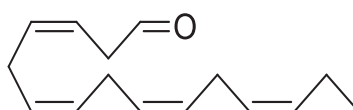
γ -Collidine (0.26 mL, 2 mmol) and I_2 (250 mg, 1 mmol) were added to a solution of eicosapentaenoic acid (EPA) (150 mg, 0.50 mmol) in acetonitrile (15 mL) at 0°C under inert atmosphere. The mixture was stirred for 1 h at 0°C and then quenched with a saturated $Na_2S_2O_3$ solution (10 mL) and ethyl acetate (30 mL). The layers were separated and the organic one was washed with 3x20 mL of brine and water (10 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The crude iodolactone was immediately used for next step without further purification.

K_2CO_3 (150 mg, 0.90 mmol) was added to a solution of the crude iodolactone (400 mg) in MeOH (10 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was stirred for 4 h at room temperature and then quenched with brine (15 mL) and water (20 mL). The aqueous layer was extracted with 4x30 mL of pentane. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc,95:5) to give the epoxide **34** (158 mg, 95%) as a pale yellow oil.

$R_f=0.25$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : $\delta=5.53-5.27$ (m, 8H, CH), 3.66 (s, 3H, CH_3 (ester)), 2.95–2.92 (m, 2H, CH (epoxide)), 2.84–2.78 (m, 6H, CH_2 (bis-allylic)), 2.41–2.35 (m, 3H, CH_2 -CO and CH - $\underline{CH_2(a)}$ - CH (epoxide)), 2.24–2.18 (m, 1H, CH - $\underline{CH_2(b)}$ - CH (epoxide)), 2.08–2.05 (m, 2H, CH - $\underline{CH_2}$ - CH_3), 1.86–1.77 (m, 2H, CH_2 - $\underline{CH_2}$ - CH_2), 1.86–1.77 (m, 2H, CH (epoxide)- $\underline{CH_2}$ - CH_2), 0.96 (t, $^3J(H,H)=7.5$ Hz, 3H, CH_3) ppm ;

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : $\delta=173.8, 132.2, 130.7, 128.7, 128.6, 127.8, 127.8, 127.1, 124.4, 56.7, 56.3, 51.7, 33.7, 27.3, 26.3, 25.9, 25.7, 25.6, 22.1, 20.7, 14.4$ ppm.

(3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraenal : 27

Acetic anhydride (9 mL) was added to a solution of the epoxide **34** (4.48 g, 13.47 mmol) in acid acetic (90 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was then stirred at 45°C for 2.5 d and the solvents were removed under reduced pressure. The crude diacetate was immediately used for next step without further purification.

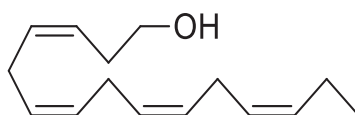
LiOH.H₂O (2.70 g, 64.35 mmol) diluted in H₂O (100 mL) was added to a solution of diacetate in MeOH (100 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 21 h then cooled at 0°C and carefully quenched with an aqueous solution of HCl(aq. (10%)) to reach pH = 1. The aqueous layer was extracted with 2x100 mL of Et₂O. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The crude diol was immediately used for next step without further purification.

Sodium periodate (6.68 g, 31.23 mmol) diluted in H₂O (49 mL) was added dropwise to a solution of crude diol in MeOH (180 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then quenched with 150 mL of brine. The aqueous layer was extracted with 3x100 mL of pentane. The combined organic layers were successively washed with 100 mL of saturated NaHCO₃ solution, brine and water. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was then dissolved in 10 mL of Et₂O and finally filtered through a plug of Celite® and the solvents were removed under reduced pressure to give the crude aldehyde **27** (2.57 g, 87%). The purification on normal phase silica gel was not possible because of isomerization of the desired aldehyde toward the α,β -unsaturated aldehyde.

$R_f=0.47$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=9.68$ (t, ³J(H,H)=2 Hz, 1H, CHO), 5.72–5.67 (m, 1H, CH), 5.62–5.56 (m, 1H, CH), 5.44–5.28 (m, 6H, CH), 3.24–3.22 (m, 2H, CH₂-CHO), 2.84–2.79 (m, 6H, CH₂(bis-allylic), 2.1–2.04 (m, 2H, CH₂-CH₃), 0.97 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H, CH₃) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=199.5, 133.3, 132.3, 129.0, 128.9, 127.7, 127.2, 127.1, 118.8, 42.6, 26.1, 25.8, 25.7, 20.7, 14.4$ ppm.

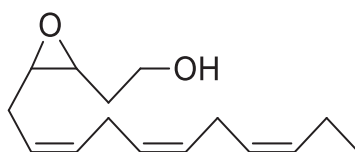
(3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-ol : 35

NaBH₄ (1.47 g, 38.86 mmol) was added to a solution of the aldehyde **27** (2.30 g of crude product, 10.53 mmol) in MeOH (70 mL) at 0°C under inert atmosphere. The mixture was stirred at 0°C for 1 h and then quenched with 150 mL of brine. The aqueous layer was extracted with 3x80 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O, 9:1 to 7:3) to give the alcohol **35** (1.64 g, 71%) as a colorless oil.

R_f=0.18 (pentane/EtOAc, 9:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ=5.58–5.53 (m, 1H, CH), 5.44–5.29 (m, 7H, CH), 3.66 (t, ³J(H,H)=6.5 Hz, 2H, CH₂-O), 2.87–2.80 (m, 6H, CH₂(bis-allylic)), 2.39–2.34 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 2.10–2.04 (m, 2H, CH₂-CH₃), 0.97 (t, ³J(H,H)=6.5 Hz, 3H, CH₃) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ=132.2, 131.3, 128.8, 128.5, 128.1, 128.0, 127.1, 125.8, 62.4, 31.0, 25.9, 25.8, 25.7, 20.7, 14.4 ppm.

2-(3-((2Z,5Z,8Z)-undeca-2,5,8-trien-1-yl)oxiran-2-yl) ethanol : 36

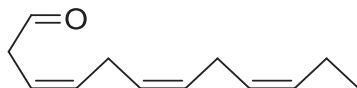
Vanadylacetylacetonate (100 mg, 0.37 mmol) was added to a solution of the homoallylic alcohol **35** (1.64 g, 7.44 mmol) in toluene (60 mL) at 0°C under inert atmosphere. The mixture was stirred at 0°C for 5 min and a solution of *t*BuOOH (5.5 M in decane, 2.7 mL) was added dropwise. The mixture was then stirred at room temperature for 1.5 h and the same amount of *t*BuOOH solution was added. The mixture was stirred 4.5 h and then quenched with an aqueous Na₂S₂O₃ solution (20%, m/m, 100 mL) and 100 mL of water. The aqueous layer was extracted with 3x60 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 9:1 to 7:3) to give the epoxide **36** (1.29 g, 73%) as a pale yellow oil.

$R_f=0.26$ (pentane/EtOAc,6:4) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=5.54\text{--}5.28$ (m, 6H, CH), 3.90–3.82 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.11 (dt, $^3J(\text{H,H})=4.5, 8$ Hz, 1H, $\text{CH}_{(\text{epoxide})}$), 3.01–2.97 (m, 1H, $\text{CH}_{(\text{epoxide})}$), 2.85–2.79 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{bis-allylic})$), 2.46–2.40 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2(\text{a})\text{-CH}_{(\text{epoxide})}$), 2.28–2.22 (m, 1H, $\text{CH-CH}_2(\text{b})\text{-CH}_{(\text{epoxide})}$), 2.10–2.03 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.93–1.85 (m, 1H, $\text{CH}_{(\text{epoxide})}\text{-CH}_2(\text{b})\text{-CH}_2$), 1.77–1.70 (m, 1H, $\text{CH}_{(\text{epoxide})}\text{-CH}_2(\text{a})\text{-CH}_2$), 0.97 (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3H, CH_3) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=132.3, 130.9, 129.0, 127.5, 127.0, 124.1, 60.8, 56.1, 55.1, 30.6, 26.5, 25.9, 25.7, 20.7, 14.4$ ppm.

(3Z,6Z,9Z)-dodeca-3,6,9-trienal : 28



Acetic anhydride (0.74 mL) was added to a solution of the epoxide **36** (200 mg, 0.85 mmol) in acid acetic (7.40 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was then stirred at 45°C for 21 h and the solvents were removed under reduced pressure. The residue, mainly composed of di-acetate derivatives, was immediately used for next step without further purification.

$\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (93 mg, 2.21 mmol) diluted in water (2.50 mL) was added to a solution of the crude residue in MeOH (2.50 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 3 h then cooled at 0°C and carefully quenched with an aqueous solution of HCl(aq. (10%, m/m) to reach pH = 1 and then 10 mL of water. The aqueous layer was extracted with 3x10 mL of Et_2O . The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The crude triol was immediately used for next step without further purification.

Sodium periodate (309 mg, 1.44 mmol) diluted in water (2.30 mL) was added dropwise to a solution of crude triol in MeOH (8.90 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h and then quenched with 15 mL of brine. The aqueous layer was extracted with 3x10 mL of pentane. The combined organic layers were successively washed with 2x20 mL of saturated NaHCO_3 solution, brine and water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The

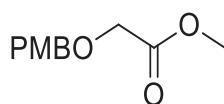
residue was then dissolved in 10 mL of Et₂O and finally filtered through a plug of Celite® and the solvents were removed under reduced pressure to give the crude aldehyde **28** (93 mg, 62%). The product must not be purified on normal phase silica gel because its degradation.

$R_f=0.50$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=9.67$ (t, ³J(H,H)=2Hz, 1H, CHO), 5.71–5.66 (m, 1H, CH), 5.61–5.55 (m, 1H, CH), 5.43–5.26 (m, 4H, CH), 3.24–3.21 (m, 2H, CH₂-CHO), 2.83–2.78 (m, 4H, CH₂(bis-allylic), 2.10–2.03 (m, 2H, CH₂-CH₃), 0.97 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H, CH₃) ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=199.3$, 133.2, 132.2, 129.2, 126.9, 126.8, 118.7, 42.5, 26.0, 25.6, 20.6, 14.3 ppm.

methyl 2-(4-methoxybenzyloxy)ethanoate : **38**



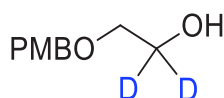
4-Methoxybenzyl alcohol (8.54 g, 61.80 mmol) diluted in dry Et₂O (50 mL) was added dropwise to a suspension of sodium hydride (NaH) (60% m/m dispersion in mineral oil, 148 mg, 6.18 mmol) in dry Et₂O (30 mL) at room temperature under inert atmosphere. After 30 min the mixture was cooled at 0°C and trichloroacetonitrile (9.82 g, 68 mmol) was added dropwise. After complete addition the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature and stirred for 4 h. The solvent was then removed under reduced pressure to give the crude intermediate 4-methoxybenzyl trichloroacetimidate. Methyl glycolate (3.90 g, 43.30 mmol) was then added to a solution of the intermediate in dry CH₂Cl₂ (210 mL) under inert atmosphere. The mixture was cooled at 0°C and (+)-camphor-10-sulfonic acid (1 g, 4.33 mmol) was added. After complete addition the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature and stirred for 1 d. The obtained suspension was filtered through a pad of Celite®. The filtrate was washed with a saturated NaHCO₃ solution (100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure (600 mbar at 40°C). The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O, 9:1 to 6:4) to give the protected alcohol **38** (8.74 g, 96%) as a pale yellow oil.

$R_f=0.44$ (7:3 pentane/Et₂O) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=7.30-7.28$ (m, 2H, CH_{aro}), 6.89–6.87 (m, 2H, CH_{aro}), 4.56 (s, 2H, CH₂(PMB)), 4.07 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, CH₃(PMB)), 3.75 (s, 3H, CH₃) ppm ;

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) : $\delta=171.0$, 159.6, 129.9 (2C), 129.2, 114.0 (2C), 73.1, 66.9, 55.4, 52.0 ppm.

1,1-dideuterio-2-(4-methoxybenzyloxy) ethanol : **39**



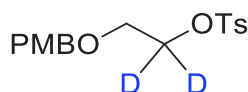
The ester **38** (671 mg, 3.19 mmol) diluted in dry Et₂O (9 mL) was added dropwise to a suspension of lithiumaluminumdeuteride (LiAlD₄) (134 mg, 3.19 mmol) in dry Et₂O (9 mL) at 0°C under inert atmosphere. The mixture was stirred for 2 h at 0°C and then quenched carefully with an aqueous solution of Rochelle salt (1M, 5 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 3x10 mL of Et₂O. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure (600 mbar at 40°C). The residue was purified by chromatography on silica gel (1:1, pentane/Et₂O) to give the deuterated alcohol **39** (535 mg, 91%) as a colorless oil.

$R_f=0.25$ (pentane/EtOAc,1:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=7.28-7.26$ (m, 2H, CH_{aro}), 6.90–6.88 (m, 2H, CH_{aro}), 4.48 (s, 2H, CH₂(PMB)), 3.80 (s, 3H, CH₃(PMB)), 3.55 (s, 2H CH₂) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=159.4$, 130.2, 129.6 (2C), 114.0 (2C), 73.1, 71.1, 61.4 (quint., ¹J(C,D)=21.7 Hz), 55.4 ppm.

1,1-dideuterio-2-(4-methoxybenzyloxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate : **40**



Triethylamine (2.2 mL, 16.30mmol) and tosyl chloride (3.10 g, 16.30mmol) were added under inert atmosphere to a solution of the alcohol **39** (1 g, 5.43 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was stirred for 20 h and then quenched with CH₂Cl₂ (120 mL)

and saturated NaHCO₃ solution (20 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with CH₂Cl₂ (80 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O,7:3 to 1:1) to give the activated alcohol **40** (1.77 g, 97%) as a white solid.

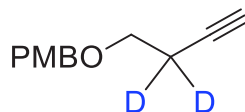
$R_f=0.40$ (pentane/EtOAc,7:3) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=7.80-7.77$ (m, 2H, CH_{aro}(Tosyl)), 7.32–7.30 (m, 2H, CH_{aro}(Tosyl)), 7.20–7.17 (m, 2H, CH_{aro}(PMB)), 6.87–6.84(m, 2H, CH_{aro}(PMB)), 4.41 (s, 2H, CH₂(PMB)), 3.80 (s, 3H, CH₃(PMB)), 3.62 (s, 2H, CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃(Tosyl)) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=159.4, 144.9, 133.1, 129.9$ (2C), 129.7, 129.5 (2C), 128.1 (2C), 113.9 (2C), 73.0, 68.8 (quint., ¹J(C,D)=22.7 Hz), 67.1, 55.4, 21.8 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for C₁₇H₁₈D₂O₅S : 338.1157 [M]⁺* ; found : 338.1157.

1-((but-3-yn-1,1-dideuterio-1-yloxy)methyl)-4-methoxybenzene : **31**



The activated alcohol **40** (664 mg, 1.96 mmol) diluted in dry DMSO (4 mL) was added dropwise to a suspension of Lithium acetylide ethylenediamine complex (LiCCH.eda) (90% m/m, 300 mg, 2.95 mmol) in dry DMSO (2 mL) at 10°C under inert atmosphere. The mixture was stirred for 15 min at 10°C and then allowed to warm up at room temperature. The mixture was stirred for 4 h then quenched carefully with CH₂Cl₂ (20 mL), water (10 mL) and brine (10 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 4x10 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure (500 mbar at 40°C). The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O,95:5) to give the deuterated alkyne **31** (290 mg, 77 %) as a pale yellow oil.

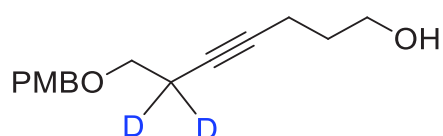
$R_f=0.30$ (pentane/Et₂O,9:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta=7.28-7.26$ (m, 2H, CH_{aro}), 6.89–6.87 (m, 2H, CH_{aro}), 4.49 (s, 2H, CH₂(PMB)), 3.80 (s, 3H, CH₃(PMB)), 3.56 (s, 2H, CH₂), 1.99 (s, 1H, CH) ppm ;

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=159.4, 130.2, 129.5$ (2C), 113.9 (2C), $81.4, 72.8, 69.4, 67.8, 55.4, 19.4$ (quint., $^1J(\text{C},\text{D}) = 20.3$ Hz) ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{D}_2\text{O}_2$: 192.1119 [M]⁺ ; found : 192.1118.

6,6-dideutero-7-(4-methoxybenzyloxy)hept-4-yn-1-ol : **41**



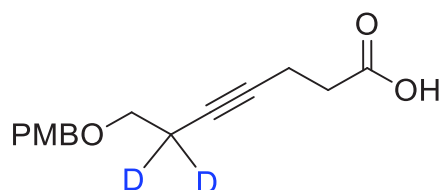
A solution of *n*BuLi (1.6 min hexane, 1.64 mL) was slowly added to a solution of alkyne **31** (500 mg, 2.06 mmol) in dry THF (3 mL) at -78°C under inert atmosphere. The mixture was stirred at -78°C for 30 min. Then a solution of oxetane (85 μL , 1.30 mmol) in dry THF (2.50 mL) was slowly added to the mixture, followed by the slow addition of $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (320 μL , 2.52 mmol). The reaction was stirred at -78°C for 30 min then quenched with EtOAc (10 mL), saturated NH_4Cl solution (5 mL) and brine (5 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 2x10 mL of EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue obtained was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O, 9:1 to 5:5) to give the deuterated alcohol **41** (258 mg, 79%) as a pale yellow oil.

$R_f=0.49$ (pentane/EtOAc, 1:1) ;

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=7.28\text{--}7.25$ (m, 2H, CH_{aro}), $6.89\text{--}6.86$ (m, 2H, CH_{aro}), 4.47 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{PMB})$), 3.80 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{PMB})$), $3.75\text{--}3.72$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.51 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.27 (t, $^3J(\text{H},\text{H})=6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), $1.75\text{--}1.69$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$) ppm ;

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=159.3, 130.3, 129.5$ (2C), 113.9 (2C), $80.7, 77.6, 72.7, 68.4, 61.9, 55.4, 31.5, 19.7$ (quint., $^1J(\text{C},\text{D})=19.9$ Hz), 15.5 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{D}_2\text{O}_3$: 250,1538[M]⁺ ; found : 250,1530.

6,6-dideutero-7-(4-methoxybenzyloxy)hept-4-ynoic acid : 42

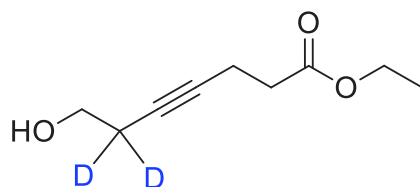
A Jones solution (2.17 M, 0.28 mL) was added dropwise to a solution of the alcohol **41** (100 mg, 0.40 mmol) in acetone (6 mL) at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 1 h. The reaction was then quenched with isopropanol (0.50 mL). The suspension is filtered through a pad of Celite® and the green solid was washed with EtOAc (15 mL). The filtrate was washed with acidified water (5 mL) and acidified brine (10 mL) (pH=1), dried over Na₂SO₄, filtered and then the solvents were removed under reduced pressure. The residue obtained was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 9:1 to 6:4) to give the acid **42** (100 mg, 94%) as a white solid.

$R_f=0.20$ (pentane/EtOAc, 1:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=7.28-7.25$ (m, 2H, CH_{aro}), 6.89–6.86 (m, 2H, CH_{aro}), 4.47 (s, 2H, CH₂(PMB)), 3.80 (s, 3H, CH₃(PMB)), 3.51 (s, 2H, CH₂-O), 2.60–2.42 (m, 4H, CH₂) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=177.9$, 159.3, 130.3, 129.5 (2C), 113.9 (2C), 79.1, 78.0, 72.7, 68.3, 55.4, 33.8, 19.7 (quint., ¹J(C,D)=19.7 Hz), 14.6 ppm ;

HRMS (ESI⁻-TOF) : m/z : calcd for C₁₅H₁₅D₂O₄ : 263.1252 [M-H]⁻ ; found : 263.1250.

ethyl 6,6-dideutero-7-hydroxyhept-4-ynoate : 44

The acid **42** (100 mg, 0.38 mmol) was diluted in EtOH (7 mL) then 350 μ L of concentrated H₂SO₄ were added. The mixture was stirred at 40°C for 3 d under inert atmosphere. The reaction was quenched with a saturated NaHCO₃ solution (10 mL) and water (10 mL). The mixture was extracted with 4x10 mL of Et₂O. The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was

purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O,7:3 to 1:1) to give the ester **44** (56mg, 86%) as a pale yellow oil.

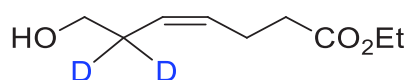
$R_f=0.57$ (pentane/EtOAc,1:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=4.13$ (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH₂(ester)), 3.64 (s, 2H, CH₂-O), 2.50–2.43 (m, 4H, CH₂), 1.24 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H CH₃(ester)) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=172.4$, 80.6, 77.7, 61.2, 60.8, 34.0, 22.6 (quint, ¹J(C,D)=19.9Hz), 14.9, 14.3 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for C₉H₁₃D₂O₃ : 173.1147 [M+H]⁺ ; found : 173.1147.

(4Z)-ethyl 6,6-dideutero-7-hydroxyhept-4-enoate : 45

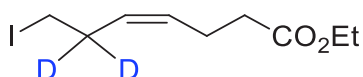


A solution of NaBH₄ in EtOH (0.50 M, 1.1 mL) was added dropwise to a solution of Ni(OAc)₂.4H₂O (70 mg, 0.28 mmol) in EtOH (25 mL) at 0°C under H₂ atmosphere. The mixture was stirred at 0°C for 15 min and ethylene diamine (0.22 mL, 3.35 mmol) was added. After further 15 min at 0°C, the deuterated alkyne **44** (384 mg, 2.23 mmol) diluted in EtOH (15 mL) was added. Before and after each addition, three cycle of vacuum/H₂ were realized. The reaction was stirred for 30 min at 0°C under H₂ atmosphere and then quenched with saturated NH₄Cl solution (30 mL) and brine (30 mL). The reaction mixture was extracted with 3x50 mL of Et₂O. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc,6:4) to give the alkene **45** (371 mg, 90%) as a pale yellow oil (+ 5% of over-reduced by-product).

$R_f=0.30$ (pentane/EtOAc,7:3) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=5.50$ –5.45 (m, 1H, CH-CH₂), 5.41 (d, ³J(H,H)=11Hz, 1H, CH-CD₂), 4.10 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH₂(ester)), 3.61 (s, 2H, CH₂-O), 2.40–2.33 (m, 4H, CH₂), 1.22 (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H, CH₃(ester)) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=173.4$, 130.8, 127.1, 62.0, 60.5, 34.1, 30.2 (quint., ¹J(C,D)=19.2 Hz), 22.8, 14.3 ppm.

(4Z)-ethyl 6,6-dideutero-7-iodohept-4-enoate : 46

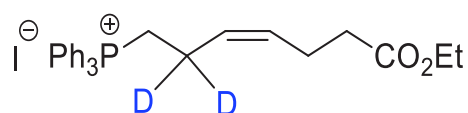
Imidazole (348 mg, 5.11 mmol) and triphenylphosphine (671 mg, 2.56 mmol) were added to a solution of I₂ (650 mg, 2.56 mmol) in CH₂Cl₂ (14 mL) under inert atmosphere. The mixture was then cooled at 0°C and the alcohol **45** (371 mg, 2.13 mmol) diluted in CH₂Cl₂ (14 mL) was added. After complete addition the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature and stirred for 2 h. The reaction was then quenched with saturated Na₂S₂O₃ solution (20 mL), water (20 mL) and CH₂Cl₂ (15 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 20 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O, 95:5) to give the iodide derivative **46** (538 mg, 89%) as a pale yellow oil.

*R*_f=0.48 (pentane/EtOAc, 9:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ=5.53–5.48 (m, 1H, CH-CH₂), 5.37 (d, ³J(H,H)=10.5 Hz, 1H, CH-CD₂), 4.12 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH₂(ester)), 3.12 (s, 2H, CH₂-I), 2.38–2.33 (m, 4H, CH₂), 1.25 (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H, CH₃(ester)) ppm ;

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) : δ=173.1, 130.3, 129.3, 60.4, 34.2, 30.8 (quint., ¹J(C,D)=19.7 Hz), 23.1, 14.4, 5.1 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : *m/z* : calcd for C₉H₁₄D₂IO₂ : 285.0321 [M+H]⁺ ; found : 285.0317.

(3Z)-(2,2-dideutero-7-ethoxy-7-oxohept-3-en-1-yl)triphenylphosphonium iodide : 29

Triphenylphosphine (595 mg, 2.27 mmol) was added to a solution of the iodide derivative **46** (538 mg, 1.89 mmol) in acetonitrile (15 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was then stirred at reflux for 20 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 90:10) to give the phosphonium salt **29** (1.02 g, 98%) as a clear wax.

$R_f=0.18$ (CH₂Cl₂/MeOH,7:3) ;

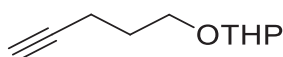
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=7.83-7.68$ (m, 15H, CH_{aro}), 5.64 (d, ³J(H,H)=11Hz, 1H, CH-CD₂), 5.36-5.31 (m, 1H, CH-CH₂), 4.04 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH_{2(ester)}), 3.65 (d, ²J(H,P)=12 Hz, 2H, CH₂-P), 2.27 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 2H, CH₂), 2.13-2.09 (m, 2H, CH₂-CH), 1.19 (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H, CH_{3(ester)}) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=173.1$, 135.3(d, ⁴J(C,P)=3 Hz, 3C), 133.8 (d, ³J(C,P)=10.2 Hz, 6C), 130.7 (d, ²J(C,P)=12.4 Hz, 6C), 130.5 (d, ⁴J(C,P)= 1.4 Hz), 127.3 (d, ³J(C,P)= 15.8 Hz), 118.0 (d, ¹J(C,P)= 85.9 Hz, 3C), 60.5, 33.5, 23.0 (d, ¹J(C,P)= 48.5 Hz), 22.7, 20.1-19.5 (m), 14.3 ppm ;

³¹P NMR (120 MHz, CDCl₃) : $\delta=23.8$ ppm ;

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z : calcd for C₂₇H₂₈D₂O₂P : 419.2109 [M-I]⁺ ; found : 419.2110.

2-(pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran : 48

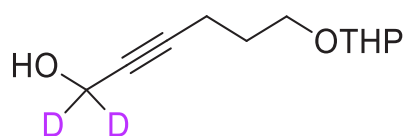


2,4-Dihydropyran (DHP) (5.78 g, 68.80 mmol) diluted in CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise under inert atmosphere to a solution of pent-4-yn-1-ol (4.82 g, 57.30mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (PTSA) monohydrate (272 mg, 1.43 mmol) in CH₂Cl₂ (60 mL) at room temperature. The reaction was stirred for 20h and then quenched with a saturated NaHCO₃ solution (50 mL). The mixture was stirred for 15 min and then the layers were separated. The aqueous layer was extracted with Et₂O (50 mL). The combined organic layers were washed with 2x50 mL of a saturated NaHCO₃ solution and 2x50 mL of brine, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure (600 mbar at 40°C). The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O,95:5) to give the protected alcohol **48** (8.77 g, 91%) as a colorless oil.

$R_f=0.22$ (pentane/Et₂O,95:5) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=4.58$ (dd, ³J(H,H)=4.1Hz, ³J(H,H)=3.1Hz, 1H, CH_(THP)), 3.87-3.79 (m, 2H, CH_{2(a)}-O_(THP) and CH_{2(a)}-O), 3.51-3.44 (m, 2H, CH_{2(b)}-O_(THP) and CH_{2(b)}-O), 2.29 (tdd, ³J(H,H)=6.6 Hz, ³J(H,H)=2.6 Hz, ³J(H,H)=1.6 Hz, 2H, CH₂-C≡C), 1.93 (t, ³J(H,H)=2.6 Hz, 1H, C≡CH), 1.82-1.76 (m, 3H, CH_{2(a)}-CH_(THP) and CH₂-CH₂-CH₂), 1.71-1.66 (m, 1H, CH_{2(b)}-CH_(THP)), 1.58-1.48 (m, 4H, CH_{2(THP)}) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=98.9$, 84.1, 68.5, 65.8, 62.3, 30.7, 28.8, 25.6, 19.6, 15.4 ppm.

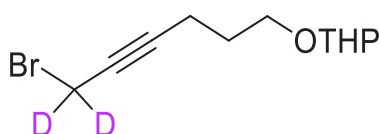
1,1-dideuterio-6-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)hex-2-yn-1-ol : 49

A commercial solution of ethyl magnesium bromide (0.90 M in THF, 13.2 mL) was added dropwise under inert atmosphere to a solution of the alkyne **48** (1 g, 5.94 mmol) in dry THF (6 mL) at room temperature. The mixture was then stirred at reflux for 1.5 h. The mixture was cooled at 0°C and deuterated *para*formaldehyde (CD₂O)_n (286 mg, 8.90 mmol) was added. The mixture was then stirred at reflux for 15 h. The reaction was cooled at 0°C and quenched carefully with Et₂O (20 mL) and saturated NaHCO₃ solution (10 mL). The obtained suspension was filtered through a pad of Celite® and the solid was washed with 2x20 mL of Et₂O. The layers were separated and the aqueous one was extracted with 3x20 mL of Et₂O. The combined organic layers were washed with 2x10 mL of brine, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O, 7:3 to 5:5) to give the deuterated alcohol **49** (1.02 g, 86%) as a colorless oil.

$R_f=0.16$ (pentane/Et₂O, 7:3) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=4.57$ (dd, ³J(H,H)=4.2 Hz, ³J(H,H)= 3 Hz, 1H, CH_(THP)), 3.86–3.77 (m, 2H, CH_{2(a)}-O_(THP) and CH_{2(a)}-O), 3.51–3.43 (m, 2H, CH_{2(b)}-O_(THP) and CH_{2(b)}-O), 2.31 (t, ³J(H,H)=7.1Hz, 2H, CH₂-C≡C), 1.82–1.74 (m, 3H, CH_{2(a)}-CH_(THP) and CH₂-CH₂-CH₂), 1.71–1.66 (m, 1H, CH_{2(b)}-CH_(THP)), 1.58–1.47 (m, 4H, CH_{2(THP)}) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=98.9, 85.5, 78.9, 66.0, 62.3, 55.7$ (quint., ¹J(C,D)=22.3 Hz), 30.7, 28.8, 25.5, 19.5, 15.7 ppm.

2-(6-bromo-6,6-dideuteriohex-4-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran : 50

Triphenylphosphine (PPh₃) (13.80 g, 52.60 mmol) diluted in CH₂Cl₂ (50 mL) was added dropwise under inert atmosphere to a solution of tetrabromomethane (CBr₄) (8.72 g, 26.30 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) at -40°C. Then the deuterated alcohol **49** (5.26 g, 26.30 mmol) and imidazole (3.58 g, 52.60

mmol) both in CH_2Cl_2 (50 mL) were added dropwise in the mixture at -40°C . The reaction was stirred at -40°C during 2 h then quenched with a saturated NaHCO_3 solution (25 mL) and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aqueous solution (10% w/w, 25 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 2x50 mL of CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with 2x100 mL of water, dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was then triturated in Et_2O (50 mL) and the suspension is filtered through a pad of Celite® to remove most of the white solid (triphenylphosphine oxide) which was washed with 3x50 mL of Et_2O . The filtrate then was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O , 9:1 to 7:3) to give the deuterated bromide derivative **50** (6.92 g, 60%) as a colorless oil.

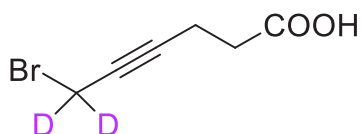
$R_f = 0.39$ (pentane/ EtOAc , 9:1) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta = 4.59$ (m, 1H, $\text{CH}_{(\text{THP})}$), 3.88–3.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}_{(\text{THP})}$ and $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.53–3.43 (m, 2H, $\text{CH}_{2(\text{b})}\text{-O}_{(\text{THP})}$ and $\text{CH}_{2(\text{b})}\text{-O}$), 2.37 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.1\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 1.84–1.77 (m, 3H, $\text{CH}_{2(\text{a})}\text{-CH}_{(\text{THP})}$ and $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.73–1.70 (m, 1H, $\text{CH}_{2(\text{b})}\text{-CH}_{(\text{THP})}$), 1.60–1.50 (m, 4H, $\text{CH}_{2(\text{THP})}$) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) : $\delta = 98.9, 87.6, 75.5, 65.9, 62.3, 30.7, 28.6, 25.6, 19.6, 16.0, 15.5$ (quint., $^1J(\text{C,D}) = 24.3\text{ Hz}$) ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{D}_2\text{BrO}_2$: 263,0616 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found : 263,0616.

6-bromo-6,6-dideuteriohex-4-ynoic acid : **51**



A Jones solution (2.17 M, 35 mL) was added dropwise to a solution of the deuterated bromide derivative **50** (3.95 g, 15 mmol) in acetone (40 mL) at 0°C . The mixture was stirred at 0°C for 30 min. The reaction was then quenched with isopropanol (45 mL) and Et_2O (200 mL). The suspension is filtered through a pad of Celite® and the green solid was washed with 4x100 mL of Et_2O . The filtrate was washed with 2x100 mL of acidified brine (pH=1), dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue obtained was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O , 8:2 to 6:4) to give the acid **51** (2.51 g, 87%) as a white solid.

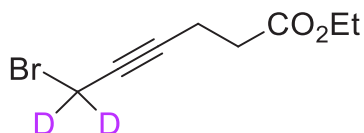
$R_f=0.26$ (pentane/EtOAc,1:1) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=2.62\text{--}2.55$ (m, 4H, CH_2) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=178.2, 85.5, 76.3, 33.1, 14.7$ ppm (signal of CD_2 is not visible) ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_6\text{H}_6\text{D}_2\text{BrO}_2$: 192,9833 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found : 192,9836.

Ethyl 6-bromo-6,6-dideuteriohex-4-ynoate : **32**



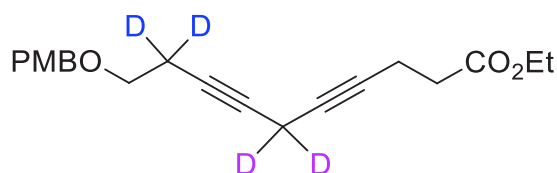
The acid **51** (1.93 g, 9.48 mmol) was diluted in EtOH (80 mL) then 250 μL of concentrated H_2SO_4 were added. The mixture was stirred at reflux for 1 d. The reaction was quenched with a saturated NaHCO_3 solution (20 mL). The aqueous layer was extracted with 4x100 mL of pentane/ Et_2O (1:1). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O ,95:5) to give the deuterated ester **32** (2.07 g, 90%) as a pale yellow oil.

$R_f=0.47$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=4.14$ (q, 4H, $^3J(\text{H,H})=7.1\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2(\text{ester})$), 2.56–2.48 (m, 4H, CH_2), 1.25 (t, $^3J(\text{H,H})=7.1\text{Hz}$, 3H, CH_3) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=171.8, 86.0, 76.0, 60.8, 33.3, 15.0, 14.3$ ppm (signal of CD_2 is absent).

Ethyl 6,6,9,9-tetradeutero-10-(4-methoxybenzyloxy)deca-4,7-diynoate : **52**



The terminal alkyne **31** (1.63 g, 8.50 mmol) diluted in DMF (40 mL) was added to a solution of CuI (3.40 g, 17.80 mmol), NaI (2.67 g, 17.80 mmol) and K_2CO_3 (3.52 g, 25.50 mmol) in DMF (25 mL) at 20°C. The bromide derivative **32** (1.88 g, 8.50 mmol) diluted in DMF (30 mL) was immediately added to the mixture at 20°C. The mixture was stirred at 20°C for 15 h and then quenched with

saturated NH_4Cl solution (100 mL) and brine (100 mL). The aqueous layer was extracted with 3x200 mL of EtOAc. The combined organic layers were washed with 2x50 mL of brine and water (50 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O ,9:1) to give the coupling product **52** (2.12 g, 75%) as a pale yellow oil.

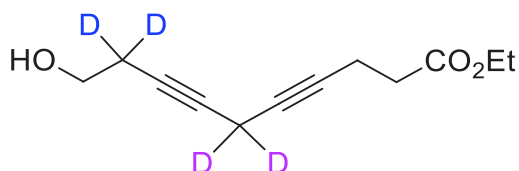
$R_f=0.20$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=7.27\text{--}7.24$ (m, 2H, CH_{aro}), 6.88–6.86 (m, 2H, CH_{aro}), 4.47 (s, 2H, $\text{CH}_2(\text{PMB})$), 4.14 (q, $^3J(\text{H,H})=7.1\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2(\text{ester})$), 3.79 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{PMB})$), 3.52 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.51–2.45 (m, 4H, CH_2), 1.25 (t, $^3J(\text{H,H})=7.1\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}_3(\text{ester})$) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=172.1$, 159.3, 130.3, 129.4 (2C), 113.9 (2C), 78.7, 77.4, 75.4, 75.1, 72.7, 68.1, 60.7, 55.4, 33.7, 19.7 (quint., $^1J(\text{C,D})=20.5$ Hz), 14.8, 14.3, 9.4 (quint., $^1J(\text{C,D})=20.3$ Hz) ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{D}_4\text{O}_4$: 332.1926 $[\text{M}]^{+\bullet}$; found : 332.1922.

Ethyl 6,6,9,9-tetradeutero-10-hydroxydeca-4,7-diynoate : **53**



2,3-Dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (DDQ) (1.88 g, 8.26 mmol) was added to a solution of the protected alcohol **52** (1.92 g, 5.78 mmol) in $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ (10:1, v/v, 88 mL) at 0°C. The mixture is stirred at 0°C for 4 h and then quenched with saturated NaHCO_3 solution (200 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 3x100 mL of EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O ,6:4) to give the deprotected alcohol **53** (1.14 g, 94%) as a pale yellow oil.

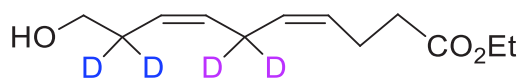
$R_f=0.43$ (pentane/EtOAc,1:1) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=4.15$ (q, $^3J(\text{H,H})=7.1\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2(\text{ester})$), 3.69 (d, $^3J(\text{H,H})=6.2\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.52–2.45 (m, 4H, CH_2), 1.85 (t, $^3J(\text{H,H})=6.2\text{ Hz}$, 1H, OH), 1.26 (t, $^3J(\text{H,H})=7.1\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}_3(\text{ester})$) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=172.2$, 78.8, 77.4, 76.6, 75.0, 61.1, 60.7, 33.7, 22.7 (quint., $^1J(\text{C,D})=20\text{ Hz}$), 14.8, 14.3, 9.5 (quint., $^1J(\text{C,D})=20.5\text{ Hz}$) ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{D}_4\text{O}_3$: 213.1429 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found : 213.1430.

(4Z, 7Z)-ethyl 6,6,9,9-tetradeutero-10-hydroxydeca-4,7-dienoate : 54



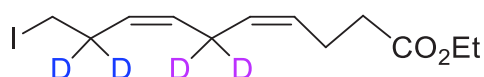
A solution of NaBH_4 in EtOH (0.5 M, 0.56 mL) was added dropwise to a solution of $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (38 mg, 0.15 mmol) in EtOH (25 mL) at 0°C under H_2 atmosphere. The mixture was stirred at 0°C for 15 min and ethylene diamine solution in EtOH (0.5 M, 2.82 mL) was added. After further 15 min at 0°C , the diyne **53** (100 mg, 0.47 mmol) diluted in EtOH (15 mL) was added. Before and after each addition of reagent, three cycle of vacuum/ H_2 were realized. The reaction was stirred for 30 min at 0°C under H_2 atmosphere and then quenched with saturated NH_4Cl solution (15 mL) and brine (20 mL). The aqueous layer was extracted with 3x30 mL of EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O ,6:4) to give the diene **54** (91 mg, 90%) as a pale yellow oil (with 13% of over-reduced by-product).

$R_f=0.24$ (pentane/EtOAc,6:4) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=5.52$ (d, $^3J(\text{H,H})=10.5\text{ Hz}$, 1H, $\text{CD}_2\text{-CH=CH-CD}_2$), 5.41-5.34 (m, 3H, CH), 4.13 (q, $^3J(\text{H,H})=7\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2(\text{ester})$), 3.64 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.42–2.34 (m, 4H, CH_2), 1.25 (t, $^3J(\text{H,H})=7\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3(\text{ester})$) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=173.3$, 130.4, 129.0, 127.9, 125.8, 61.9, 60.4, 34.2, 30.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.2\text{ Hz}$), 25.7-24.9 (m), 22.8, 14.2 ppm ;

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{D}_4\text{O}_3$: 217.1742 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found : 217.1741.

(4Z, 7Z)-ethyl 6,6,9,9-tetradeutero-10-iododeca-4,7-dienoate : 47

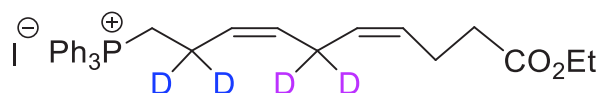
Imidazole (429 mg, 6.30 mmol) and triphenylphosphine (826 mg, 3.15 mmol) were added to a solution of I₂ (800 mg, 3.15 mmol) in CH₂Cl₂ (7 mL) under inert atmosphere. The mixture was then cool at 0°C and the alcohol **54** (447 mg, 2.10 mmol) diluted in CH₂Cl₂ (7 mL) was added. After complete addition the reaction mixture was allowed to warm up at room temperature and stirred for 4 h. The reaction was then quenched with saturated Na₂S₂O₃ solution (20 mL), water (20 mL) and CH₂Cl₂ (15 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 15 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O,95:5) to give the iodide derivative **47** (634 mg, 93%) as a pale yellow oil.

$R_f=0.55$ (pentane/EtOAc, 95:5) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=5.49$ (d, ³J(H,H)=11Hz, 1H, CD₂-CH-CH-CD₂), 5.38-5.33 (m, 3H, CH), 4.13 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH_{2(ester)}), 3.12 (s, 2H, CH₂-I), 2.41–2.33 (m, 4H, CH₂), 1.25 (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H, CH_{3(ester)}) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=173.2$, 130.4, 128.8, 128.4 (2C), 60.5, 34.3, 30.9 (quint., ¹J(C,D)=19.7 Hz), 25.3(quint., ¹J(C,D)=19.1Hz), 23.0, 14.4, 5.1 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for C₁₂H₁₆D₂IO₂ : 327.0759 [M+H]⁺ ; found : 327.0762.

(3Z,6Z)-(2,2,5,5-tetradeutero-10-ethoxy-10-oxodeca-3,6-dien-1-yl)triphenylphosphonium iodide : 30

Triphenylphosphine (583 mg, 2.22 mmol) was added to a solution of the iodide derivative **47** (604 mg, 1.85 mmol) in acetonitrile (12 mL) at room temperature under inert atmosphere. The mixture was then stirred at reflux for 17 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH,98:2 to 9:1) to give the phosphonium salt **30** (903 mg, quant.%) as a clear wax.

$R_f=0.21$ (CH₂Cl₂/MeOH,95:5) ;

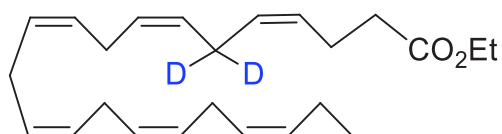
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=7.83-7.68$ (m, 15H, CH_{aro}), 5.57 (d, ³J(H,H)= 10.5 Hz, 1H, P-CH₂-CD₂-CH), 5.33 (d, ³J(H,H)=11Hz, 1H, P-CH₂-CD₂-CH=CH), 5.28-5.23 (m, 1H, CH=CH₂), 5.19 (d, ³J(H,H)=11Hz, 1H, CH=CH-CH₂), 4.03 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH_{2(ester)}), 3.66 (d, ²J(H,P)=12 Hz, 2H, P-CH₂), 2.26-2.14 (m, 4H, CH₂), 1.18 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H, CH_{3(ester)}) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : $\delta=173.0$, 135.2 (d, ⁴J(C,P)=1.8 Hz, 3C), 133.6 (d, ³J(C,P)=9.9 Hz, 6C), 130.6 (d, ²J(C,P)=12.4 Hz, 6C), 130.4, 128.4, 128.1, 126.2 (d, ³J(C,P)= 15 Hz), 117.8 (d, ¹J(C,P)=86 Hz, 3C), 60.3, 33.9, 24.9 (quint., ¹J(C,D)=19.2 Hz), 23.0 (d, ¹J(C,P)=48.7 Hz), 22.7, 20.0-19.5 (m), 14.3 ppm ;

³¹P NMR (120 MHz, CDCl₃) : $\delta=24.1$ ppm ;

HRMS (ESI⁺-TOF) : m/z : calcd for C₃₀H₃₀D₄O₂P : 461.2547 [M-I]⁺ ; found : 461.2549.

(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-ethyl 6,6-dideuterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate : 56



A solution of NaHMDS (2.0 M in THF, 0.50 mL) was added dropwise to a solution of the deuterated phosphonium salt **29** (548 mg, 1 mmol) in THF (9 mL) at -50°C under inert atmosphere. The reaction was then stirred at -20°C for 30 min and cooled at -78°C. The aldehyde **27** (371 mg, 1.7 mmol) in THF (9 mL) at -78°C was added through a cannula to the orange mixture. The reaction was allowed to reach room temperature in 1.5 h and then stirred for 21 h. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl solution (30 mL). The aqueous layer was extracted with 4x20 mL of pentane/EtOAc (8:2). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/Et₂O,98:2) to give the deuterated DHA ethyl ester **56** (143 mg, 40%) as a yellow oil.

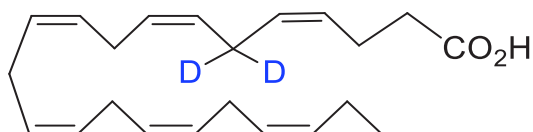
$R_f=0.51$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : $\delta=5.40-5.29$ (m, 12H, CH), 4.12 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H, CH_{2(ester)}), 2.85-2.79 (m, 8H, CH_{2(bis-allylic)}), 2.40-2.33 (m, 4H, CH₂-CH₂-CO), 2.08-2.04 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.25 (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H, CH_{3(ester)}), 0.96 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H, CH₃) ppm ;

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ =173.2, 132.1, 129.2, 128.6, 128.3 (2C), 128.3, 128.2, 128.2, 128.1 (2C), 128.0, 127.1, 60.4, 34.4, 25.7 (2C), 25.7, 25.6, 25.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.4$ Hz), 22.9, 20.7, 14.4, 14.3 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{D}_2\text{O}_2$: 359.2919 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found : 359.2918.

(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-6,6-dideuterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid: (6,6-D₂)-DHA (22)



A solution of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (109 mg, 2.60 mmol) in 1 mL of water was added to a solution of the ester **56** (143 mg, 0.40 mmol) in 1 mL of EtOH under inert atmosphere. The mixture was heated at 65°C for 1 h and additional $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (50 mg, 1.20 mmol) was added. After 7 h at 65°C the reaction was cooled at room temperature and quenched with water (10 mL) and HCl(aq. (1.0 M) until pH = 2. The aqueous layer was extracted with 3x10 mL of pentane/EtOAc (6:4). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 9:1 to 7:3) to give the (6,6-D₂)-DHA (**22**) (98 mg, 77%) as a yellow oil. A part of this product was purified by preparative HPLC to remove traces of over reduced by-products (column Waters Symmetry PrepTM (C_{18}) 7 μm (7.8x300mm) ; H_2O /acetonitrile, 17:83 isocratic ; detection 217 nm) to give pure (6,6-D₂)-DHA (**22**).

$R_f=0.50$ (pentane/EtOAc, 6:4) ;

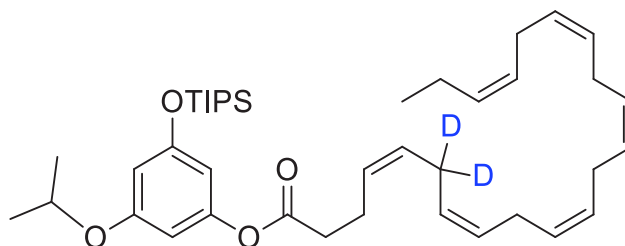
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ =5.43–5.29 (m, 12H, CH), 2.86–2.80(m, 8H, CH_2 (bis-allylic), 2.43–2.38 (m, 4H, $\text{HC}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CO}$), 2.10–2.04 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$), 0.97 (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3H, CH_3) ppm ;

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ =179.5, 132.2, 129.6, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.2, 128.2, 128.0 (2C), 127.7, 127.1, 34.1, 25.8 (2C), 25.7, 25.7, 25.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.2$ Hz), 22.6, 20.7, 14.4 ppm ;

HRMS (ESI⁻-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{D}_2\text{O}_2$: 329.2450 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found : 329.2446 ;

HPLC : column Bridge[®] BEH (C_{18}) 2.5 μm (2.1 x 100 mm) ; H_2O /MeOH, 20:80 isocratic ; PDA detection (200-800 nm) : $t_R= 6.36$ min.

(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-6,6-Dideutero-3-isopropoxy-5-(triisopropylsilyloxy)phenyldocos-4,7,10,13,16,19-hexaenoate : 58



5-Isopropoxy-1,3-bis(triisopropylsilyloxy)benzene **25** (75 mg, 0.23 mmol) dissolved in dry CH_2Cl_2 (3.7 mL) was added to a solution of (6,6- D_2)-DHA n°22 (68 mg, 0.21 mmol) in dry CH_2Cl_2 (3.7 mL) at room temperature under inert atmosphere. Then DCC (47 mg, 0.23 mmol) and DMAP (2 mg, 0.02 mmol) were added to the mixture. The reaction was stirred for 2 h and then additional DCC (22 mg, 0.1 mmol) and DMAP (2 mg, 0.02 mmol) were added. After 4 h the reaction was cooled at 4°C for 1 h to induce the crystallization of dicyclohexylurea. The mixture was then filtered to remove the solid and the solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 99:1) to give the coupled product **58** (111 mg, 83%) as a pale oil.

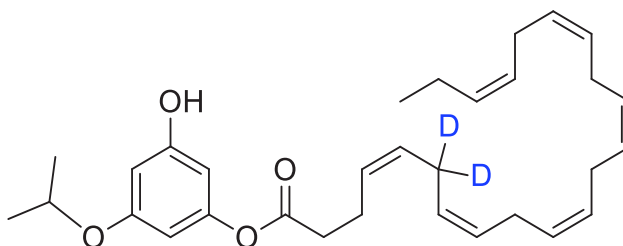
$R_f=0.55$ (pentane/EtOAc, 95:5) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=6.28\text{--}6.27$ (m, 1H, CH_{Ar}), $6.23\text{--}6.22$ (m, 1H, CH_{Ar}), $6.21\text{--}6.20$ (m, 1H, CH_{Ar}), $5.47\text{--}5.28$ (m, 12H, $\text{CH}_{\text{vinyllic}}$), 4.44 (septuplet, $^3J(\text{H,H})=6\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}_{\text{O}i\text{Pr}}$), $2.86\text{--}2.80$ (m, 8H, CH_2 (bis-allylic)), $2.60\text{--}2.57$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{--CO}$), $2.51\text{--}2.48$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CO}$), $2.10\text{--}2.04$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 1.30 (d, $^3J(\text{H,H})=6\text{Hz}$, 6H, $\text{CH}_3(\text{O}i\text{Pr})$), $1.27\text{--}1.21$ (m, 3H, CH_{TIPS}), 1.09 (d, $^3J(\text{H,H})=7.5\text{Hz}$, 18H, $\text{CH}_3(\text{TIPS})$), 0.97 (t, $^3J(\text{H,H})=8.5\text{Hz}$, 3H, CH_3) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=171.4$, 159.3, 157.5, 152.1, 132.1, 129.6, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.2, 128.2, 128.0, 128.0, 127.8, 127.1, 106.1, 105.5, 102.4, 70.3, 34.4, 25.8, 25.8, 25.7, 25.7, 25.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.2$ Hz), 22.9, 22.1 (2C), 20.7, 18.0 (6C), 14.4, 12.7 (3C) ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{D}_2\text{O}_4\text{Si}$: 637.4621 [M + H]⁺ ; found : 637.4617.

**(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-6,6-Dideutero-3-isopropoxyphenyldocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate :
Phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D₂)-DHA (20)**



Et₃N.3HF (83 μ L, 0.51 mmol) was added dropwise to a solution of the coupled product **58** (111 mg, 0.17 mmol) in dry THF (7 mL) at room temperature under inert atmosphere. Additional Et₃N.3HF (55 μ L, 0.34 mmol) was added after 2.5 h and 5.5 h of reaction. After 7 h the reaction was quenched with EtOAc (20 mL) and H₂O (20 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 2 \times 10 mL of EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvents removed under reduce pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 95:5 to 85:15) to give the residue which was then purified by preparative HPLC (column Waters SymmetryPrep™ (C₁₈) 7 μ m (7.8 \times 300mm) ; H₂O/acetonitrile, 1:9 isocratic ; detection 214 nm) to give the Phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D₂)-DHA 20 (60 mg, 71%) as a pale oil.

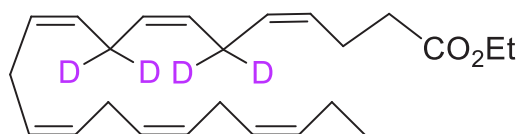
$R_f=0.25$ (pentane/EtOAc, 85:15).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ =6.23–6.22 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.20–6.17 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.14–6.13 (m, 1H, CH_{Ar}), 5.47–5.30 (m, 12H, CH_{vinyl}), 4.44 (septuplet, ³J(H,H)=6Hz, 1H, CH_{OiPr}), 2.85–2.80 (m, 8H, CH₂(bis-allylic), 2.60–2.58 (m, 2H, CH₂-CO), 2.52–2.48 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.10–2.04 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.30 (d, ³J(H,H)=6Hz, 6H, CH₃(_{OiPr})), 0.97 (t, ³J(H,H) = 7.5Hz, 3H, CH₃) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ = 172.1, 159.7, 157.4, 152.2, 132.3, 129.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.5, 128.3, 128.3, 128.1 (2C), 127.7, 127.2, 101.9, 101.8, 101.2, 70.5, 34.5, 25.9, 25.8, 25.8, 25.7, 25.3 (quint., ¹J(C,D)=19.1Hz), 24.9, 23.0, 22.2, 20.8, 14.5 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for C₃₁H₄₁D₂O₄ : 481.3287 [M + H]⁺ ; found : 481.3293 ;

HPLC : column Bridge® BEH (C₁₈) 2.5 μ m (2.1 x 100 mm) ; H₂O/MeOH, 20:80 isocratic ; PDA detection (200-800 nm) : $t_R=13.61$ min.

(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-ethyl 6,6,9,9-tetradeuterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate : 57

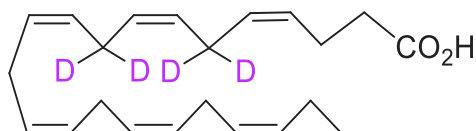
A solution of NaHMDS (2.0 M in THF, 85 μ L) was added dropwise to a solution of the phosphonium salt **30** (100 mg, 0.17 mmol) in THF (1.50 mL) at -50°C under inert atmosphere. The reaction was then stirred at -20°C for 30 min and cooled at -78°C . The aldehyde **28** (51 mg, 0.29 mmol) in THF (1.50 mL) at -78°C was added through a cannula to the orange mixture. The reaction was allowed to reach room temperature in 1.5 h and then stirred for 21 h. The reaction was quenched with saturated NH_4Cl solution (10 mL). The aqueous layer was extracted with 4x5 mL of pentane/EtOAc (9:1). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/ Et_2O , 98:2) to give the ethyl DHA ester **57** (31 mg, 51%) as a yellow oil.

$R_f=0.53$ (pentane/EtOAc,9:1) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=5.40\text{--}5.32$ (m, 12H, CH), 4.12 (q, $^3J(\text{H,H})=7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{ester})$), 2.86–2.80 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{bis-allylic})$), 2.39–2.34 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CO}$), 2.08–2.05 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 1.25 (t, $^3J(\text{H,H})=7$ Hz, 3H, $\text{CH}_3(\text{ester})$), 0.97 (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3H, CH_3) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=173.2, 132.1, 129.2, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1$ (2C), 128.0, 127.1, 60.5, 34.4, 25.7, 25.7, 25.6, 25.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.4$ Hz), 25.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.5$ Hz), 22.9, 20.7, 14.4, 14.4 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{D}_4\text{O}_2$: 361.3045 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found : 361.3046.

(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)-6,6,9,9-tetradeuterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid : (6,6,9,9-D₄)-DHA (23)

A solution of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (72 mg, 1.71 mmol) in 0.60 mL of H_2O was added to a solution the ester **57** (95 mg, 0.26 mmol) in 0.6 mL EtOH under inert atmosphere. The mixture was heated at 65°C for 4 h and additional $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (33 mg, 3 mmol) was added. After 7 h at 65°C the reaction was cooled

at room temperature and quenched with H₂O (10 mL) and HCl_{aq}. (1.0 M) until pH = 2. The aqueous layer was extracted with 3x10 mL of pentane/EtOAc (6:4). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 95:5 to 6:4) to give the (6,6,9,9-D₄)-DHA n°**23** (72 mg, 84%) as a yellow oil. A part of this product was purified by preparative HPLC to remove traces of over reduced by-products (column Waters Symmetry Prep™ (C₁₈) 7 μm (7.8x300mm) ; H₂O/acetonitrile, 17:83 isocratic, detection 217 nm) to give pure (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**).

R_f =0.52 (pentane/EtOAc,6:4) ;

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ=5.43–5.30 (m, 12H, CH), 2.86–2.80 (m, 6H, CH₂(bis-allylic), 2.43–2.38 (m, 4H, CH₂-CH₂-CO), 2.09–2.06 (m, 2H, CH₂-CH₃), 0.97 (t, ³J(H,H)=7.5 Hz, 3H, CH₃) ppm ;

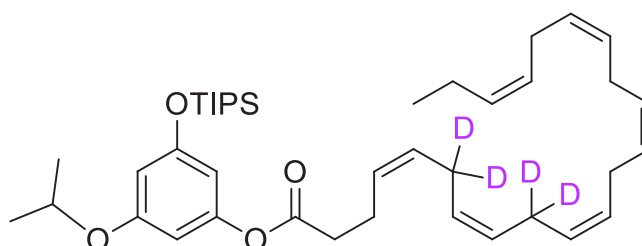
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ=179.3, 132.2, 129.6, 128.7, 128.4 (2C), 128.4, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 127.7, 127.1, 34.1, 25.8, 25.8, 25.7, 25.1 (quint., ¹J(C,D)=19.1Hz), 25.1 (quint., ¹J(C,D)=19.5 Hz), 22.6, 20.7, 14.4 ppm ;

HRMS (ESI-TOF) : m/z : calcd for C₂₂H₂₉D₂O₂ : 331.2575 [M-H]⁻ ; found : 331.2574 ;

HPLC : column Bridge® BEH (C₁₈) 2.5 μm (2.1 x 100 mm) ; H₂O/MeOH, 20:80 isocratic ; PDA detection (200-800 nm) : t_R = 4.76 min.

(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-6,6,9,9-Tetradeutero-3-isopropoxy-5-

(triisopropylsilyloxy)phenyldocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate : 59



5-Isopropoxy-1,3-bis(triisopropylsilyloxy)benzene **25** (57 mg, 0.17 mmol) dissolved in dry CH₂Cl₂ (2.6 mL) was added to a solution of (6,6,9,9-D₄)-DHA n°**23** (50 mg, 0.15 mmol) in dry CH₂Cl₂ (2.6 mL) at room temperature under inert atmosphere. Then DCC (35 mg, 0.17 mmol) and DMAP (2 mg, 0.02 mmol) were added to the mixture. The reaction was stirred for 2 h and then additional DCC (15 mg, 0.07 mmol) and DMAP (2 mg, 0.02 mmol) were added. After 4 h the reaction was cooled at 4°C for 1 h to induce the crystallization of dicyclohexylurea. The mixture was then

filtered to remove the solid and the solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 99:1) to give the coupled product **59** (84 mg, 87%) as a pale oil.

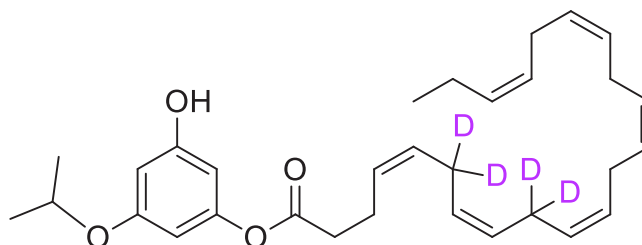
$R_f=0.56$ (pentane/EtOAc, 95:5) ;

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta=6.29\text{--}6.28$ (m, 1H, CH_{Ar}), $6.23\text{--}6.22$ (m, 1H, CH_{Ar}), $6.21\text{--}6.20$ (m, 1H, CH_{Ar}), $5.47\text{--}5.28$ (m, 12H, $\text{CH}_{\text{vinyllic}}$), 4.44 (septuplet, $^3J(\text{H,H})=6\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}_{\text{O}i\text{Pr}}$), $2.86\text{--}2.80$ (m, 6H, CH_2 (*bis*-allylic), $2.60\text{--}2.57$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{--CO}$), $2.52\text{--}2.48$ (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}\text{--CH}_2\text{--CO}$), $2.10\text{--}2.05$ (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}\text{--CH}_3$), 1.30 (d, $^3J(\text{H,H})=6\text{Hz}$, 6H, $\text{CH}_3(\text{O}i\text{Pr})$), $1.27\text{--}1.21$ (m, 3H, CH_{TIPS}), 1.09 (d, $^3J(\text{H,H})=7.5\text{Hz}$, 18H, $\text{CH}_3(\text{TIPS})$), 0.97 (t, $^3J(\text{H,H})=8.5\text{Hz}$, 3H, CH_3) ppm ;

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta=171.3$, 159.2 , 157.5 , 152.1 , 132.1 , 129.6 , 128.7 , 128.4 , 128.4 (2C), 128.2 , 128.1 , 128.1 , 128.0 , 127.8 , 127.1 , 106.1 , 105.5 , 102.4 , 70.2 , 34.4 , 25.8 , 25.7 , 25.7 , 25.1 (quint., $^1J(\text{C,D})=19.4$ Hz, 2C), 22.9 , 22.1 (2C), 20.7 , 18.0 (6C), 14.4 , 12.7 (3C) ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : m/z : calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{D}_4\text{O}_4\text{Si}$: 639.4747 [M + H]⁺ ; found : 639.4742.

**(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-6,6-Dideutero-3-isopropoxyphenyldocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate :
Phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (21)**



$\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ (64 μL , 0.39 mmol) was added dropwise to a solution of the coupled product **59** (84 mg, 0.13 mmol) in dry THF (5 mL) at room temperature under inert atmosphere. Additional $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ (43 μL , 0.26 mmol) was added after 3 h and 5 h of reaction. After 7 h the reaction was quenched with EtOAc (15 mL) and H_2O (15 mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted with 2 \times 5 mL of EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvents removed under reduce pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (pentane/EtOAc, 95:5 to 85:15) to give the residue which was then purified by preparative HPLC (column Waters SymmetryPrepTM (C_{18}) 7 μm (7.8 \times 300mm) ; H_2O /acetonitrile, 1:9

isocratic ; detection 214 nm) to give the Phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA(21) (45 mg, 71%) as a pale oil.

R_f=0.23 (pentane/EtOAc, 85:15).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ=6.23–6.22 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.18–6.17 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.14–6.13 (m, 1H, CH_{Ar}), 5.47–5.30 (m, 12H, CH_{vinyllic}), 4.44 (septuplet, ³J(H,H)=6Hz, 1H, CH_{OiPr}), 2.88–2.80 (m, 6H, CH₂(*bis*-allylic), 2.62–2.58 (m, 2H, CH₂-CO), 2.52–2.48 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 2.10–2.04 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.30 (d, ³J(H,H)=6Hz, 6H, CH₃(*OiPr*)), 0.97 (t, ³J(H,H) = 7.5Hz, 3H, CH₃) ppm ;

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ=171.9, 159.7, 157.3, 152.2, 132.2, 129.8, 128.7, 128.4 (3C), 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.6, 127.1, 101.8, 101.7, 101.1, 70.4, 34.4, 25.8, 25.7, 25.7, 25.1 (quint., ¹J(C,D)=19.4 Hz), 22.9, 22.1, 20.7, 14.4 ppm ;

HRMS (ASAP⁺-TOF) : calcd. for C₃₁H₃₉D₄O₄ : 483.3412 [M + H]⁺ ; found : 483.3410 ;

HPLC : column Bridge[®] BEH (C₁₈) 2.5 μm (2.1 x 100 mm) ; H₂O/MeOH, 20:80 isocratic ; PDA detection (200-800 nm) : t_R=12.90 min.

**Partie V : Impact des deutériums sur
l'activité des DHA et lipophénol-DHA en
lignée cellulaire ARPE-19 : toxicité,
activités antioxydantes, et anti-
stresseur carbonyle**

Introduction

Les composés deutérés et non deutérés ont été évalués grâce à plusieurs tests biologiques réalisés *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine de l'EPR, la lignée ARPE-19 (en anglais : adult retinal pigment epithelial cell line 19). Elles correspondent à des cellules épithéliales à croissance spontanée et rapide.²²⁵ Elles forment une monocouche de cellules pigmentées et adhérentes (**Figure 53**). Sur la **Figure 53** les cellules observées sont dites "confluentes" car la monocouche est constituée de cellules jointives.

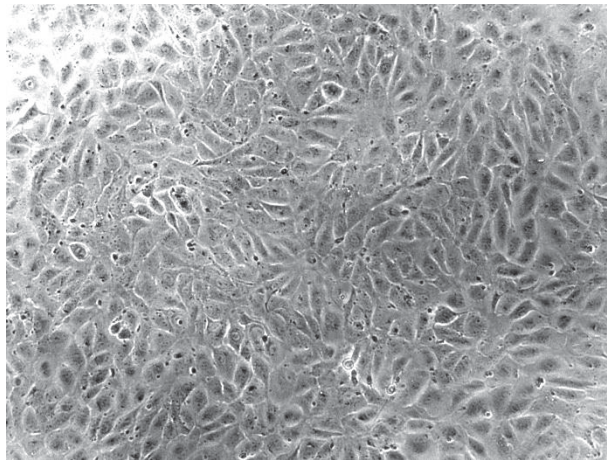


Figure 53 : Photographie des cellules ARPE-19 confluentes en culture cellulaire observées par microscope optique (grossissement : 200×).

Nous avons ainsi testé les lipophénols deutérés, le phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**), et phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**), et leurs DHA associés, le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) deutérés préalablement synthétisés (Partie IV, Chapitre II). L'objectif est de mettre en évidence l'intérêt de l'introduction des deutériums sur les positions *bis*-allyliques du DHA, en comparant les activités biologiques des molécules de(s) analogue(s) deutéré(s) à celles de l'analogue naturel (ou non deutéré) (**Figure 54**). Ayant au sein du laboratoire les AGPI et dérivés lipophénols du phloroglucinol-*OiPr*, en séries ALA et LA, non deutérés et deutérés (**Figure 54**), ces dernières ont été comparées à la série DHA (AGPI et lipophénols). En effet, l'équipe de Shchepinov ayant montré l'intérêt des composés ALA et LA deutérés en positions *bis*-allyliques dans leurs travaux, il nous est apparu intéressant de les comparer aux DHA deutérés, synthétisés dans ce travail de thèse, sur un modèle cellulaire rétinien (lignée ARPE-19). Le (11,11-D₂)-LA et le

(11,11,14,14-D₄)-ALA deutérés ayant servis dans cette partie ont été fournis par le laboratoire Shchepinov.

Remarque : pour des soucis de simplification d'écriture, les nomenclatures des AGPI et lipophénols ont été modifiés comme suit :

Composés	Noms simplifiés
Série DHA	
DHA naturel	DHA naturel
(6,6-D ₂)-DHA (22)	DHA-D ₂
(6,6,9,9-D ₄)-DHA (23)	DHA-D ₄
phloroglucinol-OiPr-ODHA (17)	PG-DHA non D
phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D ₂)-DHA (20)	PG-DHA-D ₂
phloroglucinol-OiPr-O-(6,6,9,9-D ₄)-DHA (21)	PG-DHA-D ₄
Série ALA	
ALA naturel	ALA naturel
(11,11,14,14-D ₄)-ALA	ALA-D ₄
phloroglucinol-OiPr-OALA	PG-ALA non D
phloroglucinol-OiPr-O-(11,11,14,14-D ₄)-ALA	PG-ALA-D ₄
Série LA	
LA naturel	LA naturel
(11,11-D ₂)-LA	LA-D ₂
phloroglucinol-OiPr-OLA	PG-LA non D
phloroglucinol-OiPr-O-(11,11-D ₂)-LA	PG-LA-D ₂

Tableau 21 : noms simplifiés des différents composés testés sur la lignée ARPE-19.

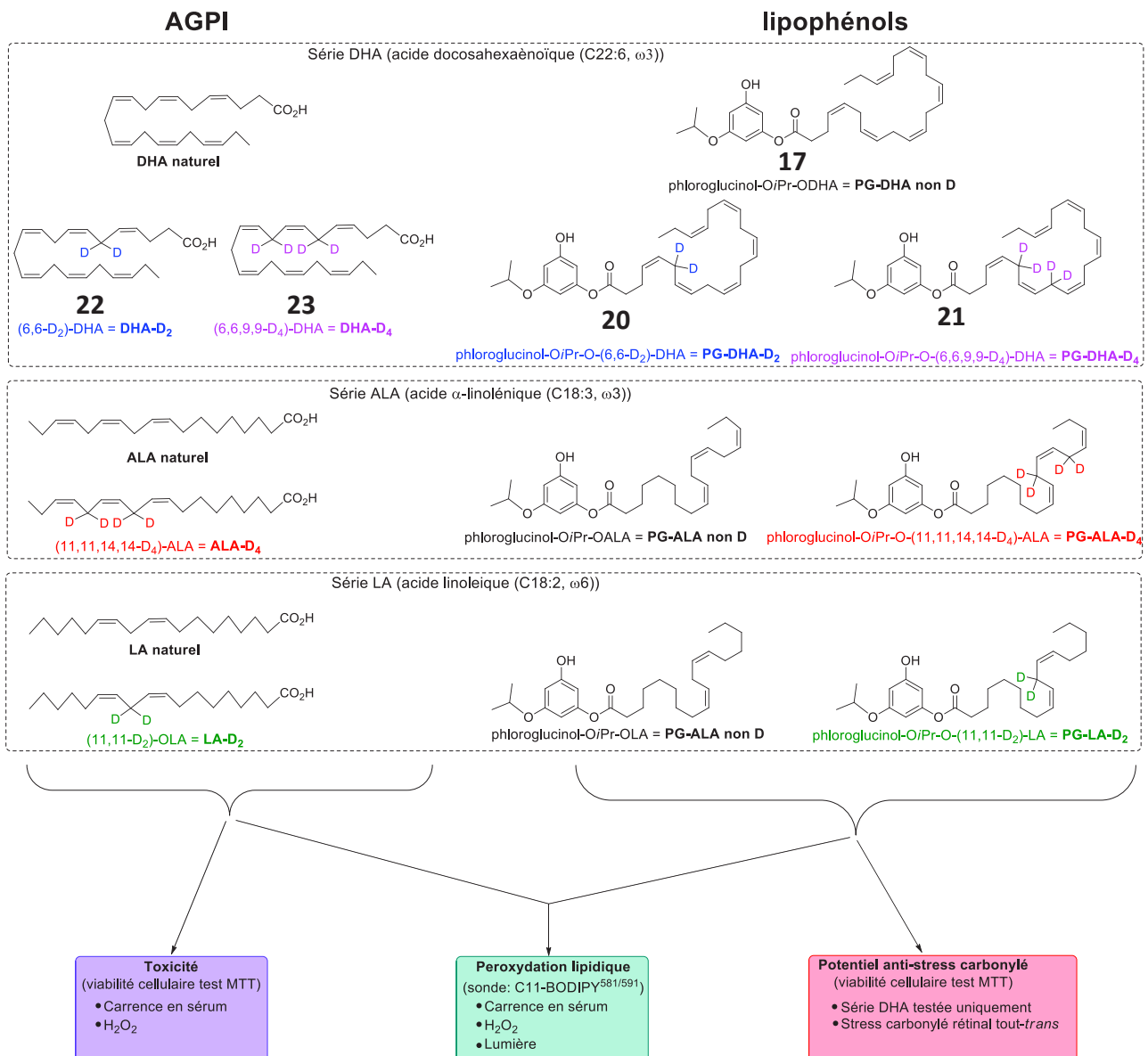


Figure 54 : Séries des AGPI et lipophénols naturels et deutérés (DHA, ALA et LA) testés sur la lignée cellulaire ARPE-19. Trois tests biologiques mis en œuvre : toxicité, peroxydation lipidique et potentiel anti-stress carbonylé.

Deux tests ont été mis en œuvre pour montrer l'intérêt de l'incorporation des deutériums : l'évaluation de la toxicité des composés en condition oxydante, et leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique. Le troisième test correspond à l'évaluation de l'activité anti-stress carbonylé sur les lipophénols de la série DHA contre le rétinale tout-*trans*.

Le premier test mis en œuvre dans ce travail a pour but d'évaluer la toxicité des composés lorsque les cellules sont soumises à un stress oxydant (carence en sérum ou incubation avec H₂O₂). L'intérêt d'un tel test est ici d'évaluer l'impact des deutériums sur la toxicité du DHA, induite en condition de stress oxydant. En effet, la liaison ester présente entre le lipophénol et le DHA peut être clivée en milieu cellulaire et en présence d'estérases, conduisant au DHA libre et pouvant former des composés délétères (HHE, MDA, ...) après peroxydation lipidique, comme décrit dans la partie III (chapitre I, paragraphe III.). Les lipophénols n'ayant pas montré de toxicité à faibles concentrations (uniquement à partir de 80 µM) lors des tests préliminaires, contrairement aux AGPI, l'évaluation des toxicités en condition de stress oxydant a été effectuée uniquement sur les AGPI des séries DHA, ALA et LA (**Figure 54**). Ce test de viabilité cellulaire a été effectué en utilisant le réactif MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Les résultats obtenus sont décrits dans le chapitre I de cette partie.

Le deuxième test développé et mis au point dans ce travail, concerne l'évaluation de l'inhibition de la peroxydation lipidique. En effet il a été montré par l'équipe de Shchepinov *et al.* que cette dernière pouvait être réduite en présence d'AGPI deutérés comparés aux AGPI naturels (Partie III, chapitre II). La capacité des molécules deutérés à limiter la peroxydation lipidique comparées aux composés non deutérés a été ainsi évaluée sur la lignée ARPE-19. Les AGPI mais également les lipophénols (séries DHA, ALA et LA) ont été testés. Les cellules, après un traitement avec ces composés, ont été soumises non seulement à un stress oxydant correspondant à une carence en sérum ou à une incubation avec H₂O₂, mais également à un stress lumineux. La peroxydation lipidique induite dans ces conditions de stress oxydant a été quantifiée grâce à une sonde fluorescence, le C11-BODIPY^{581/591} spécifique de ce mécanisme. Les résultats obtenus sont rapportés dans le chapitre II de cette partie.

Un troisième test biologique de "contrôle" a finalement été effectué avec les lipophénols appartenant à la série DHA. L'objectif étant de mettre en évidence si l'activité de protection contre un stress carbonylé, le rétinol tout-*trans* (impliqué dans les pathologies rétinienne, partie I, chapitre II, paragraphe I.2.3.), préalablement obtenue pour la molécule non deutérée lead **17** (PG-DHA, partie II, chapitre II, paragraphe II.1.), pouvait être conservée avec les analogues deutérés (PG-DHA-D₂ et PG-DHA-D₄). Les résultats obtenus sont rapportés dans le chapitre III de cette partie.

Chapitre I. Effet des deutériums sur la toxicité du DHA : comparaison des toxicités du DHA naturel vs deutérés et d'autres AGPI naturels vs deutérés, en condition de stress oxydant en lignée cellulaire ARPE-19

L'objectif du travail suivant est d'évaluer l'influence de l'incorporation des atomes de deutérium sur la toxicité des AGPI en condition oxydante. Celle-ci est mise en évidence *via* une courbe de "dose-réponse", correspondant à la concentration de l'AGPI en fonction de la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire est estimée grâce à un test MTT qui permet de rendre compte de l'activité métabolique des cellules vivantes. En effet, le réactif MTT, un sel de tétrazolium soluble dans les milieux de culture, est réduit en cristaux de formazan bleu-violet insolubles par l'action de réductases mitochondriales (succinates-déhydrogénases) des cellules vivantes (**Schéma 112**). Ces cristaux de formazan sont ensuite solubilisés dans le DMSO, générant une coloration violette directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Ainsi, le test MTT permet d'évaluer la viabilité cellulaire par colorimétrie.

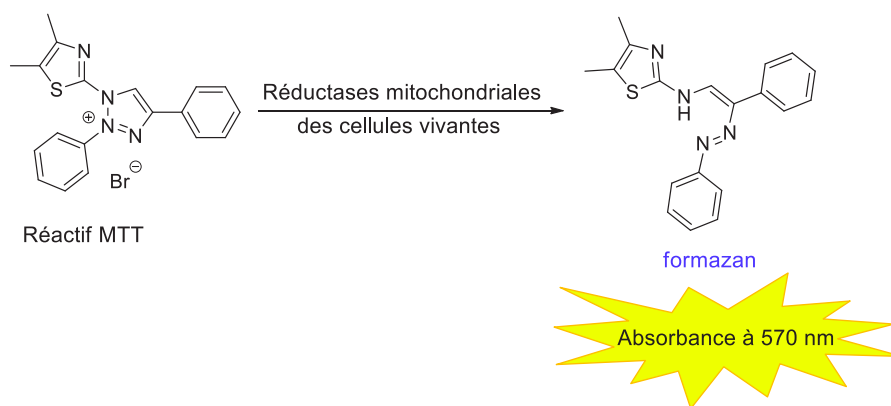


Schéma 112 : Test MTT : réduction du réactif MTT en formazan par les réductases des cellules vivantes.

Le protocole mis en œuvre pour effectuer ces tests de toxicité est le suivant (**Schéma 113**) :

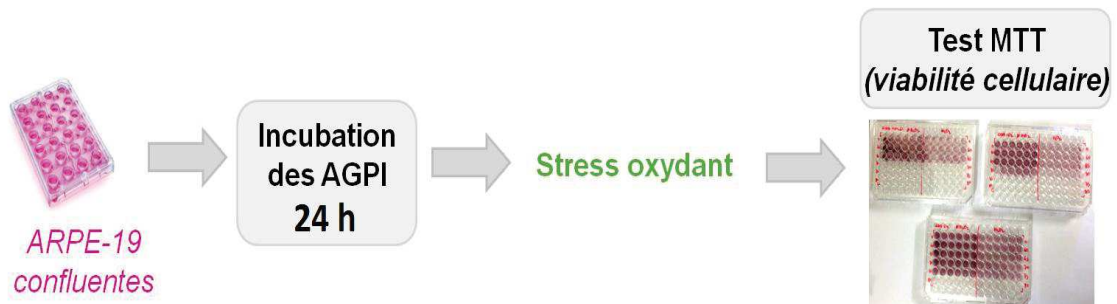


Schéma 113 : Protocole suivi pour le test de toxicité des AGPI sur les ARPE-19.

Les cellules à confluence sont incubées avec des concentrations croissantes en AGPI durant 24 h, suivi du test de viabilité cellulaire (MTT). Les cellules non traitées avec les AGPI correspondent à un "contrôle" associé à une viabilité cellulaire de 100%.

A noter que dans notre cas, les ARPE-19 ne présentent pas de mutation d'une coenzyme Q contrairement aux levures utilisées par Shchepinov (partie III, chapitre II, paragraphe II.1.), et ne sont donc pas sensibilisées à la toxicité des AGPI, induite par une peroxydation lipidique. L'effet toxique observé après incubation des AGPI non deutérés sur les cellules est donc moins évident à obtenir, car la peroxydation lipidique pourrait ne pas être le seul mécanisme à l'origine de leur toxicité dans notre modèle cellulaire. L'objectif est donc de mettre au point les différentes conditions de culture cellulaire permettant de générer une peroxydation lipidique entraînant une toxicité des AGPI *via* un stress oxydant, soit par une carence en sérum, soit par l'utilisation d'un stresseur chimique.

I. Mise au point des conditions d'oxydation engendrant une toxicité des AGPI en lignée cellulaire ARPE-19

I.1. Influence de la carence en sérum

I.1.1. Influence de la carence en sérum sur le stress oxydant cellulaire (sans traitement avec l'AGPI)

Le sérum de veau fœtal (SVF) présent à 10 % (v/v) dans le milieu de culture est un élément central pour la croissance et la prolifération des cellules. Une diminution de ce pourcentage en sérum favorise l'état de stress cellulaire. Le stress oxydant présent au sein des cellules carencées en SVF durant 24 h a été évaluée de deux manières : par la mise en évidence de la formation d'EOR, et par la quantification de la peroxydation lipidique.

Tout d'abord, la détection des EOR a été effectuée en présence d'une sonde fluorescente appelée DCFDA (diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine) (**Schéma 114**). Le DCFDA est incorporé dans les cellules en traversant leur membrane, suivi de sa transformation par déacétylation en DCFH₂, dérivé non fluorescent piégé au sein des cellules. Ce dernier est transformé en DCF fluorescent après son oxydation en présence des EOR.

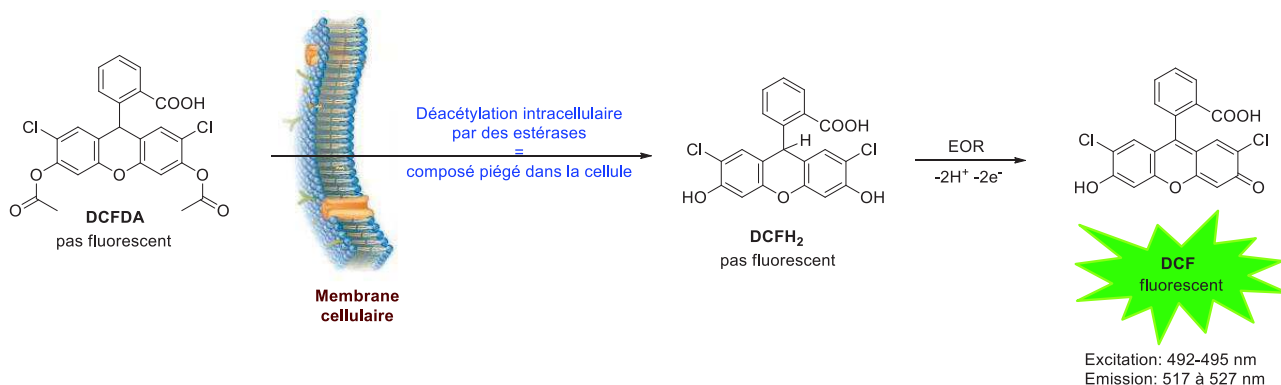


Schéma 114 : Mécanisme d'oxydation de la sonde DCFDA, permettant de quantifier l'intensité de fluorescence proportionnelle à la production d'EOR.

Ainsi la mesure de l'intensité de fluorescence du DCF est proportionnelle à la formation d'EOR au sein des cellules. Une analyse par cytométrie de flux (réalisée par FACS : fluorescence-

activated cell sorting) permet de quantifier l'intensité de fluorescence des cellules vivantes. La production d'EOR engendrée a été évaluée en présence de différentes carences en sérum : totale (0% ou \emptyset), 1%, 2,5% ou 10% (**Figure 55**). Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).

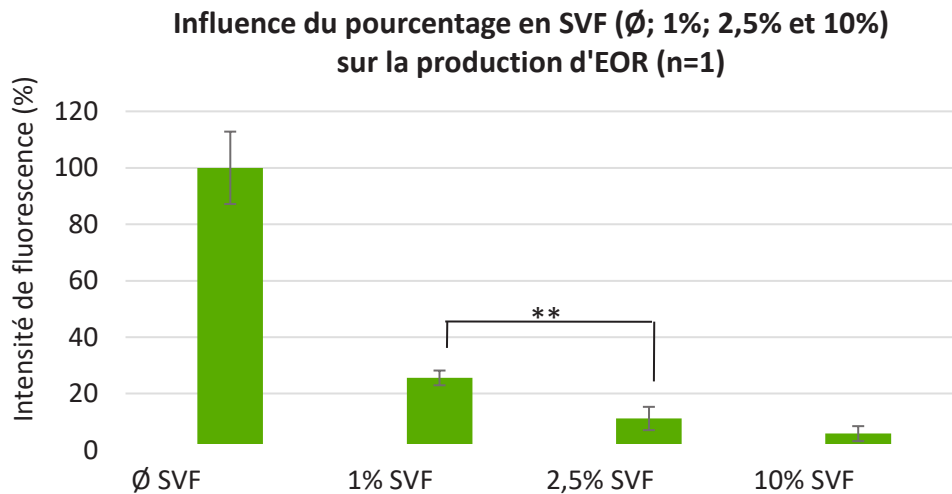


Figure 55 : Production d'EOR à différents pourcentages en SVF : Incubation des cellules dans un milieu sans sérum (\emptyset), 1%, 2,5% ou 10% durant 24 h. La sonde fluorescente utilisée pour la quantification d'EOR est le DCFDA (2 μ M), permettant une analyse de l'intensité de fluorescence par cytométrie de flux (FACS). Les résultats sont normalisés et exprimés en % d'intensité de fluorescence par rapport aux cellules présentant le maximum d'intensité de fluorescence (condition \emptyset SVF) correspondant à 100% (moyenne \pm écart type; **p<0,01).

La carence totale en sérum (\emptyset) provoque une production importante d'EOR comparée à un milieu contenant 1%, 2,5% et 10%. A noter que la carence associée à 1% de SVF dans le milieu génère une production d'EOR 2,4 et 4,3 fois plus grande comparée respectivement au milieu à 2,5% et 10% de SVF.

Ensuite, la quantification de la peroxydation lipidique présente au niveau des cellules a été effectuée *via* la sonde fluorescente C11 BODIPY^{581/591} (**Figure 56**). Cette dernière existe sous deux formes, réduite et oxydée, possédant chacune une fluorescence différente. Plus de détails sur l'utilisation de cette sonde lipidique capable de s'insérer dans les membranes cellulaires seront évoqués dans la partie V, chapitre II, consacrée à l'évaluation de l'inhibition de la peroxydation lipidique.

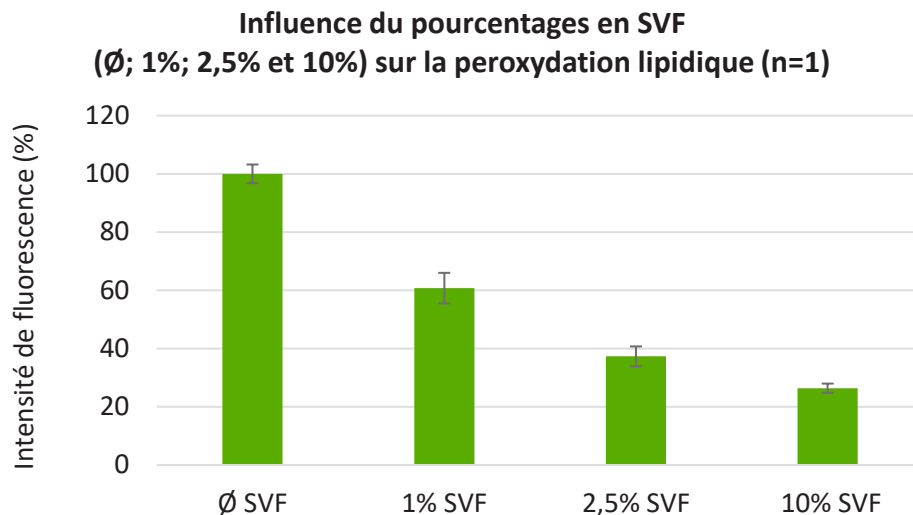


Figure 56 : Peroxydation lipidique évaluée à différents pourcentages en SVF : Incubation des cellules dans un milieu sans sérum (Ø), 1%, 2,5% ou 10% durant 24 h. La sonde fluorescente utilisée pour la quantification de la peroxydation lipidique est le C11-BODIPY^{581/591}, permettant une analyse de l'intensité de fluorescence par cytométrie de flux (FACS). Les résultats sont normalisés et exprimés en % d'intensité de fluorescence par rapport aux cellules présentant le maximum d'intensité de fluorescence (condition ØSVF) correspondant à 100%.

De même que pour la production d'EOR, nous observons grâce à ce test qu'une élévation de carence en sérum entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique associée à un état de stress des cellules.

Au vue de ces différents résultats, nous avons utilisé dans nos premiers tests un milieu totalement carencé en SVF afin d'évaluer la toxicité des AGPI dans ces conditions d'oxydation. Ce milieu générant le stress oxydant le plus important parmi les quatre conditions testées, il nous est apparu adapté afin de favoriser la formation des métabolites d'oxydation délétères issus de la peroxydation lipidique des AGPI.

I.1.2. Toxicité des AGPI naturels (DHA, ALA et LA) dans des conditions sans sérum

I.1.2.1. Test préliminaires des DHA naturel et deutérés

Les cellules ont été incubées en présence des DHA (naturel et deutérés) à différentes concentrations dans un milieu totalement carencé en SVF pendant 24 h. L'objectif étant de mettre en évidence si la toxicité du DHA pouvait être réduite par la présence de deutérium sur certaines

positions *bis*-allyliques. Les dose-réponses suivantes ont été établies (**Figure 57**) en duplicat (n=2) pour l'essai 1 et en monoplicat (n=1) pour l'essai 2.

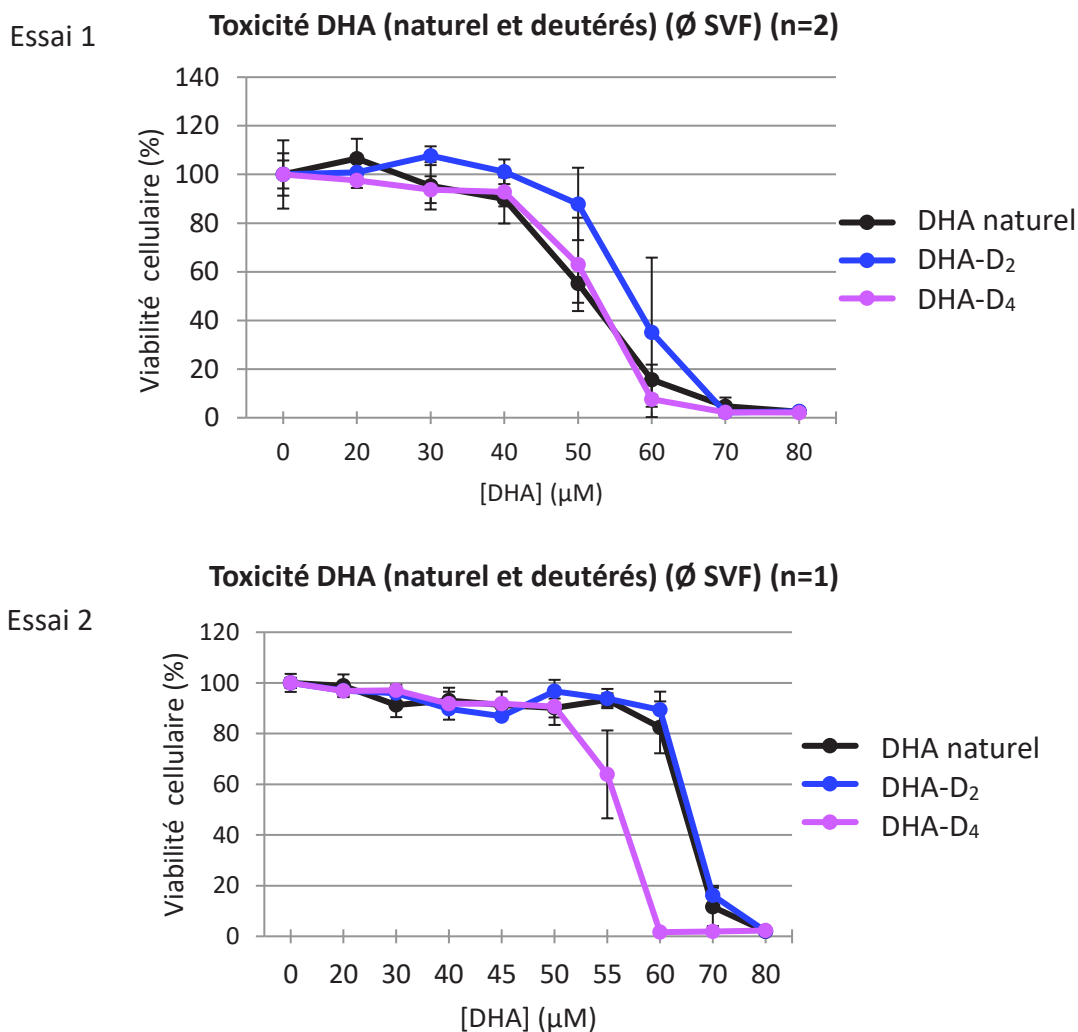


Figure 57 : Évaluations de la toxicité des DHA (naturel et deutérés) (Ø SVF) : incubation des cellules avec le DHA à différentes concentrations (milieu sans sérum Ø) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

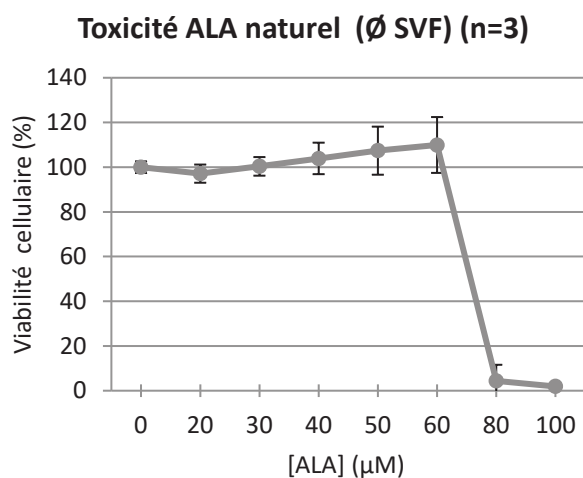
La toxicité des DHA semble être très proche dans la gamme de concentration utilisée. Malheureusement des problèmes de reproductibilité sont observables pour le point à 50 et 60µM et nous empêche d'interpréter correctement les résultats. La toxicité brutale des DHA et les conditions de stress important des cellules, obtenu avec un milieu totalement carencé en SVF, ajoutent une difficulté dans l'obtention de dose-réponses reproductibles. Nous avons par la suite évalué la toxicité de l'ALA et du LA naturels dans les mêmes conditions afin de vérifier si le problème de reproductibilité été lié à la série DHA ou non. La mise au point du test de toxicité a

également été réalisée sur l'ALA et le LA naturel afin de comparer les différences de toxicité des séries DHA, ALA et LA.

I.1.2.2. Test préliminaires de l'ALA et du LA naturels

De même que pour le DHA, les cellules ont été incubées en présence d'ALA naturel à différentes concentrations dans un milieu totalement carencé en SVF pendant 24 h. Les dose-réponses suivantes ont été réalisées en triplicat (n=3) pour l'essai 1 et en monoplicat (n=1) pour l'essai 2 (**Figure 58**).

Essai 1



Essai 2

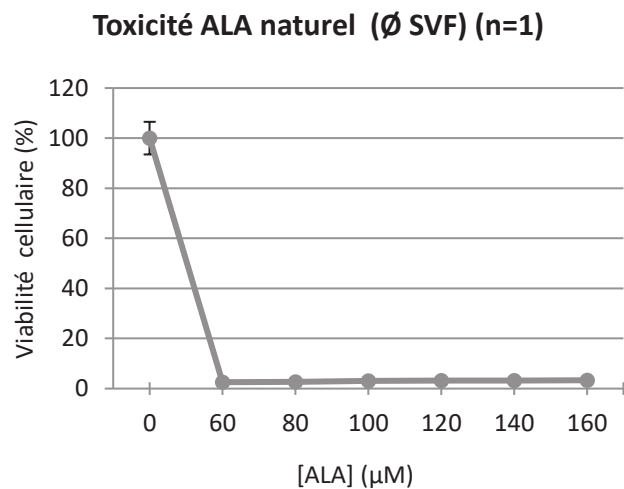


Figure 58 : Évaluations de la toxicité de l'ALA naturel (Ø SVF) : incubation des cellules avec l'ALA à différentes concentrations (milieu sans sérum Ø) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

La toxicité de l'ALA semble moins importante que celle du DHA, cependant, une toxicité brutale et des problèmes de reproductibilité sont également rencontrés pour cet AGPI. La toxicité observée à une concentration de 60 µM est très variable d'une dose-réponse à l'autre puisqu'elle passe de 109% (**Figure 58**, essai 1) en survie cellulaire à 0% (**Figure 58**, essai 2).

Les dose-réponses ont également été établies pour évaluer la toxicité du LA naturel selon un protocole similaire à celui décrit précédemment. Les essais ont été réalisés en duplicat (n=2) pour l'essai 1 et en monoplicat (n=1) pour l'essai 2 (**Figure 59**) et conduisent également à un défaut de reproductibilité d'un essai à l'autre.

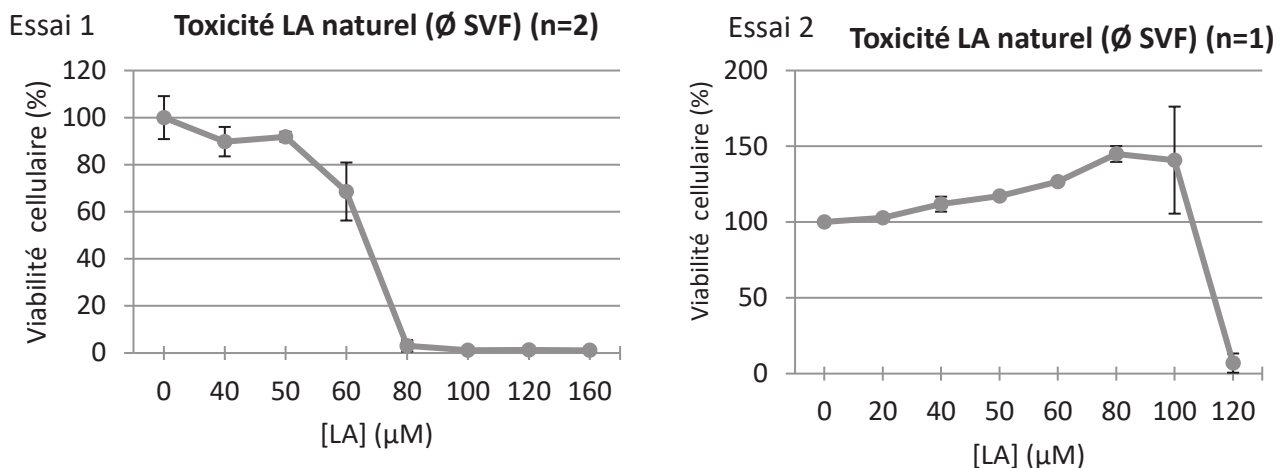


Figure 59 : Évaluations de la toxicité du LA naturel (Ø SVF) : incubation des cellules avec le LA à différentes concentrations (milieu sans sérum Ø) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Ainsi, l'utilisation du milieu totalement carencé en sérum semble être limitante pour observer une toxicité des AGPI de manière reproductible. Les toxicités obtenues sont assez brutales, ce qui laisse très peu de marge au niveau du choix des concentrations toxiques à étudier. Le stress induit par la carence en sérum s'est révélé important que ce soit en termes de formation d'EOR (**Figure 55**) ou en présence de peroxydation lipidique (**Figure 56**) et pourrait varier en fonction de l'état des cellules. Toutes ces raisons nous ont amené à augmenter le pourcentage en sérum à 2,5%, condition dans lequel les cellules subissent toujours un stress oxydant. En effet, en termes de formation d'EOR et de peroxydation lipidique, la carence en sérum à 2,5% engendre un stress respectivement 11% et 31% moins important comparé à un milieu totalement carencé en sérum.

I.1.3. Toxicité des AGPI naturels (DHA, ALA et LA) en présence de 2,5% de SVF

I.1.3.1. Test préliminaires du DHA, de l'ALA et du LA naturels

Des gammes de concentration en AGPI plus élevées ont été appliquées aux cellules (0 à 110 µM pour l'ALA et le DHA, et 0 à 140 µM pour le LA) comparées à celles associées au milieu totalement carencé en SVF ce qui correspond à des concentrations relativement élevées. (**Figure 60**). Chaque expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).

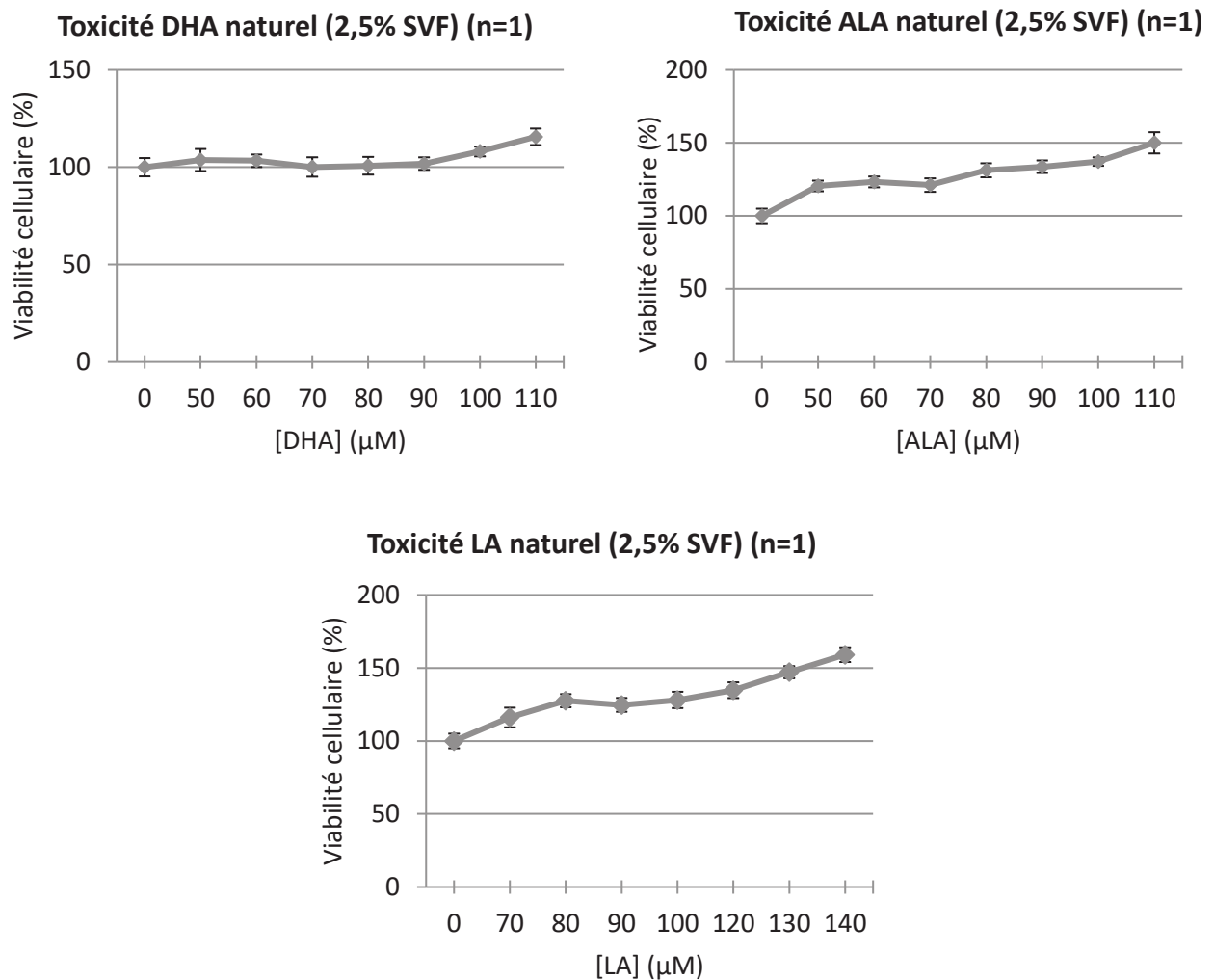


Figure 60 : Evaluations de la toxicité des AGPI (DHA, ALA et LA) naturels (2,5% SVF) : incubation des cellules avec l'AGPI à différentes concentrations (milieu à 2,5% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Malheureusement aucune toxicité n'est observée sur les cellules après incubation des AGPI en milieu carencé à 2,5 % de SVF, malgré la gamme de concentration élevée utilisée. Un effet protecteur du sérum semble être présent, limitant considérablement la toxicité des composés. Cela peut être en partie lié à la diminution du stress oxydant en présence de 2,5% de sérum comparé aux conditions de carence totale en sérum, comme mis en évidence dans le test de formation d'EOR (**Figure 55**) ou de peroxydation lipidique (**Figure 56**). Cependant la peroxydation lipidique, bien que limitée par la présence de sérum, n'est pas nulle. Il apparaît par ce test que la toxicité des AGPI pourrait ne pas être uniquement corrélée à ce mécanisme. De plus, on observe à de fortes concentrations pour les 3 séries d'AGPI, une augmentation de la survie cellulaire,

traduisant la présence d'une protection dose-dépendante, illustrant le double effet de certains AGPI (toxiques ou protecteurs). Ainsi, les essais effectués en carence totale en SVF et à 2,5% de SVF mettent en évidence que l'effet bénéfique ou délétère des AGPI dépend considérablement de l'état de stress des cellules.

I.1.3.2. Test préliminaires du DHA et de l'ALA naturels en présence de H₂O₂

Au vu des résultats précédents, de nouvelles conditions utilisant un stresser chimique comme H₂O₂, ont été appliquées afin d'augmenter le stress oxydant cellulaire et visualiser une toxicité des AGPI. Ce dernier est responsable de la formation d'EOR pouvant être à l'origine d'une peroxydation lipidique au sein des cellules et ainsi induire une toxicité visible des AGPI. Le mécanisme recherché est donc très spécifique, à noter que la peroxydation lipidique pourrait ne pas être le seul mécanisme responsable de la toxicité des AGPI dans les conditions appliquées.

Des essais préliminaires ont été effectués afin de mettre en évidence la concentration limite non toxique à utiliser en H₂O₂, en l'absence d'une supplémentation en AGPI, mais suffisante pour produire des EOR. Une dose-réponse associée à la toxicité du stresser chimique H₂O₂ en milieu carencé à 2,5% de SVF a donc été établie (**Figure 61**) ainsi qu'une cinétique de production d'EOR engendrée à plusieurs concentrations en H₂O₂ (**Figure 62**), sonde fluorescente DCFDA).

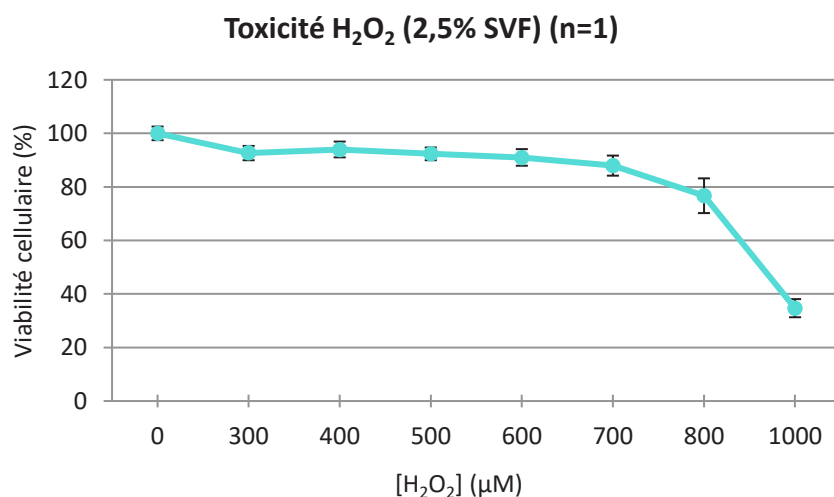


Figure 61 : Évaluation de la toxicité de H₂O₂ (2,5% SVF) : incubation des cellules avec H₂O₂ à différentes concentrations (milieu carencé à 2,5% de SVF) durant 4 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Cette dose-réponse (**Figure 61**) montre que la toxicité reste faible (environ 90% de viabilité cellulaire) jusqu'à 700 μM . Ainsi, les concentrations comprises entre 300 et 700 μM pourront être utilisées pour engendrer une toxicité des AGPI.

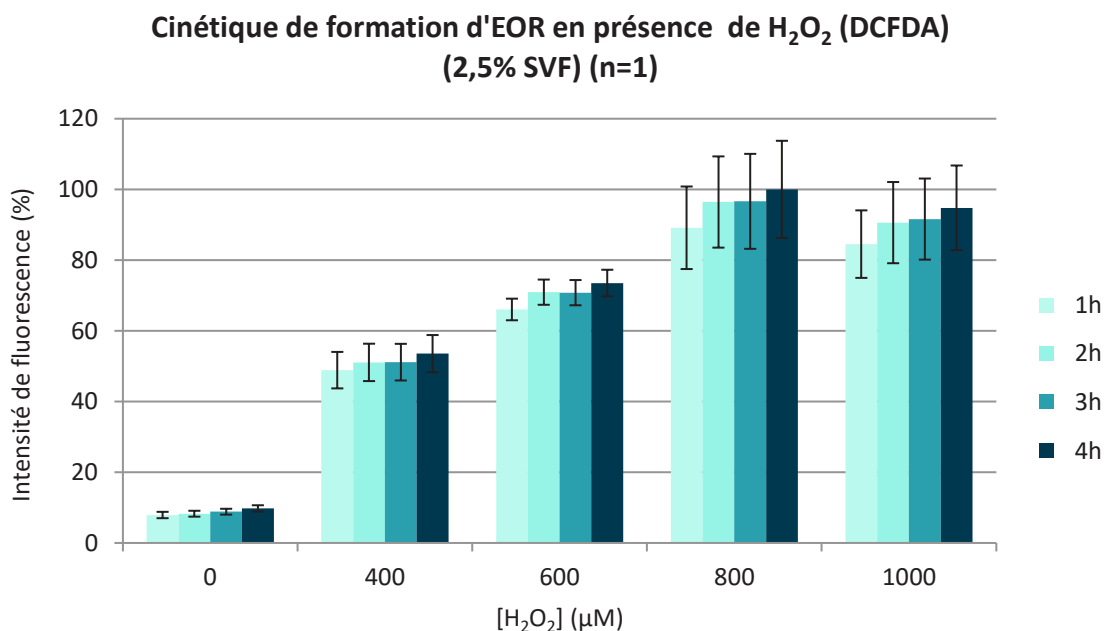


Figure 62 : Cinétique de production d'EOR pour H_2O_2 (2,5% SVF) : incubation des cellules avec H_2O_2 à différentes concentrations, 400, 600, 800 et 1000 μM (milieu carencé à 2,5% de SVF) durant 4 h. La sonde fluorescente utilisée pour la quantification d'EOR est le DCFDA (2 μM), permettant une analyse de l'intensité de fluorescence grâce au Clariostar. Les résultats sont normalisés et exprimés en % d'intensité de fluorescence par rapport aux cellules présentant le maximum d'intensité de fluorescence (condition 800 μM en H_2O_2 à 4h) correspondant à 100%.

La cinétique de production d'EOR(**Figure 62**) montre que l'utilisation de H_2O_2 à 400 μM permet, au bout de 4 h, de produire environ 50% de la valeur maximale des EOR obtenue en utilisant 800 μM de H_2O_2 . Une concentration de 400 μM de H_2O_2 pourrait donc être suffisante pour induire une toxicité associée au mécanisme de peroxydation lipidique, et a donc été choisie.

Les doses-réponses associées à la toxicité des AGPI, en présence de 400 μM de H_2O_2 , ont été établies uniquement pour le DHA et l'ALA (**Figure 63**), possédant des toxicités plus élevées (mises en évidence en condition sans sérum) et un nombre de positions *bis*-allyliques oxydables plus important comparé au LA (5 pour le DHA et 2 pour l'ALA). Ces expériences ont été réalisées en monoplicat (n=1).

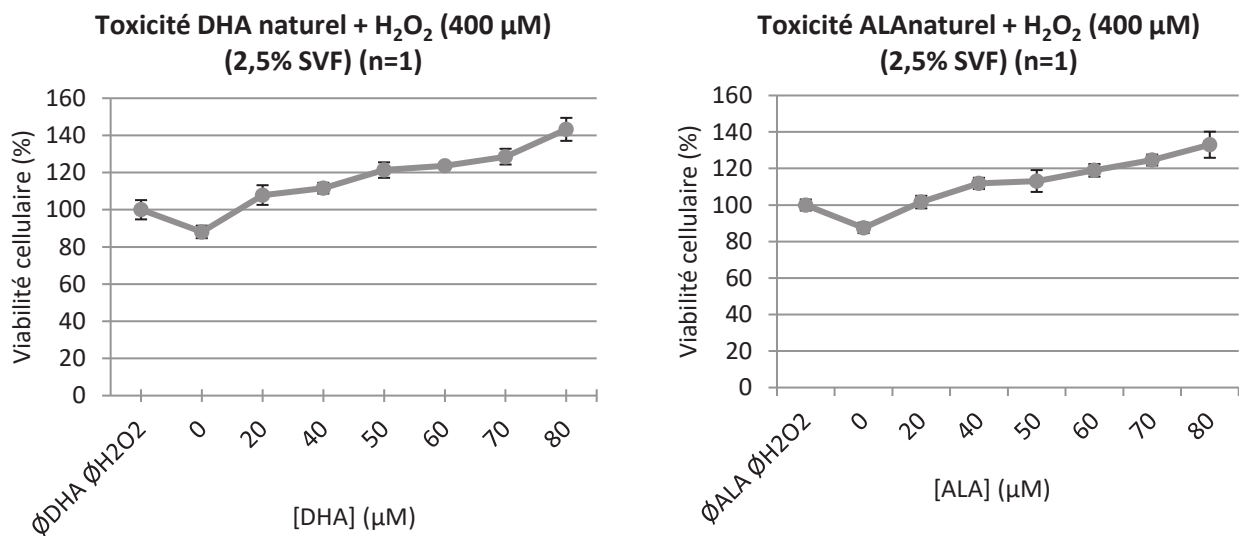


Figure 63 : Évaluation de la toxicité du DHA et ALA naturels en présence de 400 µM de H₂O₂ (2,5% SVF) : incubation des cellules avec le DHA ou l'ALA à différentes concentrations (milieu carencé à 2,5% de SVF) durant 24 h, puis ajout de H₂O₂ à 400 µM durant 4h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Aucune toxicité des AGPI n'est observée (**Figure 63**) malgré les conditions de stress imposées en présence de H₂O₂ (400 µM pendant 4 h). Un effet de protection est même observable dans la gamme de concentration utilisée. Finalement ces conditions ne semblent pas adaptées pour notre étude puisque l'objectif est de chercher des conditions d'oxydation dans lesquelles les AGPI présentent une toxicité. L'utilisation d'un milieu carencé à 1% de SVF, a donc été testée.

1.I.4. Toxicité des séries d'AGPI (DHA, ALA et LA) en présence de 1% de SVF

Cette carence à 1% de SVF entraîne une peroxydation lipidique (**Figure 56**), 0,4 fois moins importante comparé à celle obtenue sans sérum et 1,5 plus importante comparé au milieu à 2,5% de SVF. Ainsi le stress oxydant engendré par un milieu à 1% de SVF est plus proche de la valeur maximale obtenue sans sérum et supérieure à celui observé avec un milieu à 2,5% de SVF. Les dose-réponses associées aux toxicités des AGPI ont été établies dans ces conditions ainsi que la détermination des stressés chimiques oxydants à utiliser.

I.1.4.1. Test préliminaires des DHA naturel et deutérés

La dose-réponse associée à la toxicité des DHA naturel et deutérés dans un milieu carencé à 1% de SVF a été établie. Les expériences ont été réalisées en duplicat (essai 1) et en monoplicat (essai 2).

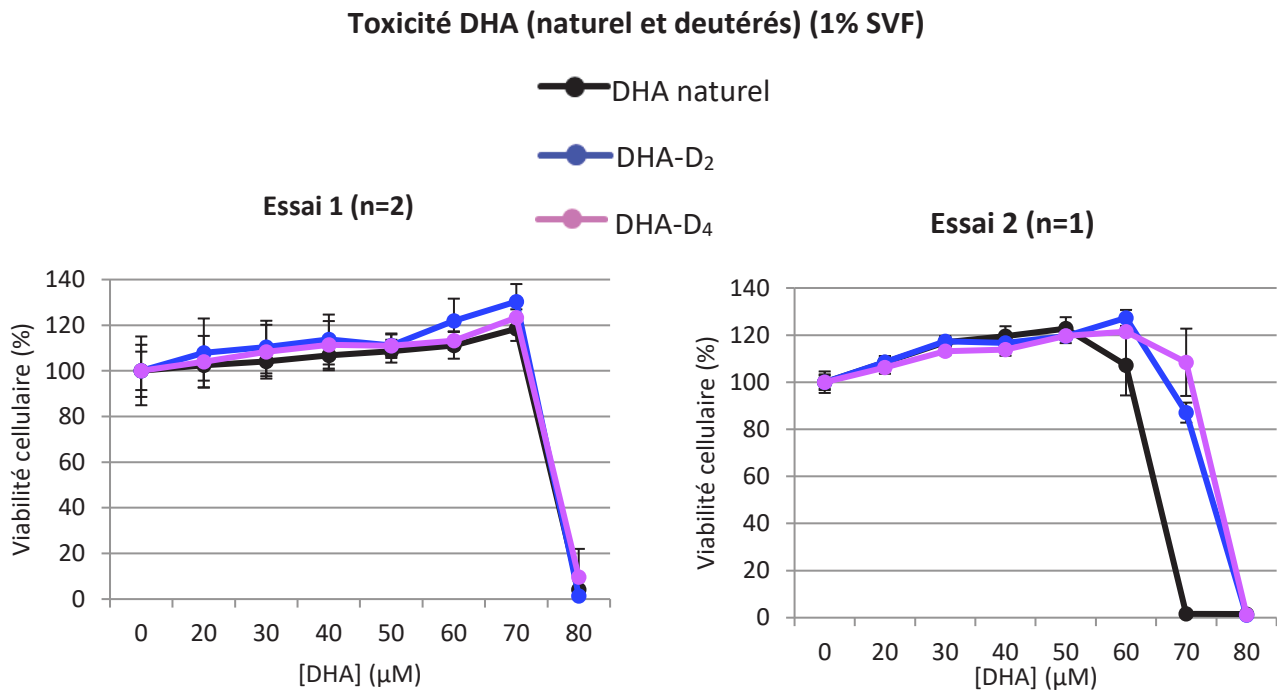


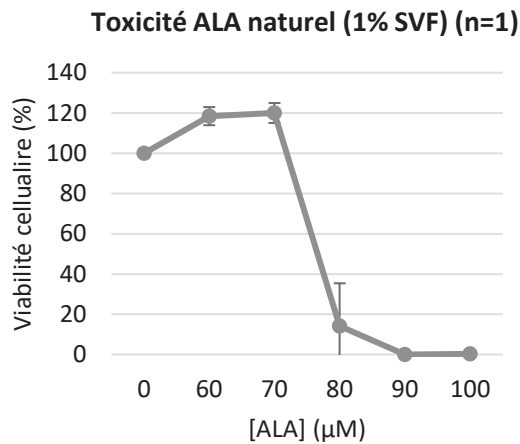
Figure 64 : Évaluation de la toxicité des DHA (naturel et deutérés) (1% SVF) : incubation des cellules avec le DHA à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Grâce à cette nouvelle condition, associée à un milieu carencé à 1 % de SVF, les écarts types observés sont plus faibles que ceux obtenus dans un milieu sans sérum, montrant un gain de reproductibilité. Cependant, un problème de reproductibilité est toujours rencontré, cette fois-ci à 70 µM pour le DHA naturel. Un étalement des concentrations entre 60 et 80 µM sera nécessaire pour obtenir une dose réponse progressive et donc étudier correctement la différence entre les DHA naturel et deutérés. Cette mise au point sera présentée dans le paragraphe II de ce chapitre.

I.1.4.2. Test préliminaires de l'ALA et du LA

De même que pour le DHA, la toxicité de l'ALA naturel a été testée dans un milieu carencé à 1% de SVF (**Figure 65**).

Essai 1



Essai 2

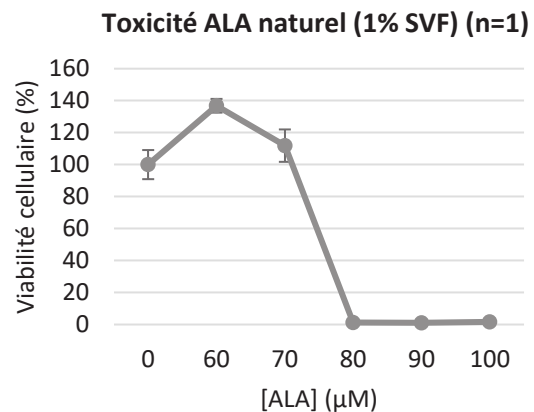


Figure 65 : Évaluation de la toxicité de l'ALA (naturel et deutéré) (1% SVF) : incubation des cellules avec l'ALA à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Avec cet AGPI, les conditions utilisant un milieu carencé à 1% de SVF ont également permis de minimiser le problème de reproductibilité entre 2 essais. Malheureusement un autre problème de reproductibilité est présent dans ce cas, au niveau du point à 80 µM (**Figure 65**, essai 1 et essai 2). Un étalement des concentrations sera également nécessaire pour l'étude de la toxicité de cet AGPI, entre 70 et 90 µM, afin d'obtenir une dose-réponse progressive.

Ensuite le LA naturel a été évalué dans un milieu carencé en 1% de SVF (**Figure 66**), permettant de réduire les valeurs des écarts types et les problèmes de reproductibilité comparés aux résultats obtenus dans un milieu sans SVF.

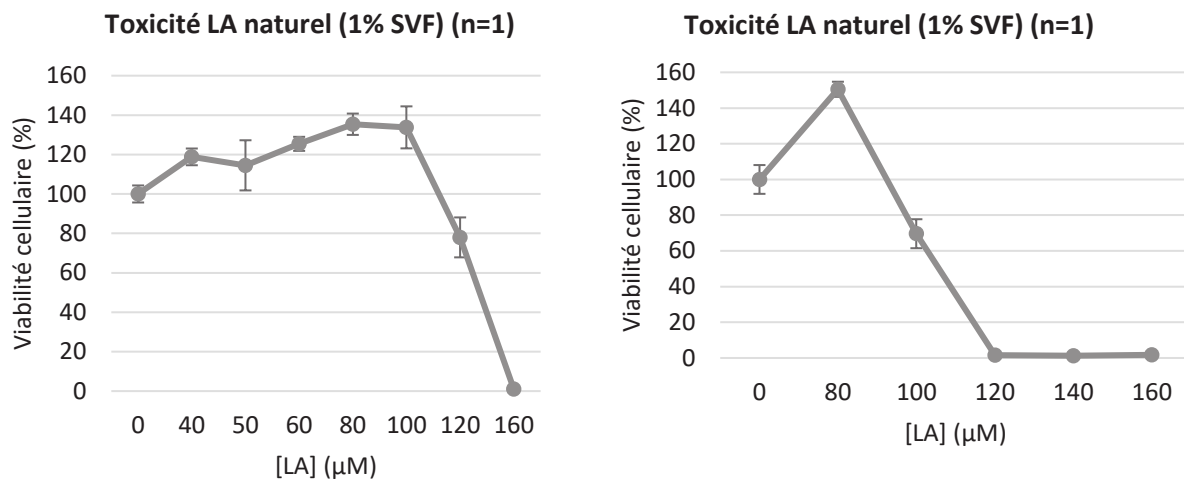


Figure 66 : Évaluation de la toxicité du LA (naturel et deutéré) (1% SVF) : incubation des cellules avec le LA à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Comme pour les autres AGPI, un étalement des concentrations sera envisagé, ici entre 80 et 120 µM, pour évaluer correctement la différence de toxicité entre le LA naturel et deutérés.

Pour conclure, l'évaluation de la toxicité des différents AGPI nécessitera un étalement des gammes de concentration afin de pouvoir éventuellement étudier la différence entre AGPI naturel et deutéré. Ces premiers essais préliminaires nous ont permis d'observer que, pour chaque AGPI, les courbes de concentration peuvent être divisées en deux parties : une partie où la viabilité cellulaire augmente considérablement illustrant un effet protecteur, une seconde partie où la toxicité brutale de l'AGPI prend le dessus sur l'effet protecteur initialement visible. Cela met encore une fois en évidence la dualité que présentent les AGPI en condition de stress oxydant.

I.2. Choix du stresser chimique

Similairement aux tests effectués dans un milieu carencé à 2,5 % en SVF, le stresser chimique H_2O_2 a été évalué. D'autres composés pouvant engendrer un stress oxydant au sein des cellules ont également été testé comme le $tBuOOH$ et le $CuSO_4$.

I.2.1. Toxicité et production d'EOR en présence de H_2O_2 (sans AGPI)

Comme pour les conditions à 2,5 % en sérum, une dose-réponse associée à la toxicité de H_2O_2 a été établie (**Figure 67**) afin de choisir la concentration limite en H_2O_2 à utiliser sans engendrer une mort cellulaire trop importante. Ces résultats ont été reproduits en tétraplicat (n=4).

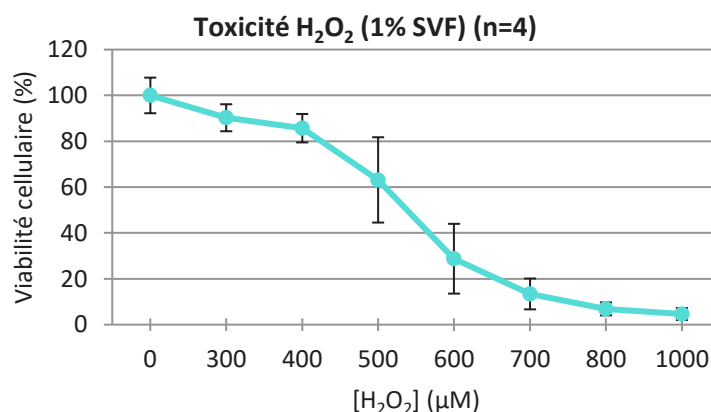


Figure 67 : Évaluation de la toxicité de H_2O_2 (1% SVF) : incubation des cellules avec H_2O_2 à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 4 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Cette dose-réponse (**Figure 67**) met en évidence qu'une toxicité de 20% est obtenue à 400 μM , correspondant à une concentration limite pouvant être utilisée en présence des AGPI.

Une cinétique de formation d'EOR a également été effectuée (**Figure 68**) pour rendre compte de l'état de stress oxydant que subissent les cellules en fonction de la concentration en H_2O_2 appliquée dans un milieu carencé à 1% de SVF.

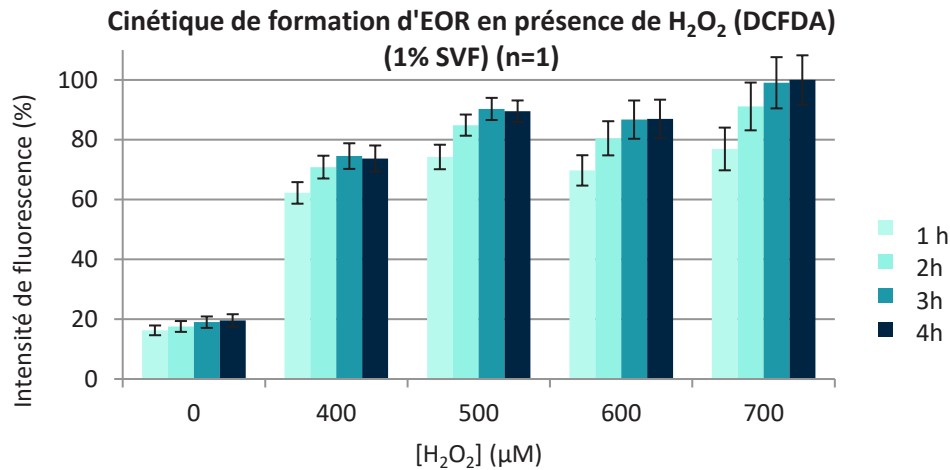


Figure 68 : Évaluation de la production d'EOR pour H₂O₂ (1% SVF) : incubation des cellules avec H₂O₂ à différentes concentrations, 400, 500, 600 et 700 µM (milieu carencé à 1% de SVF) durant 4 h. La sonde fluorescente utilisée pour la quantification d'EOR est le DCFDA (2 µM), permettant une analyse de l'intensité de fluorescence grâce au Clariostar. Les résultats sont normalisés et exprimés en % d'intensité de fluorescence par rapport aux cellules présentant le maximum d'intensité de fluorescence (condition 800 µM de H₂O₂ à 4h) correspondant à 100%.

Cette cinétique a permis de mettre en évidence que la production d'EOR, au bout de 4h en utilisant une concentration de 400 µM en H₂O₂, représente 73% de la valeur maximale de formation d'EOR obtenue (100%) en utilisant 700 µM de H₂O₂. Pour illustrer l'état des cellules subissant ce stress oxydant, des photos ont été prise à 4 h aux différentes concentrations appliquées en H₂O₂ (**Figure 69**).

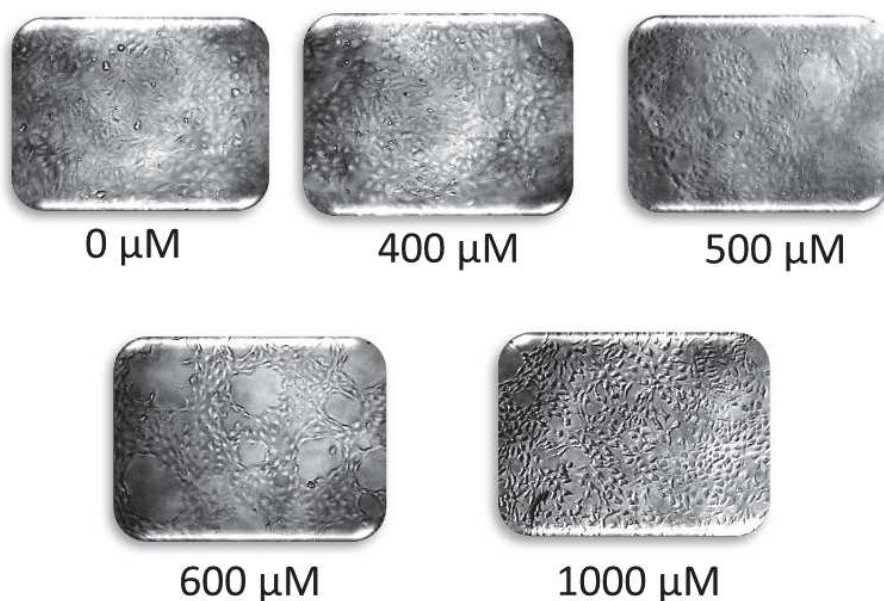


Figure 69 : Observation au microscope des ARPE-19 à différentes concentration en H₂O₂ (1% SVF) : 0 ; 400, 500, 600 et 1000 µM (milieu carencé à 1% SVF) après 4 h d'incubation (grossissement : 200×).

Ce stress est surtout visible à partir de 600 μM , où les cellules deviennent plus allongées et forment des fibres de stress.

I.2.2. Toxicité du DHA en présence de 400 μM de H_2O_2

Durant les premiers essais d'étude de toxicité en présence d'AGPI, les cellules sont incubées 24 h en présence de DHA puis traitées 4 h avec 400 μM de H_2O_2 . A cette concentration, H_2O_2 présente une toxicité de 30%, et engendre une production d'EOR non négligeable comparé aux cellules non traitées.

La dose-réponse suivante associée à une toxicité a été établie pour le DHA naturel en l'absence (**Figure 70**, courbe grise) ou en présence (**Figure 70**, courbe bleue) de H_2O_2 à 400 μM .

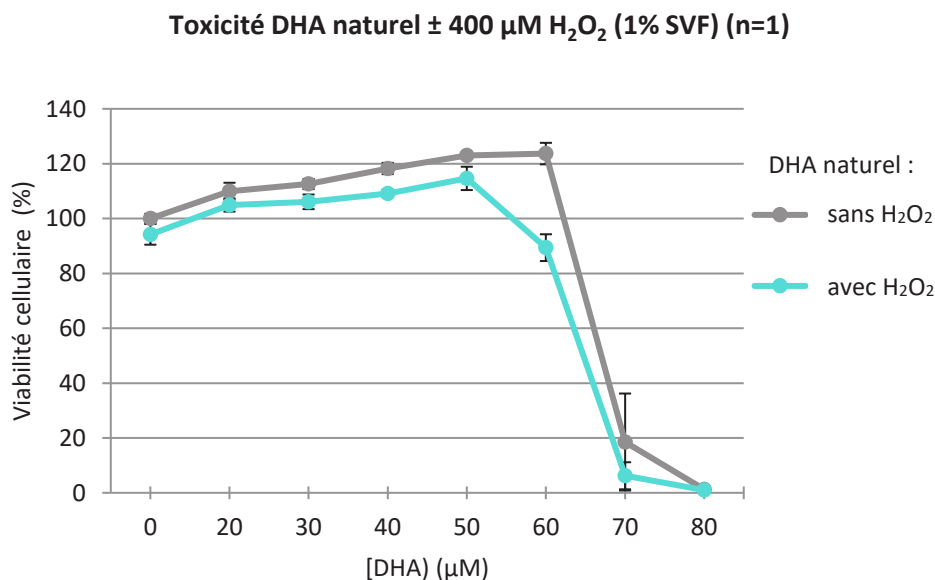


Figure 70 : Évaluation de la toxicité du DHA naturel en présence de 400 μM de H_2O_2 (1% SVF) : incubation des cellules avec le DHA à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h, puis ajout de H_2O_2 à 400 μM durant 4h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

H_2O_2 à 400 μM entraîne une toxicité légèrement plus importante du DHA, cependant la différence de toxicité n'est pas proportionnelle à la différence de production d'EOR. Le mécanisme de toxicité induit par une peroxydation lipidique du DHA est probablement trop spécifique pour être visible dans ces conditions. Ce résultat pose plusieurs hypothèses, soit le mécanisme de peroxydation

lipidique n'est pas le seul à l'origine de la toxicité du DHA, soit le stress induit à 400 μM en H_2O_2 n'est pas suffisant pour augmenter cette peroxydation.

A défaut d'augmenter la toxicité du DHA en présence de H_2O_2 à 400 μM , une concentration de 600 μM en H_2O_2 a été sélectionnée pour établir les futures dose-réponses de toxicité du DHA. Cette concentration en H_2O_2 est toxique (viabilité cellulaire réduite à environ 30%, **Figure 67**), et directement liée à un stress oxydant (production importante d'EOR, **Figure 68**), l'objectif étant de mettre en évidence si cette toxicité peut être limitée par l'utilisation de nos composés deutérés. Les différentes dose-réponses obtenues seront présentées dans le paragraphe II de ce chapitre.

I.2.3. Toxicité en présence de deux autres stressseurs : *tBuOOH* et CuSO_4

Deux autres stressseurs oxydants ont également été étudié pour entraîner une toxicité des AGPI : le CuSO_4 (impliqué dans la réaction de Fenton) et le *tBuOOH* (peroxyde plus lipophile comparé à H_2O_2) (**Figure 71**).

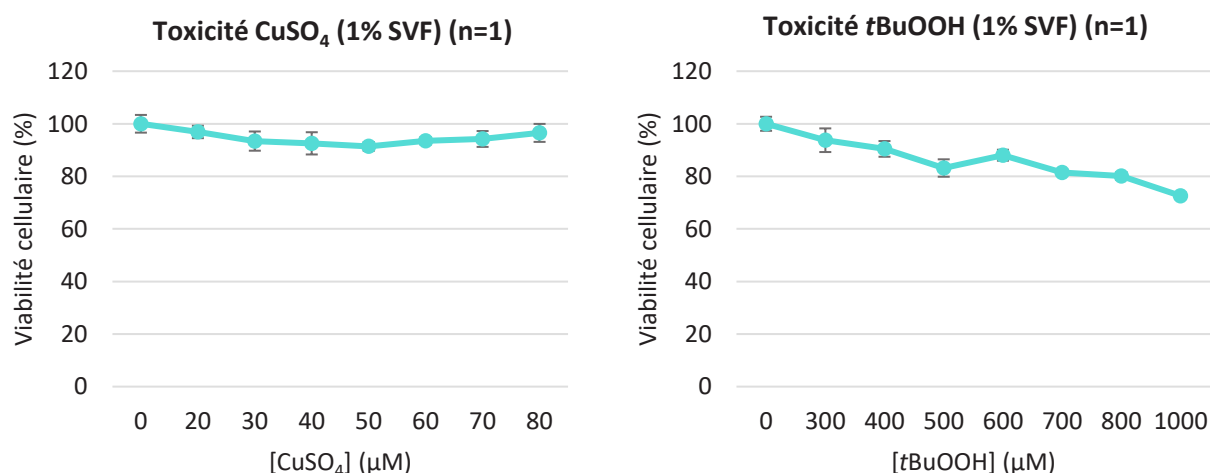


Figure 71 : Évaluation de la toxicité des stressseurs oxydants CuSO_4 et *tBuOOH* (1% SVF) : incubation des cellules en présence des stressseurs à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

Aucune toxicité n'est visible pour ces composés dans la gamme de concentration choisie, contrairement à l'utilisation de H_2O_2 . Nous nous sommes donc focalisés uniquement sur le stress oxydant induit par H_2O_2 à une concentration fixe de 600 μM pour établir les dose-réponses avec les AGPI.

II. Effet des deutériums en positions *bis*-allyliques sur la toxicité du DHA, et d'autres AGPI (ALA et LA) dans les conditions optimisées

L'optimisation précédente a été utilisée afin d'évaluer la toxicité des AGPI naturels et deutérés, et sera détaillée dans ce paragraphe. Ces dose-réponses permettent de mettre en évidence la toxicité de chaque AGPI, grâce aux calculs des concentrations inhibitrices médianes (CI_{50}) respectives. La CI_{50} correspond à la concentration d'AGPI entraînant une diminution de 50% de la viabilité cellulaire observée en absence de toxicité des AGPI. La comparaison des CI_{50} permet de mettre en évidence l'influence de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques sur la toxicité. Dans le cas des DHA, cette comparaison sera effectuée entre le DHA naturel et les DHA deutérés, mais également entre les deux composés deutérés entre eux (DHA-D₂ et DHA-D₄), afin de mettre en évidence l'influence de l'incorporation des deutériums sur une ou deux positions *bis*-allyliques. Le protocole suivi pour chaque AGPI permettant d'établir les dose-réponses étudiées dans ce paragraphe est le suivant (**Schéma 115**) :

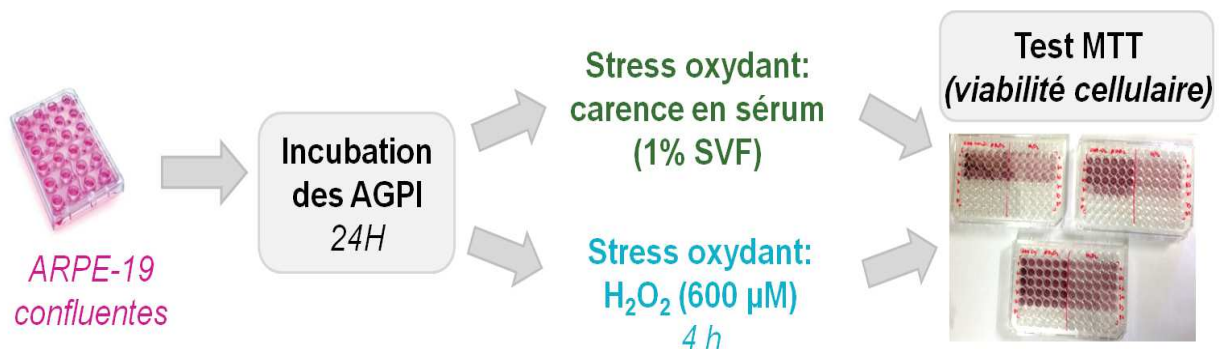


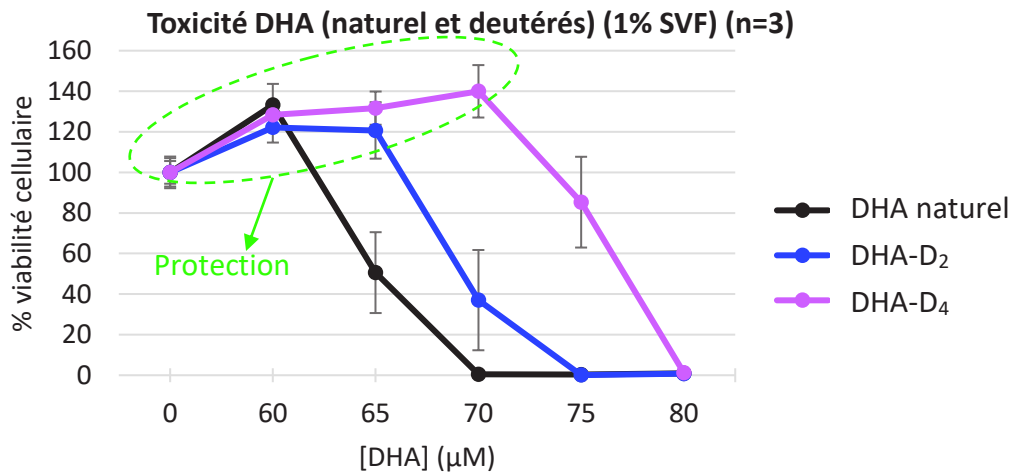
Schéma 115 : Protocole suivi pour évaluer la toxicité et déterminer les CI_{50} des AGPI en culture cellulaire d'ARPE-19 en condition de stress oxydant.

II.1. Toxicité de la série DHA

II.1.1. Toxicité des DHA naturel et deutérés en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF, sans H₂O₂

L'évaluation de la toxicité des DHA naturel et deutérés (**Figure 72**) a été effectuée sur une gamme de concentration resserrée sur la pente, associée à la chute brutale de viabilité cellulaire, avec un pas de 5 μ M à la place de 10 μ M. Les dose-réponses ont été obtenues en triplicat ($n=3$), permettant de réaliser des tests statistiques.

a)



b)

Toxicité DHA (naturel et deutérés) (1% SVF) (n=3)

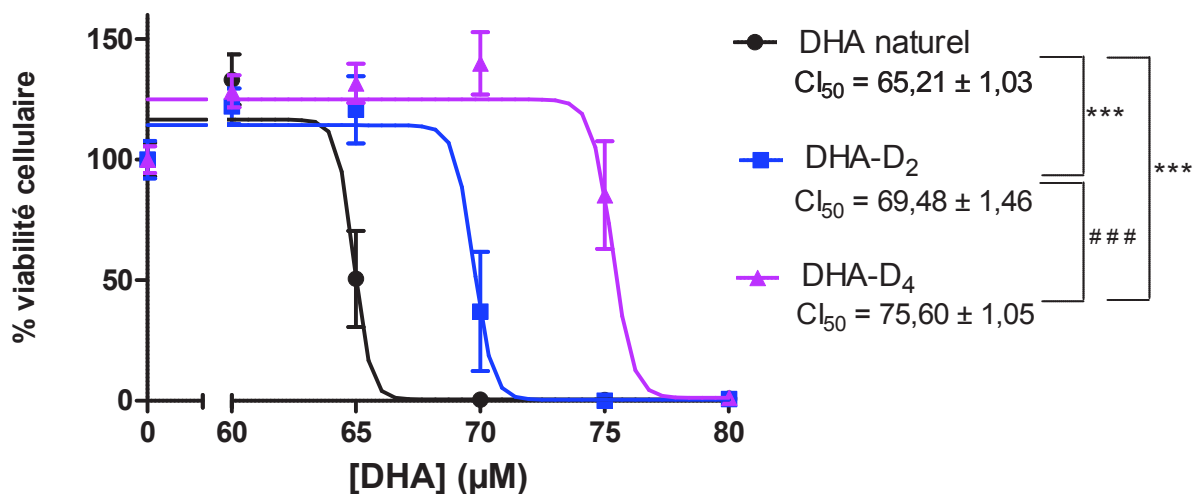


Figure 72 : Évaluation de la toxicité des DHA (naturel et deutérés) (1% SVF) : incubation des cellules avec le DHA à une gamme de concentrations de 60 à 80 µM (avec un pas de 5 µM) (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire. a) Courbes obtenues avec Excel montrant l'effet bénéfique (entouré en vert) et l'effet toxique des DHA. b) Sigmoïdes obtenues avec GraphPad Prism® pour le calcul des CI₅₀.

Pour les trois DHA (naturel et deutérés) un effet de protection est visible entre 0 et 60 µM (**Figure 72, a**), suivi d'une chute brutale de la viabilité cellulaire, mettant en évidence que la dualité du DHA naturel est également présente au niveau des DHA deutérés. D'après les calculs des

Cl₅₀associés aux sigmoïdes (**Figure 72, b**) et à une étude statistique, les résultats montrent des différences significatives entre les 3 composés en faveur des deutérés :

Cl₅₀(DHA naturel)=65,21±1,03 μM ; Cl₅₀(DHA-D₂)=69,48±1,46 μM et Cl₅₀(DHA-D₄)=75,60± 1,05μM. Une diminution de la toxicité des DHA deutérés comparés à celle du DHA naturel est ainsi observée dans ces conditions. Le DHA-D₄ est moins toxique que le DHA-D₂, montrant l'intérêt de l'incorporation des deutériums sur deux positions *bis*-allyliques.

La différence de toxicité entre les différents DHA est observable en microscopie d'après l'aspect et la morphologie des cellules (**Figure 73**). Une toxicité brutale est visible pour les trois DHA à partir de différente concentration : 65μM pour le DHA naturel, 70 μM pour le DHA-D₂et 75 μM pour le DHA-D₄. Chaque concentration correspond au point présentant l'écart type le plus important au niveau des toxicités obtenues, comprenant ainsi les valeurs des Cl₅₀ calculées (**Figure 72**).

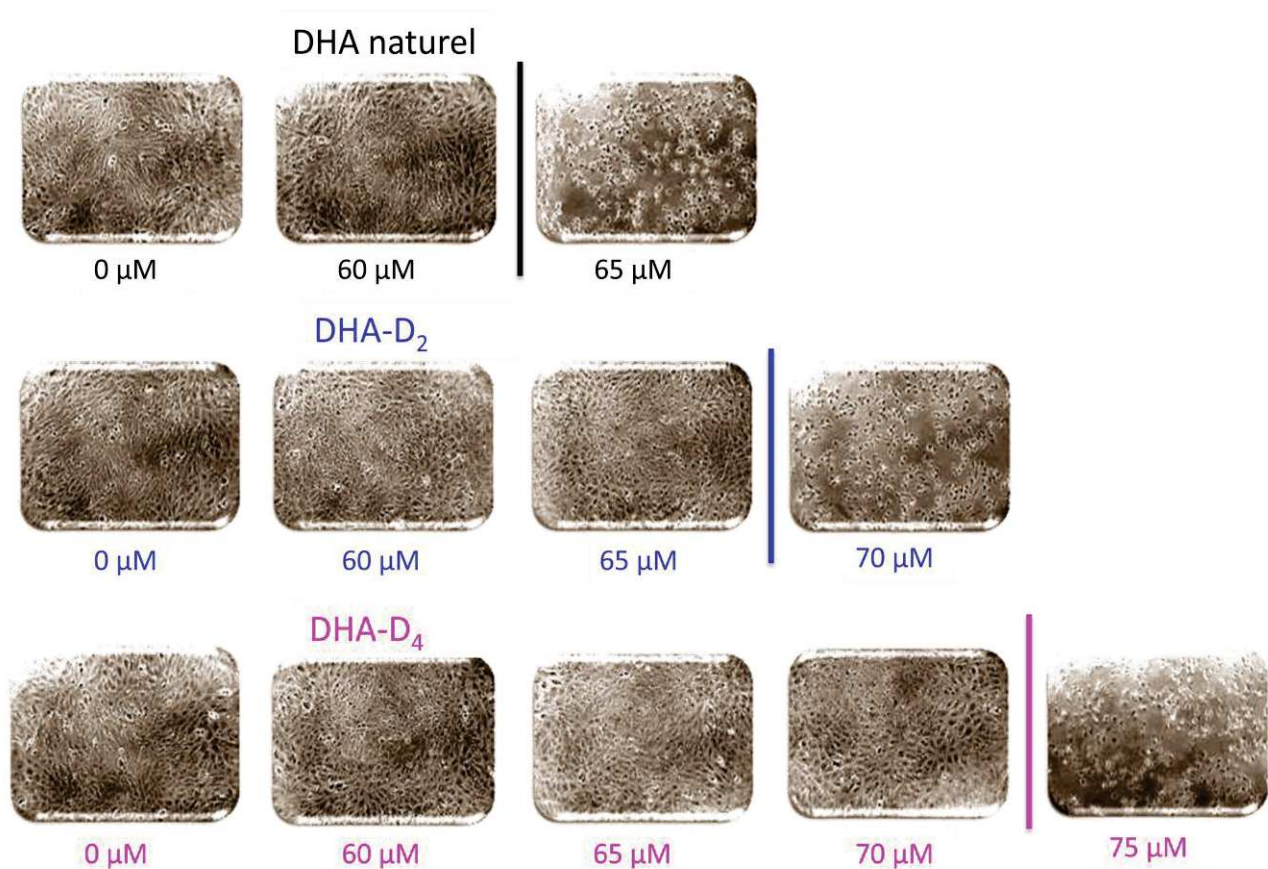


Figure 73 : Observation au microscope des ARPE-19 en présence des DHA (naturel et deutérés) à différentes concentrations (grossissement : 200×).

II.1.2. Toxicité des DHA naturel et deutérés en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF et de 600 μM de H_2O_2

Une dose-réponse avec une gamme de concentration étalée en DHA naturel et deutéré, et en présence de 600 μM de H_2O_2 a été établie (**Figure 74**). Le pourcentage de viabilité cellulaire à 600 μM n'est que de 30%, montrant l'effet toxique du stress induit par H_2O_2 même en l'absence d'AGPI. Les dose-réponses de toxicité ont été obtenues en triplicat ($n=3$).

Toxicité DHA (naturel et deutérés) + H_2O_2 (600 μM) (1% SVF) ($n=3$)

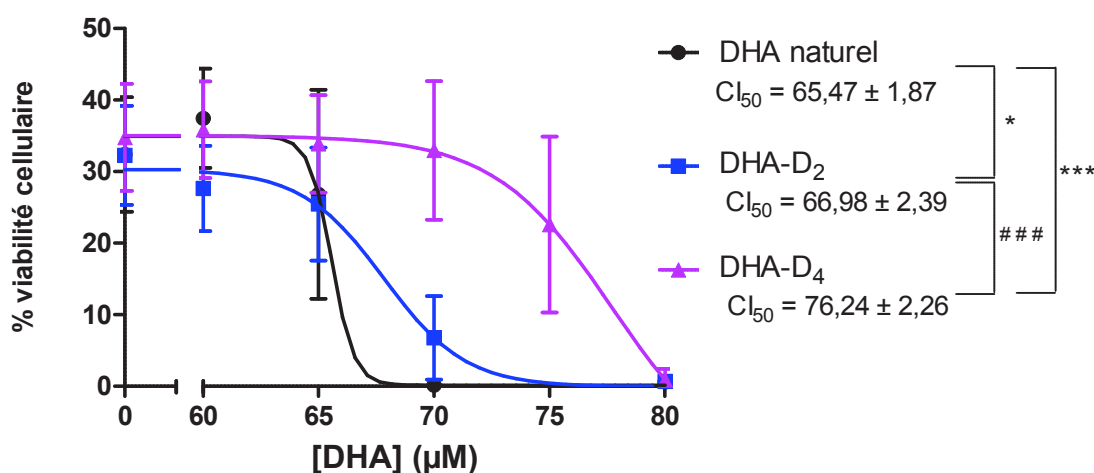


Figure 74 : Évaluation de la toxicité des DHA (naturel et deutérés) en présence de 600 μM de H_2O_2 (1% SVF) : incubation des cellules avec le DHA à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h, puis ajout de H_2O_2 à 600 μM durant 4h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire.

En présence d'un stress oxydant induit par H_2O_2 , le DHA-D₄ (Cl_{50} de $76,24 \pm 2,26 \mu\text{M}$) montre une toxicité significativement inférieure (**Figure 74**) à celle du DHA naturel et de son analogue di-deutééré. En revanche, la différence entre le DHA naturel et le DHA-D₂ est moins importante (les deux "sigmoïdes" sont très proches), avec des Cl_{50} respectives de $65,47 \pm 1,87 \mu\text{M}$ et $66,98 \pm 2,39 \mu\text{M}$. Similairement à la condition de carence à 1% de SVF sans H_2O_2 (**Figure 72**), cette dose-réponse montre l'intérêt de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques.

II.2. Toxicité des séries ALA et LA

Afin de comparer l'effet de l'incorporation des deutériums sur la toxicité de la série DHA avec les séries ALA et LA, les dose-réponses associées la toxicité des AGPI ont été établies en présence d'une carence en sérum (1% SVF) ou de H₂O₂ (600 μM).

II.2.1. Toxicité des ALA naturel et deutéré en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF, avec ou sans 600 μM de H₂O₂

Les dose-réponses de toxicité associées aux ALA naturel et deutéré (**Figure 75**) ont été reproduites en triplicat (n=3) dans les conditions où les cellules sont carencées en sérum (1% SVF), avec ou sans traitement en présence de H₂O₂ à 600 μM.

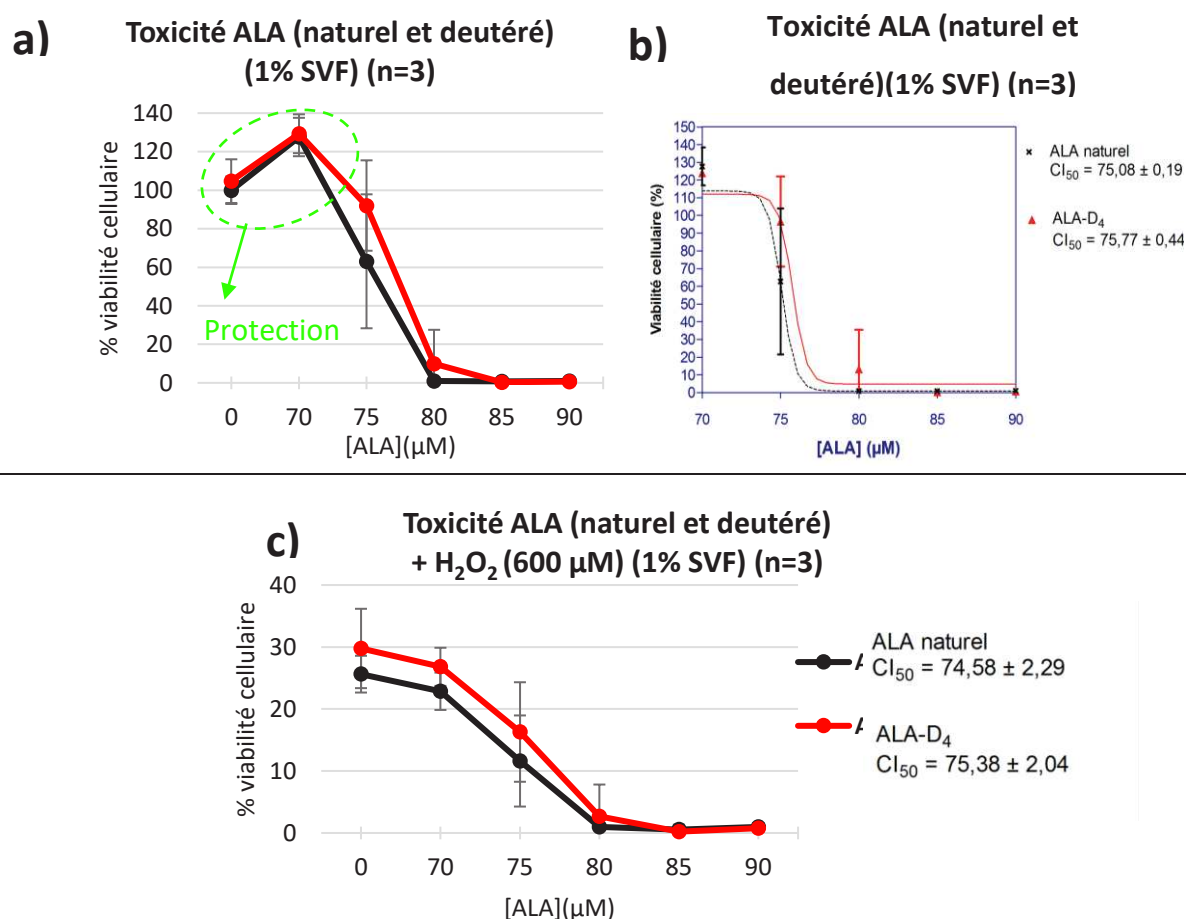


Figure 75 : Évaluation de la toxicité des ALA (naturel et deutéré) (1% SVF ± H₂O₂) : incubation des cellules avec l'ALA à une gamme de concentrations de 70 à 90 μM (avec un pas de 5 μM) (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h, puis ajout de H₂O₂ à 600 μM (uniquement pour c). Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire. a) Courbes obtenues avec Excel montrant l'effet bénéfique (entouré en vert) et l'effet toxique des ALA. b) Sigmoïdes obtenues avec GraphPad Prism® pour le calcul des CI₅₀. c) Dose-réponses de toxicité des ALA naturel et deutéré en présence de H₂O₂ (600 μM).

Dans les conditions de carence à 1% de SVF (**Figure 75, a et b**), une toxicité brutale est observée pour les deux ALA. En effet la viabilité cellulaire égale à 140 % à 70 μM chute à presque 0% à 80 μM . Cet effet engendre une grande variabilité de la survie cellulaire à 75 μM , présentant ainsi un écart type important. D'après les CI_{50} calculées, les toxicités de chaque composé apparaissent très proches et ne présentent pas de différence significative en faveur d'un composé ou d'un autre. Ces résultats, établis dans nos conditions, montrent que la diminution de toxicité due à la présence des deutériums n'est pas prouvée pour la série ALA, contrairement aux observations de la série DHA.

Les doses-réponses mises en évidence pour les ALA naturel et deutérés en présence de 600 μM de H_2O_2 (**Figure 75, c**) ne montrent pas de différence significative de toxicité entre ces deux analogues, similairement à ce qui avait été établi pour la condition de carence à 1% de SVF.

II.2.2. Toxicité des LA naturel et deutéré en présence d'un milieu carencé à 1% de SVF, avec ou sans 600 μM de H_2O_2

De même que pour l'ALA, les toxicités des LA naturel et deutéré ont été mise en évidence par des dose-réponses (**Figure 76**) et ont été reproduites en triplicat ($n=3$) dans les mêmes conditions que précédemment (carencées en sérum, ou traitées avec 600 μM de H_2O_2). Un étalement des concentrations au niveau de la pente montrant l'effet toxique du LA a été effectué entre 80 et 120 μM avec un pas de 10 μM car la toxicité est plus progressive pour cette série.

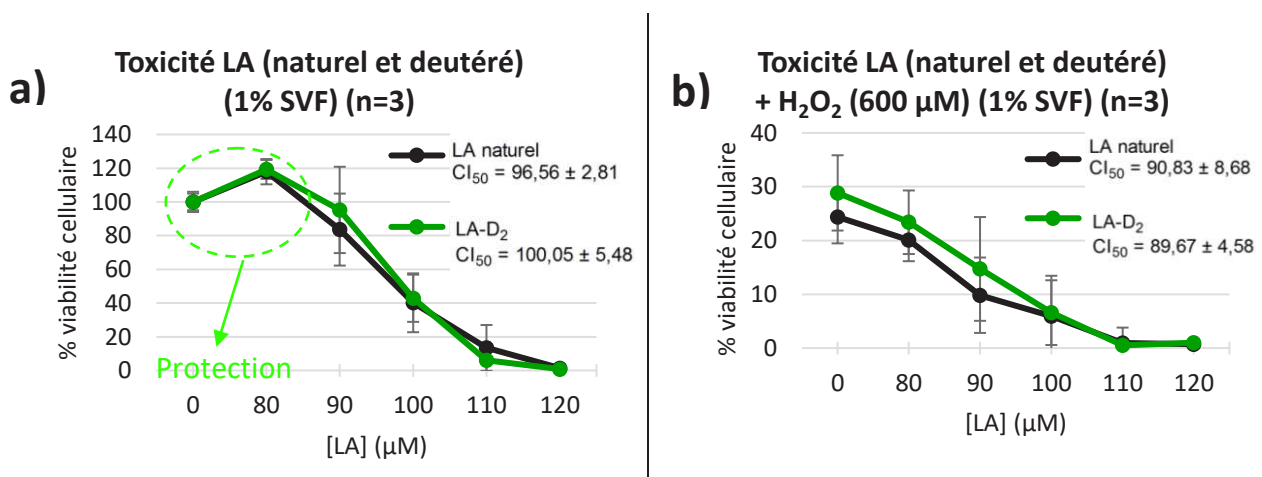


Figure 76 : Évaluation de la toxicité des LA (naturel et deutéré) (1% SVF \pm H_2O_2) : incubation des cellules avec le LA à une gamme de concentrations de 80 à 120 μM (avec un pas de 5 μM) (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h, puis ajout de H_2O_2 à 600 μM (uniquement pour b). Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles non traitées correspondant à 100% de viabilité cellulaire. a) Dose-réponse de toxicité des LA naturel et deutéré en milieu carencé à 1% de SVF et montrant leur effet bénéfique (entouré en vert) et toxique. b) Dose-réponses de toxicité des LA naturel et deutéré en présence de H_2O_2 (600 μM).

Pour les deux conditions de stress (**Figure 76, a et b**), correspondant à une carence à 1% de SVF ou à un traitement avec H₂O₂ (600 µM), aucune différence significative n'est présente après une étude statistique entre les CI₅₀ du LA naturel et du LA-D₂. De même que pour l'ALA, l'incorporation des deutériums au niveau de la position *bis*-allylique du LA naturel ne permet pas de prouver une diminution de sa toxicité dans nos conditions et dans notre modèle cellulaire.

III. Conclusion

Un travail de mise au point a dû préalablement être effectué afin de développer et de mettre au point les conditions permettant d'étudier la toxicité des AGPI en condition oxydante. En effet, selon le pourcentage en sérum la dualité des AGPI a pu être observée, correspondant à deux effets opposés : ils peuvent être soit protecteurs, soit toxiques selon les conditions de stress utilisées.

Tout d'abord, les essais préliminaires réalisés avec un milieu sans sérum ont conduit à des problèmes de reproductibilité, nous amenant à utiliser un milieu engendrant un stress oxydant moins important pour les cellules.

Ensuite un milieu carencé à 2,5% de SVF a été utilisé dans des tests préliminaires, cependant les dose-réponses réalisées dans ces conditions ont montré un manque de toxicité des AGPI dans la gamme de concentration utilisée (de 10 jusqu'à 110 µM), et ont permis d'observer à l'inverse un effet protecteur dose-dépendant. L'utilisation d'un stresseur oxydant additionnel comme H₂O₂ n'a pas permis d'engendrer un effet toxique des AGPI dans un milieu à 2,5% de SVF, ces derniers semblant même protéger les cellules.

Enfin, au vue des résultats précédents, l'utilisation d'un milieu carencé à 1% de SVF a été sélectionné afin de se placer dans des conditions de stress oxydant (formation d'EOR et peroxydation lipidique) plus important que dans le milieu carencé à 2,5% de SVF, et nécessaire pour observer une toxicité des AGPI. Cette toxicité des AGPI a ainsi été évaluée selon deux type de stress, un stress associé à une carence à 1% de SVF et un stress oxydant accentué par le traitement avec H₂O₂ à une concentration toxique de 600 µM. Les dose-réponses mise en évidence dans la condition de carence à 1% de SVF peuvent être divisées en deux parties pour chaque AGPI : un effet protecteur est observable aux faibles concentrations, suivi d'une chute brutale de la viabilité cellulaire. Pour les séries d'AGPI les plus toxiques (DHA et ALA) la gamme de concentration des dose-réponses a été resserrée sur la pente (chute brutale de viabilité cellulaires) avec un pas de 5

μM au lieu de 10 μM, ce dernier étant utilisé pour la série LA présentant une toxicité plus progressive.

Le tableau récapitulatif suivant (**Tableau 22**) résume les différentes CI_{50} obtenues pour les AGPI dans les 2 conditions de stress cellulaire utilisées.

AGPI	CI_{50}	
	Carence SVF (1% SVF)	H ₂ O ₂ (600 μM)
DHA naturel	65,21 ± 1,03	65,47 ± 1,87
DHA-D ₂	69,48 ± 1,46	66,98 ± 2,39
DHA-D ₄	75,60 ± 1,05	76,24 ± 2,26
ALA naturel	75,08 ± 0,19	74,58 ± 2,29
ALA-D ₄	75,77 ± 0,44	75,38 ± 2,04
LA naturel	96,56 ± 2,81	90,83 ± 8,68
LA-D ₂	100,05 ± 5,48	89,67 ± 4,58

Tableau 22 : Tableau récapitulatifs des CI_{50} calculés associées au traitement des cellules par les différentes séries d'AGPI en présence d'un stress oxydant.

Les résultats obtenus pour la série DHA lorsque les cellules sont carencées à 1% de SVF, montrent des toxicités significativement décroissantes en fonction du nombre de deutériums incorporés en positions *bis*-allyliques :

$$CI_{50}(DHA-D_4) > CI_{50}(DHA-D_2) > CI_{50}(DHA \text{ naturel})$$

En condition de stress oxydant accru, engendrée par la présence d'une concentration toxique en H₂O₂ (600 μM), le DHA-D₄ protège les cellules de manière plus importante que le DHA-D₂ ou naturel.

$$CI_{50}(DHA-D_4) \gg CI_{50}(DHA-D_2) > CI_{50}(DHA \text{ naturel})$$

Ainsi, l'influence de l'incorporation des deutériums permet une diminution de la toxicité des DHA, même si les CI_{50} déterminées restent proches en valeur brutes. Ces résultats ne sont pas observables pour les séries d'AGPI (ALA et LA) car aucune différence significative n'est présente entre les CI_{50} des AGPI naturel et deutéré établies dans nos conditions.

Les ARPE-19 sembleraient ainsi être plus sensibles à la toxicité induite par le DHA comparé à celle induite par l'ALA ou le LA dans les conditions appliquées, d'après deux types de résultats :

- la comparaison des dose-réponses établies pour les séries d'AGPI naturels (**Figure 77**) montre que le DHA est plus toxique que l'ALA et le LA.

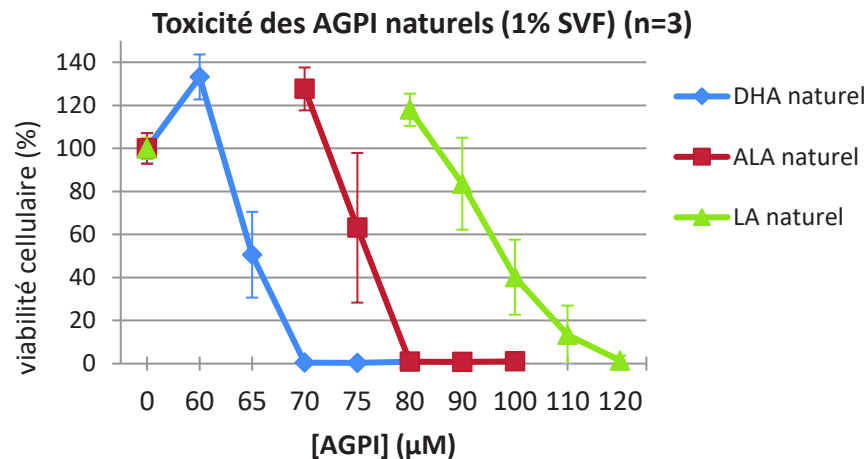


Figure 77 : Évaluation de la toxicité des AGPI naturels (1% SVF) : incubation des cellules avec l'AGPI à différentes concentrations (milieu carencé à 1% de SVF) durant 24 h. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire.

- le remplacement de positions *bis*-allyliques par des deutériums au niveau du DHA permet de diminuer sa toxicité, ce qui n'est pas observé pour l'ALA et le LA.

La dualité du DHA naturel observé lors de ces tests de toxicité a également été rapportée dans la littérature sur les ARPE-19.

IV. Le paradoxe du DHA : Effet protecteur ou toxique sur la lignée ARPE-19 évoqués dans la littérature

Afin de replacer les résultats obtenus lors de l'évaluation de la toxicité du DHA, dans un contexte bibliographique, une recherche a été menée dans la littérature montrant, comme observé dans nos travaux, la dualité ou le paradoxe du DHA naturel sur le modèle cellulaire ARPE-19.

Knott *et al.* ont rapporté un effet protecteur du DHA associé à une augmentation de 36% de survie cellulaire, lors d'un pré-traitement à 100 nM de DHA pendant 24h sur des cellules carencées à 0,5% de SVF, suivi d'un stress oxydant en présence de H₂O₂ à 600 µM.²²⁶ L'explication

suggérée par les auteurs est que cette protection observée serait liée à un dérivé bénéfique du DHA, la NPD1, à l'origine de l'activation d'une voie de signalisation importante pour la croissance des cellules et la mise en place de leur défense antioxydante.²²⁷

L'effet anti-inflammatoire du DHA est également rapporté par Fang *et al.* dans les cellules ARPE-19.²²⁸ Ces dernières sont pré-traitées dans un milieu "complet" (10% SVF) en présence de DHA (à 50 ou 100 μM), suivi d'une incubation avec le LA (à 50 μM) responsable de l'activation d'une voie pro-inflammatoire (NF- κB et PPAR). Cette dernière est contrée par la présence de DHA permettant l'activation d'une voie anti-inflammatoire.

Le DHA permet également l'activation de l'autophagie de protéines endommagées et présente un effet antioxydant cytoprotecteur,²²⁹ comme mentionné par Johansson *et al.* L'effet antioxydant rapporté est lié à la capacité du DHA à activer une voie de défense endogène (autophagie et Nrf2), similaire à NRF2, à travers une production d'EOR comme le reporte les auteurs. Le DHA est utilisé à 70 ou 140 μM dans un milieu complet. Les auteurs indiquent que ces quantités utilisées correspondent à des "doses physiologiques".

Pasovic *et al.* ont montré un effet protecteur du DHA (à 50 nM) à travers la réduction d'une caspase intervenant dans l'apoptose,²³⁰ permettant ainsi une augmentation de la viabilité cellulaire des ARPE-19 lorsqu'elles sont stockées à 16°C pendant une semaine dans un milieu dit de "stockage" ne comprenant pas de SVF.

L'effet toxique du DHA a été mentionné par Liu *et al.* lorsque les cellules ARPE-19 sont exposées à un stress lumineux durant 6, 12 ou 24 h.²³¹ Cet effet de toxicité croît avec l'intensité lumineuse d'exposition et pour des concentrations en DHA comprises entre 10 et 75 μM dans un milieu sans sérum. A ces concentrations en DHA utilisée, aucune toxicité n'est rapportée sur les cellules non exposée à la lumière. Ce résultat diffère de ce que nous avons mis en évidence lors des dose-réponses de toxicité réalisées dans un milieu totalement carencé en SVF puisqu'une toxicité du DHA a été observée à partir de 60 μM dans nos travaux. Les auteurs reportent également que le pré-traitement en présence du DHA naturel suivi d'une exposition lumineuse entraîne une augmentation de la formation d'EOR intra et extracellulaire, ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique. Leur résultat suggère que le DHA vulnérabilise la rétine face aux dommages causés par la lumière à travers une peroxydation lipidique.

Chapitre II. Impact des deutériums sur l'inhibition de la peroxydation lipidique au sein des cellules ARPE-19

L'étude de l'inhibition de la peroxydation lipidique en présence de nos composés deutérés a été effectuée pour les différentes séries d'AGPI (DHA, ALA et LA naturels ou deutérés) et leurs lipophénols respectifs. L'objectif est d'étudier l'influence de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques non seulement au niveau des lipophénols mais également des AGPI libres. En effet, la liaison entre le polyphénol et le DHA pouvant être clivée et conduire à la libération DHA, il nous est apparu important de comparer les AGPI aux lipophénols.

L'évaluation de l'inhibition de la peroxydation lipidique a été menée en parallèle des essais de toxicité des AGPI (chapitre I de cette partie). En effet, des conditions de stress cellulaire identiques au cours de ces deux tests biologiques ont été utilisées afin de pouvoir étudier leur lien éventuel. Une comparaison entre les CI_{50} (toxicité) obtenues et l'inhibition de la peroxydation lipidique a été entreprise.

I. Les différentes méthodes pour quantifier la peroxydation lipidique

I.1. Les différentes méthodes évoquées dans la littérature

Différentes méthodes existent pour quantifier la peroxydation lipidique présente dans un système cellulaire, les différentes techniques détaillées dans ce paragraphe seront données à titre d'exemple et ne constituent pas une liste exhaustive.

Les composés issus de la peroxydation lipidique, à son stade le plus avancé, correspondent à une grande variété d'alcane et d'aldéhyde (Partie I, chapitre I, paragraphe II.2.2.), comme le MDA, le HNE ou le HHE.

Le MDA peut être quantifié en utilisant le test TBARS (également mentionné dans la partie II, chapitre I, paragraphe II.1.). Une mesure d'absorbance du composé issu d'une réaction de condensation entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) est effectuée.¹²⁸ Cette méthode, bien que facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, est cependant vivement critiquée pour son manque de sensibilité et de spécificité. En effet, le TBA est capable de réagir avec d'autres composés comme par exemple les sucres, les acides aminés, ou l'albumine, formant ainsi des adduits et ayant pour conséquence la présence d'interférences et d'artefacts durant les mesures

colorimétriques ou fluorométriques de l'adduit provenant du MDA. Cette méthode est fréquemment utilisée mais n'est ainsi pas spécifique de la peroxydation lipidique des AGPI.

Le HNE, autre molécule issue de la peroxydation lipidique, peut également être dosé *via* une méthode d'HPLC-UV (absorbance à $\lambda = 233$ nm dans l'eau), cependant de nombreuses substances peuvent co-éluer avec ce composé et absorber à une longueur d'onde similaire, remettant en question la fiabilité de cette technique. Ainsi, les techniques de dosage du MDA et du HNE présentent de nombreux inconvénients tels que le manque de spécificité et de sensibilité.²³²

La quantification des isoprostanes et neuroprostanes (IsoP et NeuroP, mentionnées dans la Partie III, chapitre I, paragraphe III.1.2.),²³³ dérivés spécifiques de l'oxydation radicalaire de certains AGPI, constitue une méthode de plus en plus utilisée pour quantifier la peroxydation lipidique des AGPI. Ces composés constituent des biomarqueurs de choix pour quantifier ce phénomène de par la spécificité de leur production, leur présence physiologiques (détectables dans les tissus) et la fluctuation de leur taux en fonction du niveau de stress oxydant. Ils peuvent ainsi être reliés au stress oxydant résultant ou responsable d'un état pathologique. La stabilité de ces composés permet leur dosage par plusieurs types de technique différents tels que la GC/MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse), ou l'HPLC/MS. Un traitement préalable des échantillons biologiques doit être effectué afin d'extraire le biomarqueur et permettre son analyse. Des méthodes immunologiques de type immunoenzymatique (ELISA : enzyme linked immunosorbent assay)²³⁴ ou radio-immunologique (RIA)²³⁵ ont également été développées pour quantifier certains isoprostanes (**Figure 78**, F₂-IsoPs, métabolites issus de l'oxydation de l'acide arachidonique).

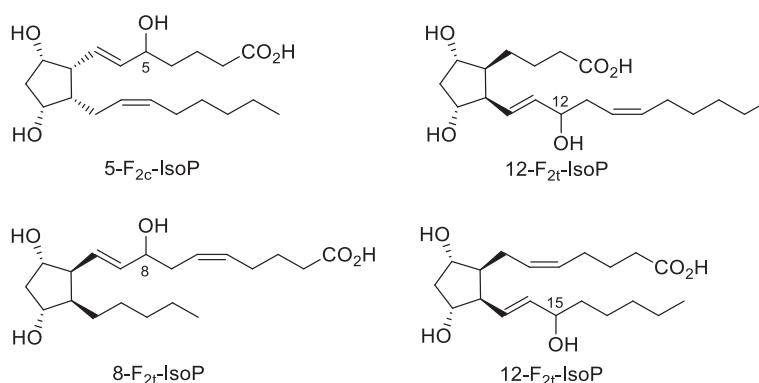


Figure 78 : Isoprostanes obtenues après l'oxydation radicalaire de l'acide arachidonique, biomarqueurs du stress oxydant lipidique.

L'utilisation de sonde fluorescente est également rapportée pour quantifier la peroxydation lipidique. Par exemple, Liu *et al.*,²³¹ ont quantifié, grâce à la sonde DCFDA (préalablement transformé en DCFH₂ avant la mise en œuvre du test), l'hydroperoxyde (LOOH) issu de la peroxydation lipidique dans le surnageant de cellule ARPE-19. Cependant, cette sonde est utilisée pour quantifier tout type d'EOR et ne présente pas de spécificité prouvée pour les EOR formés au sein des membranes lipidiques.

Une méthode validée pour quantifier de manière spécifique la peroxydation lipidique au sein des membranes cellulaires a été développée par Naguib,²³⁶ et validée par Drummen *et al.*¹⁷² Elle est mise en œuvre par l'utilisation d'une sonde fluorescente lipophile, le C11-BODIPY^{581/591} (**Figure 79**). Shchepinov *et al.*, ayant synthétisé et développé les AGPI deutérés (partie III, Chapitre II), utilisent cette sonde lipidique spécifique pour évaluer l'impact des deutériums sur la peroxydation lipidique (également mentionnée dans la partie II, chapitre I, paragraphe II.1.). La comparaison du C11-BODIPY^{581/591} avec la méthode TBARS a été rapportée par Dominguez-Rebolledo *et al.*, dans des spermatozoïdes.²³⁷ Pour quantifier la peroxydation lipidique *via* une analyse de fluorescence de la sonde C11-BODIPY^{581/591}, les auteurs mentionnent deux types d'analyse : une lecture de la fluorescence en microplaque (fluorométrie) ou une technique utilisant la cytométrie de flux (FACS : Fluoration Activated Cell Sorting). Le stress oxydant est induit par deux types de stressseurs chimiques : H₂O₂ et *t*BuOOH. En présence de ces stress oxydants responsables d'une augmentation de la peroxydation lipidique au sein des cellules, l'utilisation de la sonde C11-BODIPY^{581/591} présente un avantage supérieur comparé à la mise en œuvre du test TBARS, associé à une meilleure sensibilité et une meilleure répétabilité. Enfin, les auteurs reportent une amélioration de la sensibilité lorsque la fluorescence est quantifiée par cytométrie de flux comparée à la lecture de la fluorescence en microplaque. Au vu des résultats mis en évidence par l'équipe de Shchepinov et l'étude effectuée par Dominguez-Rebolledo *et al.*,²³⁷ nous avons utilisé la sonde C11-BODIPY^{581/591} (**Figure 79**) pour évaluer la peroxydation lipidique au sein des ARPE-19, par cytométrie de flux *via* une analyse de type FACS (Fluoration Activated Cell Sorting).

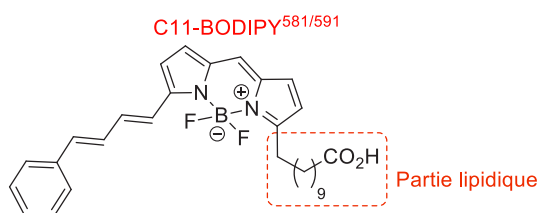


Figure 79 : Forme réduite de la sonde fluorescente C11-BODIPY^{581/591}.

I.2. Présentation et utilisation de la sonde C11-BODIPY^{581/591}

La sonde fluorescente C11-BODIPY^{581/591} est spécifique de la peroxydation lipidique présente au niveau des membranes des cellules. Sa structure présente une partie lipidique de type acide gras (**Figure 79**, -CH₂-(CH₂)₉-CO₂H) qui lui permet de s'incorporer au sein des membranes. Deux fluorescences sont associées à cette sonde, correspondant chacune aux deux formes de la sonde, une dite "réduite" et l'autre "oxydée" (**Figure 80**). Les structures chimiques de la forme oxydée ont été mises en évidence par Drummen *et al.* en milieu non cellulaire et cellulaire (culture de fibroblastes), *via* une analyse par HPLC-MS.²³⁹

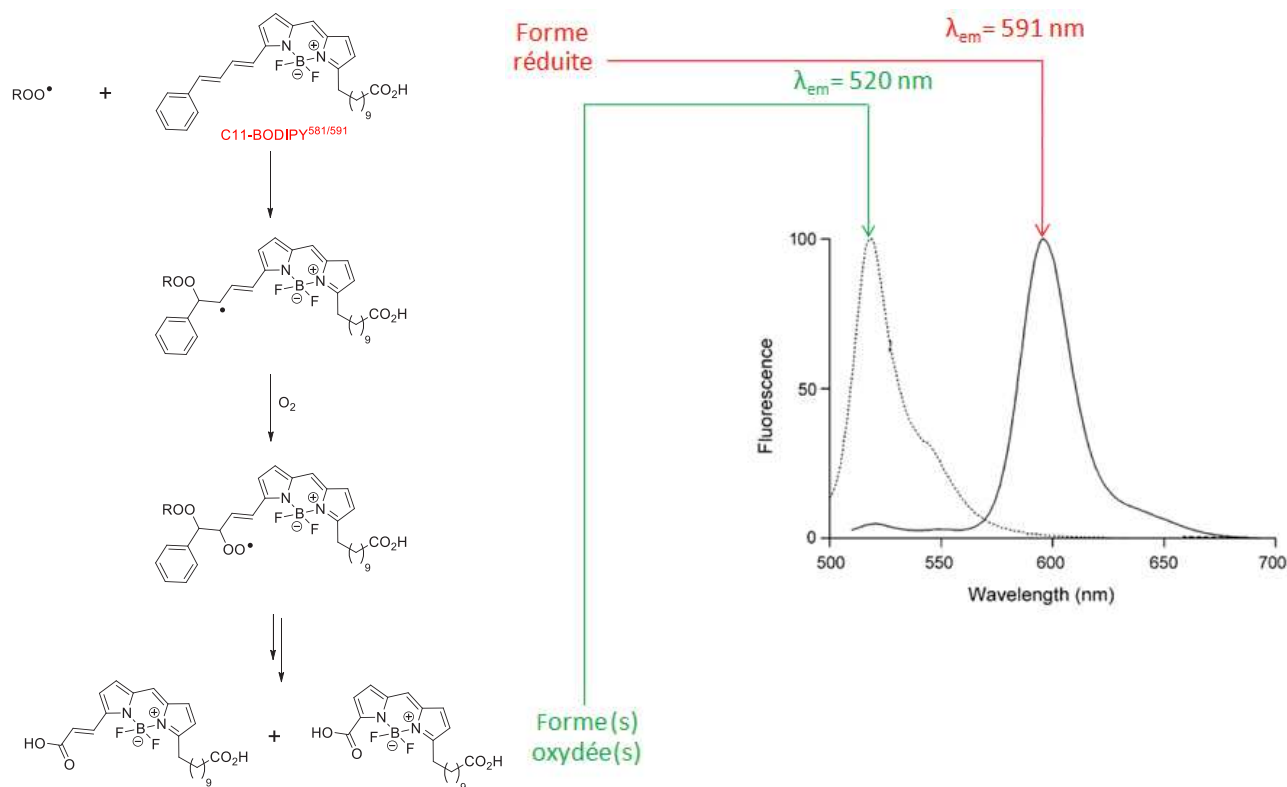


Figure 80 : A gauche : réaction d'oxydation du C11-BODIPY^{581/591} en présence de radicaux peroxydes lipidiques ROO• (propagation) : mécanisme supposé. A droite : spectre d'émission de fluorescence des deux formes de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.²³⁹⁻²⁴⁰

La présence de la forme oxydée est directement liée à la peroxydation lipidique des acides gras membranaires et permet donc de quantifier ce mécanisme. En terme d'excitation (ex), les deux formes présentent une longueur d'onde maximale distincte : $\lambda_{ex}(\text{forme réduite}) = 581 \text{ nm}$ et $\lambda_{ex}(\text{forme oxydée}) = 490 \text{ nm}$. La séparation spectrale en terme d'émission (em) des deux formes est également suffisante pour les distinguer (**Figure 80**) : $\lambda_{em}(\text{forme réduite}) = 591 \text{ nm}$ et $\lambda_{em}(\text{forme oxydée}) = 520 \text{ nm}$. Seul les spectres d'excitation/émission de la forme réduite sont fournis par le fournisseur commercial (**Figure 81**).

Forme réduite du C11-BODIPY^{581/591}

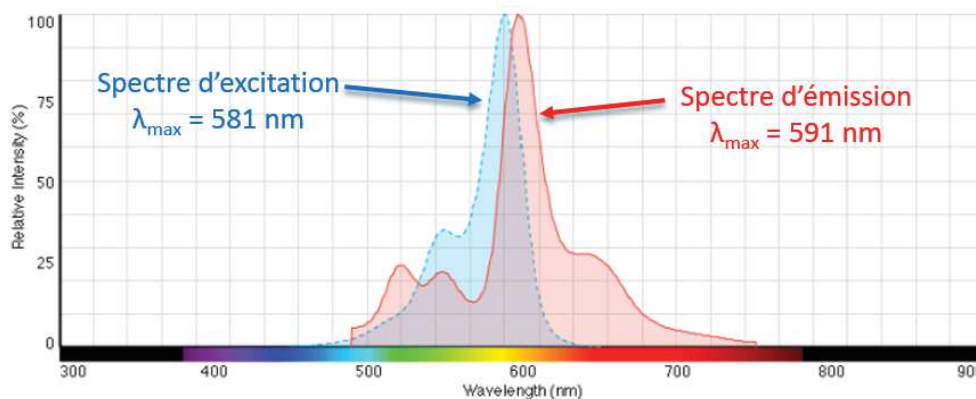


Figure 81 : Spectre d'excitation et d'émission de la forme réduite du C11-BODIPY^{581/591}.

Afin d'analyser les résultats des tests réalisés avec cette sonde fluorescente, nous utilisons la cytométrie de flux. Cette technique permet de trier et compter les cellules en fonction de leur taille (FSC : forward scatter) et leur granularité (SSC : side scatter) et ainsi de distinguer les différentes populations cellulaires (notamment les cellules vivantes et mortes) (**Figure 82**).

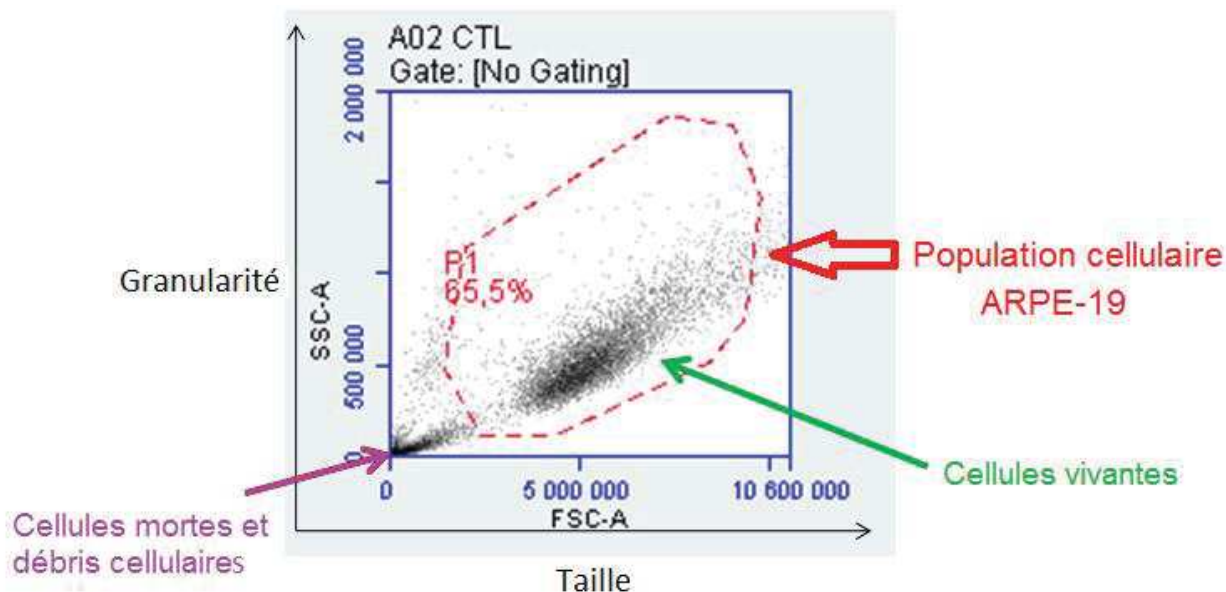


Figure 82 : Analyse par cytométrie de flux permettant la distinction de différentes populations cellulaires d'ARPE-19.

Cette analyse permet de cibler une population cellulaire constituée de cellules vivantes. L'analyse de l'intensité de fluorescence peut ainsi être réalisée en éliminant les populations de cellules mortes. Cette technique d'analyse de fluorescence est nommée FACS (Fluoraction

Activated Cell sorting), et permet de quantifier une intensité moyenne de fluorescence mesurée pour une population cellulaire précise. Afin de pouvoir comparer les différentes conditions testées nous avons fait en sorte que la viabilité cellulaire obtenue (estimée par l'analyse FACS et associée à la population de cellules vivantes) soit de l'ordre de 70% pour l'ensemble des manipulations.

Les caractéristiques du cytomètre de flux permettant l'analyse FACS sont présentées en **Figure 83**.

Laser Excitation
488 nm (rated at 20,000-h life)
640 nm (rated at 20,000-h life)
Laser Profile
10 x 75 μ m
Light Scatter Detection
Forward (0°, \pm 13°)
Side (90°, \pm 13°)
Emission Detection
4 colors, user-changeable optical filters
Standard set installed:
<ul style="list-style-type: none"> • FL1 533/30 nm (eg, FITC/GFP) • FL2 585/40 nm (eg, PE/PI) • FL3 > 670 nm (eg, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy™7) • FL4 675/25 nm (eg, APC)
Optical Alignment
Fixed alignment

Figure 83 : Caractéristiques du cytomètre de flux utilisé pour l'analyse par FACS (BD Accuri C6)

Les longueurs d'onde des lasers d'excitation (488 et 640 nm) sont éloignées du maximum d'excitation de la forme réduite (**Figure 81**, 581 nm). Le signal récupéré (émission) suite à l'excitation de la forme réduite, qui pourrait correspondre au "canal" FL2 du cytomètre de flux, n'est donc pas optimal avec cet appareil, qui n'est clairement pas adapté pour analyser la fluorescence issue de la forme réduite de la sonde. Par contre, ce cytomètre de flux est adapté pour analyser la fluorescence issue de la forme oxydée puisqu'elle présente une longueur d'onde maximale d'excitation (490 nm) proche de 488 nm. L'intensité de fluorescence liée à l'émission de la forme oxydée issue de la peroxydation lipidique sera donc quantifiée grâce au "canal" FL1 du cytomètre de flux correspondant à un "filtre d'émission".

II. Mise au point des conditions d'utilisation de la sonde C11-BODIPY^{581/591} en culture cellulaire ARPE-19

Des tests préliminaires ont été menés pour déterminer les conditions optimales d'utilisation de la sonde dans les ARPE-19 (concentration en C11-BODIPY^{581/591}, pourcentage en sérum (SVF), temps de stress). De manière similaire aux essais de toxicité, la carence en SVF et le stress chimique H₂O₂ ont été utilisés afin de générer un stress oxydant cellulaire. Un troisième stress induit par la lumière a également été évalué dans ces essais d'inhibition de la peroxydation lipidique. Pour s'affranchir de la variabilité des intensités de fluorescence les histogrammes suivants sont exprimés en "FL1 normalisé", la condition ayant servi de normalisation a été ramenée à 100%, et correspond au contrôle en présence du C11-BODIPY^{581/591} sans traitement (CTL). Les écarts types sur les barres des histogrammes sont associés à des conditions réalisées sur n=3 correspondant à 3 puits (dans une même expérience).

II.1. Choix du temps d'incubation de la sonde

Pour choisir le temps d'incubation de la sonde, deux concentrations en C11-BODIPY^{581/591} (5 et 10 µM) ont été évaluées dans un milieu de stress oxydant induit par une carence totale en SVF (**Figure 84, a**). Guha *et al.* ont précédemment utilisé une concentration de sonde égale à 10 µM sur des cellules ARPE-19,²⁴¹ nous servant ainsi de point de départ afin de débiter les différents essais. Malgré l'obtention de résultats non exploitables en termes d'intensité de fluorescence correspondant à la forme réduite de la sonde, son analyse permet d'indiquer si les cellules analysées présentent une intensité associée à cette forme. Ainsi le %FL2 permet d'indiquer le pourcentage de cellules fluorescentes sous la forme réduite de la sonde, tandis que %FL1 est associé à la forme oxydée. Si la sonde est incorporée dans toutes les cellules, la somme des pourcentages % FL1 et % FL2 est sensée être au minimum égale à 100 %. Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).

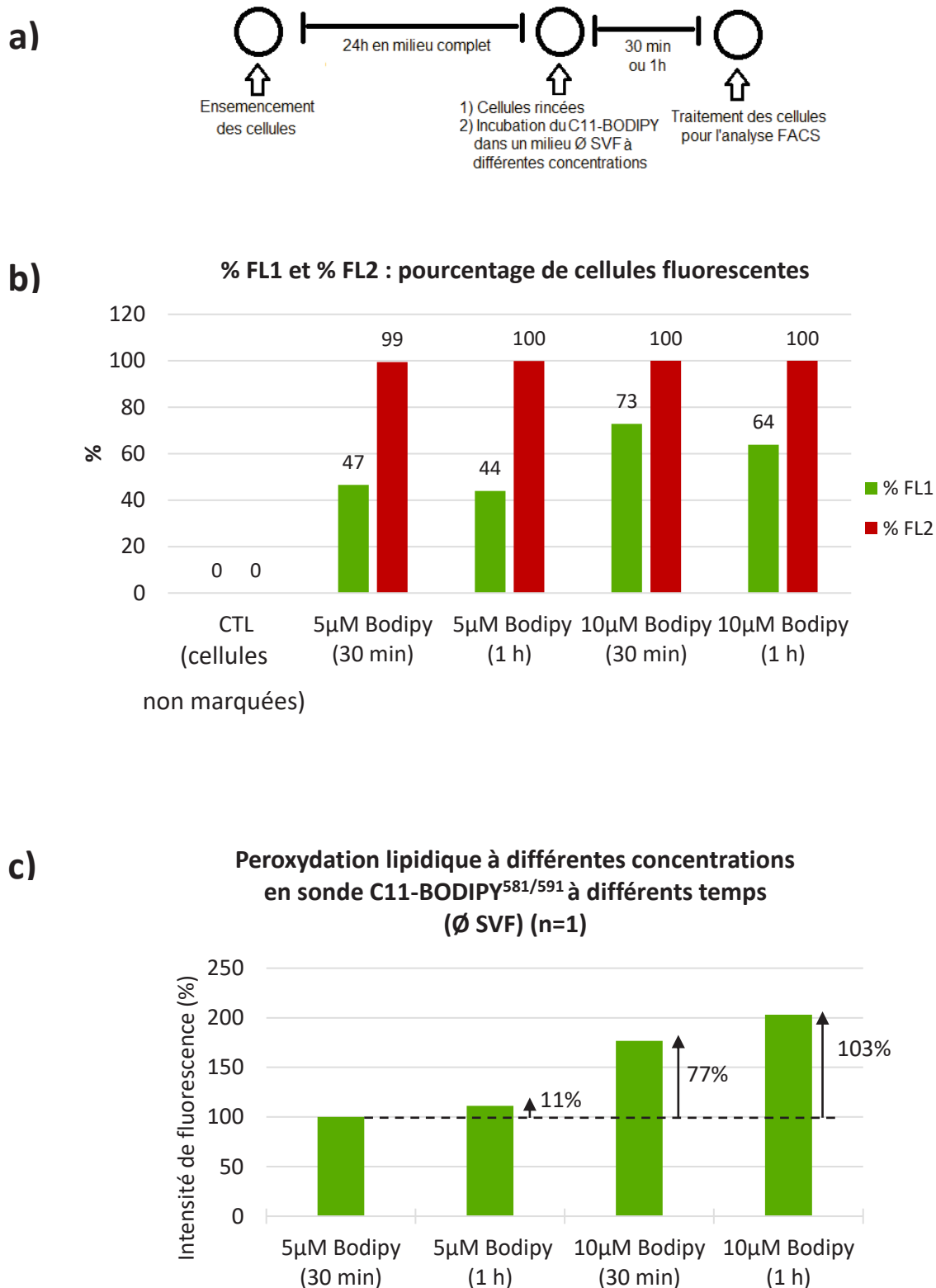
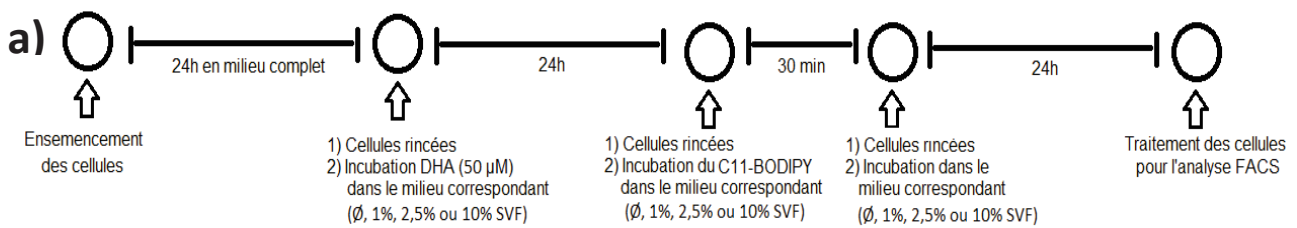


Figure 84 : Évaluation de la peroxydation lipidique à différentes concentrations en sonde incubée à différents temps (Ø SVF) : Incubation des cellules avec la sonde (5 ou 10 µM, durant 30 min ou 1 h). a) Protocole suivi. b) %FL1 et %FL2 correspondant aux % des cellules marquées respectivement par la forme oxydé et réduite de la sonde. c) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "5 µM BODIPY (30 min)" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Pour les quatre conditions, les cellules sont toutes fluorescentes (la somme entre %FL1 et FL2% est supérieure à 100%), indiquant qu'elles ont toutes incorporé la sonde (**Figure 84, b**). Ensuite, l'intensité de fluorescence (**Figure 84, c**) diffère peu entre 30 min et 1 h d'incubation à 5 μM , une augmentation de 11% est présente pour cette dernière condition, suggérant que l'incorporation de la sonde par les cellules atteint presque son maximum à 30 min. L'incubation durant un temps de 30 min à une concentration de 10 μM indique une augmentation de l'intensité de fluorescence de 77% comparée à une concentration de 5 μM . Les cellules étant sensées être dans un état de stress identique, cette augmentation suggère que l'incorporation de la sonde est supérieure à la concentration la plus importante. Finalement, en comparant la condition à 5 μM pendant 30 min et 10 μM pendant 1 h, l'intensité de fluorescence double lorsque la concentration de la sonde et le temps d'incubation sont multipliés par deux, suggérant encore une fois une différence d'incorporation de la sonde. Le choix de 30 minutes d'incubation de la sonde à une concentration de 5 μM sont alors retenus pour la suite des expériences car ces deux paramètres suffisent à obtenir des cellules marquées à 100% et permettent de quantifier une peroxydation lipidique.

II.2. Influence et choix de la carence en sérum

Des expériences préliminaires ont été effectuées afin de déterminer les conditions optimales d'analyse permettant d'observer une variation de la peroxydation lipidique au sein des ARPE-19, en l'absence ou en présence de DHA naturel. Nous avons vu précédemment que le pourcentage en sérum avait une influence importante sur la production d'EOR (**Figure 55**), et sur la toxicité cellulaire (chapitre I). Pour illustrer l'influence de la carence en sérum sur la peroxydation lipidique de cellules ayant subi un pré-traitement au DHA naturel, le protocole suivant a été mis en œuvre (**Figure 85, a**) : les cellules sont traitées pendant 24 h en absence ou en présence de DHA naturel solubilisé dans les milieux à différent pourcentage en SVF (\emptyset , 1%, 2,5% ou 10%). Elles sont ensuite rincées, puis le C11-BODIPY^{581/591} est incubé durant 30 min en étant en solution dans les milieux à différent pourcentage en SVF (pour ne pas perturber les cellules). Les cellules sont ensuite rincées et mises dans les milieux à différent pourcentage de SVF pendant 24 h avant d'être analysée par FACS (**Figure 85, b**). Sachant qu'une mort cellulaire trop importante ne permet pas d'obtenir des résultats exploitables en cytométrie de flux (quantification de cellules vivantes), une concentration non toxique de 50 μM en DHA a été utilisée pour ces essais. Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).



b)

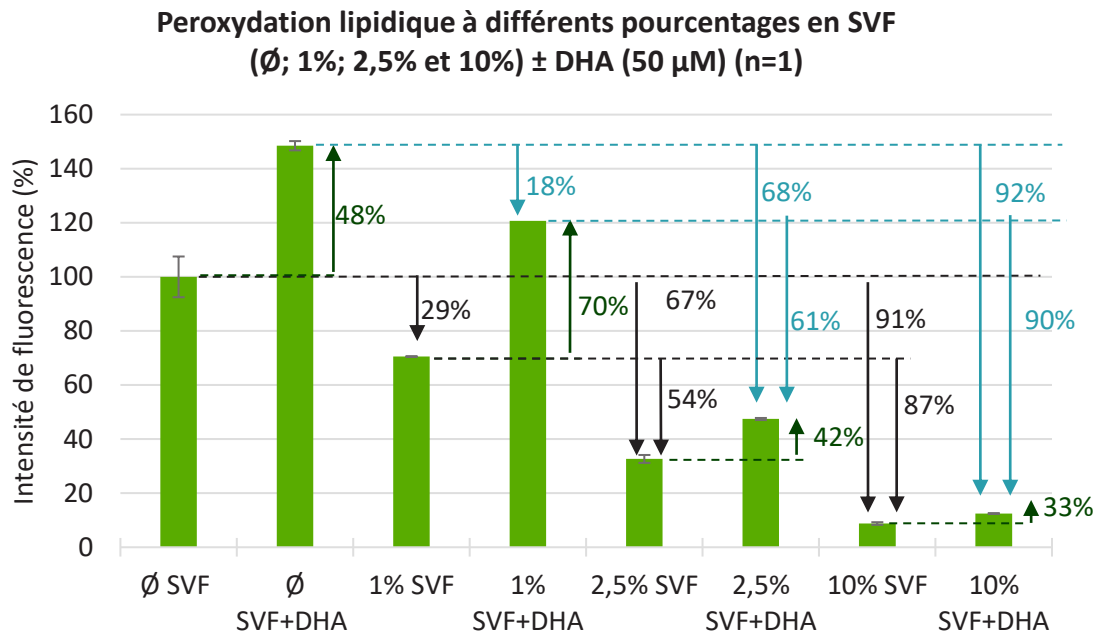


Figure 85 : Évaluation de la peroxydation lipidique à différents pourcentages en SVF \pm 50 μ M de DHA : incubation des cellules sans sérum (\emptyset), 1%, 2,5% ou 10% de SVF, durant 24 h avec ou sans DHA (50 μ M). a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition \emptyset SVF (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Les résultats mis en évidence avec cette expérience sont présentés dans la **Figure 85**, (b). Les conditions de carence totale en SVF (\emptyset SVF) et à 1% de SVF montre une augmentation de la peroxydation lipidique plus importante (respectivement 48% et 70%) en présence de DHA comparé à la condition correspondante en l'absence de DHA. Le traitement des cellules dans un milieu à 1% de SVF (sans ou avec DHA) entraîne une diminution de la peroxydation lipidique (29% et 18% respectivement) comparée aux conditions mises en œuvre dans un milieu sans SVF. La condition de carence à 2,5% de SVF montre également une augmentation (42%) de l'état de stress oxydant des cellules en présence de DHA. Malgré cette augmentation, l'utilisation de ce pourcentage en sérum semble protéger les cellules du stress induit par un milieu totalement carencé en SVF ou à 1% de SVF en l'absence (diminution de 67% ou 54%) ou en présence de DHA (diminution de 68% ou 61%). En condition de milieu complet (10% SVF), la présence du DHA

entraîne également une augmentation de la peroxydation lipidique. Cependant, d'importantes diminutions (91% et 87%) de ce mécanisme sont engendrées en présence d'un tel milieu comparé à une carence totale ou à 1% de SVF. De plus, le niveau de peroxydation lipidique induit pour les conditions dans un milieu complet avec ou sans DHA est proche (9% et 12%) de celui correspondant à l'autofluorescence cellulaire (égal à 0%, associé à la fluorescence des cellules non marquées par la sonde). Finalement, cet essai montre que l'état de stress oxydant cellulaire diminue en présence d'un pourcentage croissant en SVF.

Finalement, le choix de l'utilisation d'un milieu à 1% de SVF permet d'observer une variation de peroxydation lipidique non négligeable entre les cellules non traitées et traitées en présence de DHA naturel. De plus, les mêmes conditions ayant été utilisées pour les essais de toxicité des AGPI dans le chapitre I, cela nous permettra de comparer les résultats obtenus lors de ces deux tests biologiques.

II.3. Choix de la concentration en C11- BODIPY^{581/591} dans un milieu carencé à 1% de SVF

Différentes concentrations en C11-BODIPY^{581/591} ont été testées pour déterminer la concentration minimale en sonde pouvant être utilisée (**Figure 86**). Comme vu précédemment dans le paragraphe II.1., l'analyse des pourcentages de cellules fluorescentes associés à la forme réduite (%FL2) ou la forme oxydée (%FL1) permet de mettre en évidence son taux d'incorporation (la somme des pourcentages en FL1 et FL2 est sensée être au minimum égale à 100 %).

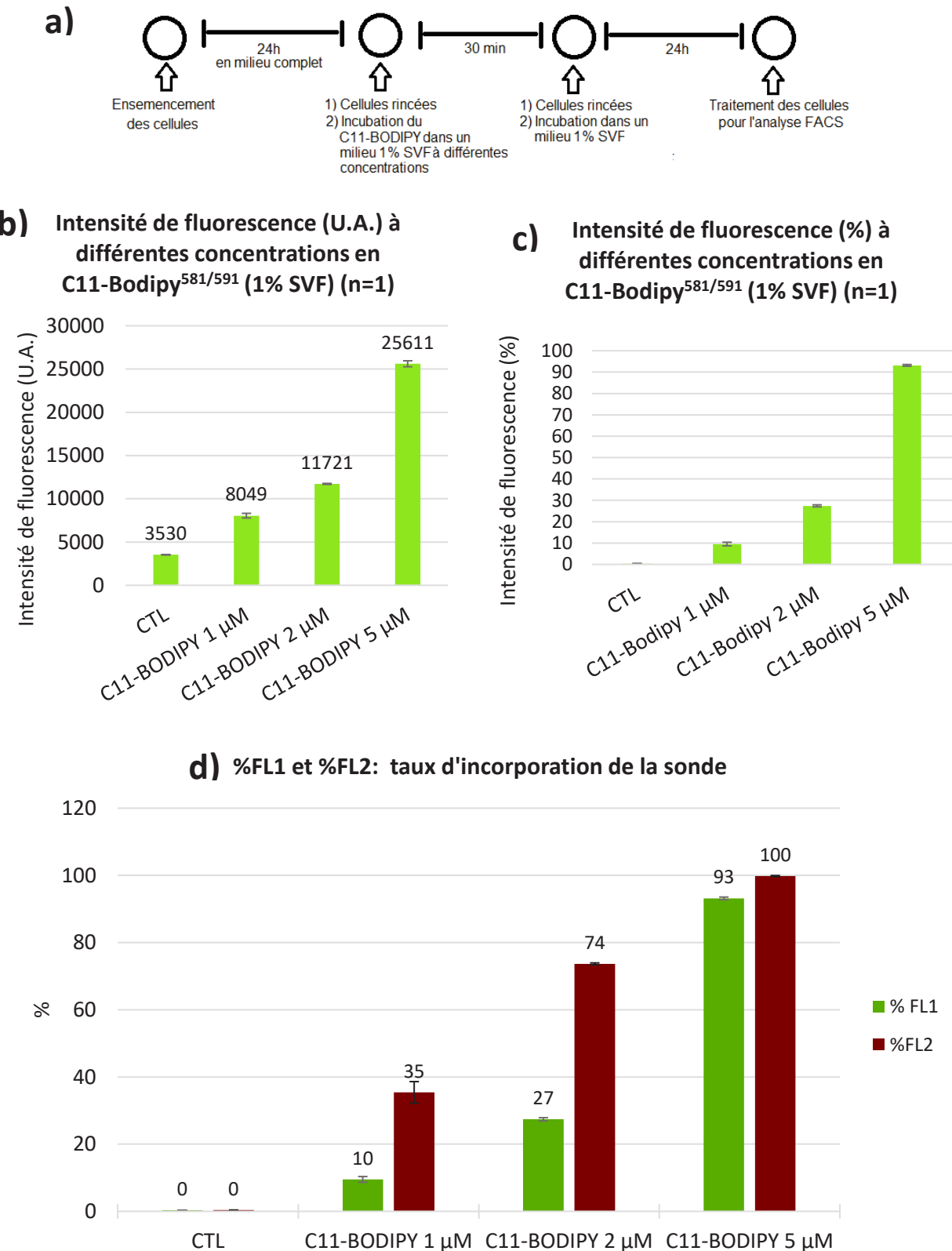


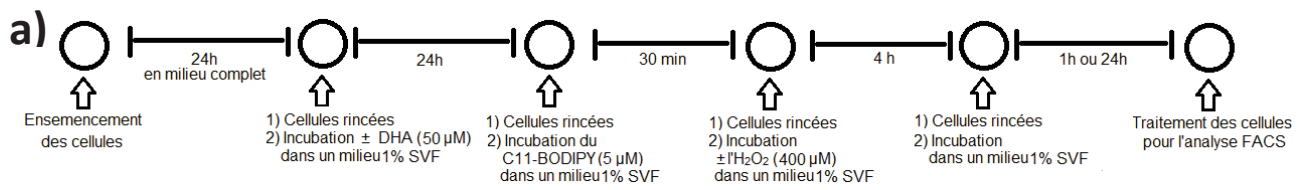
Figure 86 : Évaluation du taux d'incorporation de la sonde C11-BODIPY^{581/591} : Incubation des cellules en présence de la sonde C11-BODIPY^{581/591} (1, 2 ou 5 μM). a) Intensités de fluorescence associées aux différentes conditions avant normalisation. b) % d'intensités de fluorescence, normalisées avec la condition C11-BODIPY à 5 μM fixée à 100%. c) %FL1 et %FL2 correspondant aux % des cellules marquées respectivement par la forme oxydée ou réduite de la sonde.

La somme des pourcentages en FL1 et FL2 (respectivement %FL1 et %FL2) (**Figure 86, d**) est égale à 45% pour la condition associée à une concentration d'1 μM de C11-BODIPY^{581/591}. Cette somme étant inférieure à 100%, ce résultat suggère un manque d'incorporation de la sonde au sein des cellules. Ce résultat n'est pas retrouvé pour les concentrations en sonde de 2 μM et 5 μM , associées respectivement à une somme en %FL1 et %FL2 de 101% et 193%. Afin de s'affranchir de cet éventuel manque d'incorporation et pour pouvoir comparer toutes les conditions entre elles, il semble être plus cohérent de se placer à une concentration où toutes les cellules présentent la forme réduite de la sonde (%FL2 = 100%). Ces conditions sont obtenues en utilisant une concentration de 5 μM .

De plus, l'intensité de fluorescence (**Figure 86, b**) montre que les concentrations en C11-BODIPY^{581/591} à 1 et 2 μM sont assez proches du contrôle (CTL, correspondant aux cellules non marquées avec la sonde (auto-fluorescence)). Ces conditions pourraient engendrer un manque d'amplitude du signal nécessaire afin de visualiser une variation entre les différents composés testés (DHA naturel et deutérés par exemple). La sensibilité est donc suffisante à 5 μM mais pas à des concentrations plus faibles. Pour le reste des expériences nous avons donc retenu l'incubation du C11-BODIPY^{581/591} à une concentration de 5 μM pendant 30 minutes.

II.4. Choix du temps de stress (carence à 1% de SVF et H₂O₂) appliqué sur les cellules ARPE-19

La carence en sérum (1% SVF) et H₂O₂ ont été choisis afin de générer un stress oxydant cellulaire, la figure suivante correspond à l'évaluation de la peroxydation lipidique réalisée à 1 h et à 24 h dans ces conditions de stress (**Figure 87**). Les cellules sont tout d'abord incubées (**Figure 87, a**) en absence ou en présence de DHA à 50 μM , concentration non toxique vérifiée précédemment dans un milieu carencé à 1% de SVF pendant 24 h. Pour les cellules traitées avec H₂O₂, ce stress chimique est appliqué à 400 μM durant 4 h, le milieu est aspiré et les cellules sont rincées et remises dans du milieu 1% SVF et incubées 1 h ou 24 h. Le choix des concentrations en DHA et H₂O₂ a été préalablement effectué grâce aux dose-réponses de toxicité établies en parallèles, ayant montré qu'à ces concentrations aucune mort cellulaire n'était observée malgré une carence à 1% de SVF.



b)

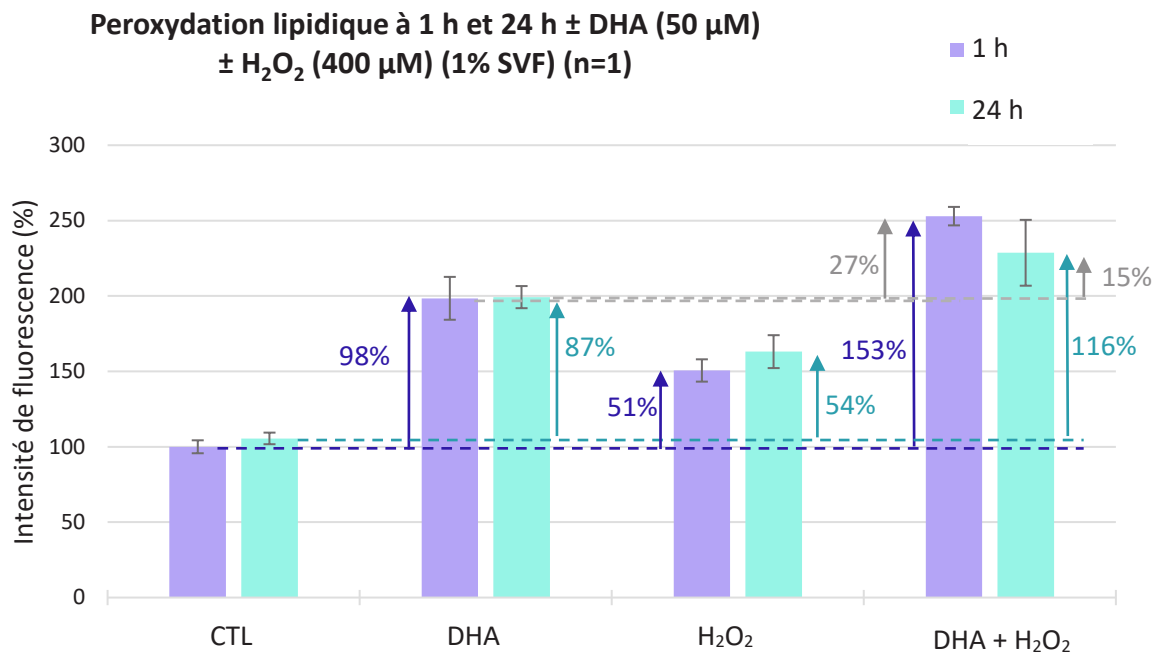


Figure 87 : Évaluation de la peroxydation lipidique à 1 h et 24 h, \pm DHA \pm H₂O₂ (1% SVF) : Incubation des cellules en présence de DHA (50 μ M) puis incubation de H₂O₂ (400 μ M) dans un milieu carencé à 1% de SVF. a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition CTL à 1 h (fixé à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Une augmentation de la peroxydation lipidique comparée à la condition contrôle (CTL, sans DHA ni H₂O₂, juste une carence à 1% de SVF) est visible (augmentation de 98%, 51% et 153%) après traitements des cellules en présence de DHA, de H₂O₂ et de DHA+H₂O₂ et un temps d'incubation en condition de stress de 1 h. Pour un temps de stress de 24 h, cette augmentation passe à 87%, 54% et 116% correspondant respectivement aux conditions d'incubation du DHA, de H₂O₂ et du mélange DHA+H₂O₂. Pour les deux temps, 1 h et 24 h, le stress est plus important dans la condition DHA+H₂O₂ respectivement de 27% et 15%, comparé à la condition DHA seul, suggérant que la peroxydation lipidique est accentuée en présence de H₂O₂. L'étude de la peroxydation lipidique à 1 h et 24 h montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre ces

deux temps de stress dans l'ensemble des conditions testées. Malgré ce résultat, on peut considérer qu'à 24 h un équilibre cellulaire a été atteint. Ces résultats nous montrent également que la sonde est stable dans le temps (entre 1 h et 24 h). Par la suite, le protocole avec une peroxydation lipidique associée à un temps de 24 h d'incubation est retenu et sera appliqué pour toutes les conditions, juste après le stress des cellules induit par une carence à 1% de SVF ou par la présence de H₂O₂.

II.5. Mise au point et choix des conditions de stress lumineux

La lumière devant avoir un fort impact sur la peroxydation lipidique, l'influence des deutériums sur ce stress a été envisagée dans ces travaux. Deux types de stress lumineux ont été évalués, une lumière bleue et une lumière blanche dont les caractéristiques sont présentées en **Figure 88**. Les temps du stress, l'ordre d'application du stress et l'intensité lumineuse sont des paramètres évalués dans ce paragraphe.



Figure 88 : Caractéristiques de la lampe permettant d'effectuer le stress lumineux associé à une lumière blanche ou bleue.

II.5.1. Ordre d'application du stress au sein du test

Tout d'abord, la peroxydation lipidique engendrée par un stress lumineux (lumière blanche (Blc), intensité lumineuse de 2 000 ou 20 000 lux), durant 1 h a été évaluée (**Figure 89**). Le protocole mis en œuvre dans ce cas (**Figure 89, a**) consiste à incuber la sonde C11-BODIPY^{581/591} après les stress lumineux et juste avant l'analyse FACS. Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1) et dans des conditions maximum de stress induit par une carence en SVF.

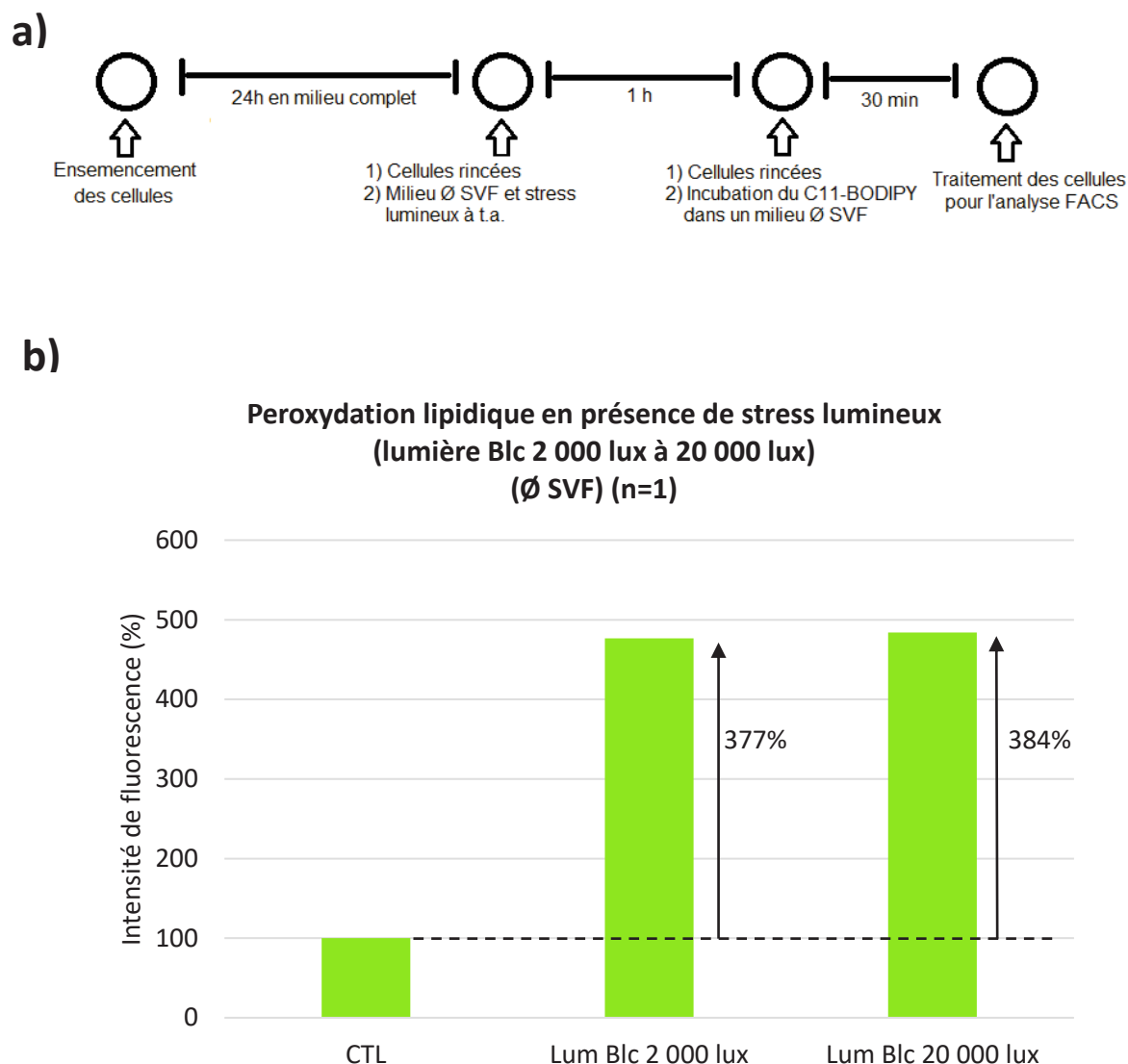
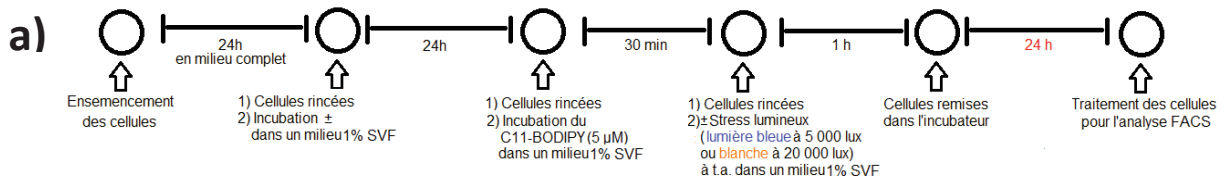


Figure 89 : Évaluation de la peroxydation lipidique en présence de plusieurs stressseurs (Ø SVF) : Incubation des cellules sans sérum suivi d'un stress lumineux (lumière Blc, intensité lumineuse de 2 000 à 20 000 lux). a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition CTL (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

La peroxydation lipidique engendrée par un stress lumineux est très importante dans ces cas (augmentation de 377% et 348% comparé à la condition CTL), montrant une importante sensibilité des cellules dans ces conditions. En revanche, il n'y a pas de différence entre les peroxydations lipidiques engendrées par les deux intensités lumineuses. Ce dernier résultat semble incohérent car le stress oxydant, et donc la peroxydation lipidique, est sensée augmenter en fonction de l'intensité lumineuse. Ainsi, le choix d'incuber la sonde, avec les cellules, avant d'exercer les différents stress, s'est imposé dans le but d'obtenir des résultats cohérents dans nos conditions.

II.5.2. Temps de stress et choix du type de lumière

Afin de valider un protocole de stress lumineux en cellules ARPE-19, un essai dans les conditions suivantes a été réalisé pour mettre au point un protocole (**Figure 90, a**) : les cellules sont traitées en présence de DHA (50 μ M) durant 24 h, suivi de l'incubation de la sonde C11-BODIPY^{581/591} pendant 30 min. Ensuite les cellules sont rincées, remises dans un milieu 1% SVF suivi du stress lumineux (lumière bleue à 5 000 lux ou blanche à 20 000 lux) durant 1 h. Elles sont ensuite remises dans l'incubateur pendant 24 h avant d'effectuer l'analyse. Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).



b) Peroxydation lipidique ± DHA (50 μM) ± stress lumineux (lumière bleue: 5 000 Lux ou blanche: 20 000 Lux), traitement à 24 h après (1% SVF) (n=1)

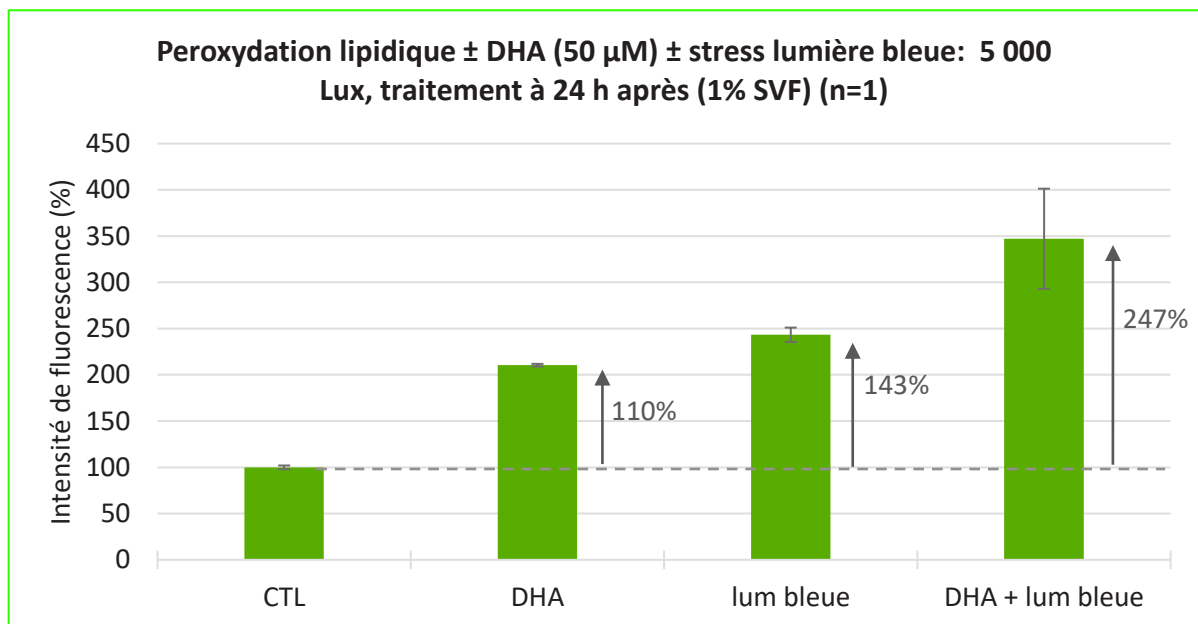
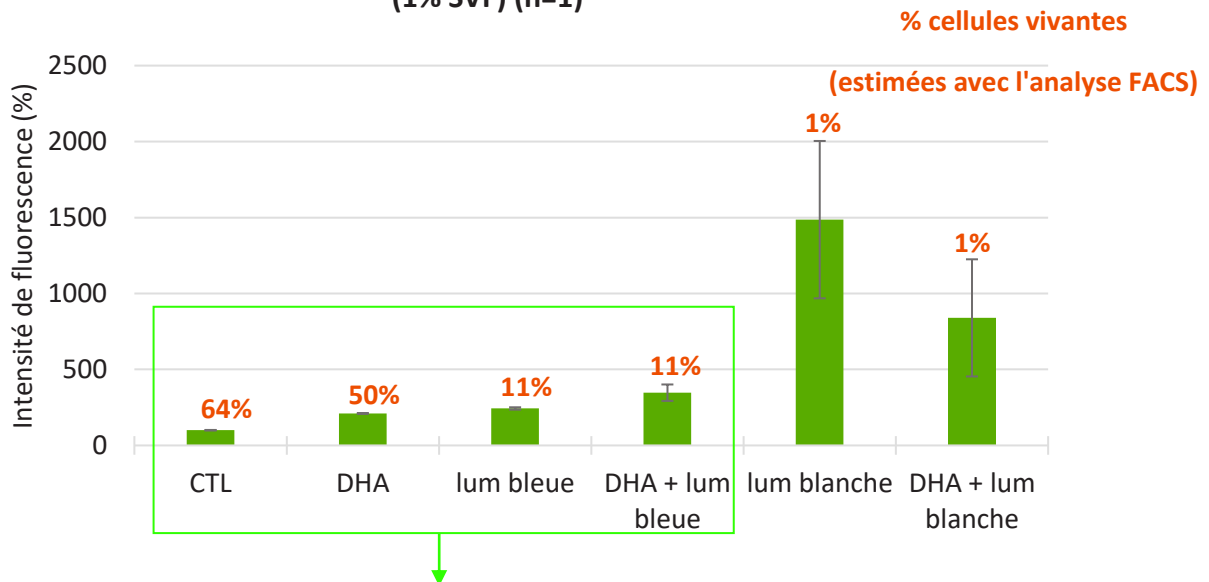


Figure 90 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± DHA ± stress lumineux (lumière bleue et blanche) : incubation des cellules en présence de DHA (50 μM) dans un milieu carencé en 1% SVF suivi d'un stress lumineux (lumière bleue : 5 000 Lux et blanche : 20 000 Lux) durant 1 h puis incubation durant 24 h. a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition Ø SVF (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Contrairement à ce qui a été choisi dans le paragraphe précédent (II.4.) pour les stressseurs "carence à 1% de SVF" et " H_2O_2 ", ce protocole ne semble pas être adapté pour cette analyse. En effet, au bout des 24 h d'incubation qui ont suivi les stress lumineux, quasiment aucune cellule ne survie dans les conditions lumière blanche (1%) et seulement 11% pour les conditions en lumière bleue (**Figure 90, b**). Il y a donc une perte d'adhérence des cellules à 24 h d'incubation après l'exposition à la lumière. Pour cette raison, des écarts types importants sont obtenus dans cet essai puisque certaines valeurs ne sont pas représentatives de l'état de peroxydation lipidique précis des cellules.

Afin de palier à ce problème, l'expérience a été réalisée en quantifiant la forme oxydée de la sonde, directement après l'application du stress lumineux (**Figure 91, a**). Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).

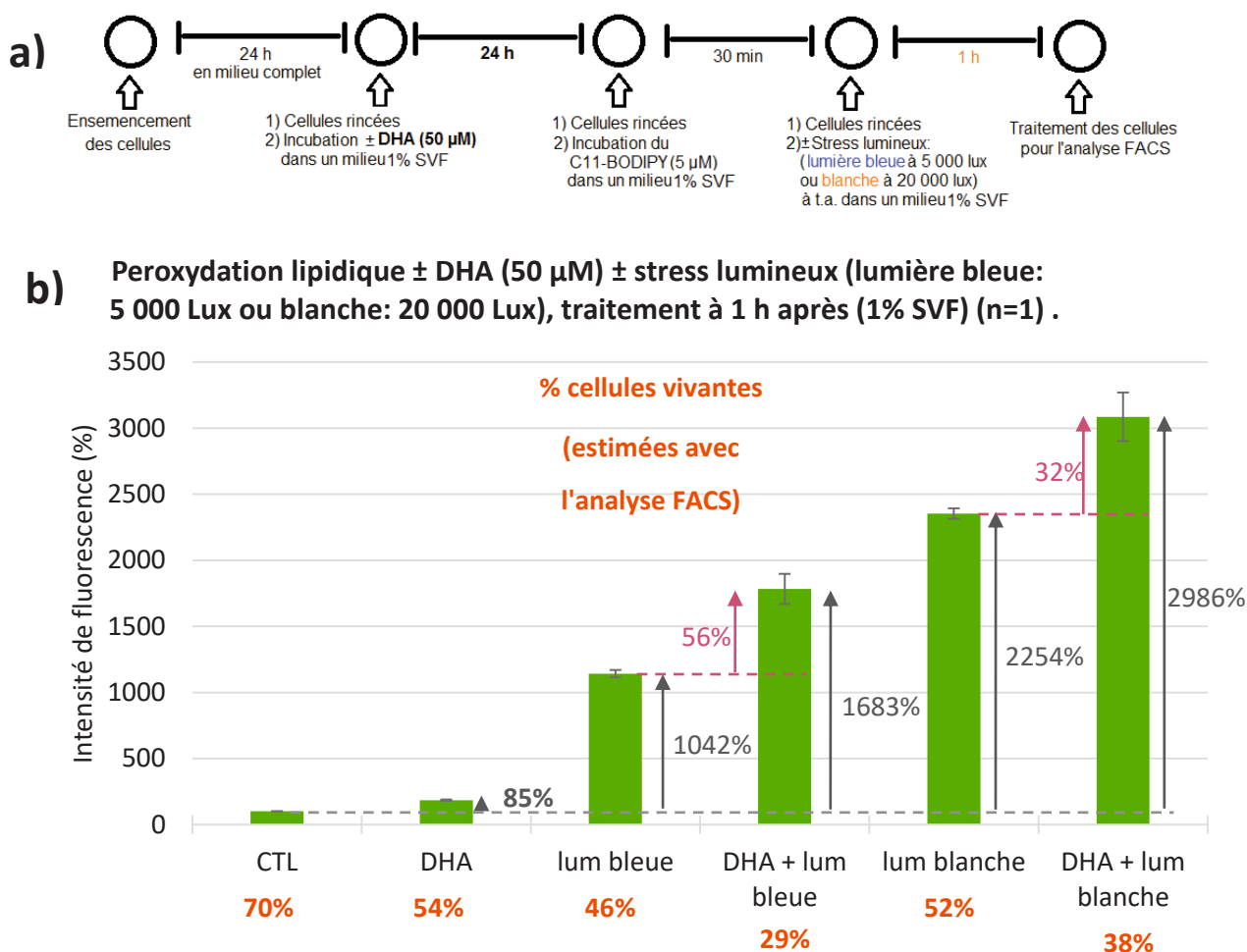


Figure 91 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm DHA \pm stress lumineux (lumière bleue et blanche) : incubation des cellules en présence de DHA (50 μM) dans un milieu carencé en 1% SVF suivi d'un stress lumineux (lumière bleue : 5 000 Lux et blanche : 20 000 Lux) durant 1 h. a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition CTL (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde.

La viabilité cellulaire (**Figure 91, b**) est bien plus importante lorsque l'on effectue l'analyse des cellules juste après le stress lumineux comparé à l'expérience où les cellules sont incubées 24 h de plus : 46%, 29%, 52% et 38% de cellules vivantes sont obtenues, respectivement associé aux conditions : lumière bleue, DHA+lumière bleue, lumière blanche et DHA+lumière blanche. La perte d'adhérence est donc moins importante en analysant directement les cellules après l'exposition à la lumière, donnant des analyses représentatives de l'état de stress associé à une peroxydation lipidique au sein des cellules. La lumière blanche à 20 000 Lux entraîne une peroxydation lipidique 2,2 fois plus importante comparée à la lumière bleue à 5 000 lux. La présence de DHA augmente le taux de peroxydation lipidique pour les deux conditions de stress lumineux, respectivement de 56% pour la lumière bleue et 32% pour la lumière blanche ce qui nous permettra d'évaluer l'impact des deutériums dans ces conditions de stress. Finalement, le choix s'est porté sur la lumière blanche pour la suite de la mise au point puisqu'elle est complète en termes de longueur d'onde d'exposition,.

De plus, nous avons vérifié deux paramètres importants en condition de stress lumineux nous permettant de valider le protocole décrit ci-dessus: 1) la nécessité de la présence des cellules pour obtenir un signal d'intensité de fluorescence lié à la forme oxydée de la sonde; 2) la stabilité de la sonde. Nous avons ainsi procédé à l'éclairement d'une solution de C11-BODIPY^{581/591} correspondant soit à la forme réduite, soit à la forme oxydée (obtenue en présence de *t*BuOOH), dans le milieu de culture carencé à 1% de SVF, sans cellule. Ensuite la lecture de l'intensité de fluorescence de la forme oxydée de la sonde a été effectuée grâce à un spectromètre de fluorescence. Les résultats obtenus montrent que la sonde C11-BODIPY^{581/591} n'est pas oxydée dans les conditions d'éclairement appliquées et ainsi que la présence des cellules est nécessaire pour obtenir la forme oxydée (liée à une peroxydation lipidique). Ensuite aucune diminution de l'intensité de fluorescence n'est observée lorsque l'on compare les solutions de la sonde oxydée avec ou sans éclairage. Ce dernier résultat suggère que la forme oxydée de la sonde est photo-stable dans nos conditions.

II.5.3. Choix de l'intensité lumineuse

L'utilisation d'une intensité lumineuse de 20 000 lux entraîne une peroxydation lipidique très importante. L'objectif de cette mise au point est de déterminer les conditions de lumière optimales nécessaires à l'évaluation de l'oxydation des AGPI deutérés et naturels, ainsi que leurs lipophénols associés. Dans des conditions de stress trop élevé, il est redouté qu'aucune différence

ne soit visible lors de la comparaison entre les composés non deutéré et deutéré. Une mise au point sur l'intensité lumineuse de la lumière blanche a donc été effectuée (**Figure 92**), afin de mettre en évidence l'intensité minimale à laquelle la peroxydation lipidique serait suffisante pour l'étude.

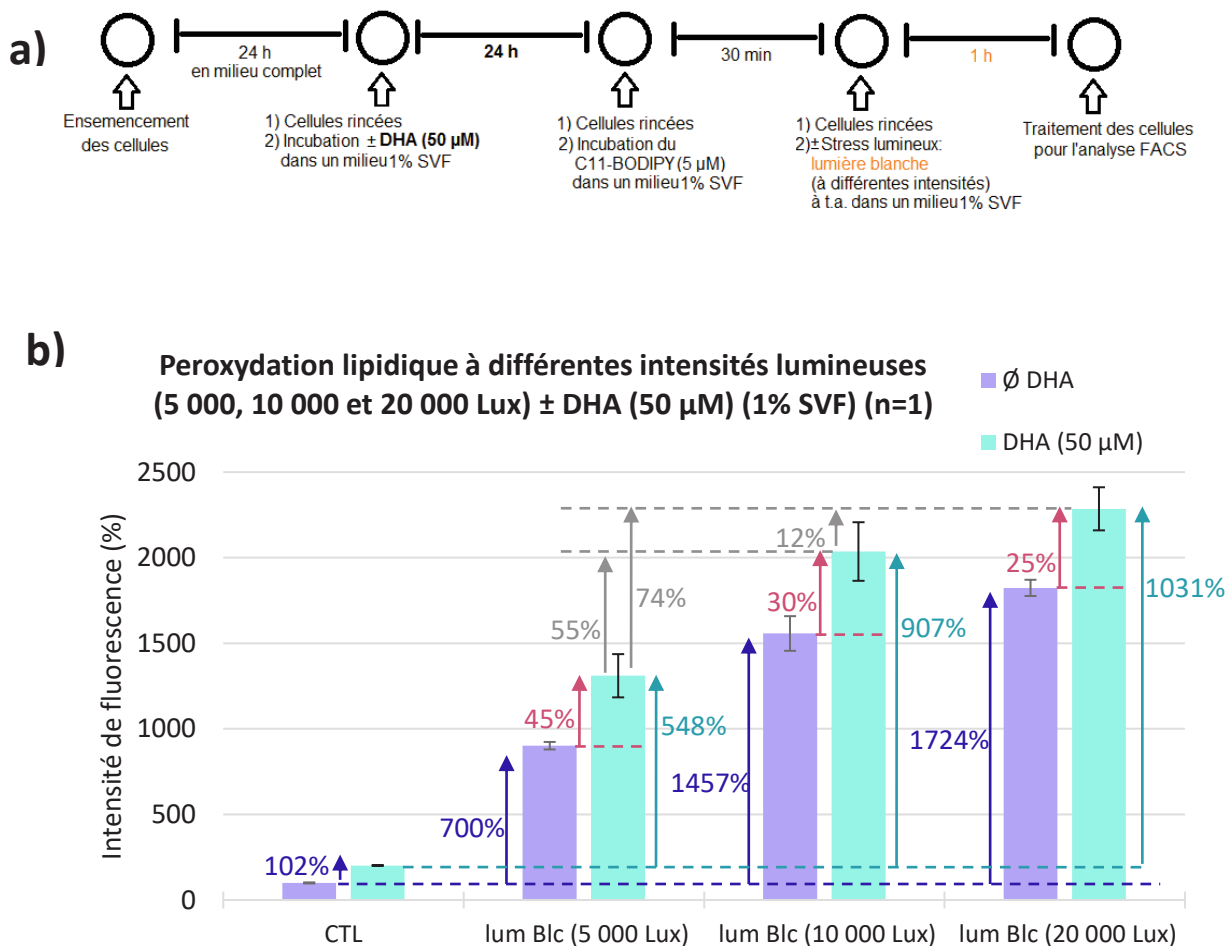


Figure 92 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm DHA \pm stress lumineux (lumière blanche) : incubation des cellules en présence de DHA (50 μ M) dans un milieu carencé en 1% SVF suivi d'un stress lumineux (intensités : 5 000, 10 000 et 20 000 lux) durant 1 h. a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition CTL \emptyset DHA (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Plusieurs informations importantes peuvent être interprétées grâce aux résultats obtenus (**Figure 92, b**). Tout d'abord la présence du DHA seul permet de doubler la peroxydation lipidique comparée à l'échantillon non traité (barres d'histogramme CTL). Ensuite ce mécanisme est augmenté en fonction de l'intensité lumineuse de 5000, 10 000 ou 20 000 lux appliquée et correspondant à une augmentation de 700, 1457 et 1724%. De plus, pour des intensités lumineuses différentes et croissantes, l'augmentation de la peroxydation lipidique est

décroissante (45%, 30% et 25%) et ce en présence d'une même concentration en DHA. On pourrait s'attendre à visualiser une augmentation de la peroxydation lipidique proportionnellement à l'intensité de la lumière, mais ce n'est pas ce qui est observé. En effet, dans les conditions à 20 000 lux l'effet du DHA est moins visible qu'à 5 000 lux. Finalement, l'effet de la lumière avec une intensité lumineuse à 5 000 lux pendant 1 h semble être suffisamment important pour engendrer une augmentation de peroxydation lipidique comparé au contrôle non exposé, et sera retenu pour la suite des essais.

II.6. Effet du DHA sur l'incorporation de la sonde C11-BODIPY^{581/591}

Pour pouvoir comparer la peroxydation lipidique générée dans les conditions avec et sans DHA au sein des ARPE-19, nous avons vérifié que la présence de DHA n'impactait pas l'incorporation de la sonde C11-BODIPY^{581/591} de manière significative. En effet, le DHA, étant incubé 24 h avant l'ajout de la sonde, s'incorpore dans les membranes cellulaires et pourrait ainsi augmenter leur fluidité et donc faciliter la pénétration de la sonde. L'expérience suivante a ainsi été réalisée afin de mettre en évidence l'éventuel impact du DHA pourrait sur l'incorporation de la sonde (**Figure 93**) : Deux conditions ont été testées et comparées (**Figure 93, a**) : une première où le C11-BODIPY^{581/591} est incubé après le DHA (voie orange et condition utilisée de manière générale pour toutes les expériences) et l'autre où le C11-BODIPY^{581/591} est incubé avant le DHA (voie bleue). Deux conditions "contrôles" sans DHA (CTL) ont été réalisées et associées chacune à une des deux conditions mentionnées, permettant de normaliser les résultats en vue de les comparer. Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1).

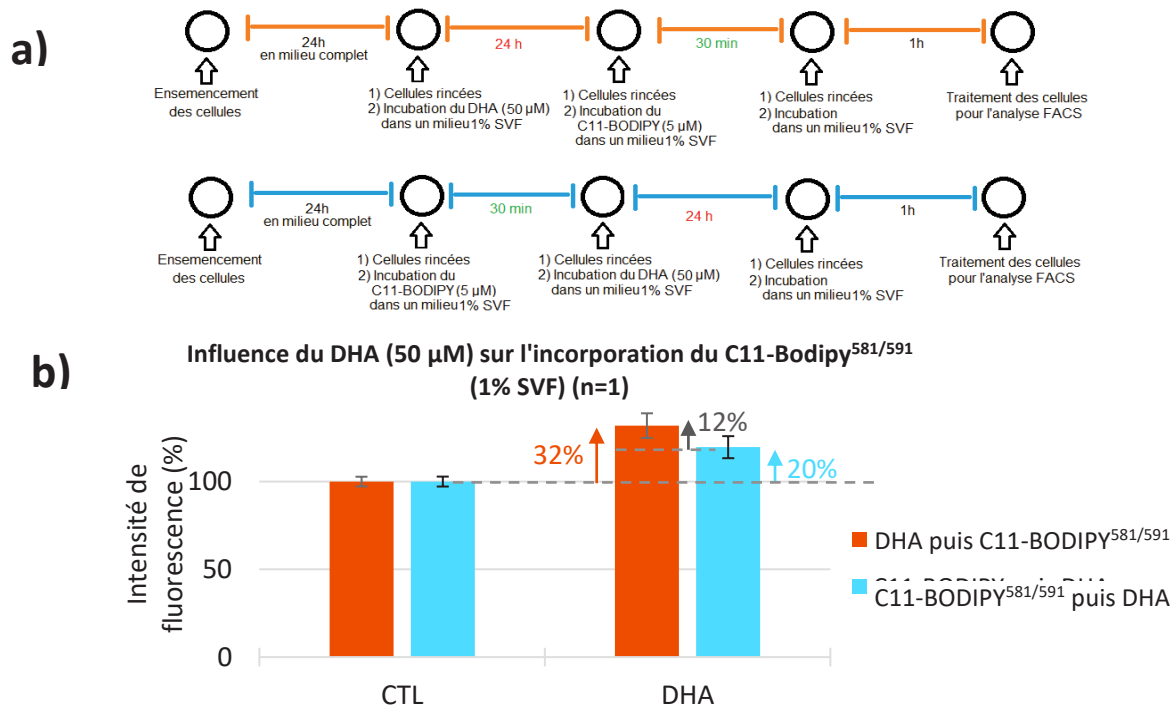


Figure 93 : Influence du DHA sur l'incorporation du C11-BODIPY^{581/591} : Incubation des cellules en présence de DHA (50 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport aux conditions CTL (fixées à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Lorsque l'on compare les deux conditions en présence de DHA, on observe une augmentation de la peroxydation lipidique de 12% lorsque le DHA est incubé avant le C11-BODIPY^{581/591} (histogramme orange) comparé à la condition d'incubation du DHA après la sonde (histogramme bleu). Trois puits par condition ont été réalisés, nous permettant d'effectuer des tests statistiques pour comparer les résultats. La comparaison statistique des deux conditions en présence du DHA indique que les augmentations des pourcentages d'intensité de fluorescence ne sont pas significativement différentes. Il y a donc très peu d'impact de la présence du DHA sur l'incorporation de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Nous pourrions donc comparer par la suite les résultats obtenus en présence ou en l'absence du DHA.

II.7. Efficacité de la sonde dans des conditions limitant (α -tocophérol) ou accentuant (*t*BuOOH) la peroxydation lipidique

Afin de vérifier l'efficacité de la sonde C11-BODIPY^{581/591} pour étudier la peroxydation lipidique par l'analyse en cytométrie de flux (FACS), l' α -tocophérol (100 µM), composé modèle pour limiter la peroxydation lipidique²⁴² a été choisi (**Figure 94**). Un stresser oxydant, de type *t*BuOOH a été utilisé à une concentration de 400 µM pour ce test. Ce dernier entraînant une

peroxydation lipidique plus importante que H_2O_2 . Cette expérience a été réalisée en monocult (n=1).

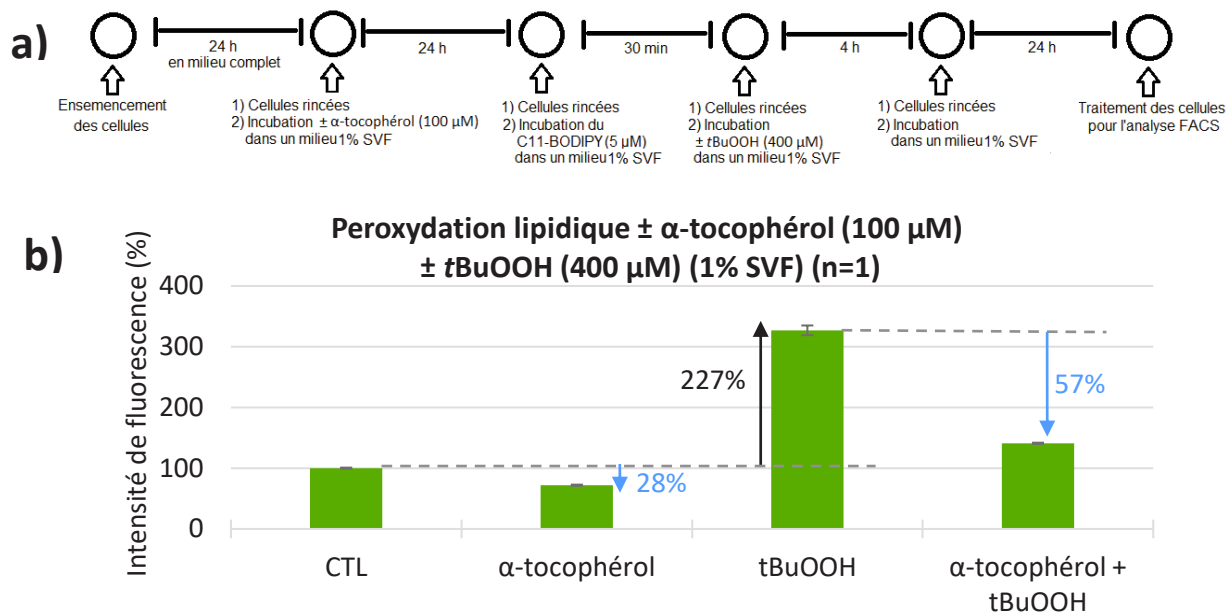


Figure 94 : Influence du DHA sur l'incorporation du $C11-BODIPY^{581/591}$ (n=1) : Incubation des cellules en présence de l' α -tocophérol (100 µM) puis incubation du $tBuOOH$ (400 µM) dans un milieu carencé à 1% de SVF. a) Protocole suivi. b) Histogramme des résultats obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition CTL (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde $C11-BODIPY^{581/591}$.

L' α -tocophérol engendre une diminution de la peroxydation lipidique (**Figure 94, b**) de 28% comparés à la condition contrôle (CTL), et de 57% par rapport à la condition où les cellules sont stressées en présence du $tBuOOH$. Ainsi, une protection des cellules contre la peroxydation lipidique engendrée soit par la carence à 1% de SVF soit en présence de $tBuOOH$ est observée grâce à l' α -tocophérol. Ces résultats sont cohérents avec ce qui est rapporté dans la littérature,²³⁸ validant l'utilisation de nos conditions et de la sonde $C11-BODIPY^{581/591}$ pour le protocole développé sur les ARPE-19.

II.8. Résumé du protocole sélectionné après optimisation pour l'évaluation de l'impact des deutériums sur la peroxydation lipidique cellulaire

Pour évaluer et comparer l'effet de l'ensemble des composés (deutérisés et leurs analogues non deutérés) sur la peroxydation lipidique, le protocole mis en œuvre est identique : les cellules à confluence sont incubées en présence des AGPI ou lipophénols à 50 µM pendant 24 h. Elles sont ensuite rincées avec le milieu 1% SVF, qui est ensuite aspiré pour pouvoir incubé le C11-

BODIPY^{581/591} à 5µM pendant 30 min. Les cellules sont ensuite rincées, et selon le type de stress utilisé, le traitement et les temps d'incubation diffèrent :

- Pour le stress en présence de H₂O₂ et/ou en carence à 1% de SVF et (**Figure 95**) : les cellules sont incubées dans le milieu carencé à 1% de SVF en présence ou en l'absence de H₂O₂ à 400 µM pendant 4 h. Le milieu est ensuite aspiré, les cellules sont rincées et incubées dans le milieu à 1% de SVF pendant 24 h suivi du traitement pour l'analyse de cytométrie de flux (FACS).

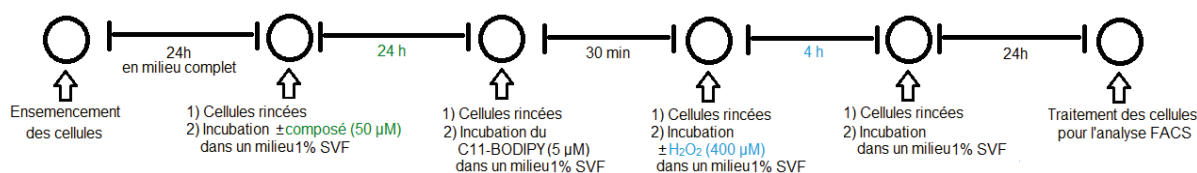


Figure 95 : Protocole utilisé pour l'évaluation de la peroxydation lipidique des composés (50 µM) ± H₂O₂ (400 µM).

- Pour le stress lumineux (**Figure 96**) : les cellules sont mises dans le milieu carencé à 1% de SVF suivi d'un stress lumineux (lumière blanche, 5 000 lux) à température ambiante durant 1 h. Les cellules associées à la condition contrôle (CTL) n'étant pas éclairées sont également laissée à t.a. (entourée d'un papier d'aluminium) durant le temps d'exposition à la lumière. Après avoir subi le stress lumineux, les cellules sont directement analysées par cytométrie de flux (FACS).

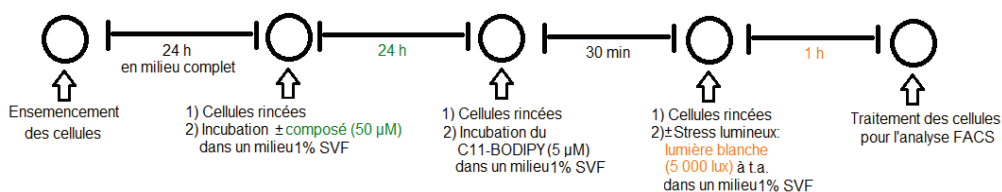


Figure 96 : Protocole utilisé pour l'évaluation de la peroxydation lipidique des composés (50 µM) ± stress lumineux (lumière blanche à 5 000 lux).

Le protocole simplifié suivant (**Figure 97**) permet de résumer les différents essais effectués avec les composés :

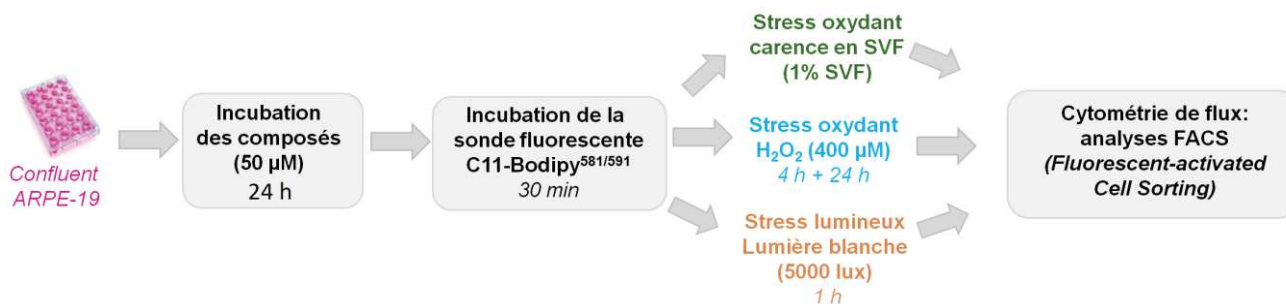


Figure 97 : Protocole simplifié suivi pour réaliser les expériences de quantification de la peroxydation lipidique en présence des composés (AGPI et lipophénols) en culture cellulaire d'ARPE-19 en condition de stress oxydant.

A noter que pour une même série, les analogues naturels et deutérés sont testés dans la même expérience afin de pouvoir être comparés de manière rigoureuse. Trois puits ont été réalisés par condition pour 1 expérience et permettent de calculer une moyenne sur n=3. Ensuite, afin d'effectuer des tests statistiques et d'exploiter les résultats obtenus, 3 expériences ont été réalisées (triplicat, n=3) pour chaque série de composés (en tout n=9 données correspondant à des intensités de fluorescence normalisées en % sont obtenues).

III. Mise en évidence de l'effet des deutériums sur la peroxydation lipidique au sein des ARPE-19, en séries DHA (AGPI et lipophénols)

III.1. Évaluation des DHA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique

L'effet des deutériums en positions *bis*-allyliques du DHA a été évalué en présence de trois types de stress précédemment évoqués : un milieu d'incubation carencé en 1% SVF, un stress chimique correspondant à H₂O₂ (400 µM) et un stress lumineux (lumière blanche à 5 000 lux). Un essai correspondant, au stress associé à une carence à 1% de SVF, a également été effectué à des concentrations proches des CI₅₀ des DHA (à 60 µM) afin d'évaluer l'influence sur la peroxydation lipidique à une concentration toxique en DHA.

III.1.1. Comparaison de l'effet des DHA naturels et deutérés (à 50 μM) en présence du stress chimique H_2O_2 (400 μM) et/ou d'une carence à 1% de SVF

Les DHA naturel et deutérés (DHA-D₂ et DHA-D₄) ont été évalués à une concentration de pré-incubation (non toxique) de 50 μM , (**Figure 98** et **Figure 99**) dans un milieu carencé en 1% SVF et en l'absence ou en présence de H_2O_2 à 400 μM .

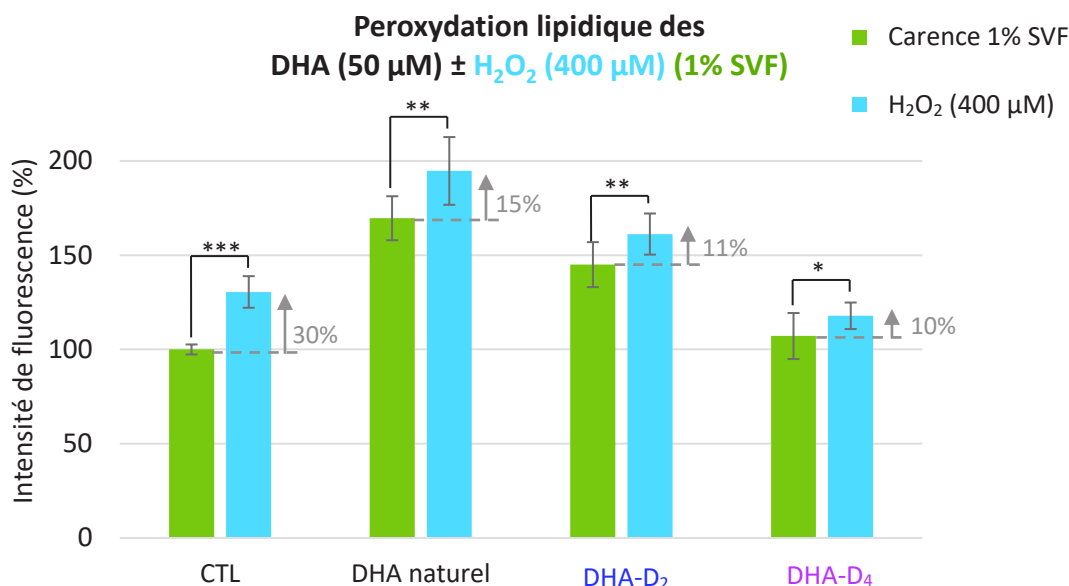


Figure 98 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm DHA \pm H_2O_2 : incubation des cellules en présence de DHA (50 μM) puis incubation de H_2O_2 (400 μM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et H_2O_2 . Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les résultats obtenus (**Figure 98**) suggèrent une augmentation significative de la peroxydation lipidique en présence de H_2O_2 (barres d'histogramme bleues), comparé aux conditions présentant uniquement une carence à 1% de SVF (barres d'histogramme vertes). Cette augmentation illustre que la peroxydation lipidique induite par le DHA, plus importante en présence de H_2O_2 et en présence ou en l'absence de deutériums en positions *bis*-allyliques. La présence des deutériums permet néanmoins de réduire légèrement la différence entre les conditions en présence et en l'absence de H_2O_2 (15% pour le DHA naturel, 11% pour le DHA-D₂ et 10% pour le DHA-D₄). En effet, l'augmentation obtenue entre la condition de carence à 1% de SVF et H_2O_2 en présence de DHA-D₄ est moins significative (*) que celle obtenue pour ces deux même stress en présence du DHA naturel (**). L'histogramme (**Figure 98**) a été divisé en deux sous

histogrammes, associés chacun à un stress : une carence à 1% de SVF ou un traitement avec H₂O₂ à 400 µM (Figure 99, a et b).

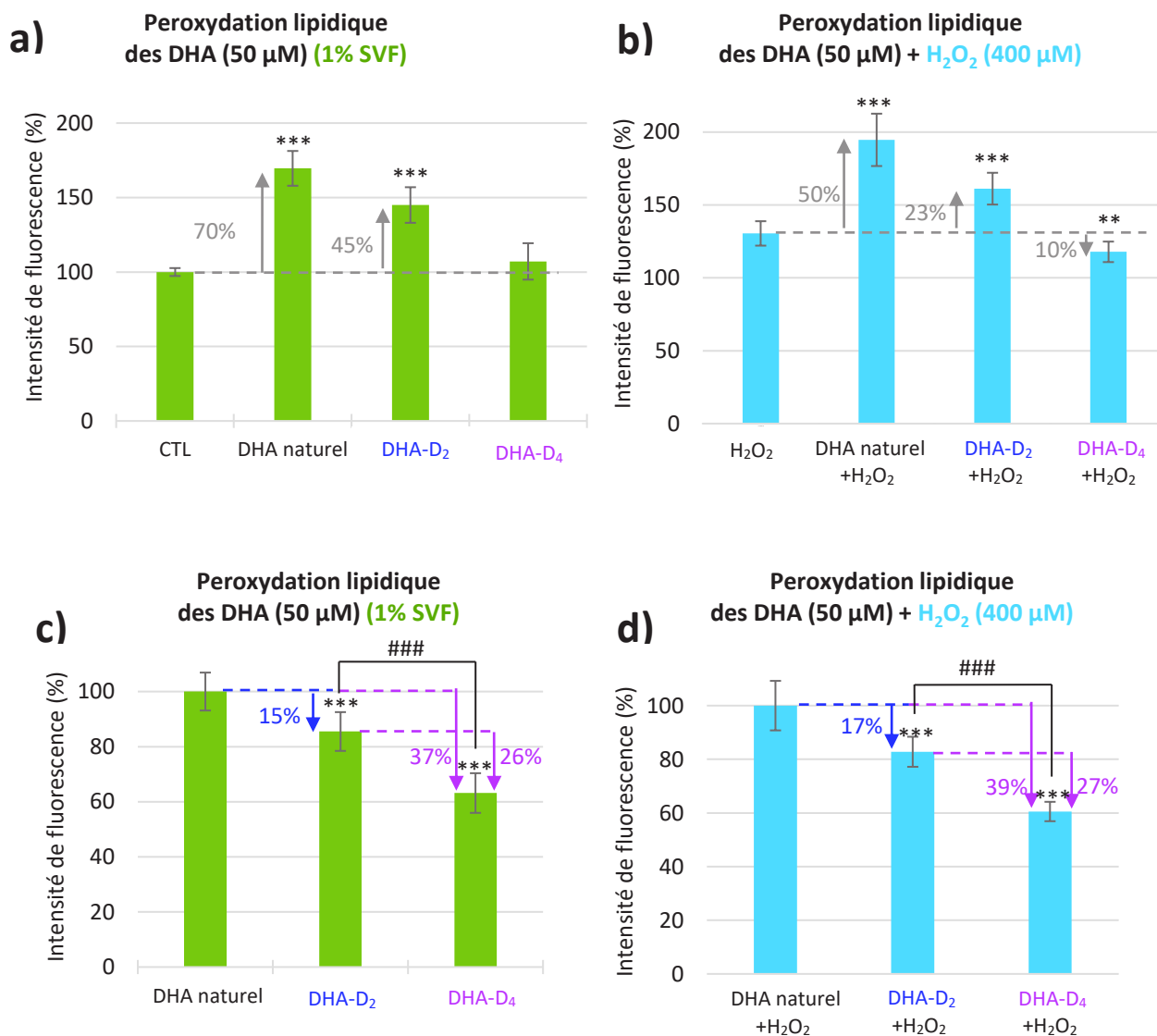


Figure 99 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± DHA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de DHA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence à 1% de SVF. b) Histogramme associé au stress H₂O₂ (400µM). Les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et tous sont exprimés en % d'intensités de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF avec des résultats normalisés avec la condition DHA naturel (fixée à 100%). d) Histogramme associé au stress H₂O₂ avec des résultats normalisés avec la condition DHA naturel+H₂O₂ (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001.

Pour le stress correspondant à une carence à 1% de SVF (Figure 99, a), la pré-incubation des cellules avec le DHA naturel ou le DHA-D₂ engendre une augmentation de la peroxydation lipidique respectivement de 70 et 45% comparé à la condition contrôle (CTL). Il est important de

noter que l'utilisation du DHA-D₄ comparé au DHA naturel permet de retrouver un seuil de peroxydation lipidique proche de celui obtenu en l'absence de DHA (CTL). On annule donc dans ces conditions la peroxydation lipidique induite par le DHA naturel.

Les deux DHA deutérés, le DHA-D₂ et le DHA-D₄ limitent la peroxydation lipidique de manière significative par rapport à celle obtenue avec le DHA naturel normalisée à un maximum de 100% (**Figure 99, c**), respectivement de 15% et 37%. Le DHA-D₄ limite d'autant plus ce mécanisme comparé au DHA-D₂ avec une diminution de 26%.

Dans les essais où le stress oxydant est engendré par H₂O₂ à 400 µM (**Figure 99, b**), des augmentations significatives de 50% et 23% respectivement pour le DHA naturel et DHA-D₂ sont présentes par rapport à la peroxydation lipidique engendrée par H₂O₂ seul. Malgré cela, on observe un léger effet protecteur du DHA-D₄, qui permet une diminution de la peroxydation lipidique de 10%, par rapport à la condition sans DHA. La présence des DHA deutérés limite significativement la peroxydation lipidique (**Figure 99, d**), dans ces conditions également, de 17% pour le DHA-D₂ et de 39% pour le DHA-D₄, comparé à la condition DHA naturel+H₂O₂. Le DHA-D₄ limite également de manière significative (26%) la peroxydation lipidique induite par le DHA-D₂. La protection de cellules par les DHA deutérés est donc toujours présente, même dans des conditions de stress plus important (H₂O₂ à 400 µM).

Pour conclure, la peroxydation lipidique est globalement limitée en présence des DHA-D₂ et DHA-D₄ par rapport au DHA naturel, en condition de carence à 1% de SVF avec et sans H₂O₂ (400 µM). Cela pourrait justifier en partie leur toxicité plus faible dans certaines conditions d'oxydation, même si la peroxydation lipidique ne semble pas être le seul mécanisme intervenant dans la toxicité des DHA. De plus, le DHA-D₄ engendre moins de peroxydation lipidique comparé au DHA-D₂ pour les deux conditions de stress évaluées, montrant ainsi l'impact d'une position *bis*-allylique deutérée supplémentaire. L'objectif de départ visant à obtenir un DHA protégeant les cellules de la peroxydation lipidique est donc atteint.

La peroxydation lipidique a ensuite été évaluée dans des conditions de stress lumineux associé à une peroxydation lipidique induite de manière bien plus importante comparée à H₂O₂ à 400 µM.

III.1.2. Comparaison de l'effet des DHA naturels et deutérés (à 50 μM) en présence d'un stress lumineux (lumière blanche, 5 000 lux) et/ou d'une carence à 1% de SVF

Les DHA naturel et deutérés ont été évalués en présence de stress lumineux correspondant à une lumière blanche (lum Blc) utilisée à une intensité lumineuse de 5 000 lux durant 1 h (**Figure 100**). Le stress lumineux est évalué après 1 h de stress comparé à 24 h dans des conditions de carence à 1% de SVF en présence de H_2O_2 .

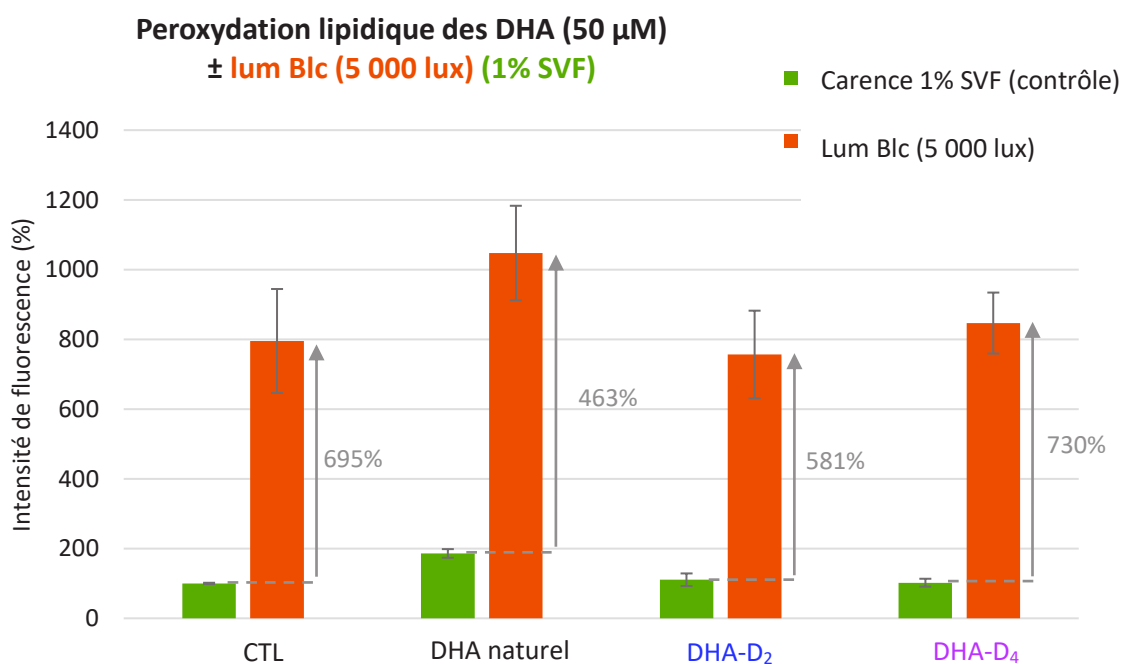


Figure 100 : Évaluation de la Peroxydation lipidique ± DHA ± lum Blc : incubation des cellules en présence de DHA (50 μM) puis stress lumineux (lumière blanche à 5 000 lux) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et lum Blc. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Le stress engendré par la lumière (**Figure 100**) est assez important au sein des cellules non traitées avec les DHA, comparé à la condition contrôle (695%). L'éclairement des cellules engendre une augmentation de la peroxydation lipidique de 463%, 581% et 730% respectivement pour les conditions où les cellules ont été pré-traitées avec le DHA naturel, DHA-D₂ et DHA-D₄. Cela suggère que le stress appliqué est trop accru pour être totalement contrôlé par la présence des DHA deutérés (contrairement aux essais précédents). Pour une meilleure lecture des résultats, cet

histogramme (**Figure 100**) a été divisé en deux sous histogrammes, associés chacun à un stress engendré par une carence à 1% de SVF ou par un stress lumineux à 5 000 lux (**Figure 101, a et b**)

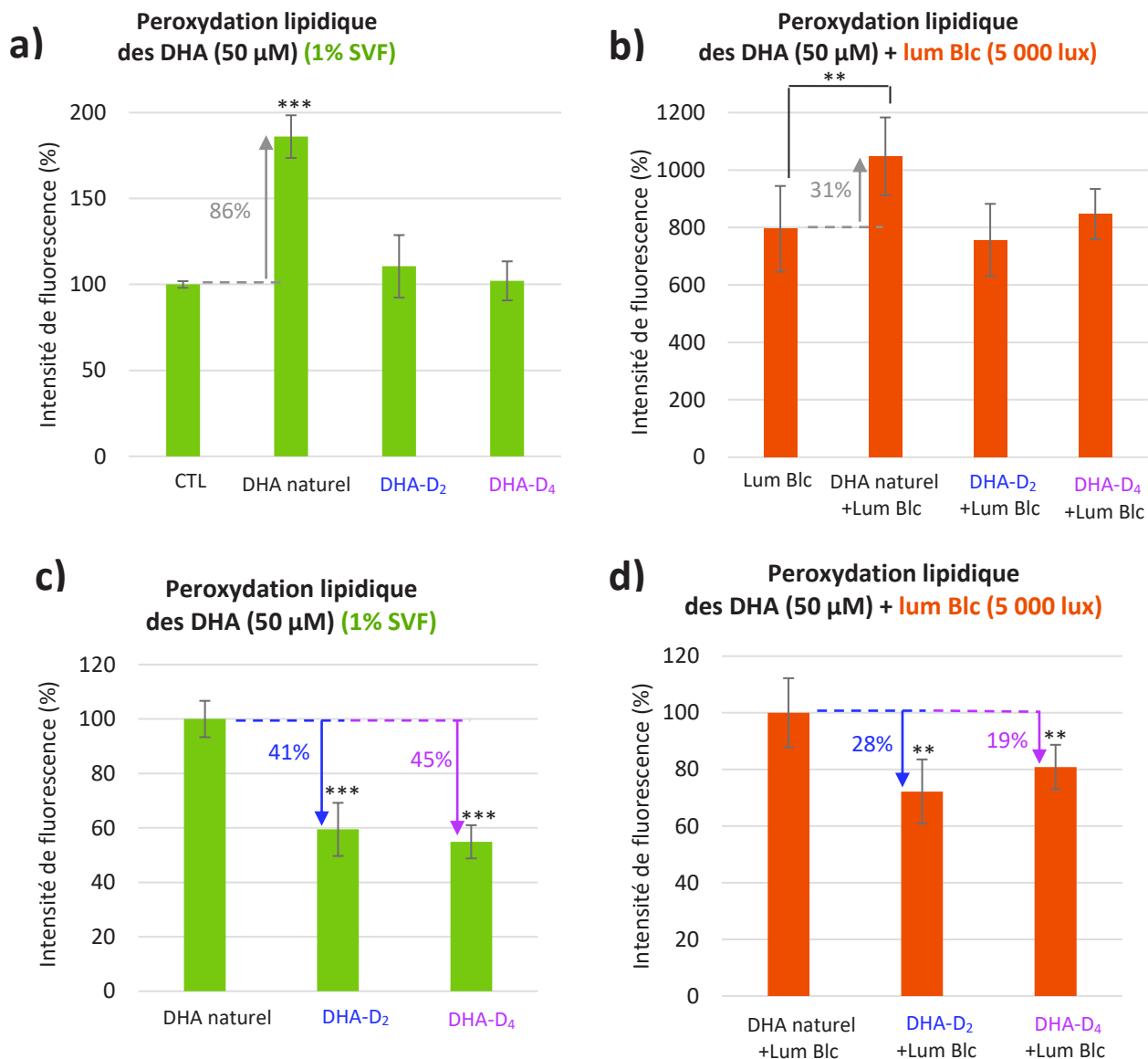


Figure 101 : Évaluation de la Peroxydation lipidique ± DHA ± lum Blc : incubation des cellules en présence de DHA (50 µM) puis stress lumineux (lumière blanche à 5 000 lux) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence à 1% de SVF. b) Histogramme associé au stress lum Blc. Les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et tous sont exprimés en % d'intensités de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF avec des résultats normalisés avec la condition DHA naturel (fixée à 100%). d) Histogramme associé au stress lum Blc avec des résultats normalisés avec la condition DHA naturel+lum Blc (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le test de Mann Whitney permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

La condition carence à 1% de SVF (**Figure 101, a**) a été réalisée en tant que contrôle et diffère de celle effectuée précédemment par le temps de stress appliqué sur les cellules (48 h au

lieu de 24 h). Les DHA deutérés n'entraînent pas une augmentation de peroxydation lipidique comparé à la condition contrôle, contrairement au DHA naturel (86%). Ce résultat est légèrement différent de celui obtenu précédemment (**Figure 99, a**), où une augmentation de peroxydation lipidique avait été obtenue pour le DHA-D₂ (45%). Cette variation des résultats s'explique par l'utilisation de protocoles différents (temps d'incubation des cellules dans le milieu carencé en SVF). En effet dans l'expérience précédente (**Figure 99, a**) les cellules sont laissées en tout 48 h dans le milieu sans sérum, contre 24 h dans ce cas (**Figure 101, a**) et subissent donc un de stress cellulaire différent. Lorsque les résultats sont exprimés en normalisant par rapport aux cellules traitées avec le DHA naturel (**Figure 101, c**), une diminution significative de ce mécanisme est présent, respectivement de 41% et 45% pour le DHA-D₂ et DHA-D₄. Cependant, aucune différence n'est visible entre les deux DHA deutérés.

Pour la condition utilisant le stress lumineux, une augmentation de la peroxydation lipidique de 31% est obtenue (**Figure 101, b**) pour les cellules incubées avec le DHA naturel comparé à la condition sans DHA. Comme précédemment, aucun des deux DHA deutérés n'augmentent la peroxydation lipidique induite par la lumière blanche. Lorsque les résultats sont exprimés en normalisant par rapport aux résultats du DHA naturel+lum Blc (**Figure 101, d**), une diminution significative de ce mécanisme est observable, respectivement de 28% et 19% pour le DHA-D₂ et DHA-D₄. Cependant, l'effet de l'ajout d'une position *bis*-allylique supplémentaire sur le DHA n'est pas visible ici.

III.1.3. Comparaison de l'effet des DHA naturel et deutérés utilisé à 60 μ M (proche des CI₅₀) en présence d'une carence à 1% de SVF

Dans une dernière expérience nous avons utilisé une concentration de 60 μ M en DHA, concentration proche de l'IC₅₀ (**Figure 102**), afin d'utiliser des conditions proches de la limite de mortalité des cellules. Après incubation pendant 24 h, une observation au microscope montre que les cellules sont très affectées par le traitement au DHA naturel et au DHA-D₂ et beaucoup moins en présence du DHA-D₄ (résultat cohérent avec la toxicité obtenue). Cette expérience a été réalisée en monoplicat (n=1), avec 3 puits par condition.

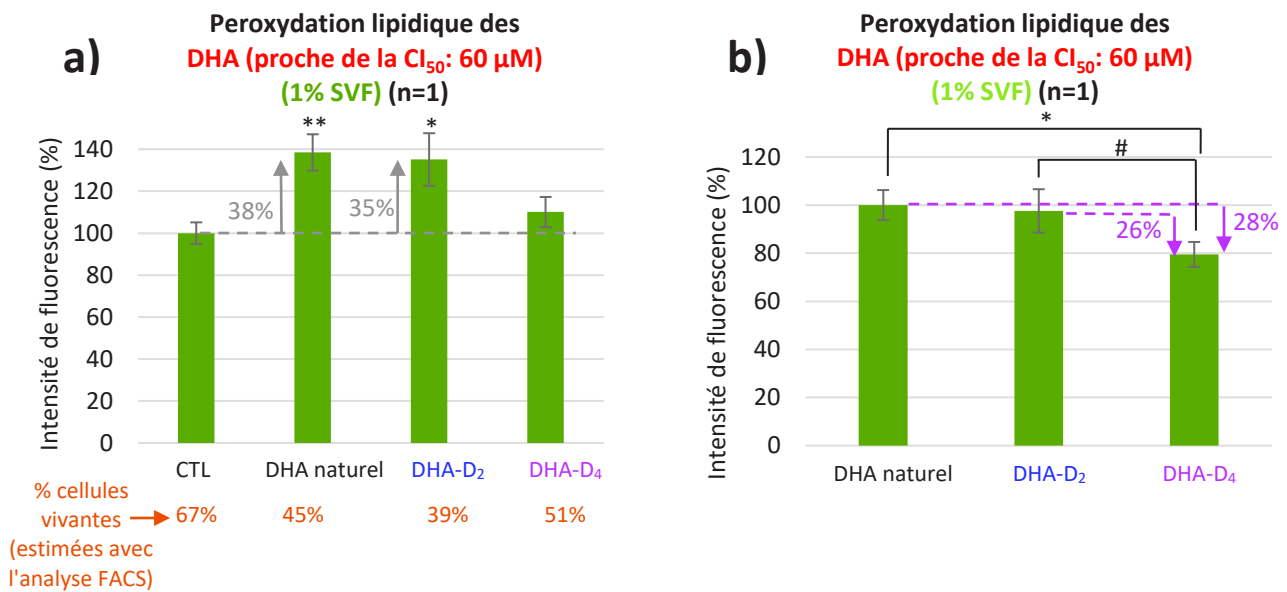


Figure 102 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± DHA ± lum Blc : incubation des cellules en présence de DHA (60 μ M) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence à 1% de SVF, les résultats sont normalisés par rapport à la condition CTL (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensité de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. b) Histogramme pour la carence à 1% de SVF avec des résultats normalisés avec la condition DHA naturel (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001.

Les augmentations de la peroxydation lipidique engendrée par le DHA naturel et DHA-D₂, respectivement de 38% et 35%, sont similaires (**Figure 102, a**). Ces pourcentages sont moins importants comparés aux résultats précédents (**Figure 99, a**), 70% pour le DHA naturel et 45% pour le DHA-D₂), et pourrait s'expliquer par la différence de viabilité des cellules présentes dans les échantillons comparée au contrôle non traité. Une différence d'environ 25% à 30 % en cellules vivantes est observée, et pourrait être responsable d'une perte d'information. Malgré cela, il est possible de comparer les résultats obtenus pour les DHA puisque la viabilité cellulaire obtenue pour chaque condition reste du même ordre de grandeur (**Figure 102, b**). Les résultats obtenus suggèrent que le pré-traitement des cellules avec une concentration en DHA proche des CI_{50} réduit l'effet protecteur des DHA deutérés. On n'observe pas de diminution de la peroxydation lipidique après traitement avec le DHA-D₂. Cependant, le pré-traitement en présence du DHA-D₄ permet toujours de limiter la peroxydation lipidique, de 28% et 26% respectivement par rapport au DHA naturel et au DHA-D₂. Dans ces conditions de survie cellulaire affaiblie, l'effet du DHA-D₄ est toujours observable.

III.2. Évaluation des PG-DHA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique

III.2.1. Comparaison de l'effet des PG-DHA non deutéré et deutérés (à 50 μM) en présence du stress chimique H_2O_2 (400 μM) et/ou d'une carence à 1% de SVF

Les composés lipophénoliques liés au DHA (PG-DHA non deutéré et deutérés) ont également été évalués afin d'étudier l'effet des deutériums sur ces molécules conjuguées. Les stress en présence ou en l'absence de H_2O_2 ont été appliqués selon le protocole décrit précédemment et sont présentés dans la **Figure 103**.

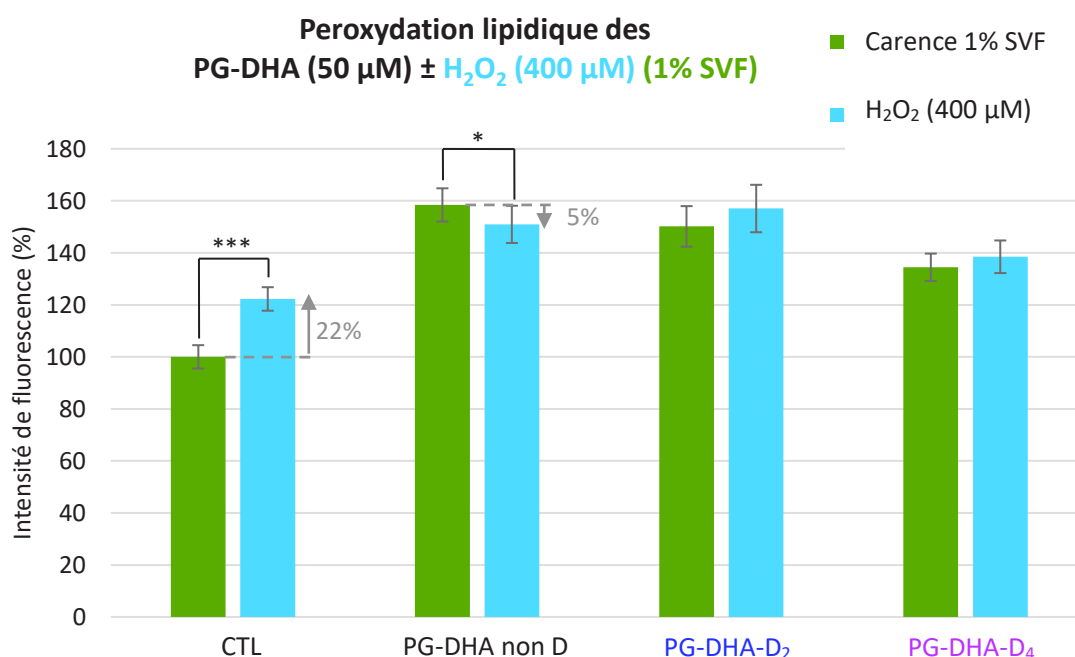


Figure 103 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm PG-DHA \pm H_2O_2 : incubation des cellules en présence de PG-DHA (50 μM) puis incubation de H_2O_2 (400 μM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et H_2O_2 . Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart type ; le *t*-test permet de déterminer les valeurs- *p* : **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001.

Dans cet essai (**Figure 103**), la condition contrôle indique une augmentation de la peroxydation lipidique de 22% en présence de H_2O_2 . Cependant, aucune augmentation de ce stress n'est obtenue en présence de H_2O_2 lorsque les cellules ont été pré-traitées avec les différents lipophénols-DHA. Ainsi le couplage entre le phloroglucinol-*O*/Pr et le DHA semble avoir un impact positif sur l'effet du PG-DHA en condition oxydante induite par H_2O_2 , puisque la

présence de la partie lipidique n'engendre pas d'augmentation de peroxydation après ajout de H_2O_2 . Les histogrammes (**Figure 104, a et b**) issus de la **Figure 103** permettent de mieux visualiser la peroxydation lipidique induite par une carence à 1% de SVF ou par un traitement avec H_2O_2 .

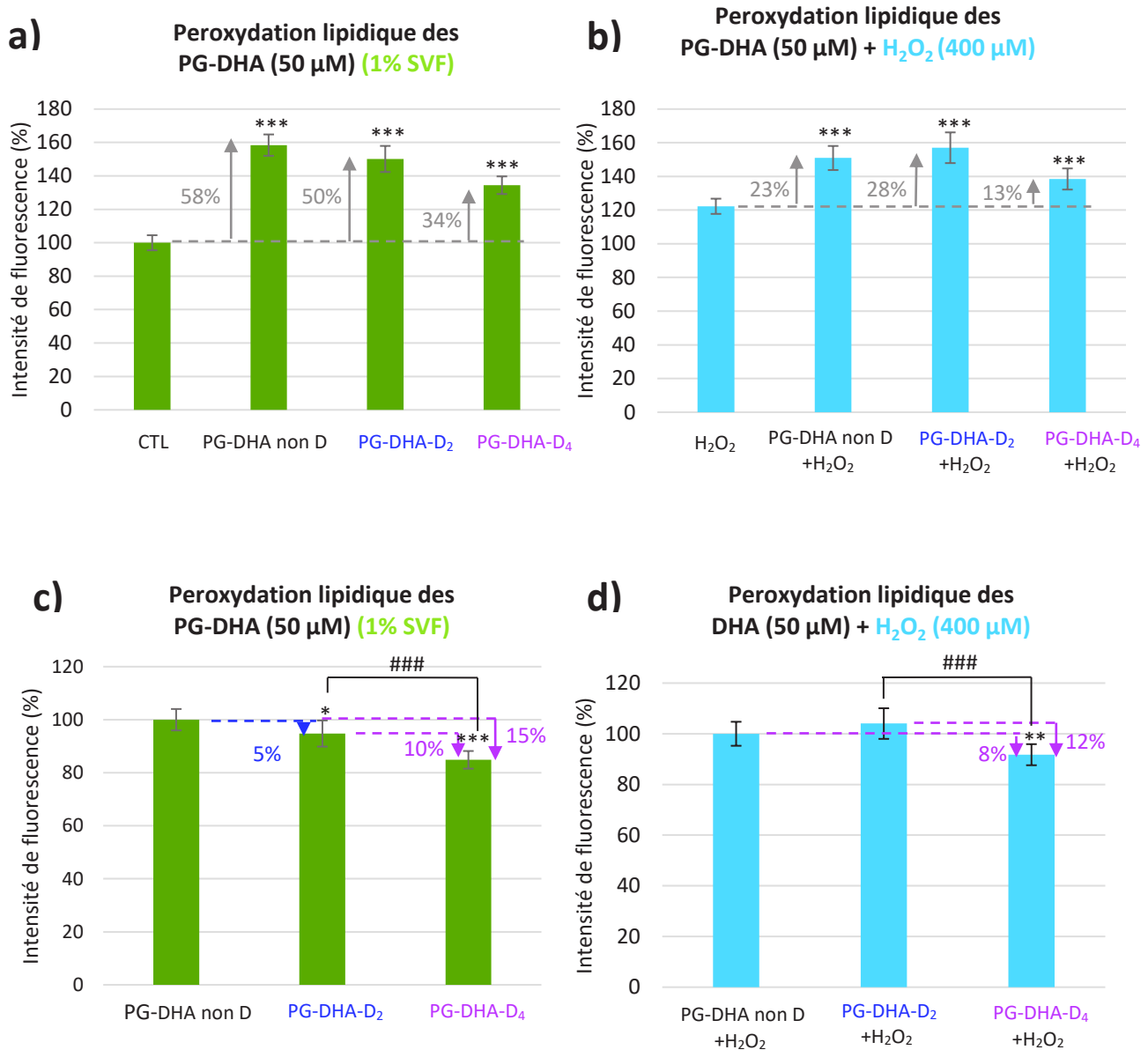


Figure 104 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm PG-DHA \pm H_2O_2 : incubation des cellules en présence de PG-DHA (50 μ M) puis incubation de H_2O_2 (400 μ M) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence à 1% de SVF. b) Histogramme associé au stress H_2O_2 (400 μ M). Les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et tous sont exprimés en % d'intensités de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF avec des résultats normalisés avec la condition PG-DHA non D (fixée à 100%). d) Histogramme associé au stress H_2O_2 avec des résultats normalisés avec la condition PG-DHA non D + H_2O_2 (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ###p<0,01 ; ####p<0,001.

Dans les conditions de stress correspondant à une carence à 1% de SVF, le pré-traitement avec tous les PG-DHA augmentent de manière significative la peroxydation lipidique (**Figure 104, a**) comparés à la condition contrôle sans composé (58%, 50% et 34% respectivement pour le PG-DHA non D, PG-DHA-D₂ et le PG-DHA-D₄). Le pré-traitement des cellules avec ces composés induit donc une augmentation de la peroxydation lipidique par rapport aux cellules non traitées, sûrement liée à la présence de la partie lipidique. Cependant, lorsque l'on compare entre eux les dérivés de la série PG-DHA (**Figure 104, c**), les composés deutérés induisent une diminution significative de la peroxydation lipidique comparés au PG-DHA non D. Cette diminution, de 5% et 15% respectivement pour le PG-DHA-D₂ et le PG-DHA-D₄, reste cependant assez faible mais observable.

Après traitement en présence de H₂O₂ à 400 µM (**Figure 104, b**), une augmentation de la peroxydation lipidique est obtenue pour les trois composés comparée à la condition contrôle + H₂O₂ (23%, 28% et 13% respectivement pour un traitement en présence de PG-DHA non D, PG-DHA-D₂ et le PG-DHA-D₄). Lors de la comparaison des PG-DHA dans la condition de stress en présence de H₂O₂ (**Figure 104, d**) correspondant à des résultats normalisés par rapport au PG-DHA non D, seul le PG-DHA-D₄ permet une diminution de la peroxydation lipidique significative, de 8% par rapport au PG-DHA et de 12% comparé au PG-DHA-D₂.

III.2.2. Comparaison de l'effet des PG-DHA non deutéré et deutérés (à 50 μM) en présence d'un stress lumineux (lumière blanche, 5 000 lux) SVF et/ou d'une carence à 1% de

Les différents lipophénols PG-DHA ont été également évalués en présence d'un stress lumineux. Les cellules sont éclairées pendant 1 h, à une intensité lumineuse de 5 000 lux (**Figure 105** et **Figure 106**).

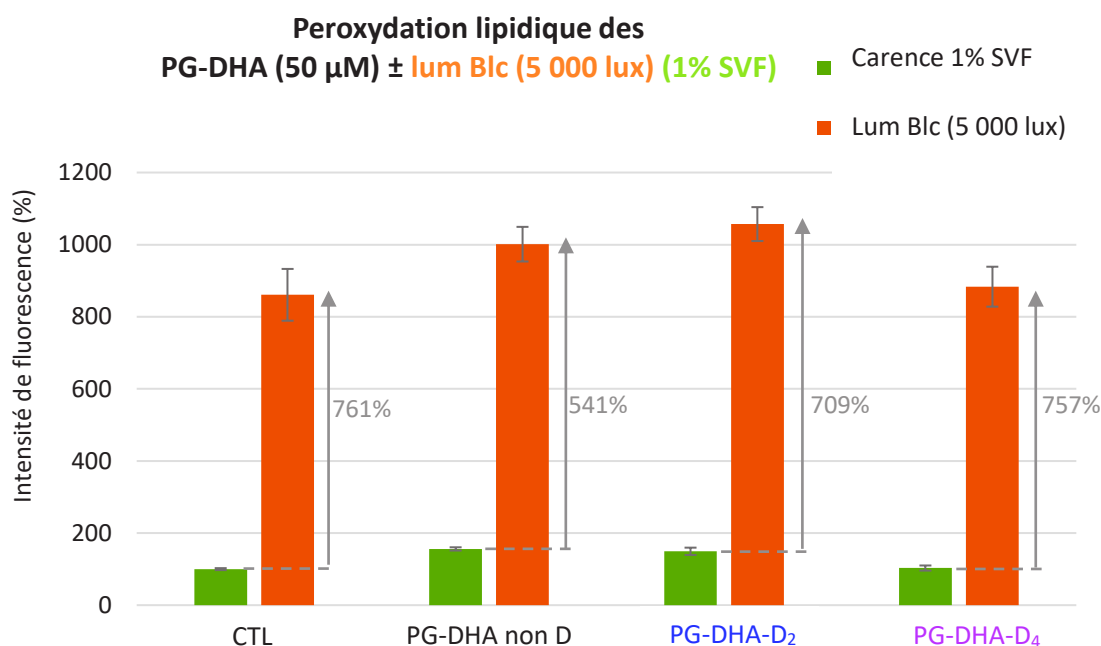


Figure 105 : Évaluation de la Peroxydation lipidique \pm PG-DHA \pm lum Blc : incubation des cellules en présence de PG-DHA (50 μM) puis stress lumineux (lumière blanche à 5 000 lux) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et lum Blc. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}.

Le stress lumineux engendré par cet éclairage correspond à une augmentation massive de la peroxydation lipidique présente au sein des cellules (761% comparé à la condition contrôle sans aucun traitement). De plus, les augmentations restent globalement élevées (541%, 709% et 757%) lors des traitements en présence de PG-DHA non D, PG-DHA-D₂ et le PG-DHA-D₄. Ainsi le stress lumineux induit une peroxydation lipidique trop accrue pour être totalement diminuée par les différents lipophénols PG-DHA. Cet histogramme (**Figure 105**) a également été divisé en deux sous histogrammes correspondant respectivement à la condition de stress associée à une carence à 1%

de SVF (**Figure 106, a**) et à une condition de stress lumineux (**Figure 106, b**), pour une analyse plus précise de l'effet des deutériums sur la peroxydation lipidique induite par le traitement au lipophénol.

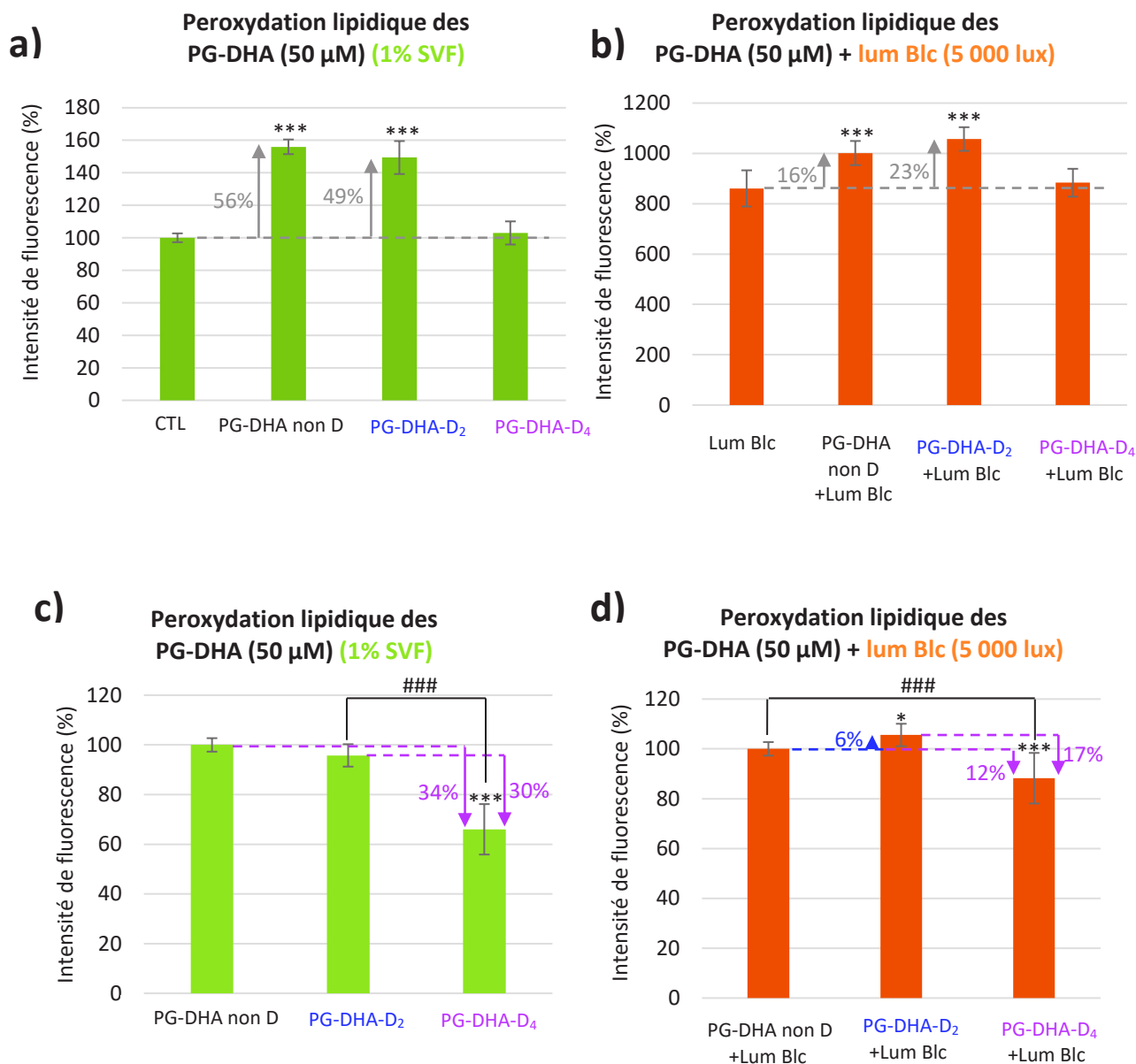


Figure 106 : Évaluation de la Peroxydation lipidique ± DHA ± lum Blc : incubation des cellules en présence de PG-DHA (50 µM) puis stress lumineux (lumière blanche à 5 000 lux) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence à 1% de SVF. b) Histogramme associé au stress lum Blc. Les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et tous sont exprimés en % d'intensités de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF avec des résultats normalisés avec la condition PG-DHA non D (fixée à 100%). d) Histogramme associé au stress lum Blc avec des résultats normalisés avec la condition PG-DHA non D + lum Blc (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001.

Lors de condition de stress, associée à une carence à 1% de SVF (**Figure 106, a**) (effectuée en guise de contrôle), seul le PG-DHA non D et le PG-DHA-D₂ entraînent une augmentation de la peroxydation lipidique, respectivement associée aux valeurs de 56% et 49% comparé à la valeur contrôle. Le PG-DHA-D₄, quant à lui, ne présente pas cet effet d'augmentation. Ce dernier permet une diminution de la peroxydation lipidique (**Figure 106, c**) associé aux valeurs de 34% et 30% comparé respectivement au PG-DHA non D et au PG-DHA-D₂. Tout comme pour l'évaluation de la série DHA libre, les résultats diffèrent de ceux présentés en **Figure 104**, à cause d'une différence de protocole associé à l'utilisation de la lumière (temps de stress 1 h suivi de l'analyse par FACS).

En présence d'un stress lumineux (**Figure 106, b**), seul le PG-DHA non D et le PG-DHA-D₂ entraînent une augmentation de la peroxydation lipidique (respectivement de 16% et 23%) comparé à la valeur contrôle. A nouveau, seul le PG-DHA-D₄ ne présente pas cet effet d'augmentation. A noter que le PG-DHA-D₂ présente une augmentation plus importante de peroxydation lipidique comparé au PG-DHA non D, ce qui n'avait pas été retrouvé dans la condition de carence à 1% de SVF. Finalement, la comparaison des composés de la série PG-DHA (**Figure 106, d**) dans cette condition de stress montre une augmentation de la peroxydation lipidique significative mais restant assez faible (6%) associée au PG-DHA-D₂ comparé au PG-DHA non D. Le PG-DHA-D₄ montre quant à lui l'activité la plus intéressante en termes de limitation de la peroxydation lipidique, associée à 12 et 17% comparé respectivement au PG-DHA non D et PG-DHA-D₂. Il permet comme pour le DHA-D₄ libre de restaurer l'état de peroxydation lipidique obtenu en absence de traitement au lipophénol. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'un lipophénol tétra-deutééré permettrait de conserver les effets bénéfiques du lipophénol (propriété anti-stress carbonylé) en réduisant le potentiel effet de la peroxydation lipidique.

III.3. Comparaison des résultats obtenus pour la série DHA : AGPI libres et lipophénols non deutérés et deutérés

Une comparaison des DHA (libre et deutérés) et PG-DHA (non deutéré et deutérés) a été effectuée pour classer l'effet des composés sur la variation de la peroxydation lipidique (**Figure 107**) à 50 µM. Cette comparaison pourrait donner une indication sur le devenir de la molécule en présence des cellules. En effet, si la liaison ester est totalement clivée dans la cellule, la peroxydation lipidique engendrée est sensée être proche de celle du DHA seule. Cependant, le taux d'incorporation du PG-DHA comparé à celui du DHA libre n'étant pas connu (ni dans quel organite ils vont s'accumuler), l'interprétation de ces résultats nous permet uniquement d'émettre des hypothèses.

Cette comparaison a été effectuée pour la condition de carence à 1% de SVF avec des cellules traitées ou non avec H₂O₂ (400 µM) (**Figure 107**).

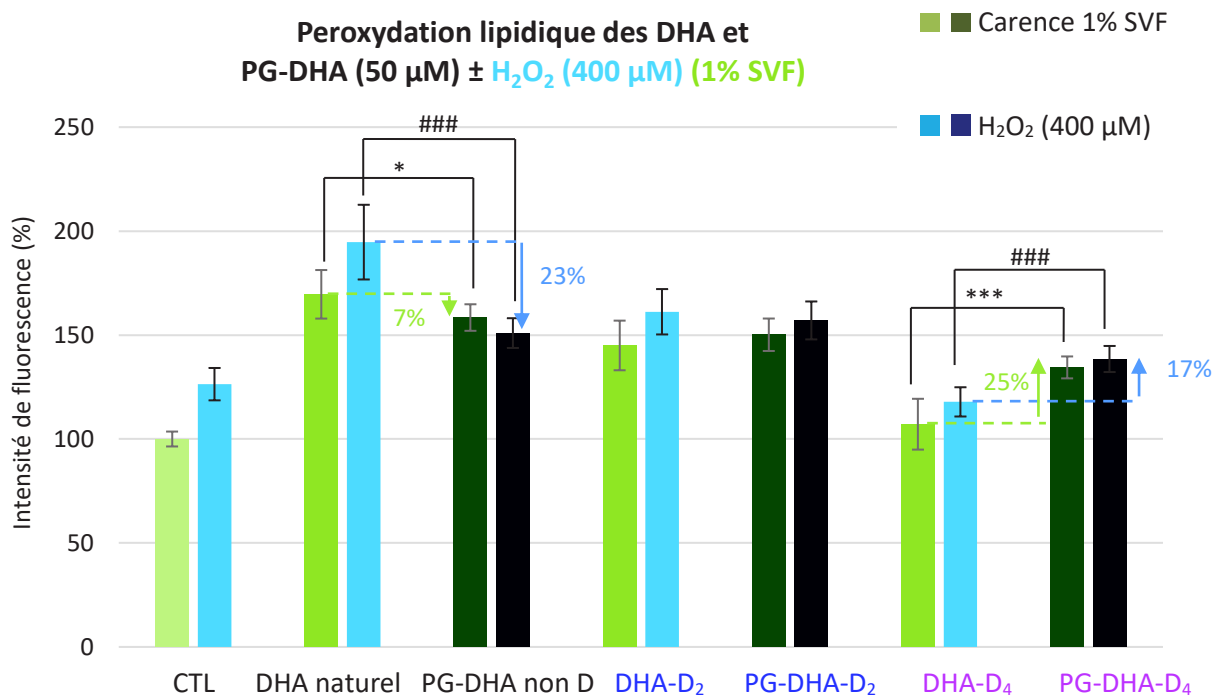


Figure 107 : Évaluation de la peroxydation lipidique pour les DHA et PG-DHA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de DHA ou PG-DHA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats (**Figure 98** et **Figure 103**) pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001.

La comparaison du DHA naturel avec le PG-DHA non D indique une diminution de la peroxydation lipidique pour ce dernier dans les deux conditions de stress, carence en sérum et H₂O₂, respectivement associée à 7% et 23%. Ainsi, la présence du groupement phloroglucinol-OiPr lié au DHA permet de limiter le stress oxydant induit par le DHA naturel, suggérant une stabilité de la liaison ester pendant le temps du test. En comparant les composés deutérés DHA-D₂ et PG-DHA-D₂, aucune diminution de la peroxydation lipidique n'est significativement observée. La comparaison des composés DHA-D₄ et PG-DHA-D₄ montre que le DHA-D₄ limite la peroxydation lipidique de manière plus importante comparée au lipophénols, pour les deux conditions de stress, carence à 1% de SVF et H₂O₂ (400 µM) (respectivement de 25% et 17%). L'effet des deutériums est plus important ici, et un effet protecteur de la molécule a été observé dans certaines conditions d'oxydation. Pour cette raison, une différence est visible entre les deux composés tétra-deutérés.

La différence des résultats obtenus (DHA naturel/PG-DHA non D et DHA-D₄/PG-DHA D₄) suggère probablement que la liaison ester n'est pas totalement clivée au cours de ce test.

IV. Mise en évidence de l'effet des deutériums sur la peroxydation lipidique au sein des ARPE-19, en séries ALA et LA (AGPI et lipophénols), et comparaison avec la série DHA

Afin d'effectuer une comparaison entre les différentes séries d'AGPI (DHA, ALA et LA) et leurs lipophénols, une évaluation de la peroxydation lipidique, présente au sein des cellules et induite par les deux conditions de stress différentes (carence à 1% de SVF et H₂O₂), a été réalisée pour les séries ALA et LA (AGPI libre et lipophénol).

IV.1. Évaluation des ALA et LA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique et comparaison avec la série DHA

IV.1.1. Évaluation de l'effet des ALA et LA naturels et deutérés (à 50 µM) en présence du stress chimique H₂O₂ (400 µM) et/ou d'une carence à 1% de SVF

Les conditions de stress appliquées en présence des ALA (**Figure 108** et **Figure 109**) et des LA (**Figure 110** et **Figure 111**) naturels et deutérés correspondent à une carence à 1% de SVF et à un traitement avec H₂O₂ (400 µM).

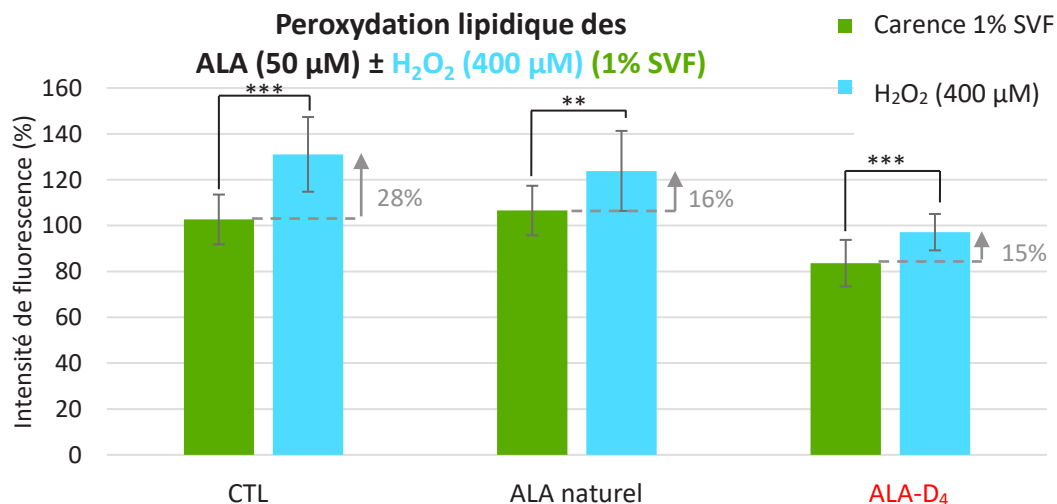


Figure 108 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± ALA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence d'ALA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le test de Mann Whitney permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Pour les cellules traitées en présence de l'ALA naturel ou l'ALA-D₄ (**Figure 108**), la présence de H₂O₂ entraîne une augmentation de peroxydation lipidique respectivement de 16 et 15%. Pour une meilleure visibilité des résultats, l'histogramme **Figure 108** a été divisé en deux sous histogrammes (**Figure 109, a et b**).

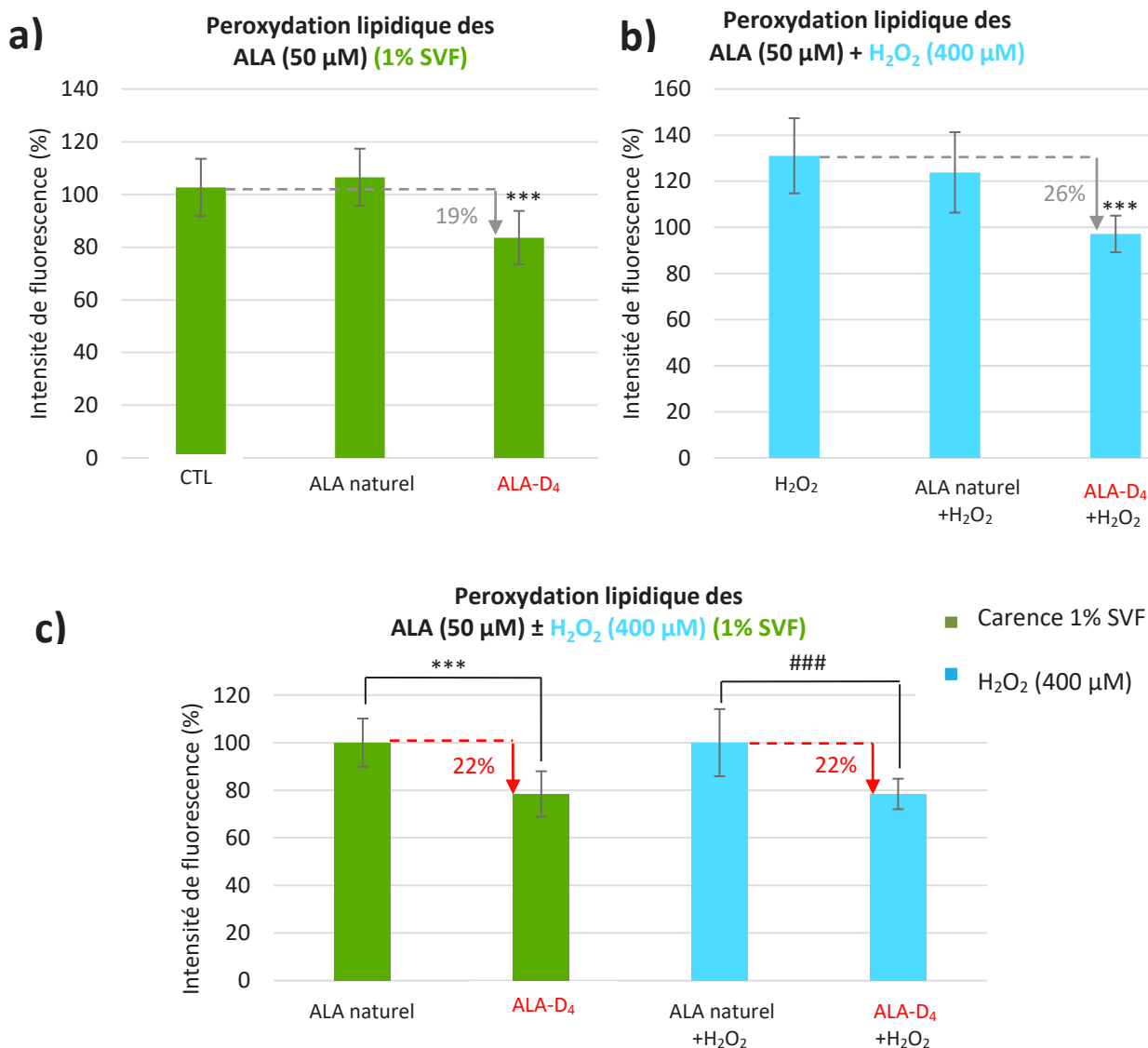


Figure 109 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± ALA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence d'ALA (50 μM) puis incubation de H₂O₂ (400 μM) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence à 1% de SVF. b) Histogramme associé au stress H₂O₂ (400μM). Les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et tous sont exprimés en % d'intensités de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂ avec des résultats normalisés avec la condition ALA naturel (fixée à 100%) ou ALA naturel+H₂O₂ (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le test de Mann Whitney permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ###p<0,01 ; ####p<0,001.

En présence uniquement d'une carence à 1% de SVF (**Figure 109, a**), le pré-traitement en présence de l'ALA-D₄ permet une diminution significative de la peroxydation lipidique de 19% comparée à la condition contrôle. Ce résultat est similaire à celui observé dans la condition de traitement avec H₂O₂ (**Figure 109, b**) où une diminution de ce mécanisme de 26% est observé. Finalement, une limitation significative de l'oxydation de 22% est obtenue pour l'ALA-D₄ comparé à l'ALA naturel pour les deux conditions de stress (**Figure 109, c**).

Une comparaison au sein de la série LA (AGPI) a également été effectuée (**Figure 110 et Figure 111**).

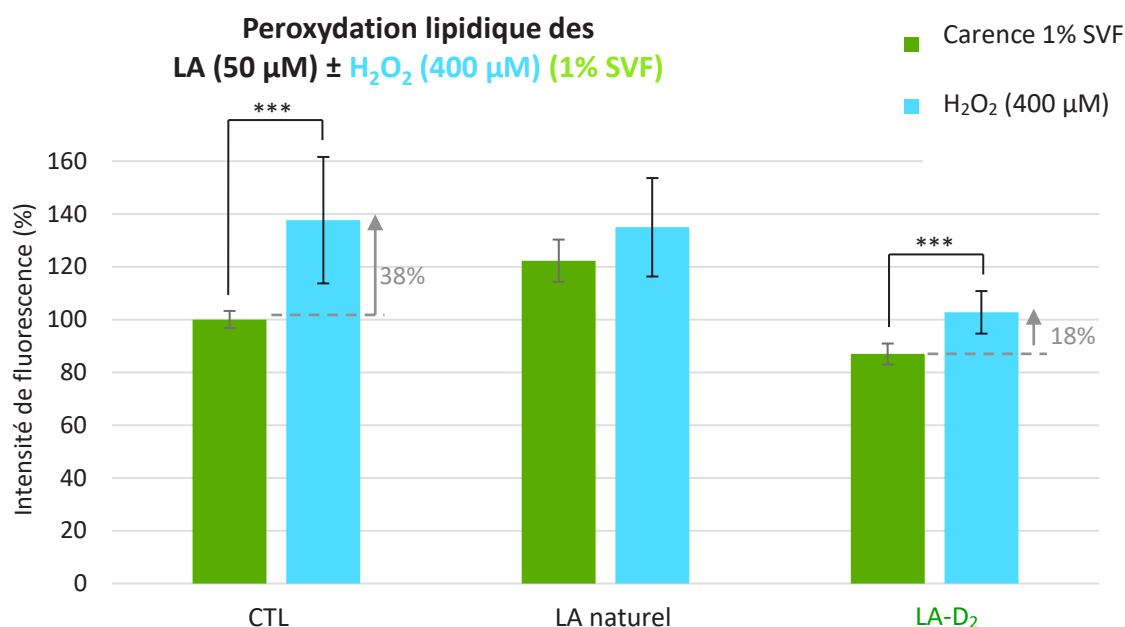


Figure 110 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± LA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de LA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le *t*-test permet de déterminer les valeurs- *p* : **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001.

Une légère augmentation de la peroxydation lipidique est obtenue (18%) lorsque les cellules, pré-traitées avec le LA-D₂, sont incubées en présence de H₂O₂. Les deux sous histogrammes de la **Figure 111 (a et b)** permettent de comparer les composés avec la condition

contrôle lorsque les stress correspondant à une carence à 1% de SVF ou un traitement avec H₂O₂ (400 µM) sont appliqués.

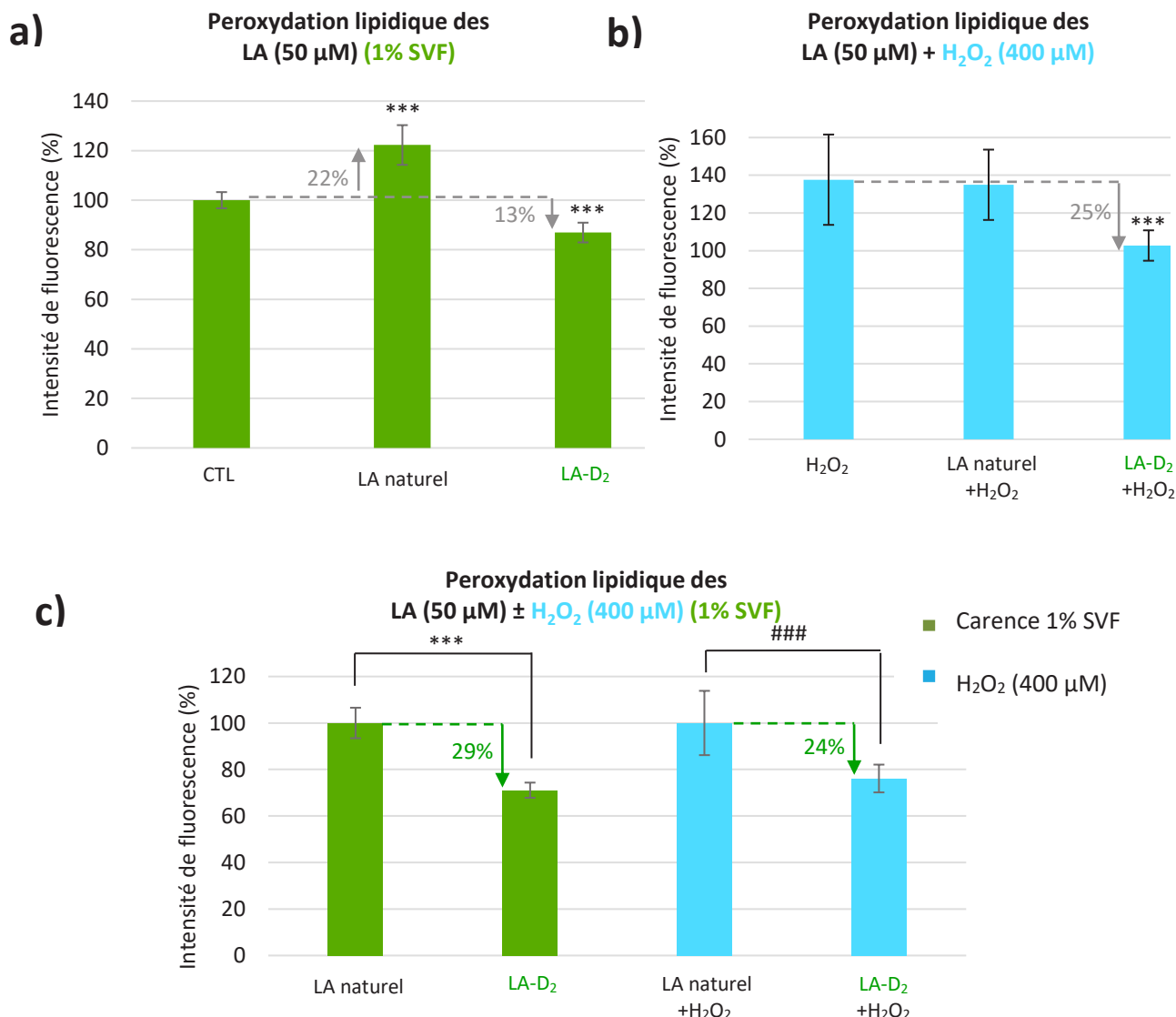


Figure 111 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± LA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de LA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence en SVF. b) Histogramme associé au stress H₂O₂. les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition CTL et exprimés en % d'intensité de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂ avec des résultats normalisés avec la condition LA naturel (fixée à 100%) ou LA naturel+H₂O₂ (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ###p<0,01 ; ###p<0,001.

En présence du stress induit par une carence à 1% de SVF (**Figure 111, a**), la comparaison de la condition contrôle avec le LA naturel et le LA-D₂ montre respectivement une augmentation

(22%) et une diminution (13%) de la peroxydation lipidique. Concernant le stress engendré par H₂O₂ (**Figure 111, b**), le LA-D₂ entraîne une diminution de ce mécanisme (25%) comparé à la condition contrôle. Finalement, la comparaison du LA naturel et du LA-D₂ (**Figure 111, c**) indique une limitation globale de la peroxydation lipidique de 29% et 24%, obtenus respectivement lors des deux conditions de stress associées à une carence à 1% de SVF et à un traitement en présence de H₂O₂.

IV.1.2. Comparaison des résultats obtenus pour les ALA et LA avec les DHA en présence du stress chimique H₂O₂ (400 µM) et/ou d'une carence à 1% de SVF

Le tableau récapitulatif suivant permet d'effectuer une comparaison entre les différentes séries d'AGPI pour mettre en évidence l'influence relative de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques dans chaque série (**Tableau 23**), sur la limitation de la peroxydation lipidique.

AGPI	Peroxydation lipidique (%)	
	Carence SVF (1% SVF)	H ₂ O ₂ (400 µM)
DHA naturel	100	100
DHA-D ₂	-15	-17
DHA-D ₄	-37	-39
ALA naturel	100	100
ALA-D ₄	-22	-22
LA naturel	100	100
LA-D ₂	-29	-24

Tableau 23 : tableau comparatif des séries d'AGPI (DHA, ALA et LA) sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Le DHA-D₂ entraîne une inhibition partielle (15%) de la peroxydation lipidique induite par le DHA naturel en condition de carence à 1% de SVF, mais inférieure aux diminutions obtenues pour l'ALA-D₄ (22%) et le LA-D₂ (29%). Cette inhibition du DHA-D₂ est toujours plus faible (le DHA-D₂ (17%), l'ALA-D₄ (22%) et le LA-D₂ (24%)) en présence d'un stress engendré par H₂O₂ à 400 µM. L'inhibition de la peroxydation lipidique la plus importante obtenue pour les trois séries

confondues correspond à une pré-incubation en présence du DHA-D₄ lié à une valeur de 37% ou 39%, contre 22% pour l'ALA-D₄ et 29% ou 24% pour le LA-D₂ pour des conditions de stress associées à une carence à 1% de SVF ou à un traitement avec H₂O₂ (400 μM) respectivement. Cette diminution plus importante pourrait s'expliquer par une susceptibilité plus prononcée du DHA face à l'oxydation, induisant plus facilement une peroxydation lipidique comparé à l'ALA et au LA. Cela peut également être lié à une efficacité plus importante du DHA-D₄ pour limiter ce phénomène. On peut également noter que les traitements par le DHA-D₄, l'ALA-D₄ et le LA-D₂ ont permis dans certaines conditions d'oxydation de diminuer le niveau basal de peroxydation lipidique (sans ajout d'AGPI) observé dans les ARPE-19.

IV.2. Évaluation des PG-ALA et PG-LA sur l'inhibition de la peroxydation lipidique et comparaison avec les PG-DHA

En vue d'une comparaison avec la série PG-DHA, une évaluation de la peroxydation lipidique, présente au sein des cellules et induite par les deux conditions de stress appliquées (carence à 1% de SVF et H₂O₂), a été réalisée pour les série PG-ALA et PG-LA.

IV.2.1. Évaluation de l'effet des PG-ALA et PG-LA naturels et deutérés (à 50 µM) en présence du stress chimique H₂O₂ (400 µM) et/ou d'une carence à 1% de SVF

Les conditions de stress appliquées en présence des PG-ALA (**Figure 112** et **Figure 113**) et PG-LA (**Figure 114** et **Figure 115**) sont également induites, comme dans le paragraphe précédent, par une carence à 1% de SVF et à un traitement avec H₂O₂ (400 µM).

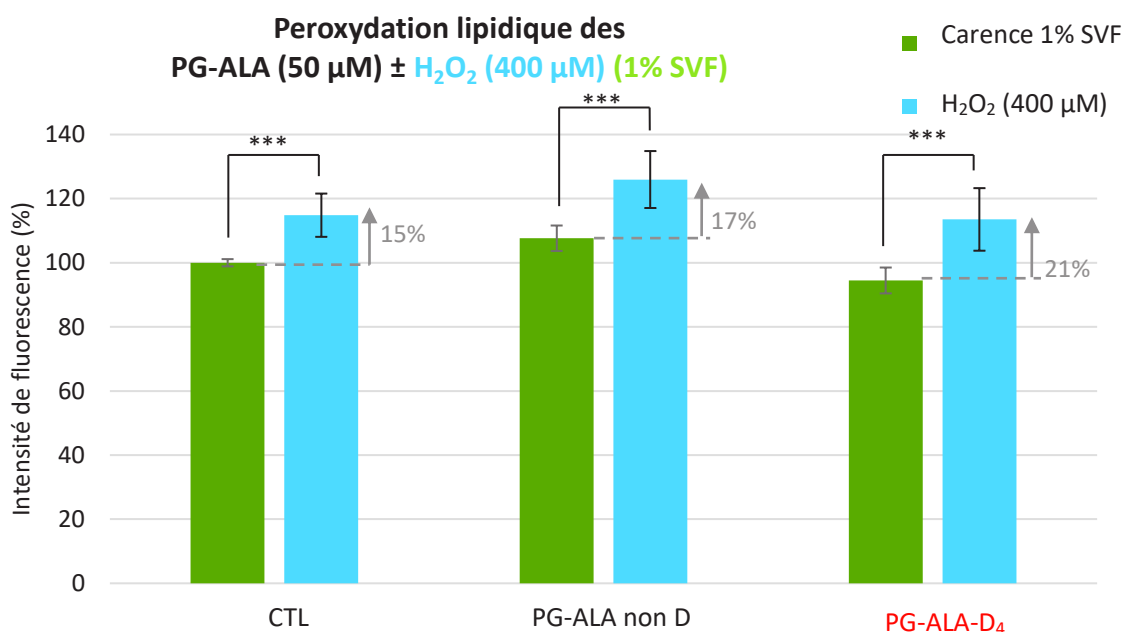


Figure 112 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± PG-ALA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de PG-ALA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le t-test permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Une augmentation de la peroxydation lipidique (20%) est obtenue pour les deux PG-ALA lorsque les cellules sont stressées en présence de H₂O₂. Cet histogramme a également été divisé en deux sous histogrammes (**Figure 113, a et b**) pour comparer les deux conditions de stress séparément.

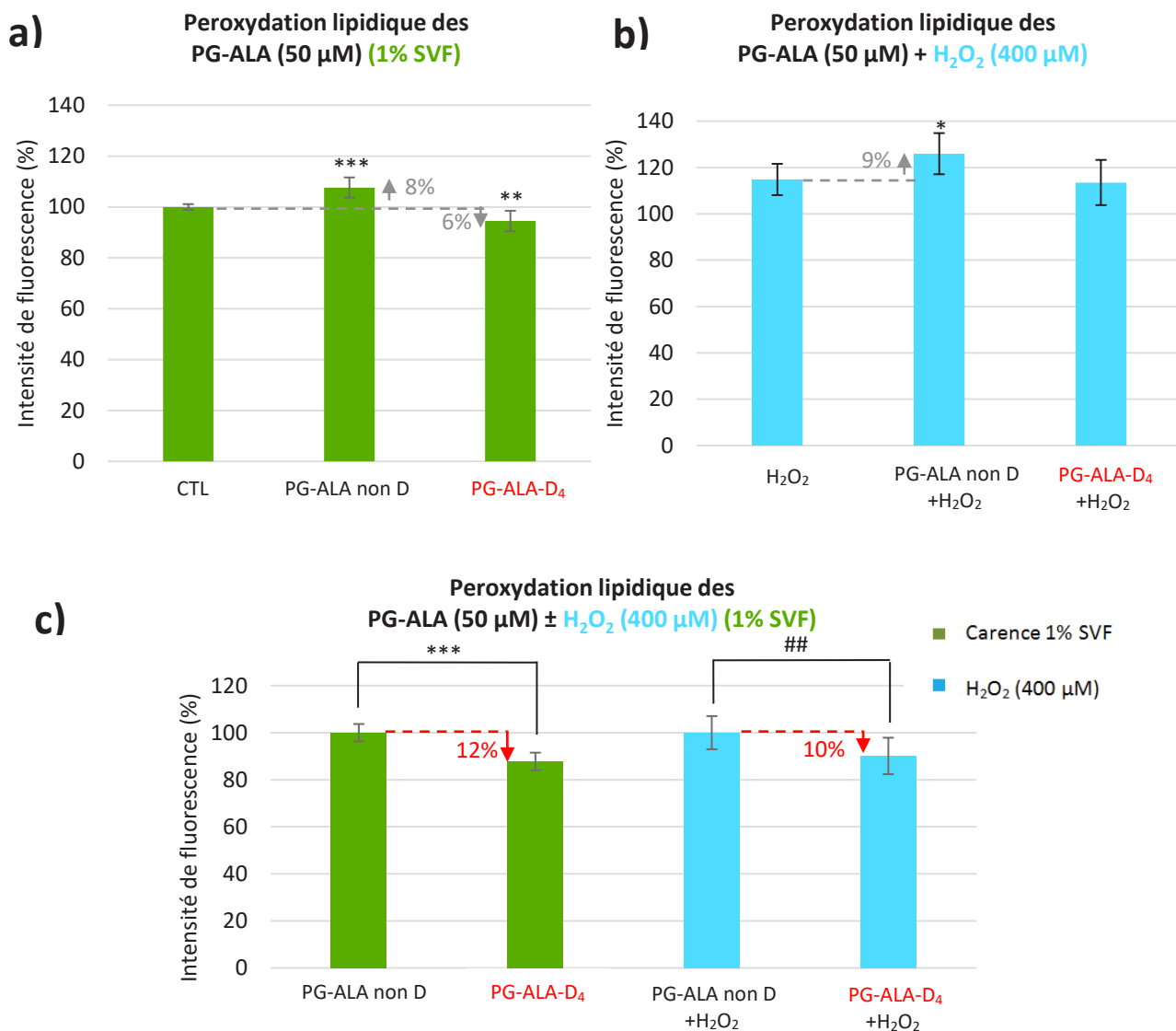


Figure 113 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± PG-ALA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de PG-ALA (50 μM) puis incubation de H₂O₂ (400 μM) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence en SVF. b) Histogramme associé au stress H₂O₂. les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition CTL et exprimés en % d'intensité de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂ avec des résultats normalisés avec la condition PG-ALA non D (fixée à 100%) ou PG-ALA non D+H₂O₂ (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le t-test et le test de Mann Whitney permettent de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001.

En présence d'un milieu carencé en 1 % SVF et après traitement avec H₂O₂ (**Figure 113, a** et b) de très légères différences (inférieures à 10%) sont présentes entre les composés de la série PG-ALA et les conditions "contrôles". Le PG-ALA-D₄ protège les cellules (diminution de 12 et 10%) du faible effet que le PG-ALA non D a sur la production de la peroxydation lipidique (**Figure 113, c**).

Par la suite, les PG-LA ont également été étudié sur l'inhibition de peroxydation lipidique (**Figure 114** et **Figure 115**) engendrée par un milieu carencé en 1% SVF, en l'absence ou en présence de H₂O₂ (400 µM).

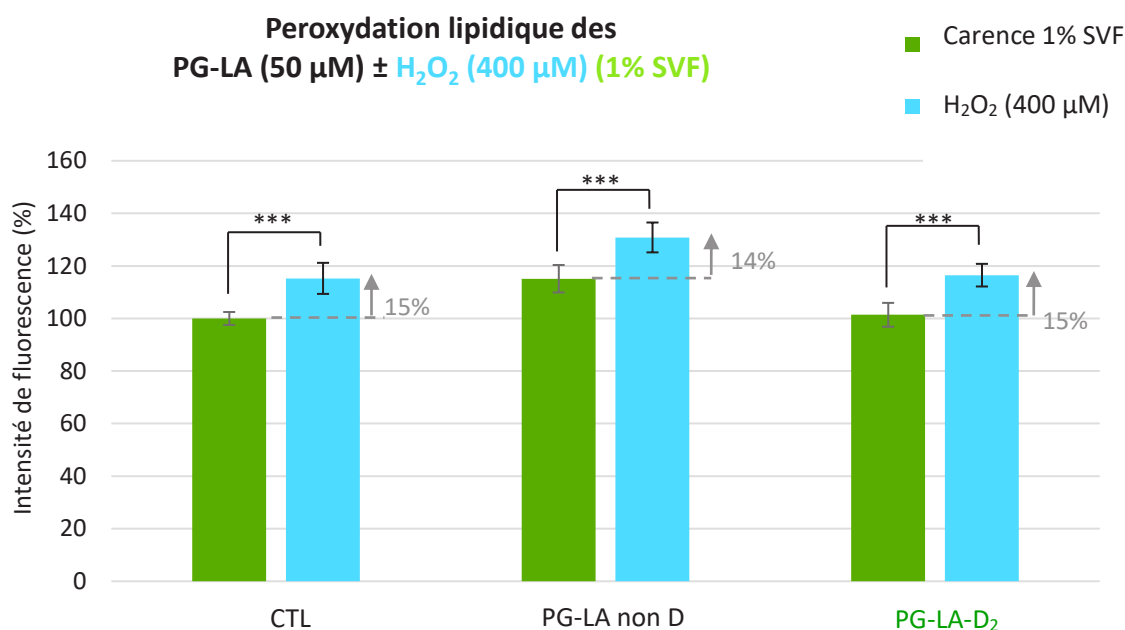


Figure 114 : Évaluation de la peroxydation lipidique ± PG-LA ± H₂O₂ : incubation des cellules en présence de PG-LA (50 µM) puis incubation de H₂O₂ (400 µM) dans un milieu carencé en 1% SVF. Histogramme rassemblant les résultats pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂. Les résultats sont obtenus par cytométrie de flux (FACS), normalisés par rapport à la condition "CTL carence 1% SVF" (fixée à 100%) et exprimés en % d'intensités de fluorescence associées à la forme oxydée de la sonde C11-BODIPY^{581/591}. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart type ; le test de Mann Whitney permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Globalement une augmentation, associée à une valeur d'environ 15%, est obtenue lorsque les cellules, prétraitées avec les PG-LA, sont incubées en présence de H₂O₂. Les deux sous histogrammes correspondant aux deux types de stress appliqués au cours de cette expérience sont présents sur la **Figure 115 (a et b)**.

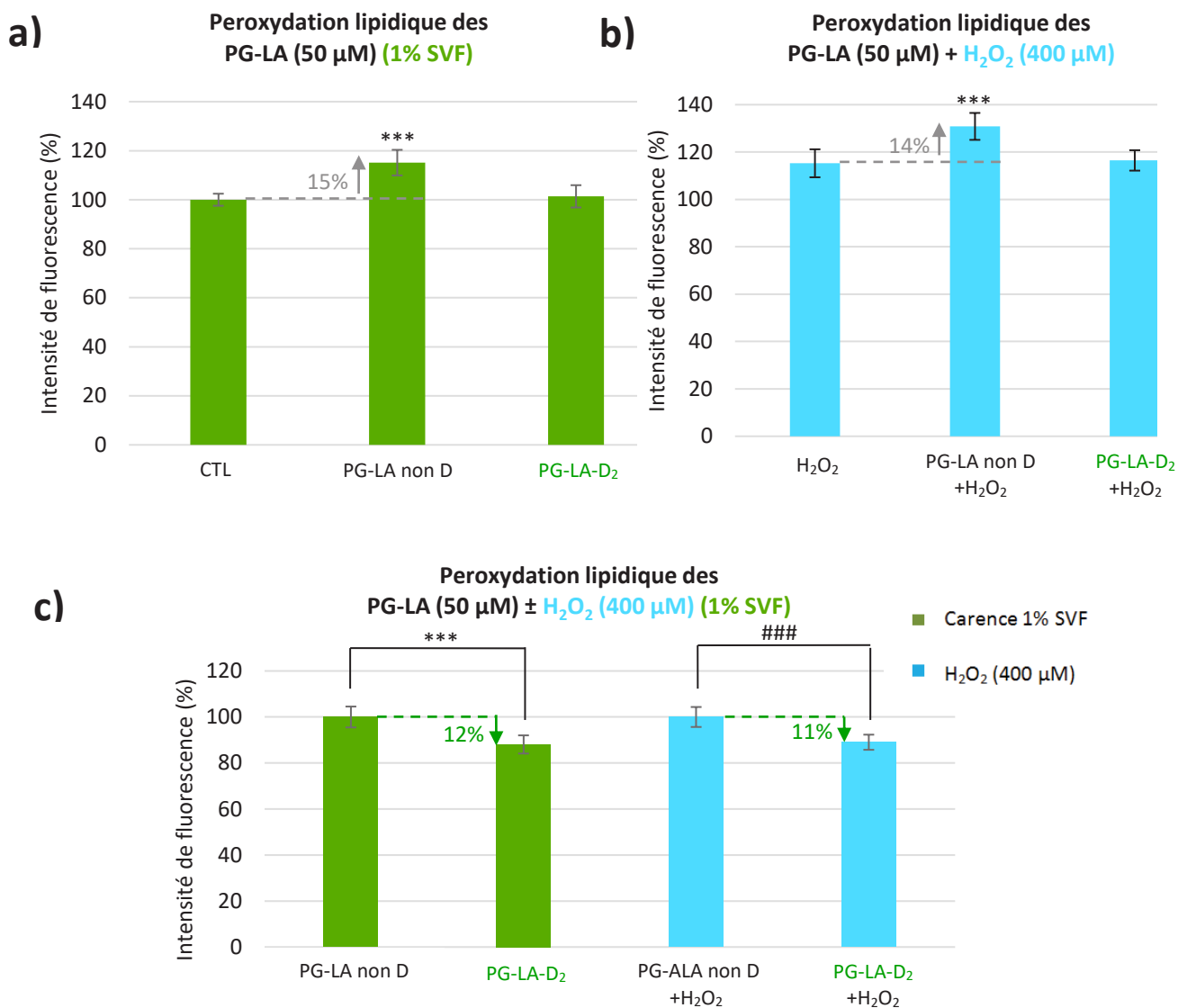


Figure 115 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm PG-LA \pm H₂O₂ : incubation des cellules en présence de PG-LA (50 μ M) puis incubation de H₂O₂ (400 μ M) dans un milieu carencé en 1% SVF. a) Histogramme associé à la carence en SVF. b) Histogramme associé au stress H₂O₂. Les résultats précédents sont normalisés par rapport à la condition CTL et exprimés en % d'intensité de fluorescence. c) Histogramme pour la carence à 1% de SVF et H₂O₂ avec des résultats normalisés avec la condition PG-LA non D (fixée à 100%) ou PG-LA non D + H₂O₂ (fixée à 100%). Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart type ; le test de Mann Whitney permet de déterminer les valeurs- p : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001.

Lors de l'application des deux types de stress (**Figure 115, a et b**), carence à 1% de SVF en présence ou en l'absence de H₂O₂), seul le PG-LA non D entraîne des augmentations de la peroxydation lipidique (15 et 14%) comparées aux conditions "contrôles". La comparaison du PG-LA non D et PG-LA-D₂ montre une inhibition d'environ 12% du stress en faveur du PG-LA-D₂ et

permet, tout comme le PG-ALA-D₄, de retrouver le niveau basal de peroxydation lipidique obtenue sans traitement par le lipophérol.

IV.2.2. Comparaison des résultats obtenus pour les PG-ALA et les PG-LA avec les PG-DHA en présence du stresser chimique H₂O₂ (400 µM) SVF et/ou d'une carence à 1% de

Le tableau récapitulatif suivant permet de comparer l'effet des lipophénols deutérés correspondant à chaque série sur l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par les composés non deutérés (**Tableau 24**).

Lipophénols	Peroxydation lipidique (%)	
	Carence SVF (1% SVF)	H ₂ O ₂ (400 µM)
PG-DHA non D	100	100
PG-DHA-D ₂	-5	/
PG-DHA-D ₄	-15	-8
PG-ALA non D	100	100
PG-ALA-D ₄	-12	-10
PG-LA non D	100	100
PG-LA-D ₂	-12	-11

Tableau 24 : Tableau comparatif des séries de lipophénols (DHA, ALA et LA) sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Des diminutions du même ordre de grandeur sont obtenues pour les lipophénols deutérés dans les conditions de stress correspondant à un milieu carencé en 1% SVF ou en présence de H₂O₂, à l'exception du PG-DHA-D₂ qui limite de manière moins importante ce mécanisme induit par la présence du PG-DHA non D. Le PG-DHA-D₄ permet de limiter la peroxydation lipidique induite par son analogue non deutéré, de façon similaire aux autres séries de lipophérol malgré la présence de trois autres positions *bis*-allyliques oxydables (non deutérées). En comparaison avec les AGPI libres, les lipophénols ne permettent pas de diminuer la peroxydation lipidique basale.

Chapitre III. Effet des deutériums sur la protection contre le rétinol tout-*trans*

Les composés PG-DHA deutérés ont été par la suite évalués au cours du test de cytoprotection contre le rétinol tout-*trans*. Ce test a initialement permis de mettre en évidence le composé lead, le PG-DHA non deutéré et constitue le test de criblage du projet. L'objectif est de comparer cette activité (anti-stress carbonylé) au sein de la série PG-DHA afin de vérifier si l'incorporation des deutériums au niveau des positions *bis*-allyliques de la partie lipidique du lipophénol lead n'impact pas l'activité principale du lipophénol.

Les tests de protection des cellules contre le rétinol tout-*trans* (Figure 116) ont été effectués en suivant un protocole déjà établi précédemment par le laboratoire.⁴ Les cellules sont incubées dans du milieu sans sérum, tout d'abord 1 h avec le lipophénol suivi de l'incubation du *all-trans*-rétinol pendant 4 h. Les cellules sont finalement remises dans du milieu frais et la viabilité cellulaire est évaluée après 20 h.

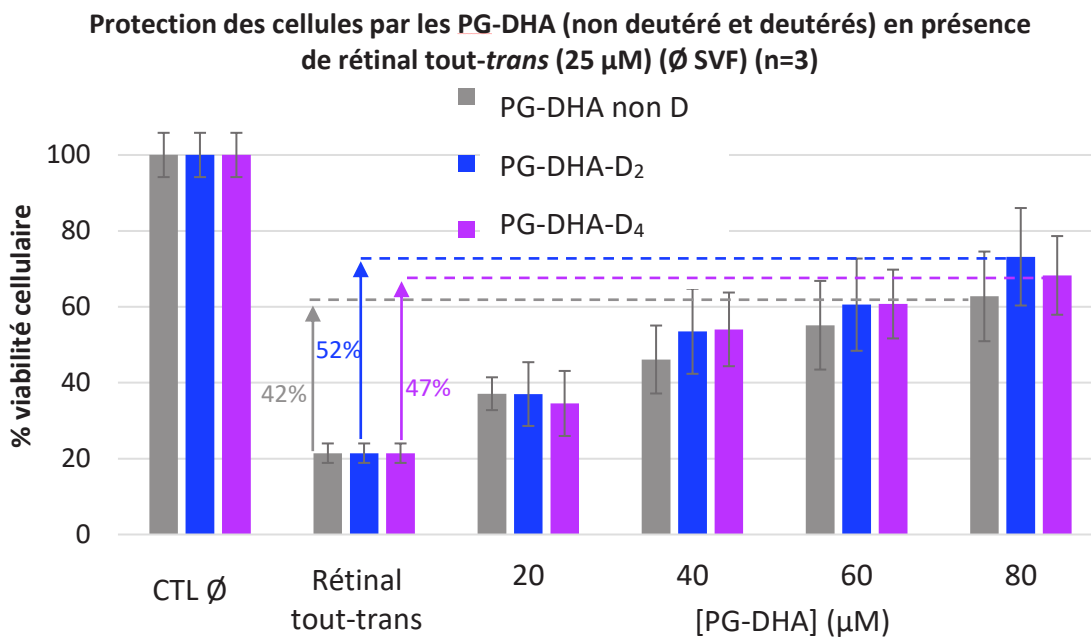
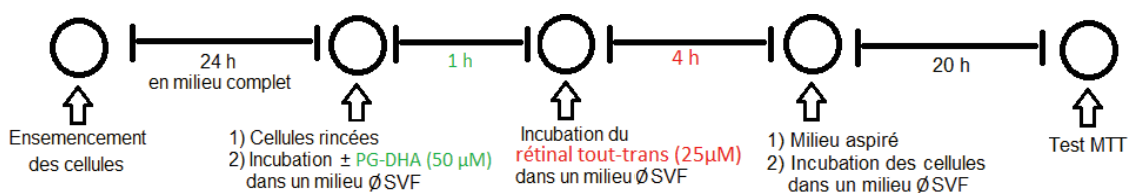


Figure 116 : Évaluation de l'activité protectrice des PG-DHA contre le rétinol tout-*trans* : incubation des cellules avec le PG-DHA à différentes concentrations dans un milieu sans SVF durant 1 h, suivi d'un stress au *trans*-rétinol 4 h puis 20 h d'incubation. Le test MTT est utilisé afin de quantifier la viabilité cellulaire. Les résultats sont normalisés et exprimés en % de viabilité cellulaire.

L'activité anti-stress carbonylé est conservée en présence de nos composés deutérés comparée au lipophénol lead. En effet, un gain de survie cellulaire de +50% est obtenu pour une incubation des PG-DHA non deutéré et deutérés, à une concentration de 80 μ M. Il n'y a donc pas d'effet des deutériums sur la protection de la molécule contre le rétinol tout-*trans* suggérant que le mécanisme de piégeage de ce dernier n'est pas altéré.

L'utilisation des lipophénols deutérés pourra donc permettre de conserver une activité anti-stress carbonylé tout en ayant la possibilité de limiter la peroxydation lipidique au sein des membranes cellulaires.

Conclusion : lien entre la toxicité et la peroxydation lipidique

Une comparaison des Cl_{50} obtenues lors des tests de toxicité et des pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique des composés obtenus dans les mêmes conditions de stress est possible grâce au **Tableau 25**.

AGPI	Cl_{50} (μM)		Peroxydation lipidique (%)	
	Carence SVF (1% SVF)	H_2O_2 (600 μM)	Carence SVF (1% SVF)	H_2O_2 (400 μM)
DHA naturel	65,21 \pm 1,03	65,47 \pm 1,87	100	100
DHA-D ₂	69,48 \pm 1,46	66,98 \pm 2,39	-15	-17
DHA-D ₄	75,60 \pm 1,05	76,24 \pm 2,26	-37	-39
ALA naturel	75,08 \pm 0,19	74,58 \pm 2,29	100	100
ALA-D ₄	75,77 \pm 0,44	75,38 \pm 2,04	-22	-22
LA naturel	96,56 \pm 2,81	90,83 \pm 8,68	100	100
LA-D ₂	100,05 \pm 5,48	89,67 \pm 4,58	-29	-24

Tableau 25 : Tableau comparatif des séries d'AGPI en toxicité (Cl_{50}) et sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

La présence des deutériums en positions *bis*-allyliques du DHA permet de diminuer la toxicité associée à un traitement par le DHA en condition oxydante (respectivement de 65,21 μM à 69,48 μM et 75,60 μM , pour le DHA naturel, le DHA-D₂ et le DHA-D₄ pour la carence à 1% de SVF). Cette protection est également visible et va dans le même sens lorsque l'on étudie l'effet des deutériums sur l'inhibition de la peroxydation lipidique. Les DHA di- et tétra-deutérés permettent de diminuer progressivement la peroxydation lipidique induite par le DHA (15% et 37% pour la condition de carence à 1% de SVF). Dans cet essai la toxicité et la peroxydation lipidique semble avoir un lien étroit et les résultats montrent l'intérêt de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques.

Aucune diminution des Cl_{50} n'est observée pour les analogues deutérés des série LA et ALA dans nos conditions. Pourtant une diminution de la peroxydation lipidique est observée pour ces

deux composés, suggérant que la toxicité de ces AGPI et la peroxydation lipidique qu'ils engendrent ne sont sûrement pas directement liées. La **Figure 117**, représentant la peroxydation lipidique induite pour chaque AGPI naturel suggère également cette information.

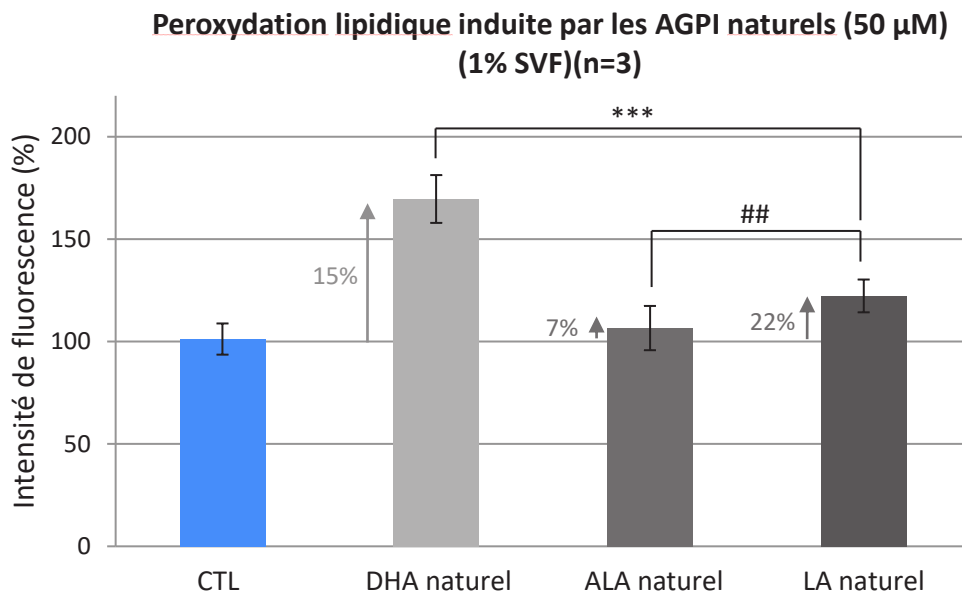


Figure 117 : Évaluation de la peroxydation lipidique \pm AGPI : incubation des cellules en présence de l'AGPI (50 μ M) dans un milieu carencé en 1% SVF. Tous les résultats sont obtenus grâce à quantification de la peroxydation lipidique avec le C11-BODIPY^{581/591}, permettant une analyse de l'intensité de fluorescence par cytométrie de flux (FACS). Ils sont normalisés par rapport à la condition CTL et exprimés en % d'intensité de fluorescence.

En effet, d'après les Cl_{50} du **Tableau 25**, Le DHA semble plus toxique que l'ALA, lui même plus toxique que le LA. Cependant, pour une même concentration non toxique de ces trois AGPI (50 μ M), le DHA entraîne plus de peroxydation lipidique que les deux autres acides gras. En revanche le LA naturel n'entraîne pas moins de peroxydation lipidique que l'ALA. Ce résultat accentue le fait que la peroxydation lipidique ne semble pas être directement liée à la toxicité des AGPI.

Le tableau comparatif suivant (**Tableau 26**) permet de comparer l'effet des deutériums sur la limitation de la peroxydation lipidique des séries d'AGPI et des lipophénols associés :

		Peroxydation lipidique			
		Carence SVF (1% SVF) (48 h)	H ₂ O ₂ (400 µM)	Carence SVF (1% SVF) (24 h)	Lumière blanche (5 000 lux)
AGPI	DHA naturel	100%	100%	100%	100%
	DHA-D ₂	-15%	-17%	-41%	-28%
	DHA-D ₄	-37%	-39%	-37%	-19%
	ALA naturel	100%	100%	-	-
	ALA-D ₄	-22%	-22%	-	-
	LA naturel	100%	100%	-	-
	LA-D ₂	-29%	-24%	-	-
Lipophénols	PG-DHA non D	100%	100%	100%	100%
	PG-DHA-D ₂	-5%	/	/	+6
	PG-DHA-D ₄	-15%	-8%	-34%	-12%
	PG-ALA non D	100%	100%	-	-
	PG-ALA-D ₄	-12%	-10%	-	-
	PG-LA non D	100%	100%	-	-
	PG-LA-D ₂	-12%	-11%	-	-

Tableau 26 : Tableau comparatif des séries d'AGPI (DHA, ALA et LA) et lipophénols associés sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Finalement, l'effet bénéfique de l'incorporation des deutériums sur l'inhibition de la peroxydation lipidique est plus important après traitement par des AGPI deutérés comparés aux lipophénols deutérés. La toxicité induite par les AGPI mise en évidence suggère que les cellules sont plus sensibles à ces derniers, pouvant expliquer une influence plus importante de la modification apportée par l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques. Ce résultat est intéressant puisque, si la libération de l'acide gras deutéré à partir du lipophénol a lieu, celui-ci pourrait avoir un effet bénéfique sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Partie expérimentale

Generalities

Chemicals

Natural DHA, ALA and LA were purchased from Sigma-Aldrich (Germany), LA purchased from Acros Organics (Belgium) and deuterated DHA and lipophenols were synthesized in the laboratory. Deuterated ALA and LA were synthesized and kindly provided by Dr. Shchepinov. All PUFA and lipophenols were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to prepare a stock solution at 40 mM. Hydrogen peroxide solution (H₂O₂, 30 wt. % in H₂O), *tert*-Butyl hydroperoxide solution (*t*-BuOOH, 70 wt. % in H₂O), and *all-trans*-retinal were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was obtained from Sigma-Aldrich (USA). 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid (C11-BODIPY^{581/591}) was obtained from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) and dissolved in EtOH to prepare stock solution at 1 mM. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) was purchased from Abcam (Cambridge, UK) and dissolved in DMSO to prepare stock solution at 20 mM. All probes and compounds were stored at -20°C in the dark.

Cell culture

ARPE-19 cells were obtained from ATCC, and were grown following the instructions in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham F12 (GIBCO) containing 10% v/v fetal bovine serum (FBS) and 1% v/v penicillin/streptomycin under an humidified air (95%)/CO₂ (5%) atmosphere at 37 °C. For experimental cell seeding and subculturing the cells were digested with 0.25% trypsin-EDTA, resuspended in the culture medium and then placed into the incubator.

Cell treatment

Different percent of serum in the medium were used for the treatment of the cell during the optimization of the conditions. The different media used during the experiments were the following : medium without FBS (serum free medium), medium enriched with various concentration of FBS : 1% FBS (1% FBSM), 2.5% FBS (2.5% FBSM) and 10% FBS (10% FBSM).

Statistical analyses

The data are presented as means \pm SD determined from at least three independent experiments. In each experiment, all conditions were done at least in triplicate. Statistical analysis was performed by *t*-test with normal distribution or Mann Whitney test with non normal distribution and differences with *p*-values <0.05 were considered as statistically significant. **p*-value <0.05 , ***p*-value <0.01 , ****p*-value <0.001 . #*p*-value <0.05 , ##*p*-value <0.01 , ###*p*-value <0.001 .

Chapter I : Influence of deuteriums on DHA toxicity : comparison between natural and deuterated DHA and other polyunsaturated fatty acids (PUFA) under oxidative stress condition in ARPE-cell line

Cell viability

Cell viability was determined by MTT colorimetric assay. Cells were incubated for 2 h with MTT reagent (0.5 mg/mL). During this incubation time, dehydrogenases of living cells reduced MTT to insoluble purple formazan, which was then dissolved in DMSO. The absorbance at 570 nm and 655 nm of individual wells was measured using a microplate reader (BioRad 550). The percentage of viable cells was calculated as $\frac{(OD_{570} \text{ sample} - OD_{655} \text{ sample})}{(OD_{570} \text{ control} - OD_{655} \text{ control})} \times 100$.

I. Conditions optimization for PUFA toxicity under oxidative stress on ARPE-19 cell line

I.1. Influence of serum starvation

I.1.1. Influence of serum starvation on oxidative stress state (without PUFA treatment)

ROS production (cytometry analysis)

Reactive oxygen species (ROS) were measured in ARPE-19 cells with the probe DCFDA. The cell permeant reagent DCFDA is deacetylated by cellular esterases to dichlorofluorescein (DCFH), which can be oxidized by ROS into the fluorophore 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). ARPE-19 cells

were plated into 2 cm² wells (2×10⁵ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before drug treatment. The cell cultures were incubated with 2 μM of DCFDA for 40 min in serum free medium. The cells were rinsed and incubated in different media without phenol red (serum free, 1% FBSM, 2.5% FBSM or 10% FBSM) for 4 h followed by the FCM analysis.

Determination of lipid peroxidation in cells with different medium (serum free, % FBSM, 2.5% FBSM or 10% FBSM) with C11-BODIPY^{581/591}

ARPE-19 cells were plated into 2 cm² wells (2×10⁵ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before drug treatment. The cell cultures were incubated with 5 μM of C11-BODIPY^{581/591} for 30 min in serum free medium without phenol red. The cells were rinsed and incubated in the different media without phenol red (serum free, 1% FBSM, 2.5% FBSM or 10% FBSM) for 24 h followed by the FCM analysis.

I.1.2. PUFA toxicity under serum free medium condition

Toxicity of polyunsaturated fatty acid

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10⁴ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before PUFA treatment. The cell cultures were treated in serum free medium containing DHA (0-80 μM) or ALA (0-160 μM) or LA (0-160 μM) for 24 h. Control cells were incubated with DMSO (0.2%). The viability of the cells was determined using a MTT colorimetric assay.

I.1.3. PUFA toxicity under 2.5% FBSM condition

Toxicity of polyunsaturated fatty acid

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10⁴ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before PUFA treatment. The cell cultures were treated in 2.5% FBSM containing DHA (0-110 μM) or ALA (0-110 μM) or LA (0-140 μM) for 24 h. Control cells were incubated with DMSO (0.2%). The viability of the cells was determined using a MTT colorimetric assay.

Toxicity of H₂O₂

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10^4 cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before H₂O₂ treatment. The cell cultures were treated in medium with 2.5% FBSM containing H₂O₂ at different concentrations (0-1000 μ m). The viability of the cells was determined in triplicate samples 4 h later, using a MTT colorimetric assay.

ROS production (fluorometry analysis)

ARPE-19 cells were put into black well, clear bottom 96-wells ViewPlates (Perkin Elmer, USA) at 3×10^4 cells/well and cultured for 24 h to reach confluence before oxidative stress. The medium was removed and the cells were washed serum free medium without phenol red and incubated for 45 min at 37°C in the same medium containing 2 μ M of DCFDA. The cells were then washed and treated with 2.5% FBSM without phenol red containing H₂O₂ at different concentrations (0–1000 μ m) for 4 h. DCF production was measured with a fluorescence spectrometer (CLARIOstar, BMG LABTECH's) with excitation and emission wavelengths at 485 nm and 535 nm, respectively.

1.2. Choice of chemical stressor under 1% FBSM condition

Toxicity of H₂O₂, CuSO₄ and tBuOOH

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10^4 cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before H₂O₂ treatment. The cell cultures were treated in medium with 1% FBS (1% FBSM) containing H₂O₂ (0-1000 μ m) or CuSO₄ (0-80 μ M) or tBuOOH (0-1000 μ m). The viability of the cells was determined in triplicate samples 4 h later, using a MTT colorimetric assay.

ROS production (fluorometry analysis)

ARPE-19 cells were put into black well, clear bottom 96-wells ViewPlates (Perkin Elmer, USA) at 3×10^4 cells/well and cultured for 24 h to reach confluence before oxidative stress. The medium was removed and the cells were washed with serum free medium without phenol red and incubated for 45 min at 37°C in the same medium containing 2 μ M of DCFDA. The cells were then washed and treated with a 1% FBSM without phenol red containing H₂O₂ at different concentrations (0–700 μ m) for 4 h. DCF production was measured with a fluorescence

spectrometer (CLARIOstar, BMG LABTECH's) with excitation and emission wavelengths at 485 nm and 535 nm, respectively.

Toxicity of DHA in presence of H₂O₂ (400 μM)

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10⁴cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before PUFA treatment. The cell cultures were treated in 1% FBSM containing DHA (0-80 μM) for 24 h. Control cells were incubated with DMSO (0.2%). The cell cultures were then treated with H₂O₂ prepared in 1% FBSM to a final concentration of 400 μm. The viability of the cells was determined 4 h later, using a MTT colorimetric assay.

II. Influence of deuteriums on PUFA (DHA, ALA and LA) toxicity under 1% FBSM condition in presence or absence of H₂O₂ at 600 μM

Toxicity of polyunsaturated fatty acid with or without H₂O₂

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10⁴ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before PUFA treatment. The cell cultures were treated in 1% FBSM containing DHA (0-80 μM) or ALA (0-90 μM) or LA (0-120 μM) for 24 h. Control cells were incubated with DMSO (0.2%). For the assays with an additional oxidative stress, the cell cultures were treated with H₂O₂ prepared in 1% FBSM to a final concentration of 600 μm. The viability of the cells was determined in triplicate samples 4 h later, using a MTT colorimetric assay. The IC₅₀ were calculated with GraphPad Prism® thanks to toxicity curves which were plotted using a sigmoidal dose-response curve corresponding to a nonlinear four parameter regression analysis with variable slope (Prism GraphPad 5.03 software, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Chapter II : Influence of deuteriums on lipid peroxidation inhibition in ARPE-19 cell line

Flow Cytometry Measurements

The flow cytometry were performed with the BD Accuri C6 Flow Cytometer and BD Accuri C6 Software for data acquisition (BD Biosciences). This flow cytometer is equipped with an

excitation's laser at 488 nm, and a fluorescence detector FL1 533/30 nm. Data were collected to 10 000 events for each samples using a flow rate of 35 μ L/min. Multi-parameter information are obtained for the data analysis : cell size from the forward scatter (FSC), granularity from the side scatter (SSC) and the green fluorescence of the stained cells with C11-BODIPY^{581/591}.

FCM Data Analysis

First the SSC-A versus FSC-A dot-plot was used to gate the cellular population and removed the cellular debris. Then the SSC-A versus SSC-H dot-plot was used to removed cell doublets in the previous gate to give a final gate. The cellular population in the last gate designed was plotted on count versus log green fluorescence to give the fluorescence mean intensity of FL1. The mean FL1 values were normalized thanks to the condition corresponding to the cells only stained with C11-BODIPY^{581/591}.

General procedure used before any treatment

ARPE-19 cells were plated into 2 cm² wells (2 \times 10⁵ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence. The cells were always rinsed with the corresponding described medium before treatment. For all the experiments, the Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham F12 without phenol red was used.

II. Conditions optimization to evaluate lipid peroxidation using C11-BODIPY^{581/591} probe in ARPE-19 cell line

II.1. Choice of the time of probe incubation

The cell cultures were rinsed with serum free medium before the incubation of C11-BODIPY^{581/591} at different concentrations (5 and 10 μ M) for 30 min or 1 h followed by the FCM analysis.

II.2. Study and choice of serum starvation

The cell cultures were treated with the corresponding medium (serum free, 1% FBSM, 2.5% FBSM or 10% FBSM) containing natural DHA at 50 μM for 24 h and then rinsed with the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min in the corresponding medium (serum free, 1% FBSM, 2.5% FBSM or 10% FBSM). The cells were rinsed and incubated in the corresponding medium (serum free, 1% FBSM, 2.5% FBSM or 10% FBSM) during 24 h followed by the FCM analysis.

II.3. Choice of the C11- BODIPY^{581/591} concentration in 1% FBSM

The cell cultures were rinsed with 1% FBSM before the incubation of C11-BODIPY^{581/591} at different concentrations (1, 2 and 5 μM) for 30 min. The cells were rinsed and incubated in 1% FBSM during 24 h followed by the FCM analysis.

II.4. Stress time determination (serum starvation with 1% FBSM and H₂O₂)

The cell cultures were treated with 1% FBSM containing natural DHA at 50 μM for 24 h and then rinsed with media before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The cells were rinsed and treated with 1% FBSM containing 400 μM of H₂O₂ during 4 h. The cells were rinsed and incubated in 1% FBSM during 1 h or 24 h followed by the FCM analysis.

II.5. Optimization of photobleaching stress experiments

II.5.1. Order of probe incubation and photobleaching stress

The cell cultures were rinsed with serum free medium and exposed to a white LED lamp with different intensities (2 000 or 20 000 lux) at room temperature during 1 h. Then, the cells were incubated with C11-BODIPY^{581/591} at 5 μM for 30 min followed by the FCM analysis.

II.5.2. photobleaching stress : time and different lights (white and blue)

The cell cultures were treated with 1% FBSM containing DHA at 50 μM for 24 h and then rinsed with 1% FBSM before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The cells were rinsed and exposed to a white or blue LED lamp with respective intensity 5 000 lux or 20 000 lux at room temperature during 1 h and then incubated during 24 h or 1 h (optimized condition) followed by the FCM analysis.

II.5.3. Choice of the white light intensity

The cell cultures were treated with 1% FBSM containing DHA at 50 μM for 24 h and then rinsed with 1% FBSM before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The cells were rinsed and exposed to a white LED lamp with different intensities (5 000, 10 000 or 20 000 lux) at room temperature during 1 h followed by the FCM analysis.

II.6. Influence of DHA on probe incorporation

A part of the cells were treated with 1% FBSM containing DHA at 50 μM for 24 h, and then rinsed with media before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The other part of the cells were incubated with 1% FBSM containing 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min, then rinsed and treated with 1% FBSM containing DHA at 50 μM for 24 h. All the cells were finally rinsed and incubated in 1% FBSM during 24 h followed by the FCM analysis.

II.7. Probe efficacy with conditions increasing (α -tocophérol) or decreasing (tBuOOH) lipid peroxidation

The cell cultures were treated with 1% FBSM containing α -tocopherol at 100 μM for 24 h and then rinsed with media before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The cells were rinsed and treated with 1% FBSM containing 400 μM of tBuOOH during 4 h. The cells were rinsed and incubated in 1% FBSM during 1 h or 24 h followed by the FCM analysis.

III. and IV. Influence of the deuteriums on lipid peroxidation inhibition : study of PUFA and lipophenols

General procedure for the entire compounds (PUFA and lipophenols)

The cell cultures were treated with 1% FBSM containing drugs (natural or deuterated PUFA or lipophenols) at 50 μM for 24 h and then rinsed with media before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The cells were rinsed and treated with the different stressors, corresponding to different protocols. For chemical stress the cell were incubated with 1% FBSM containing 400 μM of H₂O₂ during 24 h followed by the FCM analysis. For photobleaching stress, the cell were exposed to a white LED lamp with an intensity of 5 000 lux at room temperature during 1 h followed by the FCM analysis.

III.1.3. Comparison between natural and deuterated DHA at 60 μM (closed to the IC₅₀) in 1% FBSM

The cell cultures were treated with 1% FBSM containing natural or deuterated DHA at 60 μM for 24 h and then rinsed with media before the incubation of 5 μM C11-BODIPY^{581/591} for 30 min. The cells were rinsed and incubated with 1% FBSM during 24 h followed by the FCM analysis.

Chapitre III : Influence of deuteriums on protection against all-*trans*-retinal

General procedure for the protection of lipophenols against the *all-trans* retinal

ARPE-19 cells were plated into 96-well plates (3×10⁴ cells/well) and cultured for 24 h to reach confluence before lipophenols treatment. The cell cultures were treated with serum free medium containing lipophenols at different concentrations (0–80 μM) for 1 h. Then all-*trans*-retinal was added to a final concentration of 25 μM for 4 h, before rinsing with medium. The cell viability was determined 16–20 h later in triplicate samples, using a MTT colorimetric assay. Control cells were incubated with DMSO (0.2%) and DMF (0.14 %).

Partie VI : Impact des deutériums en position *bis*-allylique sur l'oxydation enzymatique et radicalaire du DHA

Introduction

Aucune étude de stabilité du lipophénol n'a pour l'instant été effectuée en milieu cellulaire. Il est possible que la liaison ester entre le phloroglucinol-OiPr-OH et le DHA soit clivée par des estérases cellulaires, conduisant à la formation du DHA libre. En présence des lipophénols deutérés, ce clivage conduira à la libération des DHA deutérés pouvant potentiellement être oxydés par voie enzymatique ou radicalaire. Il est rapporté que l'oxydation enzymatique du DHA naturel conduit à la formation de métabolites possédant des activités biologiques avérées ou potentielles permettant une protection cellulaire. L'oxydation radicalaire, quant à elle, peut conduire à la formation d'ECR suite à l'abstraction d'hydrogène en positions *bis*-allyliques, engendrant ainsi des ALE et des dérivés CEP avec comme conséquences une perte d'intégrité cellulaire. Cette oxydation peut être quantifiée *via* des biomarqueurs spécifiques de la peroxydation lipidique des AGPI.

L'évaluation des oxydations enzymatique et radicalaire des DHA deutérés préalablement synthétisés (partie IV) a donc été effectuée en vue d'une comparaison avec la formation des métabolites issu du DHA naturel. L'objectif est ainsi de mettre en évidence l'influence de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques sur ces deux types d'oxydation.

Chapitre I. Évaluation de l'oxydation enzymatique des DHA naturel et deutérés

I. Les métabolites issus de l'oxydation enzymatique du DHA naturel

I.1. Intérêt biologique de la NPD1 au sein de la rétine (rappel)

Comme mentionné dans la partie III, chapitre I, paragraphe III.1.2., la métabolisation enzymatique du DHA peut conduire à la formation du médiateur NPD1, présentant de nombreuses fonctions protectrices au sein des tissus rétinien : antioxydante, anti-inflammatoire et anti-apoptotiques (par l'activation ou l'inhibition de protéines respectivement anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques). Bazan *et al.* reportent que ce métabolite, issu de l'oxydation enzymatique du DHA, est important pour le maintien de l'homéostasie des photorécepteurs ⁶ (**Schéma 116**).

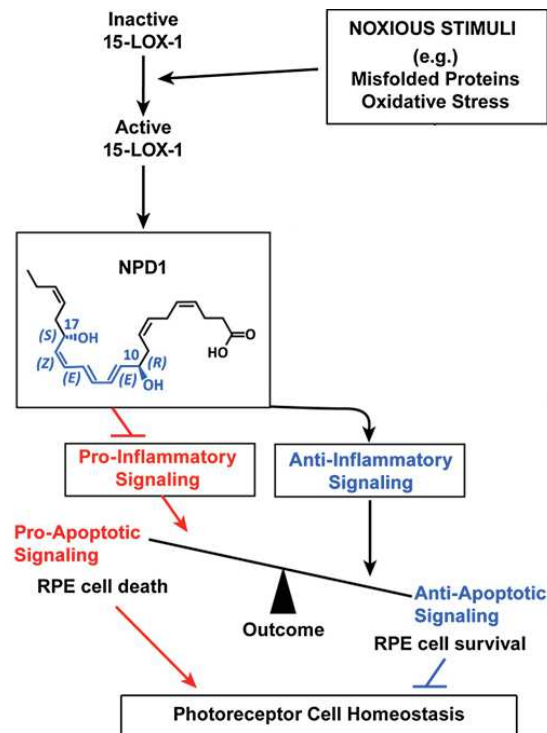


Schéma 116 : Action de la NPD1 sur l'homéostasie des photorécepteurs, synthétisée préalablement grâce à l'action de la 15-LOX au sein des cellules de l'EPR suite à un stimuli (protéines endommagées ou stress oxydant).⁶

Les différents avantages de la NPD1, illustre l'intérêt de conserver cette métabolisation enzymatique du DHA, et ce même en présence de deutériums. Ainsi, cette métabolisation a été évaluée à partir des DHA deutérés synthétisés.

I.2. Mécanisme de formation des protectines NPD1 et PDX

La NPD1 est biosynthétisée à partir du DHA (**Schéma 117**, flèches bleues) par la 15-LOX-1 *via* l'abstraction d'un hydrogène *bis*-allylique en position 15 formant l'hydroperoxyde 17(S)-HpDHA. Son époxydation enzymatique conduit à l'époxyde 16,17(S)-DHA, dont l'hydrolyse enzymatique permet d'accéder à la NPD1. Un autre métabolite, la protectine DX (PDX), peut être également formé (**Schéma 117**, flèches vertes) *via* l'action consécutive de deux réactions de type lipoxygénase, correspondant à une double dioxygénation, sur le DHA en position 15 puis en position 12.²⁴³

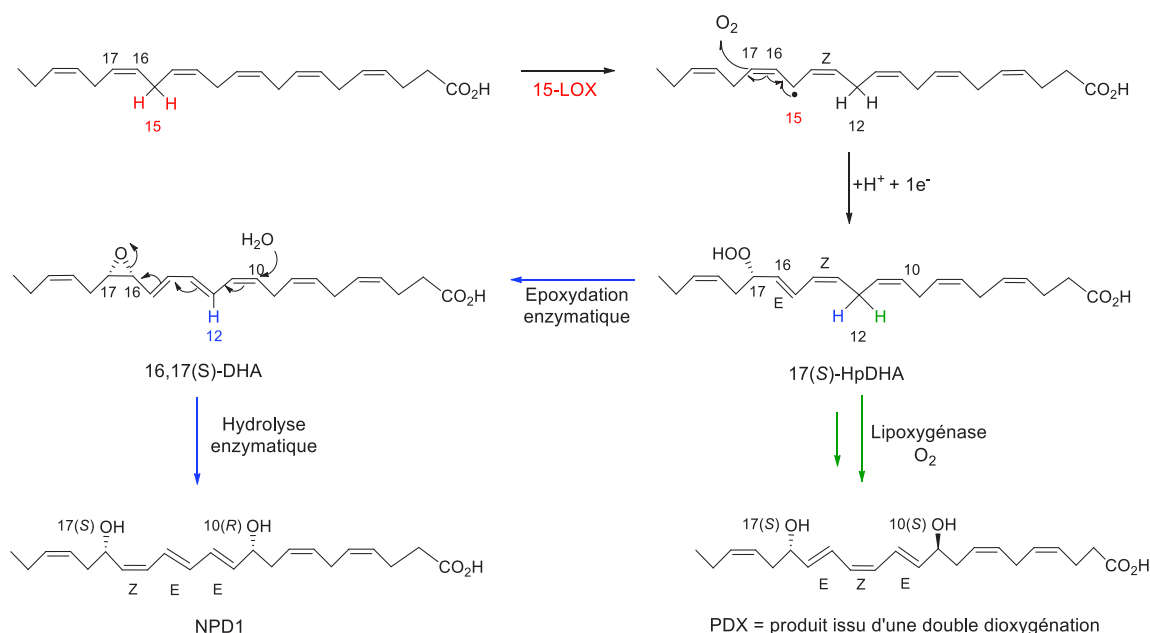


Schéma 117 : Oxydation enzymatique du DHA en NPD1 et PDX.²³⁹

La formation de la NPD1 et de la PDX fait intervenir un intermédiaire commun, l'hydroperoxyde 17(S)-HpDHA suite à l'abstraction d'un hydrogène en position 15, ainsi qu'une étape d'oxydation commune au niveau de la position 12 (**Schéma 117**). L'équipe du Pr. Michel Lagarde (INSA-Lyon) a mis au point une technique de quantification de la métabolisation enzymatique du DHA en PDX, permettant d'évaluer la capacité du DHA à être substrat d'une 15-lipoxygénase. L'oxydation enzymatique des DHA naturel et deutérés a été donc effectuée *via* une analyse de la formation de la PDX, suite à l'action d'une 15-lipoxygénase issue de la graine de soja, la sLOX (type 1-B), ayant une action similaire à la 15-LOX-1 retrouvée chez les êtres humains. Cette étude d'oxydation enzymatique a été menée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Michel Guichardant de l'INSA de Lyon.

II. Impact des deutériums en positions *bis*-allyliques sur l'oxydation enzymatique des DHA deutérés

L'oxydation enzymatique du DHA en métabolites NPD1 et PDX fait intervenir l'abstraction d'hydrogènes sur les positions *bis*-allyliques 15 puis 12. Les DHA deutérés préalablement synthétisés présentent des deutériums sur les positions *bis*-allyliques 6 et 6/9. Ainsi, la présence de deutériums sur ces positions ne devrait pas altérer l'oxydation enzymatique en métabolites protecteurs (PDX ou NPD1) (**Schéma 118**).

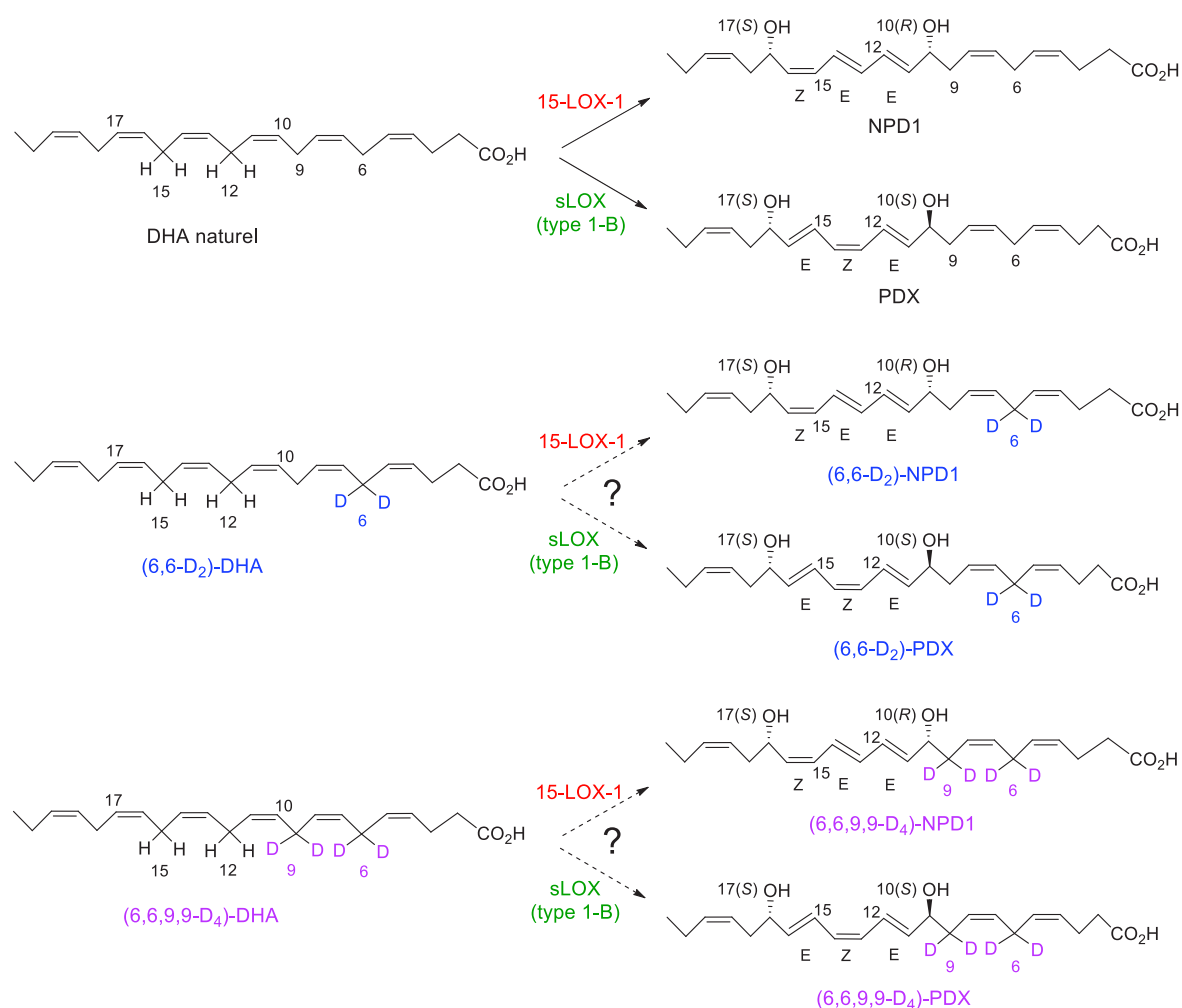


Schéma 118 : Oxydation enzymatique des DHA naturel et deutérés en NPD1 et PDX.

Le protocole mis en œuvre pour la formation des PDX est le suivant, basé sur les travaux de Chen *et al.* :²⁴⁴

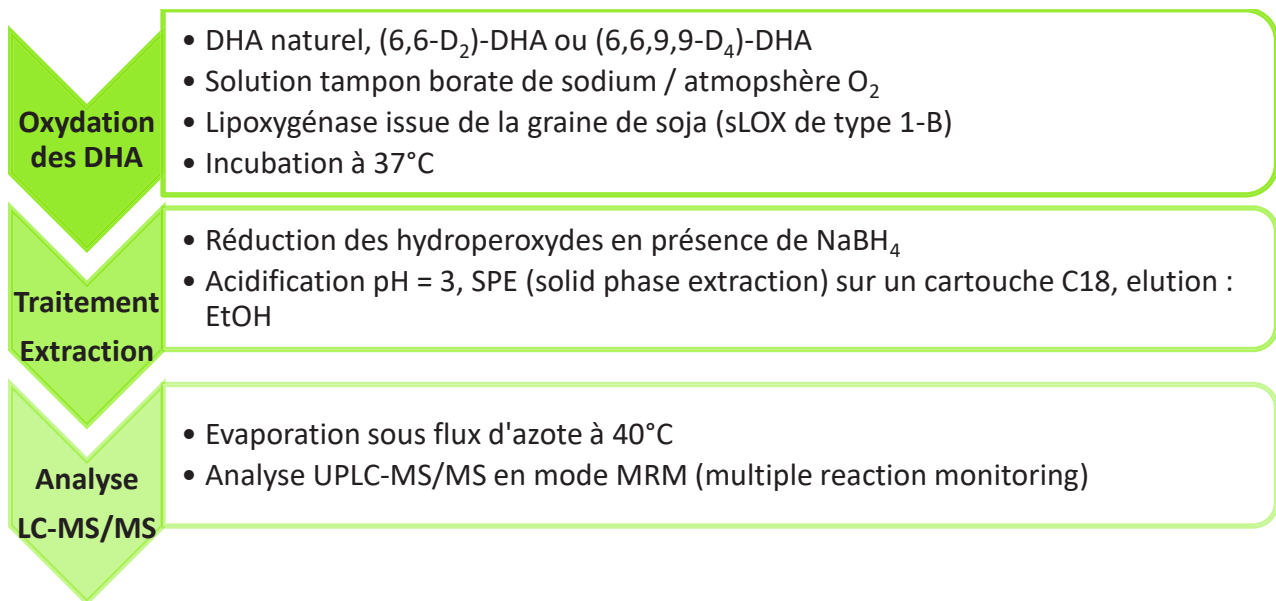


Schéma 119 : Protocole d'oxydation enzymatique du DHA en PDX, suivi des traitements et de l'analyse UPLC-MS/MS.²⁴⁴

L'analyse UPLC-MS/MS (**Figure 118**) permet de mettre en évidence de manière qualitative la formation des produits issus de l'oxydation enzymatique des DHA naturel et deutérés catalysée par la sLOX.

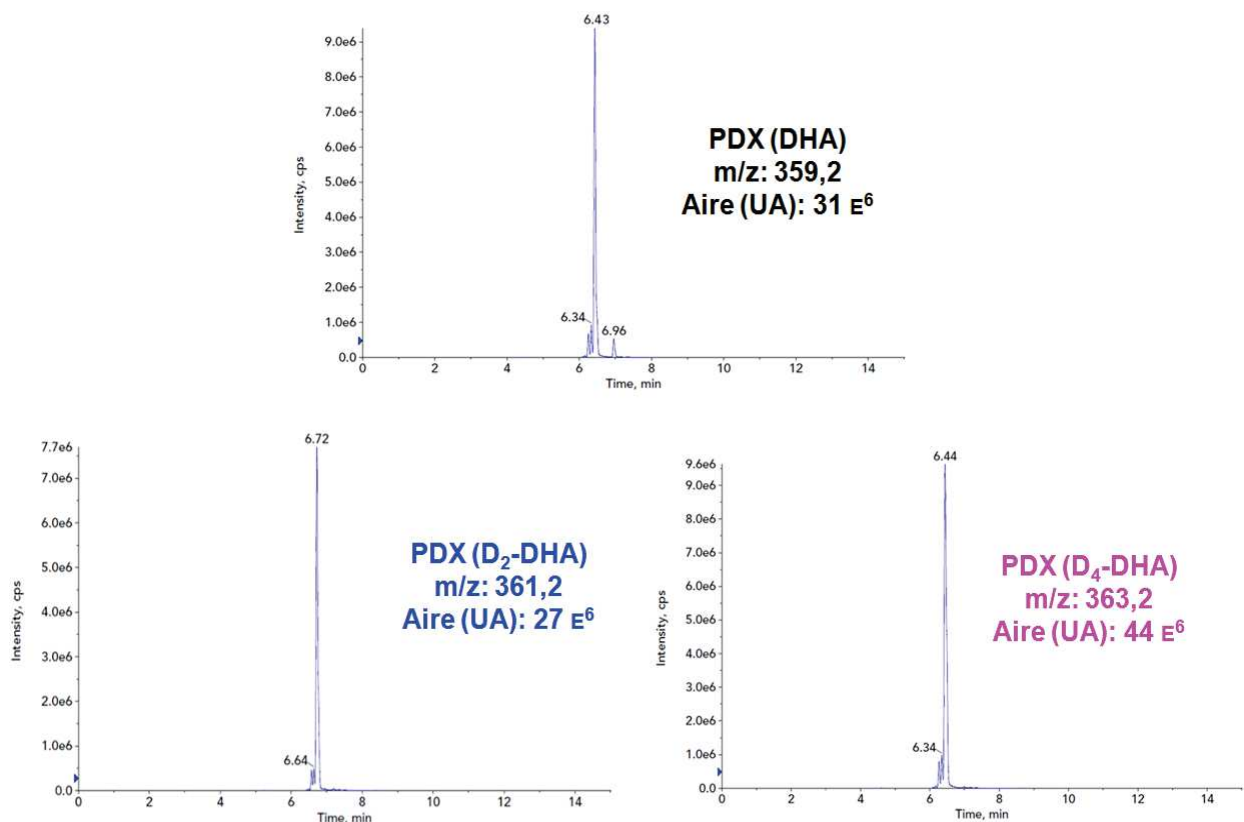


Figure 118 : Chromatogrammes correspondant au mélange issu de l'oxydation des DHA naturel ou deutérés, obtenu après une analyse par UPLC-MS/MS.

Les chromatogrammes obtenus montrent la formation des différents métabolites : la PDX, la (6,6-D₂)-PDX et la (6,6,9,9-D₄)-PDX issues respectivement de l'oxydation enzymatique du DHA naturel, du (6,6-D₂)-DHA (**22**) et du (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**). Ces résultats confirment que la présence des deutériums en positions 6 et 6/ 9 ne bloque pas l'oxydation enzymatique des DHA en PDX (**Schéma 120**). Ainsi, les DHA deutérés apportés au sein de la rétine, provenant du lipophénol deutéré suite à un éventuel clivage de la liaison ester, pourront être métabolisés par oxydation enzymatique en NPD1 protectrices (si la présence des deutériums n'affecte pas leur activité). Ce résultat renforce le choix préalable de synthétiser des DHA présentant ces deutériums sur les positions *bis*-allyliques 6 et 6/9. Ce résultat permet également d'accéder à un composé PDX tétra-deutééré qui pourrait être un outil analytique et biologique intéressant dans les études réalisées sur la quantification des neuroprotectines.

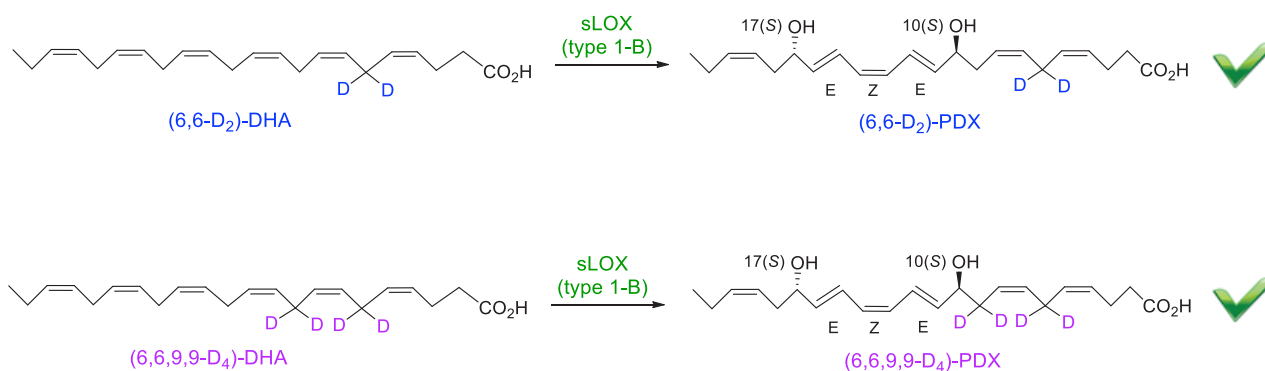


Schéma 120 : Oxydation enzymatique des DHA naturel et deutérés en NPD1 et PDX.

Chapitre II. Évaluation de l'oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés

I. Oxydation radicalaire du DHA : mécanisme de formation des NeuroPs et potentiel impact des deutériums en positions bis-allyliques 6 et 6/ 9

Différents types et séries de NeuroPs peuvent être formées en fonction du mécanisme d'oxydation radicalaire du DHA. Afin de mettre en évidence l'influence potentielle de l'incorporation des deutériums au niveau des positions *bis*-allyliques (6 ou 6 et 9) du DHA sur leur formation, une description du mécanisme conduisant à ces différentes séries est nécessaire. Nous aborderons dans ce chapitre uniquement les NeuroPs de type F₄, utilisées pour notre étude. Les séries 4, 7 et 11 sont ainsi prises comme exemple (**Schéma 121**) afin d'illustrer cette description. A noter que la nomenclature utilisée dans ce paragraphe pour nommer les différentes F₄-NeuroPs correspond à celle proposée par Taber *et al.*²⁴⁵ et reconnue par l'IUPAC (International union of pure and applied chemistry).

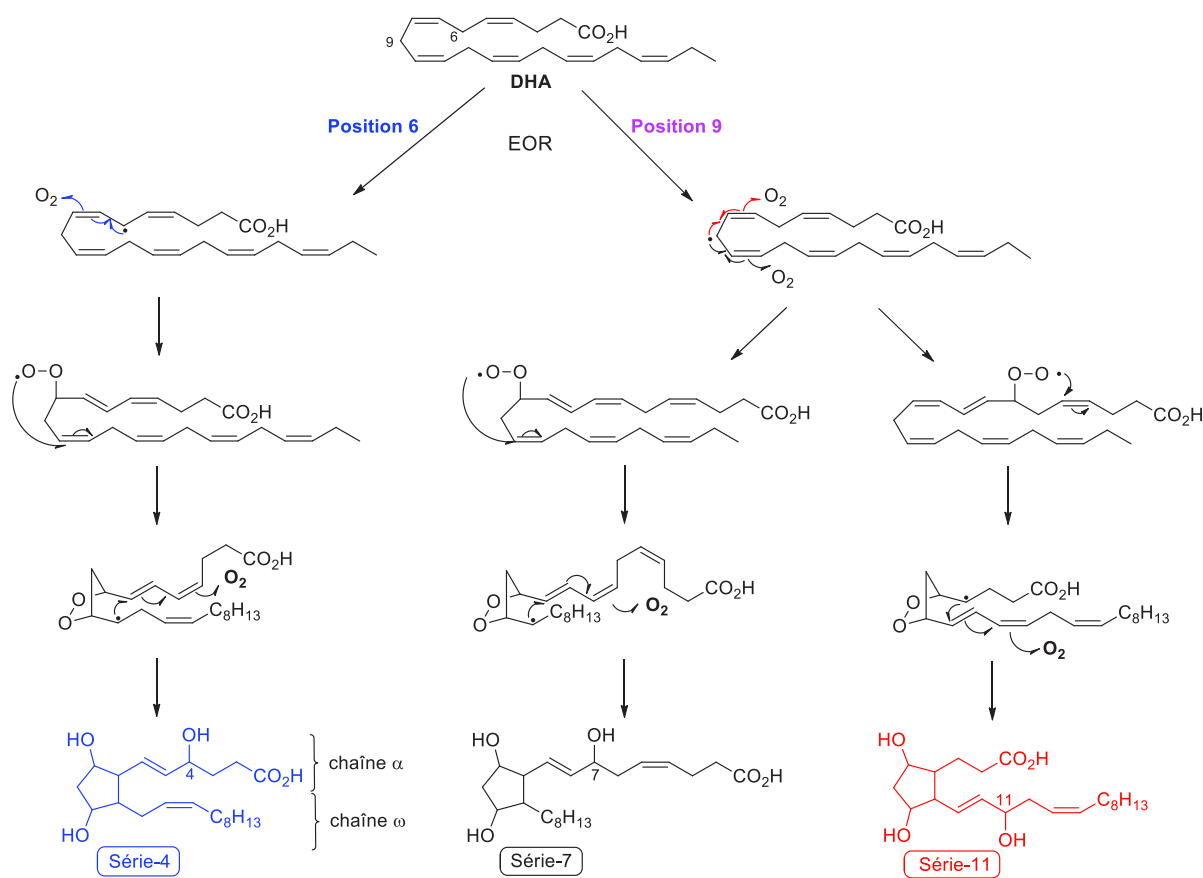


Schéma 121 : F₄-NeuroPs, séries 4 ou 7 et 11 formées après oxydation radicalaire du DHA correspondant à l'abstraction d'un hydrogène respectivement en positions 6 et 9.

La première étape de formation²³² des F₄-NeuroPs correspond à l'abstraction d'un hydrogène en position *bis*-allylique du DHA (**Schéma 121**), conduisant à un radical pentadiényle résonant. Celui-ci réagit immédiatement avec une molécule d'oxygène, formant un radical peroxyde. Une cyclisation de type 5-exo-trig a ensuite lieu, conduisant au cycle pentanique et à un hydroperoxyde après la capture d'une seconde molécule d'oxygène. Après réduction complète des deux groupements peroxydes, les neuroprostanes de type F sont formées, porteurs de 2 groupements hydroxyles sur le cycle à 5 centres et de 2 chaînes latérales α et ω . Le numéro de la série correspond à la position de l'hydroxyle sur une des chaînes latérales.

D'autres séries faisant intervenir un mécanisme du même type peuvent également être formées, mais présentent une première étape d'abstraction de l'hydrogène en position 12, 15 ou 18 (**Schéma 122**). Ainsi, suivant la position du radical pentadiényle formé (positions 6, 9, 12, 15 ou 18 du DHA) et le sens de capture de la seconde molécule d'oxygène, 8 séries de F₄-NeuroPs peuvent être obtenues, se différenciant par la position de l'alcool allylique sur la chaîne latérale. L'arrachement d'un hydrogène en position 6, 9, 12, 15 ou 18, conduira respectivement aux séries 4, 7 et 11, 10 et 14, 13 et 17, puis 20. Chaque NeuroP de type F possède 5 centres stéréogènes, ainsi le DHA peut conduire à 256 F₄-NeuroPs. Les séries potentiellement impactées par la présence des deutériums en positions 6 et 9 correspondent donc aux séries 4, 7 et 11 (**Schéma 122**), pour lesquelles la première étape d'abstraction d'un hydrogène s'effectue dans ces positions.

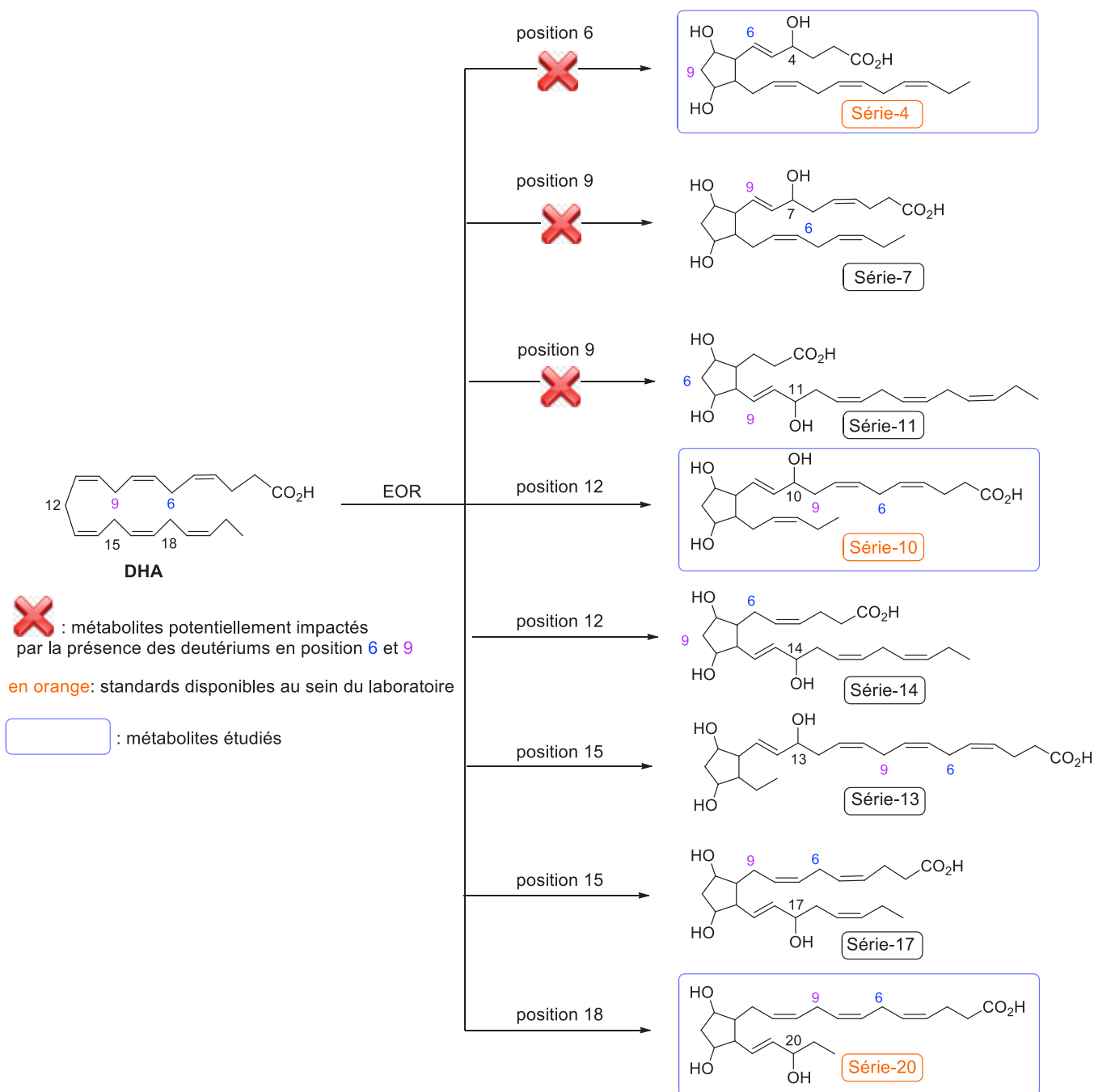


Schéma 122 : Les différentes séries de F₄-NeuroPs, formées après oxydation radicalaire du DHA.

Afin d'étudier l'impact des deutériums sur la formation des différents métabolites issus de l'oxydation radicalaire des DHA, il est nécessaire d'avoir en notre possession les standards externes de ces différentes F₄-NeuroPs afin de pouvoir les quantifier rigoureusement. Ainsi, seule l'étude de la formation de la 4-F_{4t}-NeuroP (synthétisée au laboratoire)²⁴⁶ pourra être effectuée

n'ayant pas à disposition les séries 7 et 11. Bien que la formation des composés appartenant aux séries 10 et 20 ne soit pas impactée directement par l'abstraction en 6 et 9, elle sera toutefois évaluée suite à l'oxydation des DHA naturel et deutérés, afin de mettre en évidence l'influence potentielle de la présence des deutériums sur les autres séries. A noter que les composés des séries 4 et 20 sont celles principalement quantifiés *in vivo* dans la littérature.^{233b}

II. Comparaison de la formation des F₄-NeuroPs des séries 4, 10 et 20 après oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés

II.1. Principe du dosage des NeuroPs par micro-LC-MS/MS

Les F₄-NeuroPs ont été analysées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (MS/MS). Le système utilisé est un micro-LC-QTRAP (**Figure 119**) de la société AB SCIEX. La source d'ionisation est un électrospray (ESI) et les mesures sont réalisées en mode négatif.



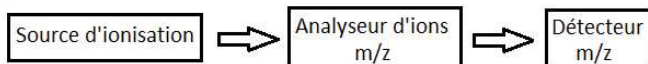
Figure 119 : Appareil analytique utilisé : Eksigent micro-LC couplée à un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP 5500.

Les avantages de la micro-LC par rapport à l'HPLC classique sont un moindre volume d'échantillon injecté conduisant à une meilleure résolution de pic assurant ainsi une sensibilité accrue, et une consommation de solvant plus faible.

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) se distingue de la spectrométrie de masse classique (**Schéma 123**) par sa capacité à former et analyser des ions fragments spécifiques d'un composé. D'une manière générale, le système MS/MS permet de sélectionner (MS1), dans une

première étape, un ion stable abondant et caractéristique (appelé ion parent) issu de la source d'ionisation, suivi d'une phase d'activation (dans la cellule de collision) permettant son excitation puis sa fragmentation en ion fils qui sera ensuite sélectionné (MS2) et analysé (détecteur).

Spectromètre conventionnel



Spectromètre en tandem (MS/MS)

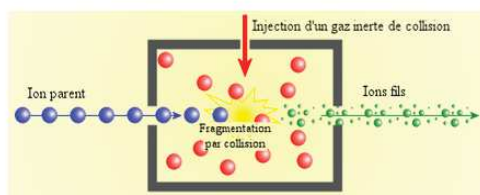
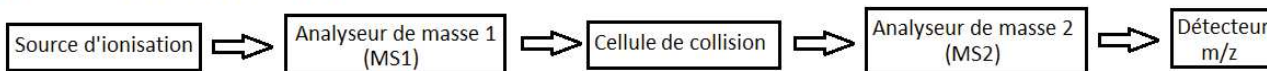


Schéma 123 : Composition schématique d'un spectromètre conventionnel et en tandem.

Dans le cas de l'appareil utilisé pour cette étude, l'analyse MS/MS est effectuée grâce à un triple quadripôles (**Schéma 124**, Q1, Q2 et Q3) correspondant aux trois composantes "analyseur de masse 1, cellule de collision et analyseur de masse 2" du **Schéma 123**. Le mode MRM (multiple reaction monitoring) utilisé permet d'étudier chaque métabolite, puisqu'il conduit à la formation d'un ion parent (dans la source d'ionisation) (**Schéma 124**) qui est ensuite sélectionné au niveau du quadripôle 1 (Q1) et conduit, après fragmentation (Q2), à la formation des ions fils (Q3). On parle ainsi de transitions, ion parent → ion fils. Un suivi de plusieurs transitions pour un même composé est possible, permettant d'obtenir un gain de spécificité.

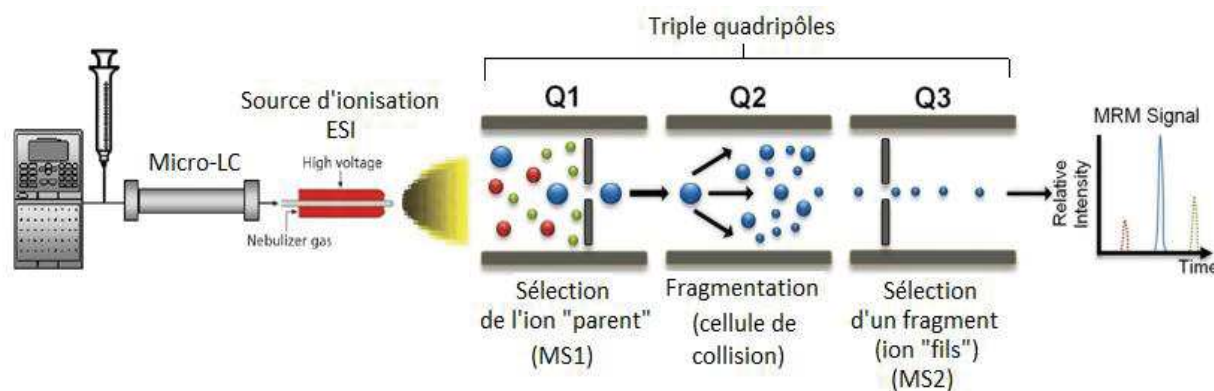


Schéma 124 : Micro-LC-MS/MS : micro-LC couplée à une source d'ion (ESI : electrospray ionization) donnant sur le triple quadripôle, constituant ainsi un spectromètre de masse en tandem (MS/MS), et dans ce cas permettant une analyse en mode MRM.

Lors de cette étude, le choix a été fait de réaliser un suivi de deux transitions (T1 et T2) pour chaque composé. Sur un chromatogramme, les deux transitions sont superposées et permettent d'identifier de manière certaine le composé étudié. La transition T1 correspond à la plus abondante provenant de l'ion parent sélectionné et permet ainsi d'effectuer une quantification du métabolite. La transition T2 est dans certains cas moins abondante comparée à la transition T1, mais est qualifiée de "caractéristique", permettant de confirmer l'identification du composé. Avant toute quantification, une étape d'optimisation est réalisée (réglage des paramètres du quadripôle 1) sur chaque composé pur (correspondant aux standards externes), en vue d'identifier clairement les valeurs m/z associées aux T1 et T2 et de magnifier les signaux, des transitions suivies, obtenus grâce au spectromètre de masse. Les transitions obtenues et suivies pour quantifier la 4-F_{4t}-NeuroP sont présentes dans la **Figure 120**.

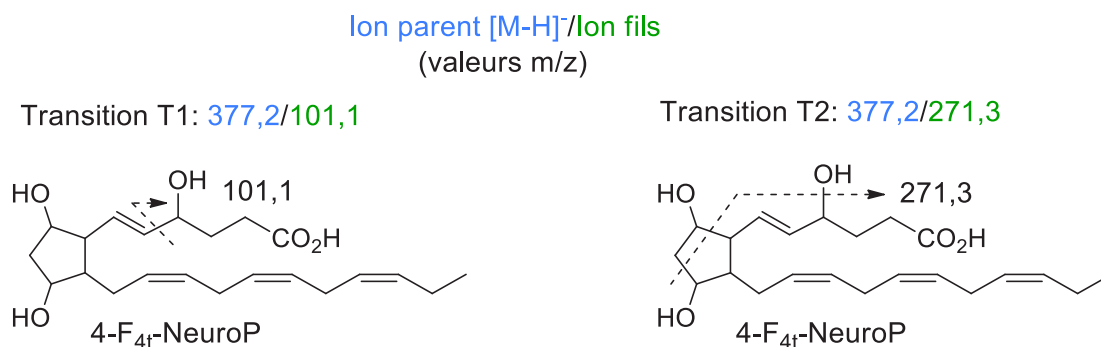


Figure 120 : Les transitions (T1 et T2) associées à l'analyte 4-F_{4t}-NeuroP.^{233b}

Les standards deutérés (F₄-NeuroP deutérés) issus de l'oxydation des DHA deutérés n'ont pas été synthétisés et ne sont donc pas disponibles. Pour cette raison, les T1 sélectionnées pour l'analyse des F₄-NeuroP deutérés sont déduites de celles associées aux analogues non deutérés (série 4, 10 et 20). Les signaux correspondant aux T1 (issus des séries 4, 10 et 20) des composés deutérés sont retrouvés à un temps de rétention similaire à ceux des analogues non deutérés. Même si la T2 n'a pas été identifiée pour ces analytes deutérés, nous considérons que l'obtention de la T1 à un temps de rétention attendu, est suffisante pour effectuer une analyse qualitative et comparer les proportions de métabolites formés lors de l'oxydation des DHA naturel et deutérés.

II.2. Oxydation du DHA naturel et mise au point du protocole

II.2.1. Choix de l'étalon interne (EI)

Lors d'une étude par spectrométrie de masse, l'utilisation de l'étalon interne (EI) permet de s'affranchir des différentes variations pouvant être observées lors du traitement de l'échantillon

jusqu'à son analyse. L'étude de la formation des NeuroPs ne se fera pas directement grâce à l'aire sous la courbe du signal qui leur est associé, mais grâce au ratio des aires du signal de l'analyte à doser sur celle de l'étalon interne. Ainsi, ce dernier possédant des propriétés chimiques et physiques comparables à celles de l'analyte, il est susceptible de se comporter de façon similaire lors de l'extraction, de l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse et du processus d'ionisation. Leur ratio restera donc inchangé malgré les variations pouvant se produire au cours du traitement et de l'analyse. *In fine*, ce ratio est utilisé lors d'une quantification des analytes, *via* une courbe de calibration réalisée à partir des standards. N'ayant pas en notre possession les standards deutérés formés suite à l'oxydation des DHA deutérés, aucune quantification ne sera rapportée lors de cette étude puisqu'aucune droite de calibration n'a pu être réalisée à partir des standards deutérés. Une quantité fixe (4 ng) d'étalon interne (EI), la C21-15-F_{2t}-IsoP (**Figure 121**) appartenant à la même classe chimique des F₄-NeuroP, est ajoutée avant le traitement de l'échantillon par SPE (solid phase extraction). A noter que cet EI est non naturel et ne peut donc pas être présent de manière endogène dans les échantillons analysés. Cet EI, synthétisé au sein du laboratoire, ne présente aucune transition en commun avec les métabolites deutérés issus de l'oxydation des DHA puisqu'il possède 21 carbones au lieu de 22.

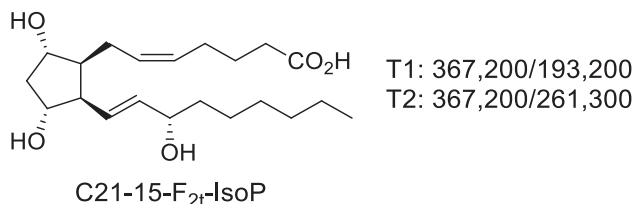


Figure 121 : Structure de l'EI (C21-15-F_{2t}-IsoP) utilisé au cours de l'étude de la formation des NeuroPs (série 4, 10 et 20) suite à l'oxydation des DHA naturel et deutérés.

II.2.2. Protocole de prétraitement de l'échantillon par SPE (solid phase extraction)

Au cours du traitement des échantillons, un protocole SPE²⁴³ (solid phase extraction) est mis en œuvre avant de réaliser l'analyse par micro-LC-MS/MS (mode MRM). Les cartouches de SPE utilisées sont des Oasis MAX correspondant à un mode mixte échangeur d'anions. Cette étape d'extraction permet une purification et une concentration des métabolites avant l'analyse (**Schéma 125**). Ce protocole SPE a été précédemment optimisé et validé au sein du laboratoire sur des matrices biologiques.

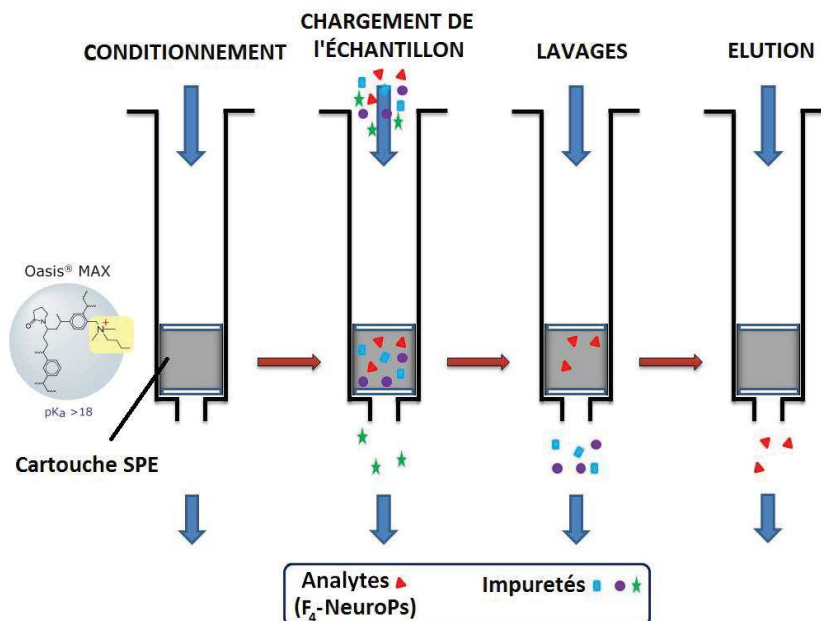


Schéma 125 : Les différentes étapes du traitement de l'échantillon correspondant au protocole SPE mis en œuvre pour récupérer les analytes d'intérêt (F₄-NeuroPs).

La vérification du protocole d'extraction appliqué à notre matrice (DHA/PBS : phosphate buffered saline/MeOH), a été effectuée grâce à la méthode des ajouts dosés permettant de calculer le rendement d'extraction associé à l'EI et aux analytes d'intérêts (**Tableau 27**). Une comparaison entre les échantillons (solutions de DHA) dans lesquels l'EI et les analytes d'intérêt ont été introduits avant ou après le traitement SPE a été effectuée pour calculer le rendement d'extraction.

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{Aire de l'analyte dopé avant traitement}}{\text{Aire de l'analyte dopé après traitement}} \times 100$$

	Composés	Rendement d'extraction ± erreur (%)
EI	C21-15-F _{2t} -IsoP	83,23 ± 12,21
Analytes	4(RS)-F _{4t} -NeuroP	100,48 ± 22,93
	10(S)-F _{4t} -NeuroP	90,25 ± 11,66
	20(R)-F _{4t} -NeuroP	98,37 ± 14,05

Tableau 27 : Résultats du rendement d'extraction obtenu grâce à la méthode des ajouts dosés.

La méthode d'extraction et de concentration des analytes est donc validée suite aux rendements d'extraction obtenus par la méthode des ajouts dosés.

II.2.3. Oxydation et analyse par LC-MS/MS : mise au point sur le DHA naturel

Les oxydations des DHA ont été effectuées (**Schéma 126**) selon un protocole similaire à celui mis en œuvre par Musiek *et al.*,²⁴⁸ grâce à un initiateur de radicaux, l'AAPH (2,2'-azobis-(2-aminopropane) hydrochloride), dans un mélange de tampon phosphate (PBS : phosphate buffered saline) et de MeOH, à 37°C durant 14 h. Le choix du temps d'oxydation a été effectué d'après les résultats obtenus par Musiek *et al.* où la formation de F₄-NeuroPs était maximale à 10 h.

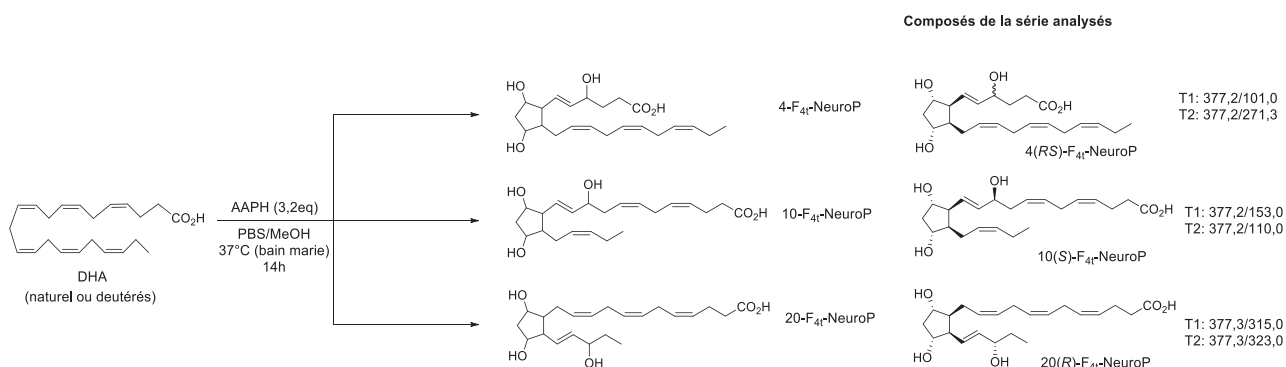


Schéma 126 : Les différentes séries de F₄-NeuroPs analysées, formées après oxydation radicalaire du DHA en présence d'AAPH et standards utilisés pour leur analyse en LC-MS/MS.

Le protocole suivi lors de l'évaluation de l'oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés est le suivant :

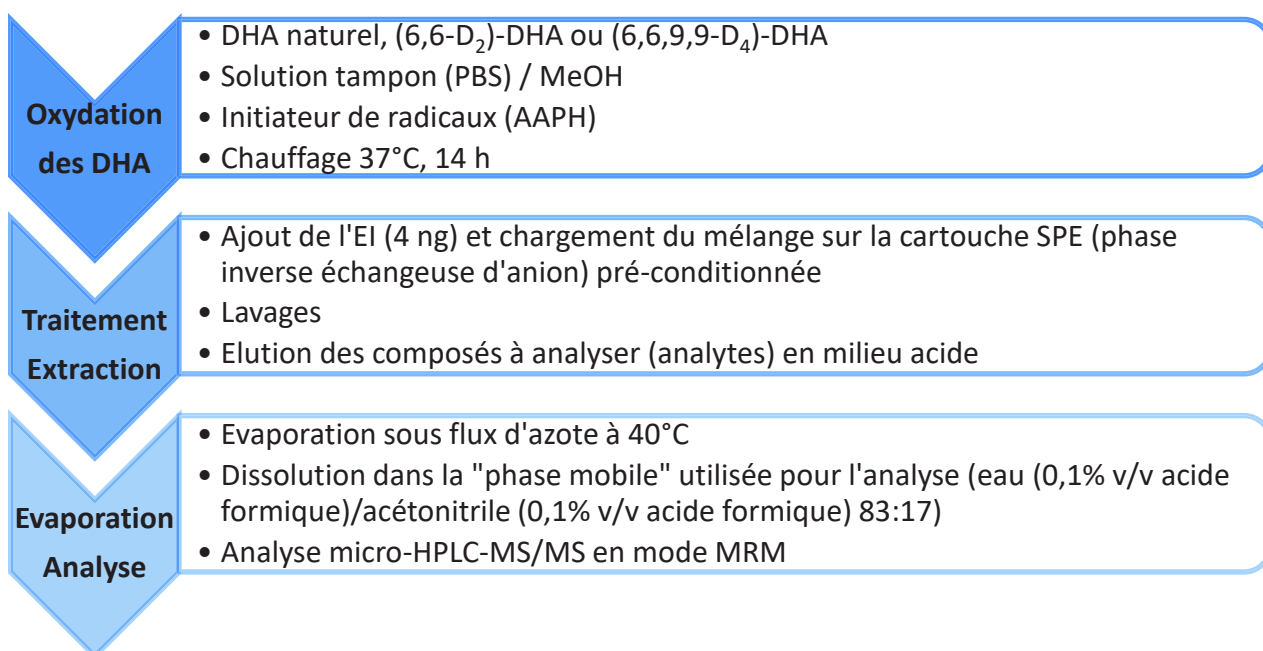


Schéma 127 : Les différentes étapes suivies lors de l'évaluation de l'oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés.

Tout d'abord, l'oxydation a été réalisée sur 0,5 mg de DHA en triplicat (**Figure 122**, 3 essais), correspondant à une quantité inférieure à celle utilisée par Musiek *et al.* (5 mg). L'objectif est de mettre en évidence la formation des F₄-NeuroPs (séries 4, 10 et 20) tout en minimisant la quantité de DHA deutérés à engager dans chaque expérience.

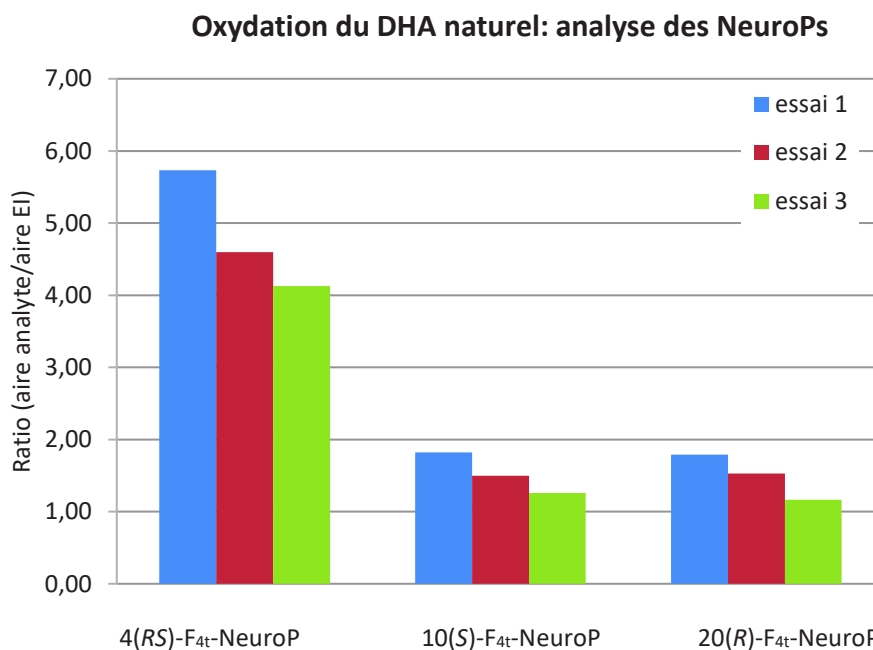


Figure 122 : Évaluation de l'oxydation du DHA naturel : analyse de la formation des NeuroPs. Les résultats sont présentés en ratio de l'aire de l'analyte sur l'aire de l'EI.

Lors de ces différents essais, le signal obtenu s'est avéré supérieur à la LOQ (Limit of quantification = limite de quantification) (ratio signal sur bruit supérieur à 10), nous permettant de qualifier le pic de "quantifiable" pour les trois composés étudiés (4(RS)-F_{4t}-NeuroP, 10(S)-F_{4t}-NeuroP et 20(R)-F_{4t}-NeuroP).

Ensuite, la variation du signal de l'EI (étalon interne) étant acceptable pour les trois essais (CV égal à 14% < à 20%), une comparaison des analytes obtenus lors des essais est possible. Le résultat des 3 essais montre que la formation des différents analytes s'effectue en proportion similaire d'un essai à l'autre.

II.3. Impact des deutériums sur l'oxydation radicalaire du DHA conduisant à la formation des F₄-NeuroPs des séries 4, 10 et 20

Trois NeuroPs sont analysés provenant de l'oxydation radicalaire de chaque DHA correspondant aux séries 4, 10 et 20. En tout 9 métabolites sont étudiés en vue d'une comparaison de leur formation respective (**Schéma 128**).

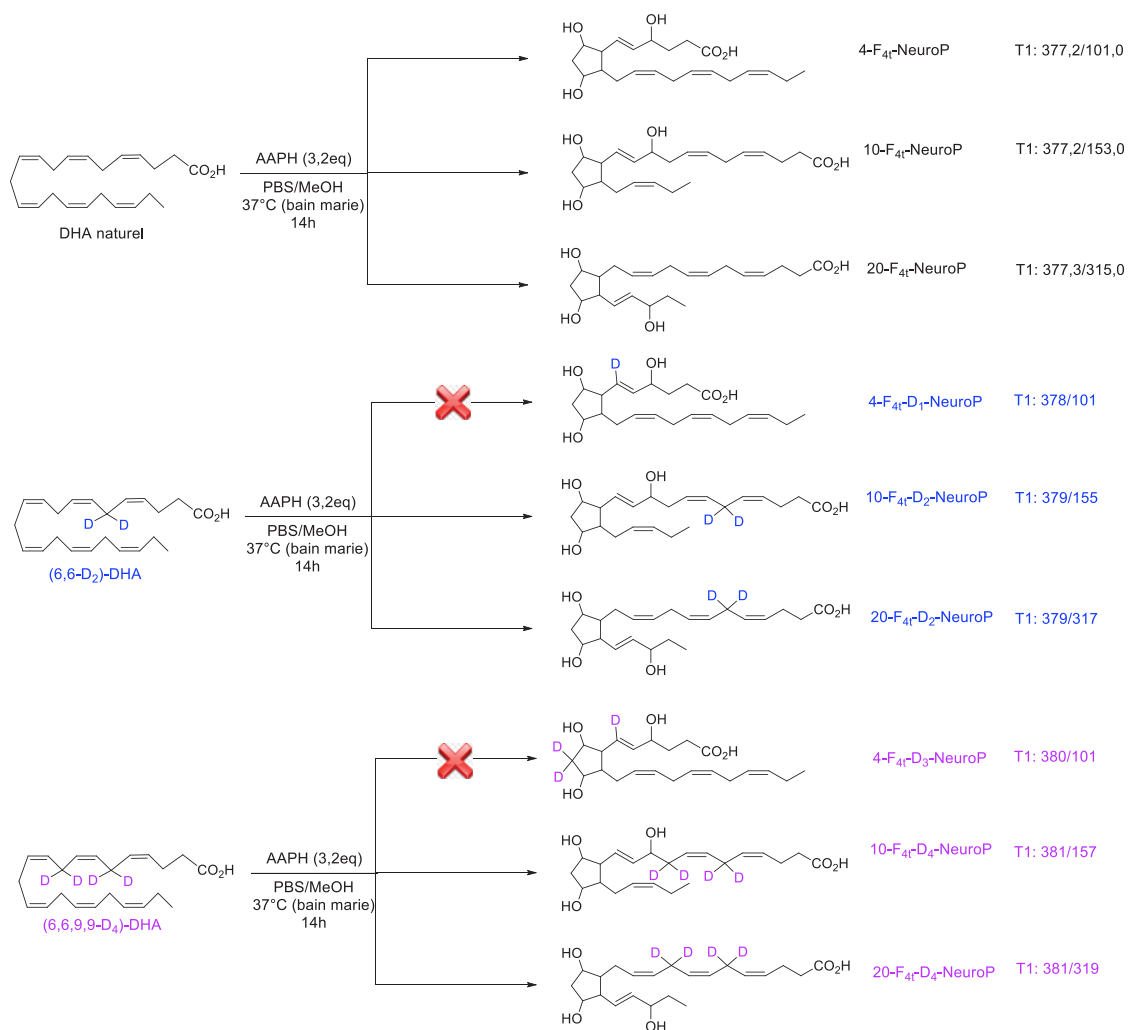


Schéma 128 : Les 9 séries de F₄-NeuroPs étudiés au cours de l'oxydation des DHA naturel et deutérés.

Le chromatogramme suivant (**Figure 123**) est obtenu lors de l'étude des séries 4, 10 et 20 de F₄-NeuroPs. La **Figure 124** représente les barres d'histogramme associées aux résultats des séries 4, 10 et 20.

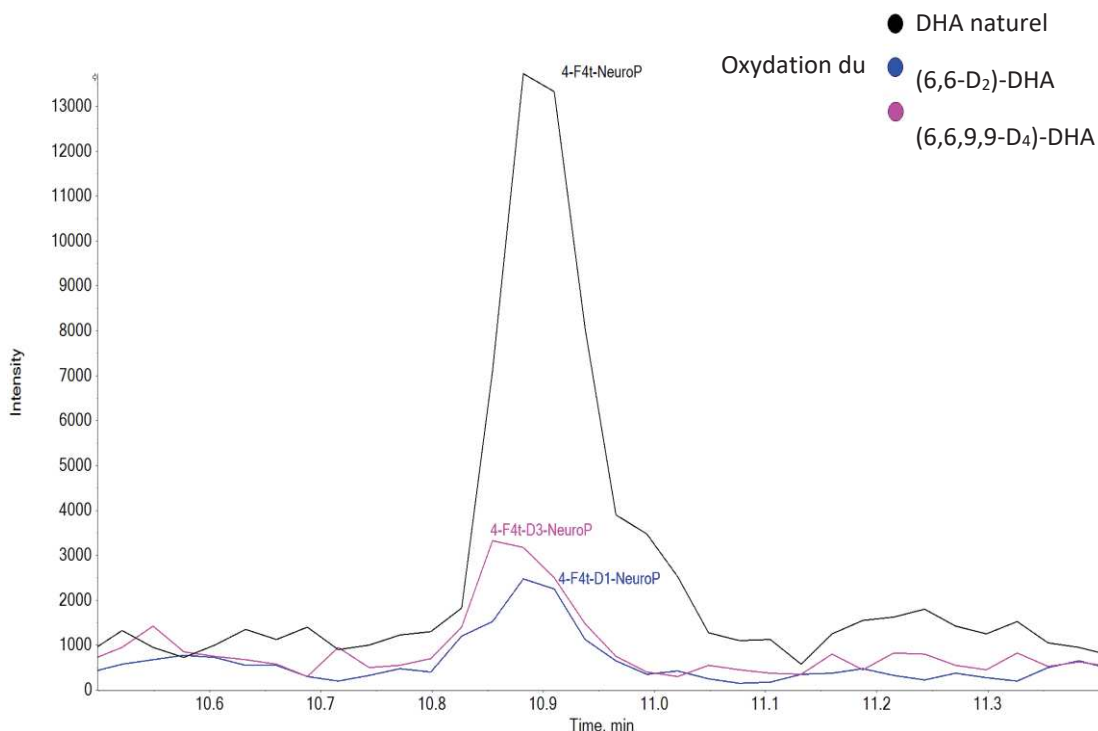


Figure 123 : Chromatogramme (zoom entre 10,5 et 11,4 minutes) associé aux F₄-NeuroPs de la série 4 (4-F_{4t}-NeuroP, 4-F_{4t}-D₁-NeuroP et F_{4t}-D₃-NeuroP) obtenu grâce au logiciel AB Sciex PeakView® 2.2.

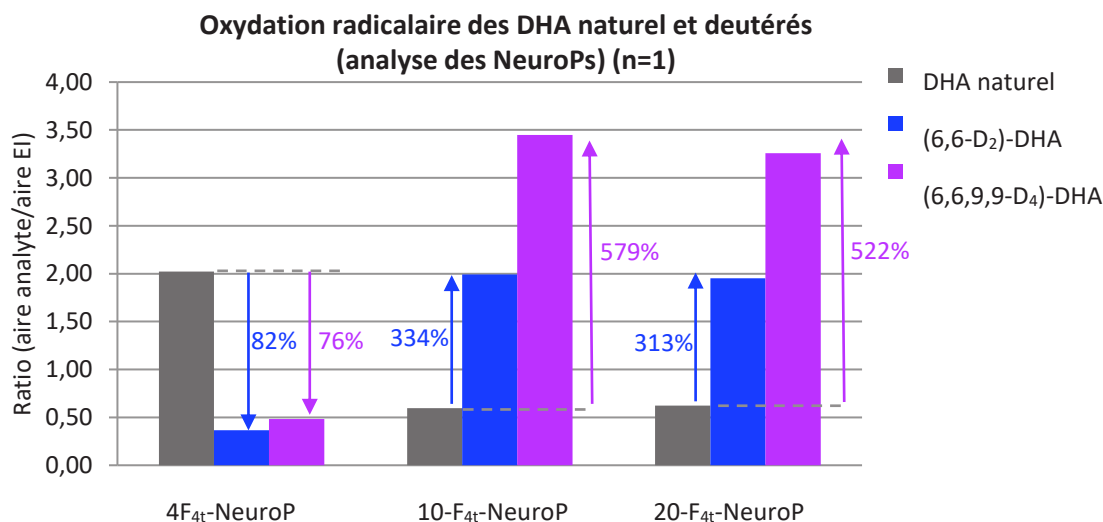


Figure 124 : Évaluation de l'oxydation des DHA naturel et deutérés : analyse de la formation des F₄-NeuroPs associés aux séries 4, 10 et 20. Les résultats sont présentés en ratio de l'analyte sur l'aire de l'EI.

Une diminution de la formation de la 4-F_{4t}-NeuroP associée à 82% et de 76% respectivement pour le (6,6-D₂)-DHA et le (6,6,9,9-D₄)-DHA comparée au DHA naturel est observée. Pour les 10-F_{4t}-NeuroP et 20-F_{4t}-NeuroP la tendance est inversée pour les DHA deutérés

comparée au DHA naturel, et on observe une augmentation des ces métabolites après oxydation des composés deutérés. Une diminution de la formation de la 4-F_{4t}-NeuroP se fait donc en faveur des séries 10 et 20 pour les DHA deutérés. Cela peut s'expliquer par la diminution du nombre d'hydrogènes pouvant être arrachés en position 6 dans le cas des DHA deutérés, favorisant l'abstraction sur les autres positions, 12 et 18, conduisant respectivement aux séries 10 et 20.

Le résultat correspondant à une diminution de la formation de la 4-F_{4t}-NeuroP pour les DHA deutérés a été reproduit (**Figure 125**).

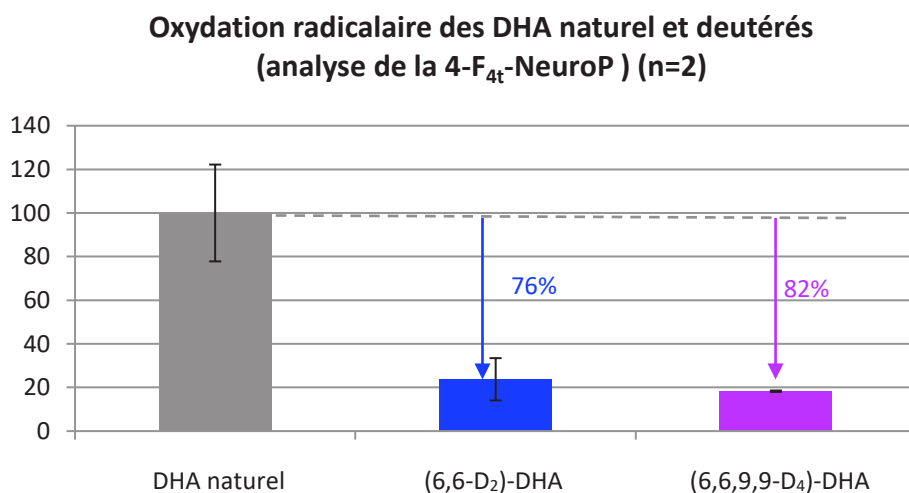


Figure 125 : Évaluation de l'oxydation des DHA naturel et deutérés : analyse de la formation de la 4-F_{4t}-NeuroP. Les résultats sont normalisés par rapport à la valeur contrôle, correspondant au ratio de l'aire de l'analyte sur l'aire de l'EI, de la 4-F_{4t}-NeuroP provenant du DHA naturel.

La reproduction de cet essai conduit une nouvelle fois à une réduction des 4-F_{4t}-NeuroPs. Ce résultat confirme une tendance, associée à la diminution de la formation des 4-F_{4t}-NeuroPs à partir des DHA deutérés. On n'observe cependant pas de différence entre les deux DHA deutérés testés. Cette expérience nous permet de confirmer l'effet protecteur des deutériums vis à vis de la première étape d'abstraction de l'hydrogène, impliquée dans le mécanisme de peroxydation lipidique radicalaire.

Conclusion

L'évaluation de l'oxydation enzymatique et radicalaire (**Schéma 129**) des DHA deutérés synthétisés a permis de mettre en évidence l'influence de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques du DHA sur la formation de différents métabolites.

Tout d'abord, la présence des deutériums en position 6 (di-deutééré) et 6/9 (tétra-deutééré) ne bloque pas l'oxydation enzymatique par la sLOX en PDX sous entendant qu'une métabolisation en NPD1 serait alors possible. Si la supplémentation des cellules rétinienne avec le composé lead di- ou tétra-deutééré entraîne une libération des DHA deutérés (clivage par des estérases cellulaires), ils pourront alors probablement être oxydés de façon enzymatique par la 15-LOX pour former les NPD1 deutérées associées, pouvant présenter les mêmes propriétés neuroprotectrices que leur analogue non deutéré.

Ensuite, la comparaison des métabolites formés lors de l'oxydation radicalaire des DHA naturel et deutérés montre une diminution de la formation de la 4-F_{4t}-NeuroP (obtenue après abstraction d'un hydrogène en position 6) à partir des DHA di- et tétra-deutééré. Cependant, la formation des métabolites 10- et 20-F_{4t}-NeuroP est quant à elle augmentée à partir de ces mêmes DHA deutérés, suggérant que la présence des deutériums en position 6 pourrait favoriser l'abstraction d'hydrogène dans d'autres positions dans un modèle non cellulaire. Ainsi, sur ce modèle *in vitro* en l'absence de cellules, l'oxydation des DHA deutérés en 4-F_{4t}-NeuroPs est diminuée au profit de la formation d'autres métabolites (10- et 20- F_{4t}-NeuroP). Il est cependant probable qu'en milieu cellulaire la présence des deutériums sur les lipides insérés au sein de la double couche lipidique ait un effet différent et soit capable de stopper la propagation radicalaire lipidique.

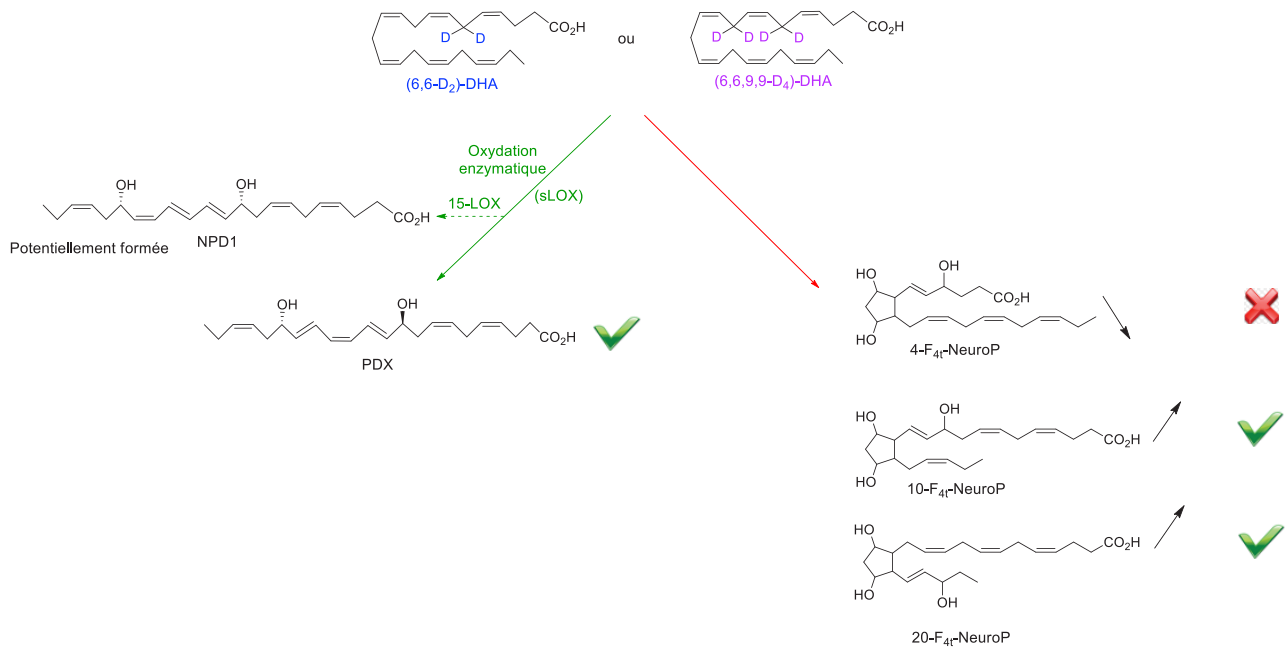


Schéma 129 : Oxydations enzymatique et radicalaire des DHA deutérés : métabolites formés et impactés.

Partie expérimentale

Chapter I : Study of enzymatic oxidation of natural and deuterated DHA

This Work was carried out at INSA of Lyon in the laboratory of our collaborator Michel Guichardant

Biosynthesis of natural or deuterated PDX

Reactions were catalyzed by soybean lipoxygenase (sLOX) (type 1-B) in sodium-borate buffer under normal atmosphere. DHA was treated by sLOX according to the described procedure²⁴⁰, then hydroperoxides were reduced by NaBH₄, the incubate was acidified to pH=3, and PDX were extracted using a C₁₈ solid-phase cartridge with 10 mL of ethanol. They were further dried under a stream of nitrogen.

Liquid Chromatography and Mass Spectrometry conditions

A Shimadzu Nexera 30 series UPLC was used. The separation was performed by injecting 10 µL of sample onto a Waters Acquity UPLC using a BEH-C18 analytical column (2.1 µm particle size, a 150 mm length, and a 2.1 mm internal diameter).

The mobile phases consisted of a binary gradient of (A) water/acetonitrile (75:25, v/v) with 0.1% (v/v) of formic acid, and (B) acetonitrile with 0.1% (v/v) of formic acid delivered at 0.4 mL.min⁻¹.

The column was held at 40 °C. The elution was in gradient mode as following:

<i>Time (min)</i>	<i>% (A)</i>	<i>% (B)</i>
0	100	0
1	100	0
8.5	15	85
9.5	0	100
14	0	100

Mass spectrometry analyses were performed on an AB SCIEX QTRAP 4500. The ionization source was an electrospray (ESI), and it was operated in the negative mode. The source temperature used was at 350°C, the source voltage was set at -4.5 kV, and N₂ was used as curtain gas. Detection of the fragmentation ion products from each analyte was performed in the multiple reaction monitoring mode (MRM). The picks identification corresponding to the deuterated metabolites was performed thanks to a comparison with a standard solution of PDX injected under the same conditions.

Chapter II : Study of radical oxidation of natural and deuterated DHA

Chemicals

The internal standard (C21-15-F_{2t}-IsoP) and neuroprostanes (4(*RS*)-F_{4t}-NeuroP, 10(*S*)-F_{4t}-NeuroP and 20(*R*)-F_{4t}-NeuroP) standards were synthesized according to previous published procedures in the laboratory. Hexane (HPLC grade), and formic acid, were purchased from Sigma Aldrich. Methanol (LC-MS grade), acetonitrile (LC-MS grade), water (LC-MS grade) and isopropanol (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific. Ethyl acetate (> 99.8%) and EtOH (analytical reagent) were purchased from Prolabo. Acetic acid (100%, LC-MS grade) and ammonium hydroxide (28-30 wt% in water) were obtained respectively from Merck and Acros organics. The solid-phase extraction cartridges (Oasis Max, 3 mL, 60 mg) were purchased from Waters.

Standards solution preparation

Standards solutions of isoprostanoid (C21-15-F_{2t}-IsoP) and neuroprostanooids (4(*RS*)-F_{4t}-NeuroP, 10(*S*)-F_{4t}-NeuroP and 20(*R*)-F_{4t}-NeuroP) used to determine the different characteristic transitions and the elution time for each compound were prepared in methanol at 1 ng/μL from 1mg/mL stock solution in methanol. The volume of the internal standard (IS: C21-15-F_{2t}-IsoP) used for the analysis of the samples (oxidized DHA) was 4 μL (from a stock solution at 1 ng/μL in methanol).

Sample preparation

Oxidation of natural or deuterated DHA and sample preparation

A solution of DHA in methanol (1 mg/mL, 0.5 mL) was added to 4.5 mL of phosphate-buffered saline solution (pH = 7.3) containing 1 mM of AAPH. The mixture was heated at 37°C for 14 h, and then allowed to reach room temperature. The mixture was spiked with 4 ng of IS and then treated by solid phase extraction.

Solid Phase Extraction (SPE)

A SPE procedure was performed to further clean-up samples, Oasis MAX mixed polymer phase anion exchanger cartridges were used. Aliquots of 2 mL of sample were loaded on the cartridges

previously conditioned with 2 mL of methanol and equilibrated with 2 mL of 0.02 M of formic acid, pH 4.5. After the sample was loaded, successive washing steps were performed using (i) 2 mL NH₄OH 2% (v/v), (ii) 2 mL of a mixture of methanol and formic acid 0.02 M, pH 4.5 (3:7, v/v), (iii) 2 mL of hexane and (iv) 2 mL of a mixture of hexane and ethyl acetate (7:3, v/v). Compounds of interest retained on the column, were eluted with two volumes of 1 mL of a (70:29.4:0.6 ; v/v/v) hexane/ethanol/acetic acid mixture. Finally, the sample was concentrated with N₂ at 40 °C.

Yield of SPE extraction protocol

The preparation of the sample of oxidized natural DHA was validated through the evaluation of the yield of extraction for the SPE protocol. For this protocol, a monoplicate of the following solution was prepared: 1) Two samples of oxidized natural DHA (n=2) were spiked with 4 ng of IS stock solution and with 3.2 ng of standards solution, and were extracted as previously described ; 2) Two samples of oxidized natural DHA (n=2) were extracted then spiked with 4 ng of IS stock solution and with 3.2 ng of standards solution. All sets of two samples were analyzed once using the LC-MS/MS system. The yield of extraction was calculated as the percentage difference between peaks areas of standards in 1) pre-spiked and 2) post-spiked samples with each set of data.

$$\frac{\text{Standard area prespiked}}{\text{standard area postspiked}} \times 100 = \text{Extraction yield (\%)}$$

Conditioning for analysis

Samples were reconstituted with 100 µL of mobile phase ((A) water with 0.1% (v/v) of formic acid, and (B) acetonitrile/methanol (80/20, v/v) with 0.1% (v/v) of formic acid, A/B (83:17, v/v) and then injected in the micro-LC-QTRAP system.

Liquid Chromatography and Mass Spectrometry conditions

An Eksigent (Sciex Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) micro-LC equipped with CTC Analytics AG (Zwingen, Switzerland) was used. The autosampler vial tray was kept at 10 °C. The needle was washed with proper mixtures of acetonitrile/water/isopropanol (1:1:1 ; v/v/v) and then with water. The separation was performed by injecting 5 µL of sample onto an HALO C18 (Sciex Applied Biosystems) analytical column (0.5 µm shell of porous silica, 100 mm length, and 2.7

μm particle size). The mobile phases consisted of a binary gradient of (A) water with 0.1% (v/v) of formic acid, and (B) acetonitrile/methanol (80:20, v/v) with 0.1% (v/v) of formic acid delivered at $0.03\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column was held at $40\text{ }^\circ\text{C}$. Optimization of the elution was done using the stock solution of standards diluted in water/acetonitrile/formic acid (83:17:0.1). The elution was in gradient mode as following:

<i>Time (min)</i>	<i>% (A)</i>	<i>% (B)</i>
0	83	17
1.6	83	17
2.85	79	21
7.27	75	25
8.8	71.6	28.4
9.62	66.9	33.1
10.95	66.7	33.3
15	60	40
16.47	5	95
18.92	5	95
19	83	17
21	83	17

Mass spectrometry analyses were performed on an AB SCIEX QTRAP 5500 (Sciex Applied Biosystems). The ionization source was electrospray (ESI), and it was operated in the negative mode. The source voltage was set at -4.5 kV , and N_2 was used as curtain gas. Detection of the fragmentation ion products from each analyte deprotonated molecule $[\text{M} - \text{H}]^-$ was performed in the multiple reaction monitoring mode (MRM). Quantification of isoprostanoïds was done by measuring the area under the specific peak using MultiQuant 3.0 software (Sciex Applied Biosystems).

The following table lists the MRM transitions, retention times (RT) and voltages (DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy, CXP: collision cell exit potential) used for the detection and determination of standards (IS) IsoP (C21-15-F_{2t}-IsoP) and analyte NeuroPs (4(RS)-F_{4t}-NeuroP, 10(S)-F_{4t}-NeuroP and 20(R)-F_{4t}-NeuroP).

Standards and Transitions	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	RT(min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
C21_15F _{2t} -IsoP_T1	367.200	193.200	11.8	-174	-3.10	-34.00	-27.0
C21_15F _{2t} -IsoP_T2	367.200	261.300	11.8	-174	-3.10	-34.00	-27.0
4-F _{4t} -NeuroP_T1	377.200	101.000	11.9	-161	-4.69	-28.30	-6.9
4-F _{4t} -NeuroP_T2	377.200	271.300	11.9	-161	-4.69	-27.00	-16.0
10-F _{4t} -NeuroP_T1	377.200	153.000	10.8	-149	-3.80	-27.20	-7.8
10-F _{4t} -NeuroP_T2	377.200	110.000	10.8	-149	-3.80	-27.20	-7.8
20(R)- F _{4t} -NeuroP_T1	377.300	315.200	10.6	-164	-3.00	-26.22	-18.4
20(R)- F _{4t} -NeuroP_T2	377.300	323.000	10.6	-164	-3.00	-26.22	-18.4

Data Processing & Statistical Analysis

Raw data extracted from the software were converted as a text file (.txt) and exported to Excel (Excel 2007) to be processed. Means, standard deviations and coefficient of variations ($\% CV = (\sigma/\bar{x}) \times 100$) were calculated with Excel.

Conclusion générale

L'étude de la physiopathologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA, forme atrophique) et de la maladie de Stargardt montre l'intervention de plusieurs mécanismes cytotoxiques communs entraînant la dégénérescence des cellules rétiennes. La combinaison du stress oxydant (EOR, peroxydation lipidique) et carbonylé (rétinal tout-*trans*, formation d'A2E et d'ECR issus de la peroxydation lipidique) ont un effet synergique sur l'évolution de ces pathologies. Afin de contrer ces deux types de stress, une molécule lead, le phloroglucinol-*OiPr*-ODHA correspondant à un lipophénol oméga-3, a précédemment été développé au sein du laboratoire. Son action de cytoprotection contre le rétinol tout-*trans* (stresseur carbonylé) a été évaluée et validée *in vitro*. Des essais préliminaires réalisés *in vivo* sur un modèle murin de la maladie de Stargardt montrent une conservation anatomique et fonctionnelle de la rétine en condition de stress lumineux.

L'aspect potentiellement délétère du DHA en condition oxydante, partie lipidique de cette molécule lead, nous a amené à concevoir des lipophénols deutérés. L'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques 6 et 9 de cet AGPI a ainsi été effectuée afin de réduire la toxicité du DHA en condition de stress oxydant, de diminuer la peroxydation lipidique (conduisant dans certain cas à la formation de métabolites délétères), mais également de conserver son oxydation enzymatique en neuroprotectine cytoprotectrice de type NPD1.

Ainsi nous avons réalisé la première synthèse totale de deux DHA deutérés en positions bis-allyliques 6 et 6/9 : (6,6-D₂)-DHA (**22**) et (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), ainsi que celles de leurs lipophénols deutérés correspondant, le phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) et le phloroglucinol-*OiPr*-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**) en nous basant sur des stratégies de synthèse convergentes comportant des intermédiaires communs (**Schéma 130**).

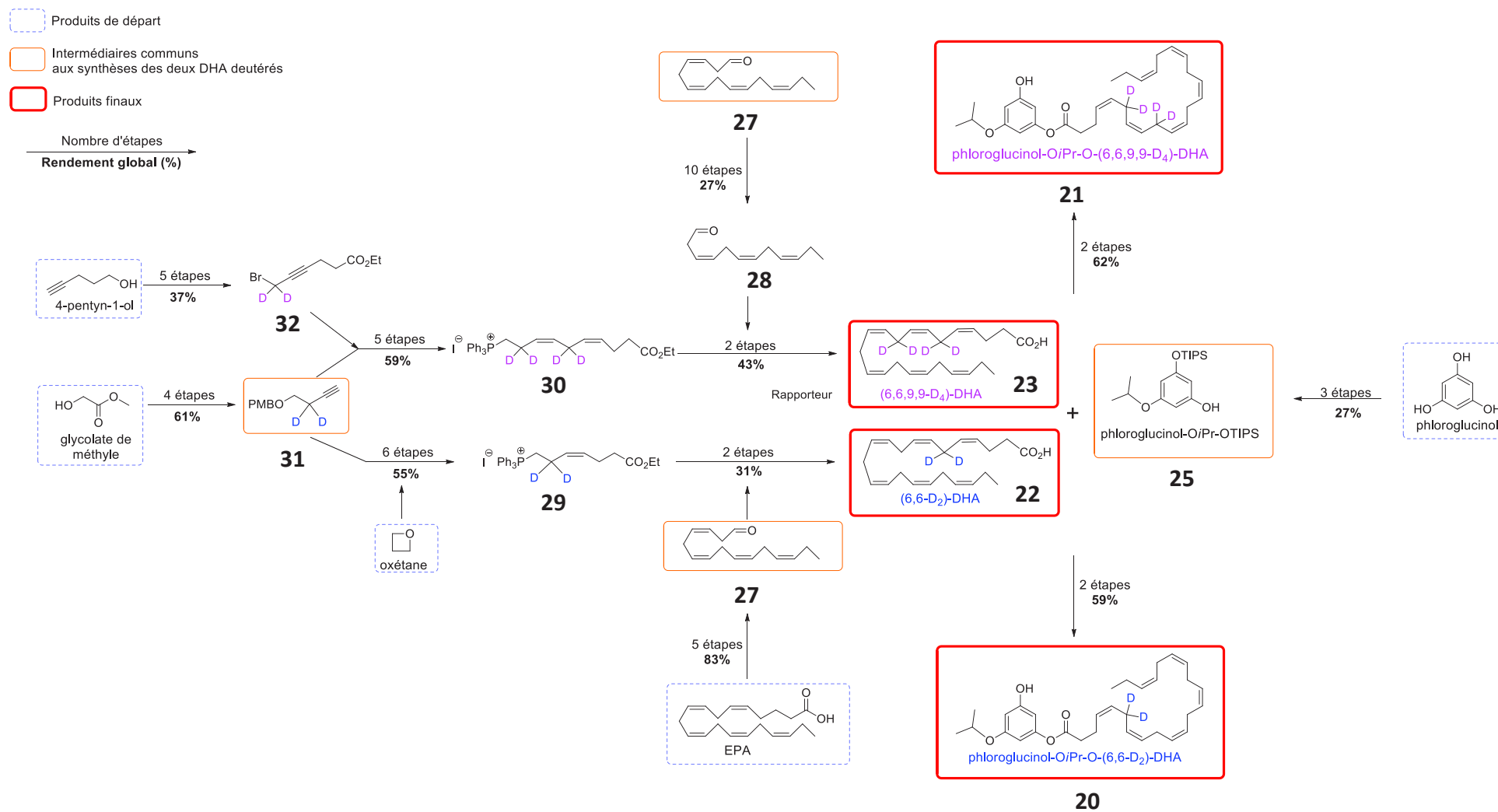


Schéma 130 : Résumé de la synthèse des (6,6-D₂)-DHA (**22**), (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), et des lipophénols deutérés correspondant, le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) et le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**).

Le (6,6-D₂)-DHA (**22**) est synthétisé en 12 étapes à partir du glycolate de méthyle avec un rendement global de 10%. L'incorporation des deutériums en position *bis*-allylique est effectuée par réduction du glycolate de méthyle en présence de LiAlD₄, permettant d'obtenir après 3 étapes supplémentaires l'alcyne vrai deutéré **31**. Enfin, le phloroglucinol-O*i*Pr-OTIPS **25**, précédemment obtenu en 3 étapes à partir du phloroglucinol avec un rendement global de 27%, est couplé avec le DHA di-deutééré **22** pour former après 2 étapes le phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**) avec un rendement de 59%. Nous avons ainsi obtenu 26 mg de (6,6-D₂)-DHA (**22**) et 60 mg de phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**).

Les synthèses mises en œuvre pour obtenir le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) ont nécessité un nombre d'étapes supplémentaires comparées au DHA di-deutééré **22** mais leurs stratégies de synthèse comportent des intermédiaires communs : l'alcyne vrai deutéré **31** et l'aldéhyde **27**. Le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) est synthétisé en 14 étapes à partir du glycolate de méthyle avec un rendement global de 9%. Ce dernier, après 2 étapes dont une réaction de couplage avec le phloroglucinol-O*i*Pr-OTIPS **25** (également un intermédiaire commun aux deux synthèses des lipophénols), conduit à la formation du phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**) avec un rendement de 62%. Nous avons ainsi obtenu 16 mg de (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) et 45 mg de phloroglucinol-O*i*Pr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**).

Pour conclure, les deux stratégies de synthèse des DHA deutérés ont été validées après d'importantes optimisations sur la réaction de Wittig et pour l'obtention des aldéhydes (**27** et **28**) notamment, et permettent d'accéder à des quantités suffisantes pour l'évaluation biologique des AGPI deutérés et de leurs lipophénols respectifs. Cependant, quelques limitations ont été observées au niveau de la montée en échelle de la stratégie, notamment pour l'obtention de l'aldéhyde **28** nécessaire à la synthèse le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**), et également pour réaliser les réactions d'oléfination de Wittig sur une montée en échelle plus importante. Une autre voie de synthèse envisageable pour palier à ce problème et ainsi d'obtenir le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) serait de mettre en œuvre une autre méthode d'incorporation des deutériums, correspondant à un échange H/D (**Schéma 131, a**). Cette méthode est basée sur la présence d'un proton énolisable en position α d'une fonction aldéhyde, et réalisée en présence de pyridine et d'oxyde de deutérium D₂O. Ainsi l'aldéhyde **27** pourrait être engagé dans cette réaction d'incorporation des deutériums et après réaction avec l'ylure issu du sel de phosphonium di-deutééré **29** et saponification, pourrait conduire à la formation du (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**). De plus, cet échange H/D pourrait également être envisagé pour obtenir l'aldéhyde **28** deutéré en position α (**Schéma 131, b**) permettant, après

la réaction d'oléfination de Wittig en présence de l'ylure provenant du sel de phosphonium tétra-deutééré **30**, la synthèse d'un DHA hexa-deutééré en positions *bis*-allyliques, le (6,6,9,9,12,12-D₆)-DHA. On pourrait ainsi accéder à la deutération de la position 12.

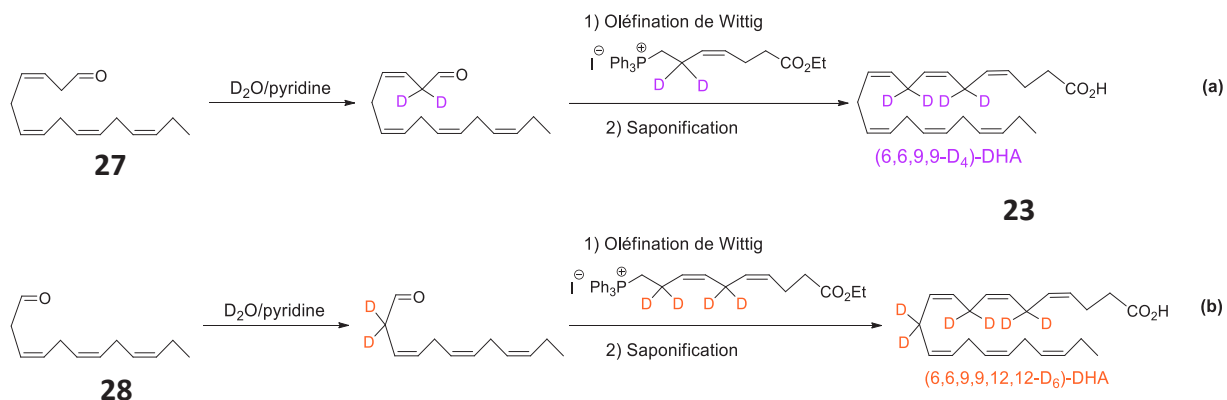


Schéma 131 : Voie alternative à tester pour obtenir le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) et le (6,6,9,9,12,12-D₆)-DHA.

Dans une deuxième partie de ce travail, les composés deutérés et non deutérés ont été évalués grâce à plusieurs tests biologiques réalisés *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine de l'épithélium pigmentaire rétinien, la lignée ARPE-19. Les lipophénols deutérés, le phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D₂)-DHA (**20**), et phloroglucinol-OiPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA (**21**), et leurs DHA associés, le (6,6-D₂)-DHA (**22**) et le (6,6,9,9-D₄)-DHA (**23**) préalablement synthétisés, ont été évalués afin de mettre en évidence l'intérêt de l'introduction des deutériums sur les positions *bis*-allyliques. En vue d'une comparaison avec la série DHA, nous avons également testés les lipophénols : phloroglucinol-OiPr-O-(11,11,14,14-D₄)-ALA et phloroglucinol-OiPr-O-(11,11-D₂)-LA et leurs AGPI associés. Deux tests ont été mis en œuvre pour montrer l'intérêt de l'incorporation des deutériums : l'évaluation de la toxicité des composés en condition oxydante, et leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique. Le troisième test correspondant à l'évaluation de l'activité anti-stress carbonyle a été réalisé sur les lipophénols de la série DHA afin de vérifier la conservation de cette activité sur les dérivés deutérés.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant (**Tableau 28**), permettant de comparer l'effet des deutériums sur la toxicité des AGPI et la limitation de la peroxydation lipidique des séries d'AGPI et des lipophénols associés :

		Cl ₅₀ (μM)		Peroxydation lipidique (%)			
		Carence SVF (1% SVF)	H ₂ O ₂ (600 μM)	Carence SVF (1% SVF) (24 h)	H ₂ O ₂ (400 μM)	Carence SVF (1% SVF) (48 h)	Lumière blanche (5 000 lux)
AGPI	DHA naturel (6,6-D ₂)-DHA (6,6,9,9-D ₄)-DHA	65,21 ± 1,03 69,48 ± 1,46 75,60 ± 1,05	65,47 ± 1,87 66,98 ± 1,89 76,24 ± 2,26	100% -15% -37%	100% -17% -39%	100% -41% -37%	100% -28% -19%
	ALA naturel (11,11,14,14-D ₄)-ALA	75,08 ± 0,19 75,77 ± 0,44	74,58 ± 2,29 75,38 ± 2,04	100% -22%	100% -22%	-	-
	LA naturel (11,11-D ₂)-LA	96,56 ± 2,81 100,05 ± 5,48	90,83 ± 8,68 89,67 ± 4,58	100% -29%	100% -24%	-	-
Lipophénols	phloroglucinol-OiPr-ODHA phloroglucinol-OiPr-O-(6,6-D ₂)-DHA phloroglucinol-OiPr-O-(6,6,9,9-D ₄)-DHA	- - -	- - -	100% -5% -15%	100% / -8%	100% / -34%	100% +6 -12%
	phloroglucinol-OiPr-OALA phloroglucinol-OiPr-O-(11,11,14,14-D ₄)-ALA	- -	- -	100% -12%	100% -10%	-	-
	phloroglucinol-OiPr-OLA phloroglucinol-OiPr-O-(11,11-D ₂)-LA	- -	- -	100% -12%	100% -11%	-	-

Tableau 28 : Tableau récapitulatif des séries des séries d'AGPI (DHA, ALA et LA) et lipophénols, en toxicité (Cl₅₀) et sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Tout d'abord, la présence des deutériums en positions *bis*-allyliques du DHA permet de diminuer la toxicité associée à un traitement par le DHA en conditions oxydantes. Cette protection est également visible et va dans le même sens lorsque l'on étudie l'effet des deutériums sur l'inhibition de la peroxydation lipidique. Les DHA di- et tétra-deutérés permettent de diminuer progressivement la peroxydation lipidique induite par le DHA. Dans cet essai la toxicité et la peroxydation lipidique semble avoir un lien étroit et les résultats montrent l'intérêt de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques. Aucune diminution des CI_{50} n'est obtenue pour les analogues deutérés des série LA et ALA dans nos conditions. Pourtant une diminution de la peroxydation lipidique est observée pour ces deux composés, et suggère que la toxicité de ces AGPI et la peroxydation lipidique qu'ils engendrent ne sont sûrement pas proportionnellement liées. Finalement, l'effet bénéfique de l'incorporation des deutériums sur l'inhibition de la peroxydation lipidique est plus important après traitement par des AGPI deutérés comparés aux lipophénols deutérés. La toxicité induite par les AGPI mise en évidence suggère que les cellules sont plus sensibles à ces derniers, pouvant expliquer une influence plus importante de la modification apportée par l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques. Ce résultat est intéressant puisque, si la libération de l'acide gras deutéré à partir du lipophénol a lieu (clivage par des estérases cellulaires), celui-ci pourrait avoir un effet bénéfique sur l'inhibition de la peroxydation lipidique. De plus, l'activité anti-stress carbonyle des dérivés deutérés est conservée comparé au lipophénol lead. Il n'y a donc pas d'effet des deutériums sur la protection de la molécule contre le rétinol tout-*trans* suggérant que le piégeage de ce dernier n'est pas altéré. L'utilisation des lipophénols deutérés pourra donc permettre de conserver une activité anti-stress carbonyle tout en ayant la possibilité de limiter la peroxydation lipidique au sein des membranes cellulaires. Au vue des résultats précédents obtenus en présence des composés tétra deutérés sur la diminution de la toxicité et l'inhibition de peroxydation lipidique, le lipophénol phloroglucinol-*O*iPr-O-(6,6,9,9-D₄)-DHA sera préférentiellement choisit pour les tests biologiques à venir.

Finalement, l'évaluation des oxydations enzymatique et radicalaire des DHA deutérés préalablement synthétisés a été effectuée et comparée à celles du DHA naturel (**Schéma 129**). L'objectif été ainsi de mettre en évidence l'influence de l'incorporation des deutériums en positions *bis*-allyliques sur ces deux oxydations. Tout d'abord les résultats ont montré que la présence des deutériums en position 6 (di-deutééré) et 6/9 (tétra-deutééré) ne bloque pas l'oxydation enzymatique par la sLOX (lipoxygénase, issue de la graine de soja) des DHA deutérés en

PDX, sous-entendant qu'une métabolisation en NPD1 neuroprotecteur serait alors possible. Si la supplémentation des cellules rétiniennes avec le composé lead di- ou tétra-deutééré entraîne une libération des DHA deutérés, ils pourraient alors être oxydés de façon enzymatique par la 15-LOX pour former les NPD1 deutérés associés (pouvant présenter les mêmes propriétés neuroprotectrices que leur analogue non deutéré). Ensuite, la comparaison des métabolites formés lors de l'oxydation radicalaire initiée par l'AAPH des DHA naturel et deutérés a montré une diminution de la formation du biomarqueur 4-F_{4t}-NeuroP, obtenue après abstraction d'un hydrogène en position 6, et ce pour les DHA di- et tétra-deutééré. Cependant, la formation des métabolites 10- et 20-F_{4t}-NeuroPs a quant à elle été augmentée pour les DHA deutérés, suggérant que la présence des deutériums en position 6 favoriserait l'abstraction dans d'autres positions. Ainsi, sur ce modèle *in vitro* en l'absence de cellules, l'oxydation des DHA deutérés en 4-F_{4t}-NeuroPs est diminuée au profit de la formation d'autres métabolites (10- et 20-F_{4t}-NeuroP). Il est cependant probable qu'en milieu cellulaire la présence des deutériums sur les lipides insérés au sein de la double couche lipidique ait un effet différent et soit capable de stopper la propagation radicalaire lipidique. Cette étude nous permet néanmoins de valider l'action protectrice des deutériums vis à vis de la première étape d'abstraction du mécanisme de formation des métabolites oxydés des AGPI. Cela permet ainsi d'envisager ces DHA spécifiquement deutérés comme de potentiels outils biologiques et analytiques.

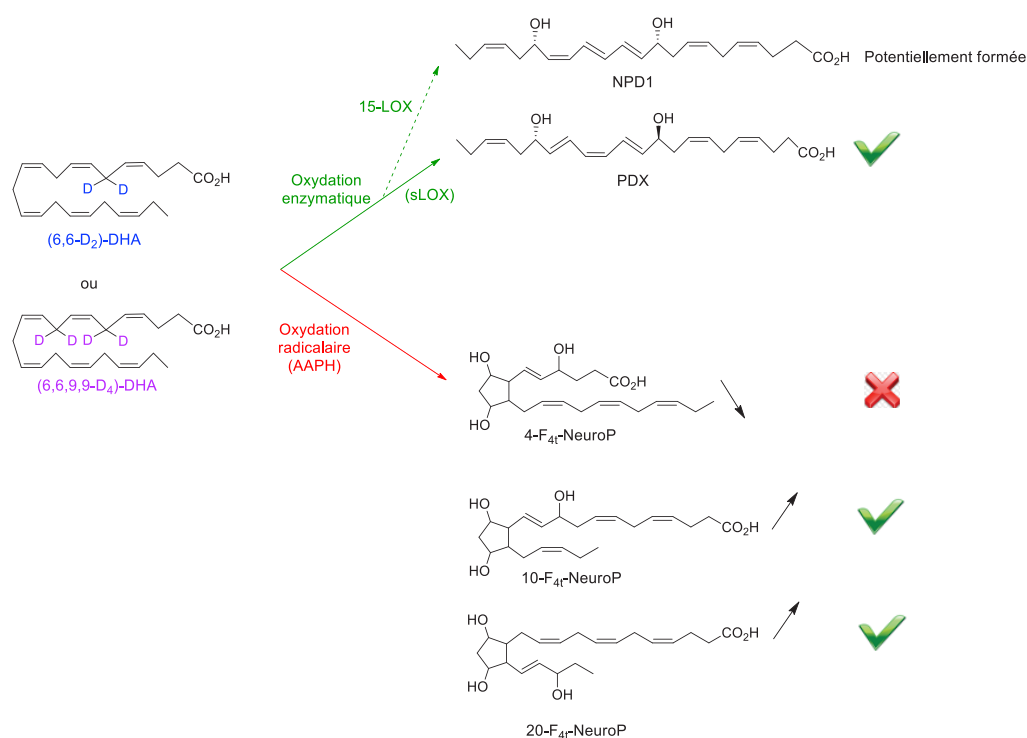


Schéma 129 : Oxydations enzymatique et radicalaire des DHA deutérés : métabolites formés et impactés.

En conclusion générale, la première synthèse de DHA deutérés en positions *bis*-allyliques et leur lipophénols associés a été effectuée. Leur évaluation biologique a permis de mettre en évidence l'influence de l'incorporation des deutériums sur la toxicité des DHA et sur la limitation de la peroxydation lipidique évaluée en condition de stress oxydant. De plus, l'activité anti-stress carbonylé contre le rétinol tout-*trans* impliqué dans la physiopathologie des maladies rétinienne n'est pas affectée par la présence des deutériums. Finalement, l'oxydation des DHA deutérés synthétisés a également été effectuée montrant un maintien de l'oxydation enzymatique et une diminution du métabolite issu de l'oxydation radicalaire impliquant une abstraction d'hydrogène sur les positions deutérées. Les perspectives envisagées de ce travail pourraient porter sur l'utilisation de différents DHA spécifiquement deutérés, afin d'étudier la formation et l'activité de différents métabolites de type F₄-NeuroP issus de l'oxydation radicalaire, au sein des cellules ARPE-19.

Références

1. Malinin, N. L.; West, X. Z.; Byzova, T. V., Oxidation as "the stress of life". *Aging* **2011**, 3 (9), 906.
2. Stargardt, K., Über familiäre, progressive degeneration in der maculagegend des auges. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **1909**, 71 (3), 534.
3. (a) Ben-Shabat, S.; Itagaki, Y.; Jockusch, S.; Sparrow, J. R.; Turro, N. J.; Nakanishi, K., Formation of a nonaoxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41 (5), 814; (b) Sparrow, J. R.; Gregory-Roberts, E.; Yamamoto, K.; Blonska, A.; Ghosh, S. K.; Ueda, K.; Zhou, J., The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **2012**, 31 (2), 121.
4. Crauste, C.; Vigor, C.; Brabet, P.; Picq, M.; Lagarde, M.; Hamel, C.; Durand, T.; Vercauteren, J., Synthesis and evaluation of polyunsaturated fatty acid-phenol conjugates as anti-carbonyl-stress lipophenols. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, (21), 4548.
5. German, O. L.; Agnolazza, D. L.; Politi, L. E.; Rotstein, N. P., Light, lipids and photoreceptor survival: live or let die? *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, 14 (9), 1737.
6. Bazan, N. G.; Calandria, J. M.; Serhan, C. N., Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *J. Lipid. Res.* **2010**, 51 (8), 2018.
7. (a) Hill, S.; Hirano, K.; Shmanai, V. V.; Marbois, B. N.; Vidovic, D.; Bekish, A. V.; Kay, B.; Tse, V.; Fine, J.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S., Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect yeast cells from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, 50 (1), 130; (b) Hill, S.; Lamberson, C. R.; Xu, L.; To, R.; Tsui, H. S.; Shmanai, V. V.; Bekish, A. V.; Awad, A. M.; Marbois, B. N.; Cantor, C. R.; Porter, N. A.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S., Small amounts of isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, 53 (4), 893; (c) Andreyev, A. Y.; Tsui, H. S.; Milne, G. L.; Shmanai, V. V.; Bekish, A. V.; Fomich, M. A.; Pham, M. N.; Nong, Y.; Murphy, A. N.; Clarke, C. F.; Shchepinov, M. S., Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect mitochondria from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 82, 63; (d) Berbee, J. F. P.; Mol, I. M.; Milne, G. L.; Pollock, E.; Hoeke, G.; Lutjohann, D.; Monaco, C.; Rensen, P. C. N.; van der Ploeg, L. H. T.; Shchepinov, M. S., Deuterium-reinforced polyunsaturated fatty acids protect against atherosclerosis by lowering lipid peroxidation and hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **2017**, 264, 100.
8. Commoner, B.; Townsend, J.; Pake, G. E., Free radicals in biological materials. *Nature* **1954**, 174 (4432), 689.
9. Ray, P. D.; Huang, B. W.; Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **2012**, 24 (5), 981.
10. Calabrese, E. J., Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. *Ageing Res. Rev.* **2008**, 7 (1), 8.
11. Forman, H. J.; Davies, K. J.; Ursini, F., How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 66, 24.
12. (a) Gerschman, R.; Gilbert, D. L.; Nye, S. W.; Dwyer, P.; Fenn, W. O., Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* **1954**, 119 (3097), 623; (b) Gerschman, R.; Gilbert, D. L.; Nye, S. W.; Fenn, W. O., Influence of x-irradiation on oxygen poisoning in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1954**, 86 (1), 27.
13. Harman, D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **1956**, 11 (3), 298.

14. B. Halliwell, J. M. C. G., *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press: Oxford, 1985.
15. Nathan, C.; Ding, A., SnapShot: reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell* **2010**, *140* (6), 951.
16. K. Krumova, G. C., Chapter 1 overview of reactive oxygen species. In *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1*, Chemistry, T. R. S. o., Ed. 2016.
17. Brown, G. C.; Borutaite, V., There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* **2012**, *12* (1), 1.
18. Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T., Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **2005**, *120* (4), 483.
19. Cadenas, E.; Davies, K. J., Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29* (3-4), 222.
20. Lambeth, J. D., NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4* (3), 181.
21. Zangar, R. C.; Davydov, D. R.; Verma, S., Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *199* (3), 316.
22. Berry, C. E.; Hare, J. M., Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **2004**, *555* (Pt 3), 589.
23. Kukreja, R. C.; Kontos, H. A.; Hess, M. L.; Ellis, E. F., Pgh synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of nadh or nadph. *Circ. Res.* **1986**, *59* (6), 61.
24. Roy, P.; Roy, S. K.; Mitra, A.; Kulkarni, A. P., Superoxide generation by lipoxygenase in the presence of nadh and nadph. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1994**, *1214* (2), 171.
25. Aikens, J.; Dix, T. A., Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (23), 15091.
26. F. Haber, J. W., The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Roy. Soc. London* **1934**, *147*, 332.
27. Fenton, H. J. H., Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.* **1894**, *65*, 899.
28. Kehrer, J. P., The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **2000**, *149* (1), 43.
29. Forstermann, U.; Sessa, W. C., Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart. J.* **2012**, *33* (7), 829.
30. Alam, M. N.; Bristi, N. J.; Rafiquzzaman, M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* **2013**, *21* (2), 143-52.
31. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280* (1), 1.
32. Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Aruoma, O. I., The characterization of antioxidants. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **1995**, *33* (7), 601.
33. (a) McCord, J. M.; Fridovich, I., The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243* (21), 5753; (b) McCord, J. M.; Keele, B. B., Jr.; Fridovich, I., An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *P Natl Acad Sci USA* **1971**, *68* (5), 1024.
34. Fukai, T.; Ushio-Fukai, M., Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15* (6), 1583.

35. Chelikani, P.; Fita, I.; Loewen, P. C., Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61* (2), 192.
36. Mills, G. C., Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* **1957**, *229* (1), 189.
37. Mills, G. C., Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *86*, 1.
38. May, J. M.; Mendiratta, S.; Hill, K. E.; Burk, R. F., Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (36), 22607.
39. Bentinger, M.; Brismar, K.; Dallner, G., The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* **2007**, *7 Suppl*, 41.
40. Kapitulnik, J., Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66* (4), 773.
41. Wongprayoon, P.; Govitrapong, P., Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *1*.
42. Lattanzio, V., Phenolic compounds: introduction. In *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*, Ramawat, K. G.; Mérillon, J.-M., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; p 1543.
43. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouysegu, L., Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (3), 586.
44. K. B. Pandey, S. I. R., Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* **2009**, *2* (5), 270.
45. Sailler, B.; Glombitza, K. W., Phloretols and fucophloretols from the brown alga *Cystophora retroflexa*. *Phytochemistry* **1999**, *50* (5), 869.
46. Wright, J. S.; Johnson, E. R.; 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.* **2001**, *123* (6), 1173.
47. Burton, G. W.; Ingold, K. U., Vitamin-E - application of the principles of physical organic-chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19* (7), 194.
48. Halliwell, B., Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *476* (2), 107.
49. Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E., Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* **1993**, *341* (8843), 454.
50. (a) Del Rio, D.; Costa, L. G.; Lean, M. E. J.; Crozier, A., Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *20* (1), 1; (b) Dangles, O., Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16* (6), 692.
51. Dangles, O.; Dufour, C.; Tonnelé, C.; Trouillas, P., *Recent advances in polyphenol research*. Wiley-Blackwell: 2017; Vol. 5.
52. Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I., Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31* (6), 435.
53. Forman, H. J.; Maiorino, M.; Ursini, F., The false dichotomy of antioxidant defense and redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, S8-S8.
54. Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P., Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2008**, *52*, 128.

55. Semchyshyn, H. M., Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. *Sci. World J.* **2014**.
56. Maillard, L. C., Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie methodique. *Compt. Rend.* **1912**, *154*, 66.
57. Hodge, J. E., Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J Agr Food Chem* **1953**, *1* (15), 928.
58. Grandhee, S. K.; Monnier, V. M., Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *The Journal of biological chemistry* **1991**, *266* (18), 11649-53.
59. Lopachin, R. M.; Gavin, T.; Decaprio, A.; Barber, D. S., Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant--target interactions. *Chemical research in toxicology* **2012**, *25* (2), 239-51.
60. Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G., Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Res* **2013**, *47*, 3-27.
61. Goldin, A.; Beckman, J. A.; Schmidt, A. M.; Creager, M. A., Advanced glycation end products - Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* **2006**, *114* (6), 597.
62. Dobretsov, G. E.; Borschevskaya, T. A.; Petrov, V. A.; Vladimirov, Y. A., Increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* **1977**, *84* (1), 125.
63. Butterfield, D. A.; Reed, T.; Sultana, R., Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* **2011**, *45* (1), 59.
64. Cookson, M. R.; Bandmann, O., Parkinson's disease: insights from pathways. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19* (R1), R21-7.
65. Spickett, C. M., The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 145.
66. Aldini, G.; Vistoli, G.; Stefek, M.; Chondrogianni, N.; Grune, T.; Sereikaite, J.; Sadowska-Bartosz, I.; Bartosz, G., Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycooxidation and advanced lipoxidation end products. *Free Radic. Res.* **2013**, *47 Suppl 1*, 93.
67. (a) Lo, C. Y.; Hsiao, W. T.; Chen, X. Y., Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids. *J. Food. Sci.* **2011**, *76* (3), 90; (b) Shao, X.; Bai, N.; He, K.; Ho, C. T.; Yang, C. S.; Sang, S., Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (10), 2042; (c) Sang, S.; Shao, X.; Bai, N.; Lo, C. Y.; Yang, C. S.; Ho, C. T., Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: a new trapping agent of reactive dicarbonyl species. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20* (12), 1862; (d) Wu, C. H.; Yen, G. C., Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53* (8), 3167.
68. Liu, H. Y.; Gu, L. W., Phlorotannins from brown algae (*fucus vesiculosus*) inhibited the formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyls. *J Agr Food Chem* **2012**, *60* (5), 1326.
69. Shao, X.; Chen, H. D.; Zhu, Y. D.; Sedighi, R.; Ho, C. T.; Sang, S. M., Essential structural requirements and additive effects for flavonoids to scavenge methylglyoxal. *J Agr Food Chem* **2014**, *62* (14), 3202.

70. Matsuda, H.; Wang, T.; Managi, H.; Yoshikawa, M., Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorgan Med Chem* **2003**, *11* (24), 5317.
71. Zhu, Q.; Zheng, Z. P.; Cheng, K. W.; Wu, J. J.; Zhang, S.; Tang, Y. S.; Sze, K. H.; Chen, J.; Chen, F.; Wang, M., Natural polyphenols as direct trapping agents of lipid peroxidation-derived acrolein and 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22* (10), 1721.
72. Zhu, Q.; Zhang, N. Q.; Lau, C. F.; Chao, J.; Sun, Z.; Chang, R. C.; Chen, F.; Wang, M., In vitro attenuation of acrolein-induced toxicity by phloretin, a phenolic compound from apple. *Food Chem.* **2012**, *135* (3), 1762.
73. Cia, D.; Cubizolle, A.; Crauste, C.; Jacquemot, N.; Guillou, L.; Vigor, C.; Angebault, C.; Hamel, C. P.; Vercauteren, J.; Brabet, P., Phloroglucinol protects retinal pigment epithelium and photoreceptor against all-trans-retinal-induced toxicity and inhibits A2E formation. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20* (9), 1651.
74. Gillery, P., Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus. *Ann. Biol. Clin.* **2006**, *64* (4), 309.
75. Mecklenburg, L.; Schraermeyer, U., An overview on the toxic morphological changes in the retinal pigment epithelium after systemic compound administration. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35* (2), 252.
76. (a) Tortora, G. J.; Reynolds Grabowski, S.; Derrickson, B., Principe d'anatomie et de physiologie. **2002**; (b) Silverthorn, D. U., *Physiologie humaine : une approche intégrée* 4ed.; Pearson Education: 2007.
77. (a) Osterberg, G., Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol.* **1935**, *11*; (b) Hargrave, P. A., Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42* (1), 3.
78. Wald, G., The molecular basis of visual excitation. *Nature* **1968**, *219* (5156), 800.
79. Kevany, B. M.; Palczewski, K., Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology* **2010**, *25* (1), 8.
80. Boulton, M.; Dayhaw-Barker, P., The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye* **2001**, *15* (Pt 3), 384.
81. Strauss, O., The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **2005**, *85* (3), 845.
82. . Polycopié national du collège des ophtalmologistes universitaires de France
Chapitre 6: La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) 2010, p. 51.
83. Kennedy, C. J.; Rakoczy, P. E.; Constable, I. J., Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye* **1995**, *9*, 763.
84. Simon, E. Participation des facteurs nutritionnels et environnementaux au vieillissement de la rétine et aux rétinopathies liées à l'âge. Université de Bourgogne, 2012.
85. Lu, L. J.; Liu, J.; Adelman, R. A., Novel therapeutics for Stargardt disease. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2017**, *255* (6), 1057.
86. Hamel, P. C., La maladie de Stargardt.
87. Noell, W. K.; Walker, V. S.; Kang, B. S.; Berman, S., Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1966**, *5* (5), 450.
88. Beatty, S.; Koh, H.; Phil, M.; Henson, D.; Boulton, M., The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **2000**, *45* (2), 115.

89. Maeda, A.; Maeda, T.; Golczak, M.; Chou, S.; Desai, A.; Hoppel, C. L.; Matsuyama, S.; Palczewski, K., Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (22), 15173.
90. Chen, Y.; Okano, K.; Maeda, T.; Chauhan, V.; Golczak, M.; Maeda, A.; Palczewski, K., Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (7), 5059.
91. Athanasiou, D.; Aguila, M.; Bevilacqua, D.; Novoselov, S. S.; Parfitt, D. A.; Cheetham, M. E., The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Lett.* **2013**, *587* (13), 2008.
92. Sparrow, J. R.; Wu, Y.; Kim, C. Y.; Zhou, J., Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *J. Lipid. Res.* **2010**, *51* (2), 247.
93. De, S.; Sakmar, T. P., Interaction of A2E with model membranes. Implications to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J. Gen. Physiol.* **2002**, *120* (2), 147.
94. Brunk, U. T.; Wihlmark, U.; Wrigstad, A.; Roberg, K.; Nilsson, S. E., Accumulation of lipofuscin within retinal pigment epithelial cells results in enhanced sensitivity to photo-oxidation. *Gerontology* **1995**, *41 Suppl 2*, 201.
95. Bonne, C.; Muller, A., Rôle du stress oxydant dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *J. Fr. Ophtalmol.* **2000**, *28* (8), 835.
96. Wu, Y. L.; Yanase, E.; Feng, X. D.; Siegel, M. M.; Sparrow, J. R., Structural characterization of bisretinoid A2E photocleavage products and implications for age-related macular degeneration. *P Natl Acad Sci USA* **2010**, *107* (16), 7275.
97. Liu, X.; Chen, J.; Liu, Z.; Li, J.; Yao, K.; Wu, Y., Potential therapeutic agents against retinal diseases caused by aberrant metabolism of retinoids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57* (3), 1017.
98. Taskintuna, I.; Elsayed, M. E.; Schatz, P., Update on clinical Trials in dry age-related macular degeneration. *Middle East. Afr. J. Ophthalmol.* **2016**, *23* (1), 13.
99. Wolf, G., Lipofuscin and macular degeneration. *Nutr. Rev.* **2003**, *61* (10), 342.
100. Golczak, M.; Kuksa, V.; Maeda, T.; Moise, A. R.; Palczewski, K., Positively charged retinoids are potent and selective inhibitors of the trans-cis isomerization in the retinoid (visual) cycle. *P Natl Acad Sci USA* **2005**, *102* (23), 8162.
101. Mata, N. L.; Lichter, J. B.; Vogel, R.; Han, Y.; Bui, T. V.; Singerman, L. J., Investigation of oral fenretinide for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Retina* **2013**, *33* (3), 498.
102. Zhang, J.; Kiser, P. D.; Badiee, M.; Palczewska, G.; Dong, Z.; Golczak, M.; Tochtrop, G. P.; Palczewski, K., Molecular pharmacodynamics of emixustat in protection against retinal degeneration. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125* (7), 2781.
103. Sparrow, J. R., Vitamin A-aldehyde adducts: AMD risk and targeted therapeutics. *P Natl Acad Sci USA* **2016**, *113* (17), 4564.
104. Liang, F. Q.; Green, L.; Wang, C.; Alssadi, R.; Godley, B. F., Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress. *Exp. Eye Res.* **2004**, *78* (6), 1069.
105. Tanito, M.; Masutani, H.; Nakamura, H.; Ohira, A.; Yodoi, J., Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43* (4), 1162.
106. Tanito, M.; Kwon, Y. W.; Kondo, N.; Bai, J.; Masutani, H.; Nakamura, H.; Fujii, J.; Ohira, A.; Yodoi, J., Cytoprotective effects of geranylgeranylacetone against retinal photooxidative damage. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (9), 2396.

107. Gao, X.; Talalay, P., Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (28), 10446.
108. Jang, Y. P.; Zhou, J.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R., Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81* (3), 529.
109. Laabich, A.; Manmoto, C. C.; Kuksa, V.; Leung, D. W.; Vissvesvaran, G. P.; Karliga, I.; Kamat, M.; Scott, I. L.; Fawzi, A.; Kubota, R., Protective effects of myricetin and related flavonols against A2E and light mediated-cell death in bovine retinal primary cell culture. *Exp. Eye Res.* **2007**, *85* (1), 154.
110. Kook, D.; Wolf, A. H.; Yu, A. L.; Neubauer, A. S.; Priglinger, S. G.; Kampik, A.; Welge-Lussen, U. C., The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49* (4), 1712.
111. King, R. E.; Kent, K. D.; Bomser, J. A., Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *151* (2), 143-9.
112. (a) Kim, S. R.; Nakanishi, K.; Itagaki, Y.; Sparrow, J. R., Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin. *Exp. Eye Res.* **2006**, *82* (5), 828; (b) Berg, J.; Lin, D., Lutein and zeaxanthin: An overview of metabolism and eye health. *Journal of Human Nutrition & Food Science* **2014**, *2* (4), 1048.
113. McCusker, M. M.; Durrani, K.; Payette, M. J.; Suchecki, J., An eye on nutrition: the role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clin. Dermatol.* **2016**, *34* (2), 276.
114. Fontaine, V.; Monteiro, E.; Brazhnikova, E.; Lesage, L.; Balducci, C.; Guibout, L.; Feraille, L.; Elena, P. P.; Sahel, J. A.; Veillet, S.; Lafont, R., Norbixin protects retinal pigmented epithelium cells and photoreceptors against A2E-mediated phototoxicity in vitro and in vivo. *PloS one* **2016**, *11* (12), e0167793.
115. Wu, Y.; Zhou, J.; Fishkin, N.; Rittmann, B. E.; Sparrow, J. R., Enzymatic degradation of A2E, a retinal pigment epithelial lipofuscin bisretinoid. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (4), 849.
116. Bahadorani, S.; Singer, M., Recent advances in the management and understanding of macular degeneration. *F1000Research* **2017**, *6*, 519.
117. Jaffe, G. J.; Schmitz-Valckenberg, S.; Boyer, D.; Heier, J.; Wolf-Schnurrbusch, U.; Staurenghi, G.; Schmidt-Erfurth, U.; Holz, F. G., Randomized trial to evaluate tandoespiron in geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration: the GATE study. *Am. J. Ophthalmol.* **2015**, *160* (6), 1226.
118. Tang, Z.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhang, D.; Shen, B.; Luo, M.; Gu, P., Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. *J. Transl. Med.* **2017**, *15* (1), 99.
119. Crauste, C.; Rosell, M.; Durand, T.; Vercauteren, J., Omega-3 polyunsaturated lipophenols, how and why? *Biochimie* **2016**, *120*, 62.
120. (a) Vercauteren, J. Compositions de dérivés polyphénoliques stilbeniques et leurs applications pour lutter contre les pathologies et le vieillissement des organismes vivants 2008; (b) Viskupicova, J.; Danihelova, M.; Ondrejovic, M.; Liptaj, T.; Sturdik, E., Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. *Food Chem.* **2010**, *123* (1), 45; (c) Kampa, M.; Theodoropoulou, K.; Mavromati, F.; Pelekanou, V.; Notas, G.; Lagoudaki, E. D.; Nifli, A. P.; Morel-Salmi, C.; Stathopoulos, E. N.; Vercauteren, J.; Castanas, E., Novel oligomeric proanthocyanidin derivatives interact with membrane androgen sites and induce regression of hormone-independent prostate cancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *337* (1), 24.

121. (a) Siriwardhana, N.; Kalupahana, N. S.; Moustaid-Moussa, N., Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv. Food. Nutr. Res.* **2012**, *65*, 211; (b) Vanden Heuvel, J. P., Nutrigenomics and nutrigenetics of omega3 polyunsaturated fatty acids. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2012**, *108*, 75.
122. Bazinet, R. P.; Laye, S., Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15* (12), 771.
123. (a) Huang, B. X.; Dass, C.; Kim, H. Y., Probing conformational changes of human serum albumin due to unsaturated fatty acid binding by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Biochem. J.* **2005**, *387* (3), 695; (b) Petitpas, I.; Grune, T.; Bhattacharya, A. A.; Curry, S., Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314* (5), 955.
124. Suh, M.; Wierzbicki, A. A.; Lien, E.; Clandinin, M. T., Relationship between dietary supply of long-chain fatty acids and membrane composition of long- and very long chain essential fatty acids in developing rat photoreceptors. *Lipids* **1996**, *31* (1), 61.
125. Mbatia, B.; Kaki, S. S.; Mattiasson, B.; Mula, F.; Adlercreutz, P., Enzymatic synthesis of lipophilic rutin and vanillyl esters from fish byproducts. *J. Agric. Food. Chem.* **2011**, *59* (13), 7021.
126. (a) Laguerre, M.; Decker, E. A.; Lecomte, J.; Villeneuve, P., Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2010**, *13* (5), 518; (b) Pinchuk, I.; Shoval, H.; Dotan, Y.; Lichtenberg, D., Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165* (6), 638.
127. Mainini, F.; Contini, A.; Nava, D.; Corsetto, P. A.; Rizzo, A. M.; Agradi, E.; Pini, E., Synthesis, molecular characterization and preliminary antioxidant activity evaluation of quercetin fatty esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90* (11), 1751.
128. Grotto, D.; Santa Maria, L.; Valentini, J.; Paniz, C.; Schmitt, G.; Garcia, S. C., Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova* **2009**, *32* (1), 169.
129. (a) Ziaullah; Bhullar, K. S.; Warnakulasuriya, S. N.; Rupasinghe, H. P. V., Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant capacity and tyrosinase inhibition activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin. *Bioorgan Med Chem* **2013**, *21* (3), 684; (b) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239* (1), 70.
130. (a) Cefarelli, G.; D'Abrosca, B.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Monaco, P., Isolation, characterization, and antioxidant activity of E- and Z-p-coumaroyl fatty acid esters from cv. Annurca apple fruits. *J Agr Food Chem* **2005**, *53* (9), 3525; (b) Yamauchi, R.; Goto, Y.; Kato, K.; Ueno, Y., Prooxidant effect of dihydroxyacetone and reducing sugars on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48* (4), 843.
131. Mohamed, Y. M.; Vik, A.; Hofer, T.; Andersen, J. H.; Hansen, T. V., Polyunsaturated fatty acid-derived chromones exhibiting potent antioxidant activity. *Chem. Phys. Lipids* **2013**, *170*, 41-5.
132. (a) Zhong, Y.; Shahidi, F., Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants. *J Agr Food Chem* **2011**, *59* (12), 6526; (b) Sabally, K.; Karboune, S.; St-Louis, R.; Kermasha, S., Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. *J. Biotechnol.* **2006**, *127* (1), 167.
133. Vauzour, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Corona, G.; Oruna-Concha, M. J.; Spencer, J. P., Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* **2010**, *2* (11), 1106.

134. (a) Kang, K. A.; Lee, K. H.; Chae, S.; Zhang, R.; Jung, M. S.; Ham, Y. M.; Baik, J. S.; Lee, N. H.; Hyun, J. W., Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *97* (3), 609; (b) Kim, M. M.; Kim, S. K., Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2010**, *48* (10), 2925; (c) Kim, H. S.; Lee, K.; Kang, K. A.; Lee, N. H.; Hyun, J. W.; Kim, H. S., Phloroglucinol exerts protective effects against oxidative stress-induced cell damage in SH-SY5Y cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2012**, *119* (2), 186; (d) Kang, K. A.; Zhang, R.; Chae, S.; Lee, S. J.; Kim, J.; Kim, J.; Jeong, J.; Lee, J.; Shin, T.; Lee, N. H.; Hyun, J. W., Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) protects against ionizing radiation-induced cell damage through inhibition of oxidative stress in vitro and in vivo. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *185* (3), 215; (e) Queguineur, B.; Goya, L.; Ramos, S.; Martin, M. A.; Mateos, R.; Bravo, L., Phloroglucinol: antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2012**, *50* (8), 2886.
135. (a) Yang, E. J.; Ahn, S.; Ryu, J.; Choi, M. S.; Choi, S.; Chong, Y. H.; Hyun, J. W.; Chang, M. J.; Kim, H. S., Phloroglucinol attenuates the cognitive deficits of the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one* **2015**, *10* (8), e0135686; (b) Ryu, J.; Zhang, R.; Hong, B. H.; Yang, E. J.; Kang, K. A.; Choi, M.; Kim, K. C.; Noh, S. J.; Kim, H. S.; Lee, N. H.; Hyun, J. W.; Kim, H. S., Phloroglucinol attenuates motor functional deficits in an animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. *PLoS one* **2013**, *8* (8), e71178.
136. Liu, Y.; Liu, G. M.; Cao, M. J.; Chen, Q.; Sun, L.; Ji, B., Potential Retinal Benefits of Dietary Polyphenols Based on Their Permeability across the Blood-Retinal Barrier. *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *65* (15), 3179.
137. Parish, C. A.; Hashimoto, M.; Nakanishi, K.; Dillon, J.; Sparrow, J., Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *P Natl Acad Sci USA* **1998**, *95* (25), 14609.
138. (a) Vercauteren, J., *PCT/IB2008/054818*, 2008; (b) Vercauteren, J., *PCT/IB2008/054814*, 2008; (c) Viskupicova, J.; Danihelova, M.; Majekova, M.; Liptaj, T.; Sturdik, E., Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: a quantum-chemical QSAR analysis. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *27* (6), 800.
139. Georgiou, T.; Neokleous, A.; Despina, N.; Sears, B., Pilot study for treating dry age-related macular degeneration (AMD) with high-dose omega-3 fatty acids. *PharmaNutrition* **2014**, *2* (1), 1-8.
140. Lefevre, E.; Toft-Kehler, A. K.; Vohra, R.; Kolko, M.; Moons, L.; Van Hove, I., Mitochondrial dysfunction underlying outer retinal diseases. *Mitochondrion* **2017**, In press, corrected proof.
141. Tuo, J.; Ross, R. J.; Herzlich, A. A.; Shen, D.; Ding, X.; Zhou, M.; Coon, S. L.; Hussein, N.; Salem, N., Jr.; Chan, C. C., A high omega-3 fatty acid diet reduces retinal lesions in a murine model of macular degeneration. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175* (2), 799.
142. Johnson, E. J.; Schaefer, E. J., Potential role of dietary n-3 fatty acids in the prevention of dementia and macular degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83* (6 Suppl), 1494.
143. Yavin, E.; Brand, A.; Green, P., Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress. *Nutr. Neurosci.* **2002**, *5* (3), 149.
144. Lluís, L.; Taltavull, N.; Muñoz-Cortés, M.; Sánchez-Martos, V.; Romeu, M.; Giralt, M.; Molinar-Toribio, E.; Torres, J. L.; Pérez-Jiménez, J.; Pazos, M.; Méndez, L.; Gallardo, J. M.; Medina, I.; Nogues, M. R., Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic

acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 140.

145. Hong, S.; Gronert, K.; Devchand, P. R.; Moussignac, R. L.; Serhan, C. N., Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (17), 14677.

146. Balas, L.; Guichardant, M.; Durand, T.; Lagarde, M., Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie* **2014**, *99*, 1.

147. Bazan, N. G., Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol.* **2005**, *15* (2), 159.

148. Bannenberg, G. L.; Chiang, N.; Ariel, A.; Arita, M.; Tjonahen, E.; Gotlinger, K. H.; Hong, S.; Serhan, C. N., Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* **2005**, *174* (7), 4345.

149. Kuda, O., Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid. *Biochimie* **2017**, *136*, 12.

150. Mukherjee, P. K.; Marcheselli, V. L.; Barreiro, S.; Hu, J.; Bok, D.; Bazan, N. G., Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2007**, *104* (32), 13152.

151. Mukherjee, P. K.; Marcheselli, V. L.; Serhan, C. N.; Bazan, N. G., Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *P Natl Acad Sci USA* **2004**, *101* (22), 8491.

152. Kanan, Y.; Gordon, W. C.; Mukherjee, P. K.; Bazan, N. G.; Al-Ubaidi, M. R., Neuroprotectin D1 is synthesized in the cone photoreceptor cell line 661W and elicits protection against light-induced stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2015**, *35* (2), 197.

153. Bazan, N. G., Neurotrophins induce neuroprotective signaling in the retinal pigment epithelial cell by activating the synthesis of the anti-inflammatory and anti-apoptotic neuroprotectin D1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *613*, 39.

154. Dai, Y. N.; Zhao, C.; Liang, X. F.; Dai, R. P.; Dong, F. T., Protectin DX, a double lipoxygenase product from DHA, inhibits the production of both inflammatory cytokines and reactive oxygen species in human retinal pigment epithelium cells. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **2015**, *117* (8), 1138-1145.

155. Galano, J. M.; Mas, E.; Barden, A.; Mori, T. A.; Signorini, C.; De Felice, C.; Barrett, A.; Opere, C.; Pinot, E.; Schwedhelm, E.; Benndorf, R.; Roy, J.; Le Guennec, J. Y.; Oger, C.; Durand, T., Isoprostanes and neuroprostanes: Total synthesis, biological activity and biomarkers of oxidative stress in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2013**, *107*, 95.

156. Roy, J.; Le Guennec, J. Y.; Galano, J. M.; Thireau, J.; Bultel-Ponce, V.; Demion, M.; Oger, C.; Lee, J. C. Y.; Durand, T., Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acid: Bioactive drugs? *Biochimie* **2016**, *120*, 56.

157. Musiek, E. S.; Brooks, J. D.; Joo, M.; Brunoldi, E.; Porta, A.; Zanoni, G.; Vidari, G.; Blackwell, T. S.; Montine, T. J.; Milne, G. L.; McLaughlin, B.; Morrow, J. D., Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (29), 19927.

158. Bultel-Ponce, V.; Durand, T.; Guy, A.; Oger, C.; Galano, J. M., Non enzymatic metabolites of polyunsaturated fatty acids: friend or foe. *Ocl Oils Fat Crop Li* **2016**, *23* (1).

159. Roy, J.; Oger, C.; Thireau, J.; Roussel, J.; Mercier-Touzot, O.; Faure, D.; Pinot, E.; Farah, C.; Taber, D. F.; Cristol, J. P.; Lee, J. C.; Lacampagne, A.; Galano, J. M.; Durand, T.; Le Guennec, J. Y.,

Nonenzymatic lipid mediators, neuroprostanes, exert the antiarrhythmic properties of docosahexaenoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *86*, 269.

160. Guennec, J. Y. L.; Galano, J. M.; Oger, C.; al., e. Methods and pharmaceutical composition for the treatment and prevention of cardiac arrhythmias. 2012.

161. Long, E. K.; Picklo, M. J., Sr., Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49* (1), 1.

162. Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G., Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.* **2013**, *47*, 3.

163. Choudhary, S.; Xiao, T.; Srivastava, S.; Zhang, W.; Chan, L. L.; Vergara, L. A.; Van Kuijk, F. J.; Ansari, N. H., Toxicity and detoxification of lipid-derived aldehydes in cultured retinal pigmented epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204* (2), 122.

164. Ishikado, A.; Morino, K.; Nishio, Y.; Nakagawa, F.; Mukose, A.; Sono, Y.; Yoshioka, N.; Kondo, K.; Sekine, O.; Yoshizaki, T.; Ugi, S.; Uzu, T.; Kawai, H.; Makino, T.; Okamura, T.; Yamamoto, M.; Kashiwagi, A.; Maegawa, H., 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. *PLoS one* **2013**, *8* (7).

165. Hollyfield, J. G., Age-related macular degeneration: the molecular link between oxidative damage, tissue-specific inflammation and outer retinal disease: the Proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51* (3), 1275.

166. Gu, X.; Meer, S. G.; Miyagi, M.; Rayborn, M. E.; Hollyfield, J. G.; Crabb, J. W.; Salomon, R. G., Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (43), 42027.

167. (a) Gugiu, B. G.; Mesaros, C. A.; Sun, M.; Gu, X.; Crabb, J. W.; Salomon, R. G., Identification of oxidatively truncated ethanolamine phospholipids in retina and their generation from polyunsaturated phosphatidylethanolamines. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19* (2), 262; (b) Schneider, C.; Tallman, K. A.; Porter, N. A.; Brash, A. R., Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of non-enzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (34), 32392.

168. Shchepinov, M. S., Reactive oxygen species, isotope effect, essential nutrients, and enhanced longevity. *Rejuven Res* **2007**, *10* (1), 47-59.

169. Park, H.; Girdaukas, G. G.; Northrop, D. B., Effect of pressure on a heavy-atom isotope effect of yeast alcohol dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 1868.

170. Lamberson, C. R.; Xu, L. B.; Porter, N. A., Unusual kinetic isotope effects of deuterium reinforced polyunsaturated fatty acids in tocopherol-mediated free radical chain oxidations. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *76*, 141.

171. Tikhonov, I. V.; Moskalenko, I. V.; Pliss, E. M.; Fomich, M. A.; Bekish, A. V.; Shmanai, V. V., Kinetic isotope H/D effect in the oxidation of ethers of linoleic acid in solutions. *Russ. J. Phys. Chem. B.* **2017**, *11* (3), 395.

172. Drummen, G. P.; van Liebergen, L. C.; Op den Kamp, J. A.; Post, J. A., C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free radical biology & medicine* **2002**, *33* (4), 473-90.

173. Tulloch, A. P., Synthesis of deuterium and C-13 labeled lipids. *Chem. Phys. Lipids.* **1979**, *24* (4), 391.

174. Tulloch, A. P., Synthesis, analysis and application of specifically deuterated lipids. *Prog. Lipid Res.* **1983**, *22* (4), 235.

175. Rakoff, H., Preparation of fatty-acids and esters containing deuterium. *Prog. Lipid Res.* **1983**, *21*, 225.
176. Yang, J., Deuterium discovery and applications in organic chemistry. Elsevier, Ed. 2016.
177. Heinz, E.; Tulloch, A. P.; Spencer, J. F. T., Stereospecific hydroxylation of long chain compounds by a species of torulopsis. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (4), 882.
178. Maegawa, T.; Fujiwara, Y.; Inagaki, Y.; Monguchi, Y.; Sajiki, H., A Convenient and Effective Method for the Regioselective Deuteration of Alcohols. *Adv Synth Catal* **2008**, *350* (14-15), 2215-2218.
179. Chatterjee, B.; Gunanathan, C., Ruthenium catalyzed selective alpha- and alpha,beta-deuteration of alcohols using D₂O. *Org. Lett.* **2015**, *17* (19), 4794.
180. Zhang, L.; Nguyen, D. H.; Raffa, G.; Desset, S.; Paul, S.; Dumeignil, F.; Gauvin, R. M., Efficient deuterium labelling of alcohols in deuterated water catalyzed by ruthenium pincer complexes. *Catal. Commun.* **2016**, *84*, 67.
181. Zhou, J. R.; Hartwig, J. F., Iridium-catalyzed H/D exchange at vinyl groups without olefin isomerization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (31), 5783.
182. Corberan, R.; Sanau, M.; Peris, E., Highly stable Cp*-Ir(III) complexes with N-heterocyclic carbene ligands as C-H activation catalysts for the deuteration of organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (12), 3974.
183. Perez, F.; Ren, Y. J.; Boddaert, T.; Rodriguez, J.; Coquerel, Y., Stable N-heterocyclic carbene organocatalyst for hydrogen/deuterium exchange reactions between pseudoacids and deuterated chloroform. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (2), 1092.
184. (a) Rakoff, H., Synthesis of methyl 11,14,17-eicosatrienoate-3,3,4,4,8,8,9,9-D(8). *Lipids* **1993**, *28* (3), 231; (b) Viala, J.; Labaudiniere, R., Synthesis of a regioselectively hexadeuterated linoleic-acid. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (5), 1280.
185. Marron, B. E.; Spanevello, R. A.; Elisseou, M. E.; Serhan, C. N.; Nicolaou, K. C., Synthesis of 19,19,20,20,20-pentadeuteriolipoxin-A4 methyl-ester and 19,19,20,20,20-pentadeuterioarachidonic acid - agents for use in the quantitative detection of naturally-occurring eicosanoids. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (23), 5522.
186. Rakoff, H., Preparation of methyl 11,14,17-eicosatrienoate-8,8,9,9-D₄ and methyl 8,11,14,17-eicosatetraenoate-8,9-D₂. *Lipids* **1991**, *26* (4), 301.
187. d'Ippolito, G.; Romano, G.; Caruso, T.; Spinella, A.; Cimino, G.; Fontana, A., Production of octadienal in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Org. Lett.* **2003**, *5* (6), 885.
188. Oger, C.; Bultel-Ponce, V.; Guy, A.; Balas, L.; Rossi, J. C.; Durand, T.; Galano, J. M., The handy use of Brown's P₂-Ni catalyst for a skipped diyne deuteration: application to the synthesis of a [D-4]-labeled F-4t-Neuroprostane. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (47), 13976.
189. Svatos, A.; Attygalle, A. B.; Meinwald, J., Synthesis of deuterium-labeled polyunsaturated fatty-acids. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (51), 9497.
190. Brown, H. C.; Murray, K. J., Protonolysis and deuterolysis of tri-2-norbornylborane-evidence for retention of configuration in protonolysis of organoboranes. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (2), 631.
191. (a) Maharvi, G. M.; Edwards, A. O.; Fauq, A. H., Chemical synthesis of deuterium-labeled and unlabeled very long chain polyunsaturated fatty acids. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (49), 6426; (b) Westerman, P. W.; Ghayeb, N., Synthesis of esters of tetradecanoic acid deuterated at the penultimate carbon - some general procedures for the synthesis of selectively deuterated fatty-acids. *Chem. Phys. Lipids* **1982**, *30* (4), 381; (c) Tulloch, A. P., Synthesis of [11-H-2(2)], [8-H-2(2)], [7-

- H-2(2)],[6-H-2(2)],[5-H-2(2)][4-H-2(2)] and [3-H-2(2)] cis-9-octadecenoates. *Chem. Phys. Lipids*. **1979**, 25 (3), 225.
192. Peng, S.; Okeley, N. M.; Tsai, A. L.; Wu, G.; Kulmacz, R. J.; van der Donk, W. A., Synthesis of isotopically labeled arachidonic acids to probe the reaction mechanism of prostaglandin H synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (36), 10785.
193. Oger, C.; Balas, L.; Durand, T.; Galano, J. M., Are alkyne reductions chemo-, regio-, and stereoselective enough to provide pure (Z)-olefins in polyfunctionalized bioactive molecules? *Chem. Rev.* **2013**, 113 (3), 1313.
194. Yan, M.; Jin, T.; Ishikawa, Y.; Minato, T.; Fujita, T.; Chen, L. Y.; Bao, M.; Asao, N.; Chen, M. W.; Yamamoto, Y., Nanoporous gold catalyst for highly selective semihydrogenation of alkynes: remarkable effect of amine additives. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (42), 17536.
195. Isabelle, M. E.; Leitch, L. C., Organic deuterium compounds .19. Synthesis of some deuterated lauric acids and their methyl esters. *Can. J. Chem.* **1958**, 36 (3), 440.
196. Szostak, M.; Spain, M.; Procter, D. J., Selective Synthesis of alpha,alpha-Dideuterio Alcohols by the Reduction of Carboxylic Acids Using SmI₂ and D₂O as Deuterium Source under SET Conditions. *Org. Lett.* **2014**, 16 (19), 5052.
197. (a) Concellon, J. M.; Rodriguez-Solla, H., Sequential elimination-reduction reactions promoted by samarium diiodide: Synthesis of 2,3-dideuterioesters or -amides. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7 (19), 4266; (b) Concellon, J. M.; Rodriguez-Solla, H., Synthesis of different deuterated carboxylic acids from unsaturated acids promoted by samarium diiodide and D₂O. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (19), 4493.
198. (a) Crombie, L.; Heavers, A. D., Synthesis of linoleic-acid with chiral isotopic labeling at a flanking and a medial allylic methylene - the (8r,9z,12z)-[8-H-2] and (11r,9z,12z)-[11-H-2]-stereoisomers, and (Z)-[2,2-(H-2)₂]non-3-enal. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1* **1992**, (15), 1929; (b) Hooz, J.; Gunn, D. M., Reaction of organoboranes with diazo esters and diazo ketones in presence of deuterium oxide. A new synthesis of alpha-deuterio- and alpha,alpha-dideuterio esters and ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (22), 6195.
199. Graff, G.; Szczepan, P.; Klein, P. D.; Chipault, J. R.; Holman, R. T., Identification and characterization of fully deuterated Fatty acids isolated from *scenedesmus-obliquus* cultured in deuterium oxide. *Lipids* **1970**, 5 (9), 786.
200. de Ghellinck, A.; Schaller, H.; Laux, V.; Haertlein, M.; Sferrazza, M.; Marechal, E.; Wacklin, H.; Jouhet, J.; Fragneto, G., Production and analysis of perdeuterated lipids from *pichia pastoris* cells. *Plos. One* **2014**, 9 (4).
201. Breil, C.; Vian, M. A.; Zemb, T.; Kunz, W.; Chemat, F., "bligh and dyer" and folch methods for solid-liquid-liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18 (4).
202. (a) Baenziger, J. E.; Smith, I. C. P.; Hill, R. J., Biosynthesis of a specifically deuterated diunsaturated fatty-Acid (18-2-Delta-6,9) for H-2 Nmr membrane studies. *Biochemistry-U.S.* **1987**, 26 (25), 8405; (b) Baenziger, J. E.; Smith, I. C. P.; Hill, R. J., Biosynthesis and characterization of a series of deuterated cis,cis-octadeca-6,9-dienoic acids. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, 54 (1), 17.
203. Fomich, M. A.; Bekish, A. V.; Vidovic, D.; Lamberson, C. R.; Lysenko, I. L.; Lawrence, P.; Brenna, J. T.; Sharko, O. L.; Shmanai, V. V.; Shchepinov, M. S., Full Library of (Bis-allyl)-deuterated arachidonic acids: synthesis and analytical verification. *Chemistryselect* **2016**, 1 (15), 4758.
204. Tucker, W. P.; Tove, S. B.; Kepler, C. R., Synthesis of 11,11-dideuterooleic acid. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1971**, 7 (2), 137.

205. Jakobsen, M. G.; Vik, A.; Hansen, T. V., Concise syntheses of three omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (44), 5837.
206. (a) Guil-Guerrero, J. L.; Loez-Martinez, J. C.; Rincon-Cervera, M. A.; Campra-Madrid, P., One-step extraction and concentration of polyunsaturated fatty acids from fish liver. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2007**, *84* (4), 357; (b) Gamez-Meza, N.; Noriega-Rodriguez, J. A.; Medina-Juarez, L. A.; Ortega-Garcia, J.; Monroy-Rivera, J.; Toro-Vazquez, F. J.; Garcia, H. S.; Angulo-Guerrero, O., Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Res Int* **2003**, *36* (7), 721-727; (c) Medina, A. R.; Gimenez, A. G.; Camacho, F. G.; Perez, J. A. S.; Grima, E. M.; Gomez, A. C., Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod-Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis-Galbana*. *J Am Oil Chem Soc* **1995**, *72* (5), 575-583.
207. alimentarius, c. d. c., **2015**.
208. Itoh, T.; Murota, I.; Yoshikai, K.; Yamada, S.; Yamamoto, K., Synthesis of docosahexaenoic acid derivatives designed as novel PPAR gamma agonists and antidiabetic agents. *Bioorgan Med Chem* **2006**, *14* (1), 98.
209. Langseter, A. M.; Stenstrom, Y.; Skattebol, L., Synthesis of all-Z-1,6,9,12,15-octadecapenten-3-one, a vinyl ketone polyunsaturated marine natural product isolated from *Callyspongia* sp. *Molecules* **2014**, *19* (3), 3804.
210. Holmeide, A. K.; Skattebol, L., Syntheses of some polyunsaturated trifluoromethyl ketones as potential phospholipase A(2) inhibitors. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1* **2000**, (14), 2271.
211. Wang, R.; He, A.; Ramu, E.; Falck, J. R., Studies towards asymmetric synthesis of 4(S)-11-dihydroxydocosahexaenoic acid (diHDHA) featuring cross-coupling of chiral stannane under mild conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (6), 1624.
212. Nicolaou, K. C.; Adsool, V. A.; Hale, C. R. H., An expedient procedure for the oxidative cleavage of olefinic bonds with PhI(OAc)(2), NMO, and catalytic OsO4. *Org. Lett.* **2010**, *12* (7), 1552.
213. Padhi, S. K.; Chadha, A., Sodium borohydride reduction and selective transesterification of beta-keto esters in a one-pot reaction under mild conditions. *Synlett* **2003**, (5), 639.
214. Cannon, J. S.; Kirsch, S. F.; Overman, L. E.; Sneddon, H. F., Mechanism of the cobalt oxazoline palladacycle (COP)-catalyzed asymmetric synthesis of allylic esters. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (43), 15192.
215. Louvel, J.; Botuha, C.; Chemla, F.; Demont, E.; Ferreira, F.; Perez-Luna, A., Asymmetric total synthesis of (+)-6-epi-castanospermine by the stereoselective formation of a syn,anti acetylenic 2-Amino-1,3-diol stereotriad. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, (15), 2921.
216. Dayaker, G.; Durand, T.; Balas, L., A versatile and stereocontrolled total synthesis of dihydroxylated docosatrienes containing a conjugated E,E,Z-triene. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (10), 2879.
217. Rej, R. K.; Nanda, S., Chemoenzymatic asymmetric total synthesis of nonanolide (Z)-cytospolides D, E and their stereoisomers. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, (4), 860.
218. de la Torre, A.; Lee, Y. Y.; Mazzoni, A.; Guy, A.; Bultel-Ponce, V.; Durand, T.; Oger, C.; Lee, J. C. Y.; Galano, J. M., Total syntheses and in vivo quantitation of novel neurofuran and dihomoisofuran derived from docosahexaenoic acid and adrenic Acid. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (6), 2442.
219. Brown, C. A.; Ahuja, V. K., P-2-nickel catalyst with ethylenediamine, a novel system for highly stereospecific reduction of alkynes to cis-olefins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, (15), 553.

220. Guy, A.; Oger, C.; Heppekaussen, J.; Signorini, C.; De Felice, C.; Furstner, A.; Durand, T.; Galano, J. M., Oxygenated metabolites of n-3 polyunsaturated fatty acids as potential oxidative stress biomarkers: total synthesis of 8-F3t-IsoP, 10-F4t-NeuroP and [D4]-10-F4t-NeuroP. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (21), 6374.
221. Yadav, J. S.; Sengupta, S., The formal total synthesis of FR252921 - an immunosuppressant. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, (2), 376.
222. Kang, B.; Britton, R., A general method for the synthesis of nonracemic trans-epoxides: Concise syntheses of trans-epoxide-containing insect sex pheromones. *Org. Lett.* **2007**, *9* (24), 5083.
223. Mori, K.; Ebata, T., Pheromone synthesis .86. syntheses of optically-active pheromones with an epoxy ring, (+)-disparlure and both the enantiomers of (3z,6z)-cis-9,10-epoxy-3,6-heneicosadiene. *Tetrahedron* **1986**, *42* (13), 3471.
224. Sandri, J.; Viala, J., Syntheses of All-(Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and all-(Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid from (Z)-1,1,6,6-tetraisopropoxy-2-hexene. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (20), 6627.
225. Dunn, K. C.; Aotaki-Keen, A. E.; Putkey, F. R.; Hjelmeland, L. M., ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.* **1996**, *62* (2), 155.
226. Knott, E. J.; Gordon, W. C.; Bazan, N. G., Docosahexaenoic Acid pretreatment protects ARPE-19 cells from subsequent oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 4432.
227. Nakanishi, A.; Wada, Y.; Kitagishi, Y.; Matsuda, S., Link between PI3K/AKT/PTEN pathway and NOX proteinin diseases. *Aging Dis.* **2014**, *5* (3), 203.
228. Fang, I. M.; Yang, C. H.; Yang, C. M., Docosahexaenoic acid reduces linoleic acid induced monocyte chemoattractant protein-1 expression via PPARgamma and nuclear factor-kappaB pathway in retinal pigment epithelial cells. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2014**, *58* (10), 2053.
229. Johansson, I.; Monsen, V. T.; Pettersen, K.; Mildenerger, J.; Misund, K.; Kaarniranta, K.; Schonberg, S.; Bjorkoy, G., The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells. *Autophagy* **2015**, *11* (9), 1636.
230. Pasovic, L.; Eidet, J. R.; Lyberg, T.; Messelt, E. B.; Aabel, P.; Utheim, T. P., Antioxidants improve the viability of stored adult retinal pigment epithelial-19 cultures. *Ophthalmol. Ther.* **2014**, *3* (1-2), 49.
231. Liu, Y.; Zhang, D.; Wu, Y.; Ji, B., Docosahexaenoic acid aggravates photooxidative damage in retinal pigment epithelial cells via lipid peroxidation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2014**, *140*, 85.
232. Oger, C. Synthèse totale de neuroprostanes de type F, dérivées du DHA, de l'EPA et de l'Ada. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 2010.
233. (a) Vigor, C.; Bertrand-Michel, J.; Pinot, E.; Oger, C.; Vercauteren, J.; Le Faouder, P.; Galano, J. M.; Lee, J. C.; Durand, T., Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *964*, 65; (b) Joumard-Cubizolles, L.; Lee, J. C.-Y.; Vigor, C.; Leung, H. H.; Bertrand-Michel, J.; Galano, J.-M.; Mazur, A.; Durand, T.; Gladine, C., Insight into the contribution of isoprostanoïds to the health effects of omega 3 PUFAs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2017**, In press, corrected proof.
234. Wang, Z.; Ciabattini, G.; Creminon, C.; Lawson, J.; Fitzgerald, G. A.; Patrono, C.; Maclouf, J., Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *275* (1), 94.

235. Basu, S., Metabolism of 8-iso-prostaglandin F2alpha. *FEBS Lett.* **1998**, *428* (1-2), 32.
236. Naguib, Y. M., A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Anal. Biochem.* **1998**, *265* (2), 290.
237. Dominguez-Rebolledo, A. E.; Martinez-Pastor, F.; Fernandez-Santos, M. R.; del Olmo, E.; Bisbal, A.; Ros-Santaella, J. L.; Garde, J. J., Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* **2010**, *45* (6), 360.
238. Drummen, G. P.; van Liebergen, L. C.; Op den Kamp, J. A.; Post, J. A., C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (4), 473.
239. Drummen, G. P. C.; Gadella, B. M.; Post, J. A.; Brouwers, J. F., Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY581/591. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36* (12), 1635.
240. Haidasz, E. A.; Van Kessel, A. T. M.; Pratt, D. A., A continuous visible light spectrophotometric approach To accurately determine the reactivity of radical-trapping antioxidants. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (3), 737.
241. Guha, S.; Baltazar, G. C.; Coffey, E. E.; Tu, L. A.; Lim, J. C.; Beckel, J. M.; Patel, S.; Eysteinnsson, T.; Lu, W.; O'Brien-Jenkins, A.; Laties, A. M.; Mitchell, C. H., Lysosomal alkalinization, lipid oxidation, and reduced phagosome clearance triggered by activation of the P2X7 receptor. *FASEB J.* **2013**, *27* (11), 4500.
242. van Dam, B.; van Hinsbergh, V. W.; Stehouwer, C. D.; Versteilen, A.; Dekker, H.; Buytenhek, R.; Princen, H. M.; Schalkwijk, C. G., Vitamin E inhibits lipid peroxidation-induced adhesion molecule expression in endothelial cells and decreases soluble cell adhesion molecules in healthy subjects. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *57* (2), 563.
243. Serhan, C. N.; Dalli, J.; Colas, R. A.; Winkler, J. W.; Chiang, N., Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851* (4), 397.
244. Chen, P.; Fenet, B.; Michaud, S.; Tomczyk, N.; Vericel, E.; Lagarde, M.; Guichardant, M., Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS Lett.* **2009**, *583* (21), 3478.
245. Taber, D. F.; Morrow, J. D.; Roberts, L. J., A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* **1997**, *53* (2), 63.
246. Durand, T.; Guy, A.; Vidal, J. P.; Viala, J.; Rossi, J. C., Total synthesis of 4(RS)-F-4t-isoprostane methyl ester. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (20), 3859.
247. Dupuy, A.; Le Faouder, P.; Vigor, C.; Oger, C.; Galano, J. M.; Dray, C.; Lee, J. C. Y.; Valet, P.; Gladine, C.; Durand, T.; Bertrand-Michel, J., Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *921*, 46.
248. Musiek, E. S.; Cha, J. K.; Yin, H. Y.; Zackert, W. E.; Terry, E. S.; Porter, N. A.; Montine, T. J.; Morrow, J. D., Quantification of F-ring isoprostane-like compounds (F-4-neuroprostanes) derived from docosahexaenoic acid in vivo in humans by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *799* (1), 95.

Annexes



Review

Omega-3 polyunsaturated lipophenols, how and why?

Céline Crauste*, Mélissa Rosell, Thierry Durand, Joseph Vercauteren



Institute of Biomolecules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247-CNRS-UM-ENSCM, Faculty of Pharmacy, 15 av. C. Flahault, 34093 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2015

Accepted 21 July 2015

Available online 23 July 2015

Keywords:

Lipophenol

PUFA

Omega-3

Polyphenol

Bioactivity

ABSTRACT

Polyphenols and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are two classes of natural compounds, which have been highlighted in epidemiological studies for their health benefits. The biological activities of those two families of metabolites on oxidation, inflammation, cancer, cardiovascular and degenerative diseases have been reported *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, chemical bonding between the two structures leading to n-3 lipophenol derivatives (or phenolipids) has been studied in numerous works over the last decade, and some examples could also be found from natural sources. Interest in lipophilization of phenolic structures is various and depends on the domain of interest: in food industry, the development of lipidic antioxidants could be performed to protect lipidic food matrix from oxidation. Whereas, on pharmaceutical purpose, increasing the lipophilicity of polar phenolic drugs could be performed to improve their pharmacological profile. Moreover, combining both therapeutic aspects of n-3 PUFAs and of polyphenols in a single lipophenolic molecule could also be envisaged. An overview of the synthesis and of the natural sources of n-3 lipophenols is presented here, in addition to their biological activities which point out in several cases the benefit of the conjugated derivatives.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction	63
2. The chemical or enzymatic pathway to access n-3 lipophenols	63
2.1. Enzymatic synthesis	63
2.2. Chemical synthesis	64
3. Natural n-3 PUFA lipophenols: sources and total synthesis	66
3.1. Natural sources	66
3.2. Biosynthesis and total synthesis	67
4. n-3 PUFA lipophenol activities	67
4.1. Antioxidant and anticarbonyl stress activity	67
4.2. Anti-cancer activity	69
4.3. Interaction with endocannabinoid system	70
4.4. Anti-inflammatory activity	70
4.5. Enzymatic inhibitor	70
4.6. Antibacterial and antiparasitic activities	71
5. From administration to the cells	71
6. Conclusions and future directions	72
Acknowledgments	72
References	72

Abbreviation: ALA, α -linolenic acid; LA, linoleic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; AR, 5-alkenylresorcinol; ACP, acylphlorogucinol; n-3 PUFA, omega-3 polyunsaturated fatty acid; PC, phosphatidylcholine.

* Corresponding author.

E-mail addresses: celine.crauste@univ-montp1.fr (C. Crauste), melissa.rosell@etud.univ-montp2.fr (M. Rosell), thierry.durand@univ-montp1.fr (T. Durand), jvercauteren@univ-montp1.fr (J. Vercauteren).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.018>

0300-9084/© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Health benefits of polyunsaturated fatty acids of the omega-3 family have been largely reported in the last decades [1,2]. The most common ones are α -linolenic acid (C18:3, ALA), eicosapentaenoic acid (C20:5, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6, DHA). They are reported as “essential fatty acids”, seem to be involved in the reduction of inflammation and may help lower risk of chronic diseases such as heart disease, cancer, and arthritis. As they are highly concentrated in the brain, they are also implicated in cognitive and behavioral functions [3]. Several omega-3-polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) conjugates have been developed in recent literature to improve the efficiency of active molecules. Among them, this review will focus especially on PUFA-Phenol conjugates, including *inter alia*, flavonoid, catechol, phloroglucinol derivatives, already known for their therapeutic applications (anti-oxidative, anti-inflammatory, anticancer activities...) [4], as well as natural omega-3 lipophenols.

The rationale to design lipophenol derivatives depends either on the initial phenolic drug or on the targeted pathology: linkage of highly hydrophilic drugs to n-3 PUFA may help to increase lipophilicity, cell penetration and bioavailability of specific polar phenolic drugs. On the contrary, conjugation with PUFA would be interesting to reach appropriate solubility of hydrophobic drugs, by facilitating its binding to human serum albumin (HSA) [5,6]. In some cases, PUFA conjugates have been investigated to target specific tissues, either ones rich in n-3 PUFA such as retina or brain (high content in DHA and EPA) [3,7], or tumor tissues in which PUFA uptake is particularly high. On one side, since PUFAs are prime targets for oxidation (due to numerous bis-allylic positions) [8], linkage with antioxidant such as phenolic compounds would also help to limit auto-oxidation, to prevent the resulting harmful effects of lipid oxidation and to preserve health benefits of PUFA. On the other side, esterification of phenolic drugs by PUFA is a good way to mask their hydroxyl polar functions and thus, to reduce their biotransformation or the pace of oxidative degradation. In addition, conjugation with a PUFA part may contribute to increase antioxidant properties of phenolic compounds in lipophilic media. Depending on the pathology studied, synergism effect between the phenolic and the PUFA parts could be expected. In those cases PUFA would be able to enhance the efficacy of the phenolic drug, not only by the release of the drug but by the combined functionality of both moieties of the conjugate (including their metabolites).

For all those reasons several research teams worked on the synthesis and the evaluation of a wide range of lipophenols, however, natural sources offer also the possibility to access lipophenol structures. As an example, several lipophenols bearing a n-3 PUFA part and a phloroglucinol moiety have been identified, mainly in vegetable sources [9]. Interest in natural n-3 lipophenols resides in their diverse biological activities.

As an illustration, we describe herein the main synthetic strategies to access n-3 lipophenols, the source and/or the total synthesis of natural n-3 lipophenolic derivatives, and we will discuss the current and potential therapeutic applications of the resulting compounds presented in the literature. Even though other n-3 PUFA conjugates bearing phenolic residues have been described, this review will focus specifically on bioactive compounds in which the phenolic or polyphenolic moiety plays a major role in the biological properties of the molecule.

2. The chemical or enzymatic pathway to access n-3 lipophenols

Introduction of PUFA on phenolic cores can be performed chemically, enzymatically, or chemo enzymatically, most often through esterification/acylation of the phenolic-OH with fatty acids. Fig. 1 presents phenolic molecules that have been transformed into li-

popilic derivatives using n-3 PUFAs, with position of the reported acylation in red/pink color.

2.1. Enzymatic synthesis

The synthesis of n-3 PUFA-phenols depends on the structure of the phenolic part. Indeed, different types of bioactive phenols have been linked to ALA, EPA or DHA. Among them, are reported polyphenolic compounds belonging to the flavonoids family such as rutin **5**, phloridzin **6**, isoquercitrin **7**, naringin **4**, quercetin **3** or epigallocatechins **1–2** (Fig. 1). The enzymatic way, involving lipases, most usually novozyme 435 (commercially immobilized lipase from *Candida antarctica* – CALB), is always preferred to the chemical one to introduce PUFA on heterosidic flavonoids. Its high regioselectivity allows introduction of only one fatty acid (FA) residue on the sugar part, and mild reaction conditions avoid substrate alteration. The most studied flavonoid for this purpose was rutin (**5**).

Enzymatic esterification using CALB is usually performed in acetone [10–12], 2-methyl-2-butanol [13,14] or in a mixture of both solvents [15], which were selected for their abilities to solubilize both the reactant and the final lipophenol, providing excellent activity and stability of the lipase. The lipase allows the introduction of ALA, EPA or DHA specifically at the 4''-hydroxyl group of the rhamnosyl moiety. Mbatia et al. [10] performed the reaction using a mixture of PUFAs enriched in ALA, EPA and DHA, in proportion phenol/FA 1/4 at 50 °C during 96 h. They reported 30% yield of the 3 lipophenols (**5**) without purification. Using similar protocol with pure ALA (phenol/FA 1/5, 50 °C, 96 h), Mellou et al. [11] observed up to 68% of esterification (measured by HPLC) while Viscupicova et al. [13,14] obtained around 30% of conversion using the same PUFA (phenol/FA:1/5, 60 °C, 168 h). Those works pointed out that the yields of enzymatic rutin esterification, inversely correlates the chain length of fatty acid (with C4–C12 fatty acids, yield >50%), probably due to steric hindrance/constraints in the active site of the CALB. It has also been reported that the presence of double bonds could negatively influence the lipase specificity to a large extent. However this was not clearly demonstrated with rutin.

More recently Zheng et al. [15], introduced ultrasound activation to link ALA to rutin (**5**) and naringin (**4**) in the presence of CALB (wrong structure of naringin is reported by the authors). Microtip probe ultrasonic pretreatment to esterification of flavonoids (frequency 25 KHz, power 150–200 W), allowed to use lower PUFA's equivalents and reduced reaction time (48–72 h instead of 72–96 h), compared to stirring experiments to reach up to 80% of conversion without damaging the lipase. Ziaullah et al. [12] were the only ones to perform phloridzin acylation at the 6'' position of the glucose, with each of the three PUFAs ALA, EPA and DHA, using the stirring process (acetone, 45–50 °C, 12–24 h) and obtained respectively 94, 85 and 82% yields after purification of phloridzin-ALA, -EPA and -DHA **6**. The same work on isoquercitrin (**7**) led to the acylation of the 6''-OH position of the sugar moiety with a complete regioselectivity and 91, 81 and 81% yield, respectively. In addition to the presence of flame dried molecular sieves to remove any *in situ* generated water in the reaction mixture, they focused on the need to dry the enzyme over P₂O₅ for 20 h before the reaction and to maintain extra dry condition so as to limit hydrolysis and drag the reaction forward.

Lipase-catalyzed esterification and transesterification were used to produce lipophenol structures having a catechol part like vanillyl alcohol, dihydrocaffeic acid or hydroxytyrosol. Using the specificity of CALB to acylate primary hydroxyl groups compared to secondary hydroxyl ones, Mbatia et al. [10] reported, as for rutin but with an increased yield (60%), the synthesis of a mixture of ALA, EPA and DHA vanillyl esters **10**, using CALB in acetone. Additionally, EPA and DHA were introduced in the olive oil hydroxytyrosol (**13**) and in analogue structures through transesterification, cata-

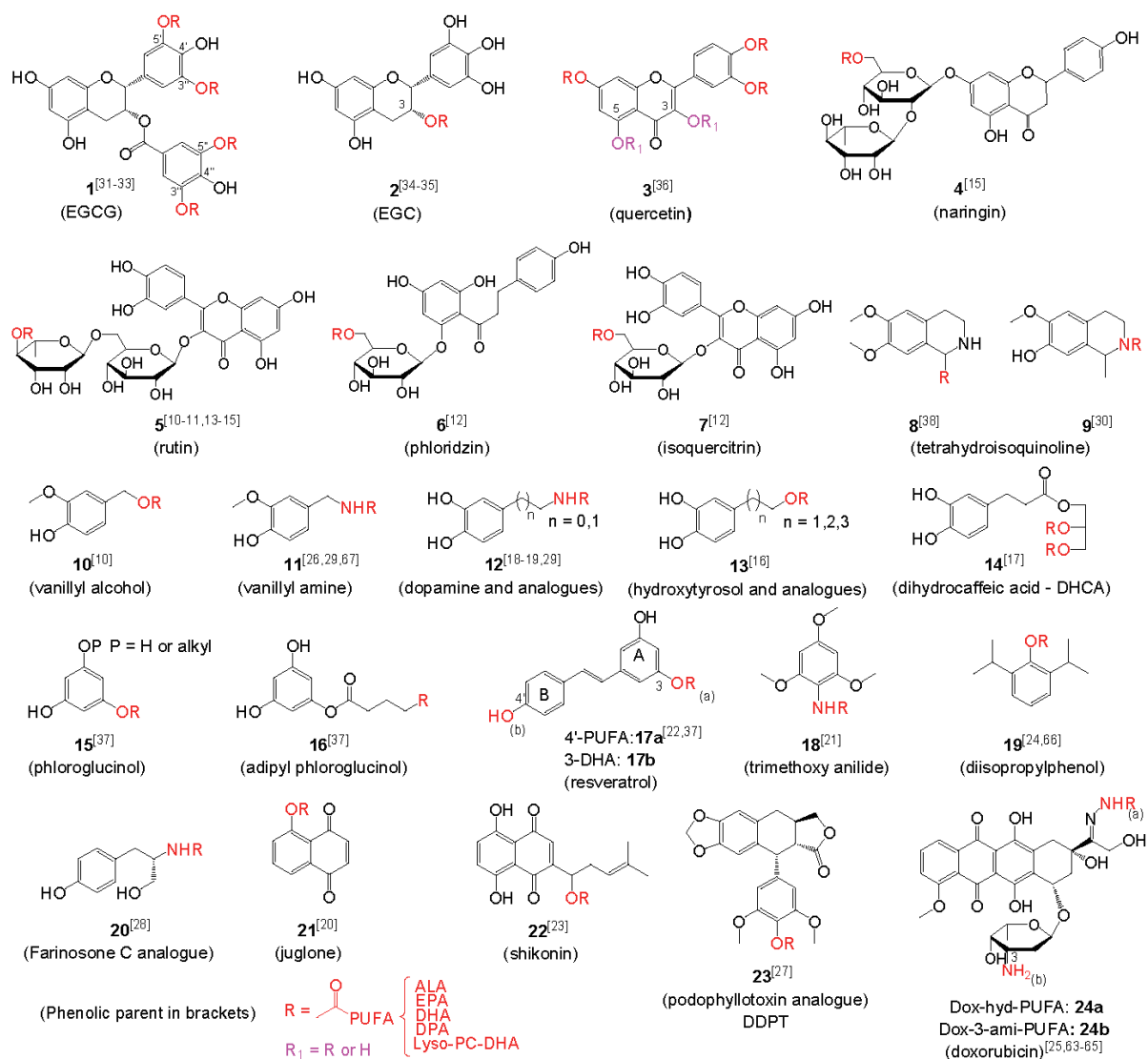


Fig. 1. Chemical structures of published synthetic n-3 PUFA lipophenols.

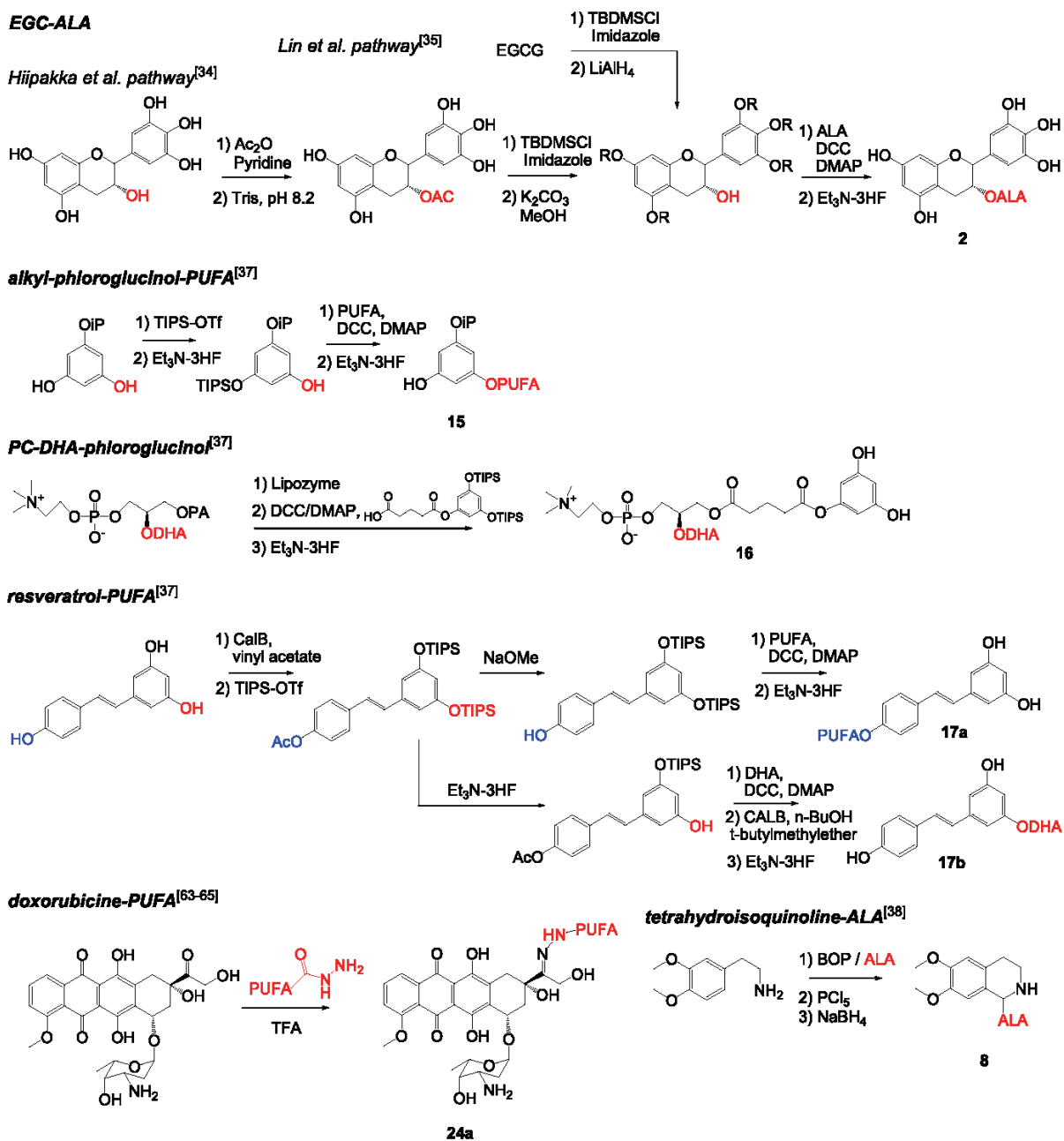
lyzed by CALB under stirring and vacuum (5–10 mmHg, 37 °C, 4–16 h, 29–97%) [16]. In this work, important decreased yields were observed, going from EPA and DHA ethyl esters to saturated ethyl palmitate and stearate esters. Weak conversions were explained by the partial hydrolysis of the PUFA ethyl esters during the reaction. Finally, CALB was used to investigate the lipase transesterification reaction of dihydrocaffeic acid (DHCA) with flaxseed oil (rich in ALA and other C18 fatty acids glycerides), in order to obtain phenolic mono or diacyl glycerol enriched in ALA (14). The high specificity and stereoselectivity of the enzyme towards C18:1 n-9 and C18:2 n-6 for transesterification reaction, led to an increased proportion of ALA in the phenolic diacyl glycerol structure [17].

2.2. Chemical synthesis

The introduction of a PUFA moiety onto chemical structures having a single free phenolic function (juglone 21, propofol 19, podophyllotoxin derivatives 23), or one amino or aliphatic-alcohol group,

with higher nucleophilicity than the phenolic one (dopamine and analogues 12, trimethoxy anilide 18, farinosone C 20, shikonin 22), was performed either by the well-established esterification procedure using either the proper preformed mixed anhydrides [18,19] or acyl chlorides [20–22] of the PUFA, or a classical coupling reagent, such as, DCC/DMAP [23–27], pentafluorophenol/TEA [28], TBTU/TEA [29] or TCTU/TEA [30]. Whatever the used procedure and reagents, moderate to good yields were obtained.

For more complex polyphenolic structures like epigallocatechine-3-O-gallate (EGCG) 1 [31–33], epigallocatechin (EGC) 2 [34,35], quercetin 3 [36], phloroglucinol 15 or resveratrol 17 [37], two different strategies are used: with or without phenolic protection. On the one hand, uncontrolled acylation leading to the introduction of the FAs on several phenolic functions have been reported for quercetin and EGCG. Penta, tetra and tri-esters of quercetin (3) were obtained using acyl chloride of ALA [36]. Unsaturated acyl chlorides/phenols molar ratio modulation allowed Mainini *et al.* to obtain preferentially pentaesters (74%) when using phenolic/FA in a 1 to



Scheme 1. Examples of n-3 PUFA lipophenol chemical synthesis.

10 ratio or a mixture of tetra and triesters (45 and 15%, respectively) at 1/4 ratio. Zhong et al. [31–33] synthesized preferentially EGCG-3', 5', 3'', 5''-O- tetraesters of DHA and EPA **1**, using acyl chloride reagents.

On the other hand, chemical strategies, involving protection and deprotection steps, were developed to access to (regio)selective mono PUFA conjugates of phloroglucinol **15**, resveratrol **17** [37] or EGC **2** [34,35] (Scheme 1).

Two strategies were reported for the synthesis of 3-O-ALA-EGC **2**. Starting from hexa-acetylated EGC, the first one [34] used the selective deprotection of phenolic acetate in the presence of Tris

buffer to obtain 3-O-monoacetate derivative. Silylation of the phenolic hydroxyls, deacetylation and ALA coupling afforded the desired lipophenol after mild "HF deprotection". Lin et al. [35] chose EGCG as starting material in which the gallate group plays the role of a protecting group of the 3-OH position, easily deprotected by LiAlH_4 reduction. Despite a close reactivity of the symmetrical phenolic hydroxyls of the phloroglucinol (**15**), Crauste et al. [37] managed to selectively remove one out of the three TIPS groups using triethylamine-3HF, thus allowing monoacylation by DHA in the presence of DCC/DMAP. In the same work, a chemical-enzymatic pathway was used to couple a phenolic derivative to *sn*1-lyso-PC-DHA.

Sn1-Lyso-phosphatidylcholine-DHA was itself obtained through a selective enzymatic hydrolysis at the *sn1* position, using liposyme immobilized from *Mucor miehei*, of a commercially available PC. Desired lipophenol **16** was isolated by coupling of adipoyl-silylated phloroglucinol, followed by HF deprotection. Finally, resveratrol-DHA acylated either at the 4' position **17a** or at the 3 position **17b** (Crauste et al. unpublished results) were obtained using CALB as selective enzyme for acylation and deprotection of the 4' position of resveratrol, and Et₃N-HF to perform the mono deprotection of TIPS groups on A ring of resveratrol.

At the difference with ester or amide linkages between the phenolic compound and the PUFA part, non hydrolysable bounds have been obtained [38] by synthesizing a tetrahydroisoquinoline derivative **8** with ALA side chain using a Bischler-Napieralski cyclization reaction. Original anti-cancer DHA-doxorubicin conjugate (DOX-hyd-DHA **24a**) was obtained using a cleavable hydrazone linker [39]. Since pH in tumor cells is lower than in healthy tissue, the hydrazone bond, stable at pH 7.4, is rapidly cleaved at lower pH in cancerous cells. DOX-hyd-DHA was synthesized by reaction of hydrazinamide-DHA (activated by Boc-hydrazine) on doxorubicin.

3. Natural n-3 PUFA lipophenols: sources and total synthesis

3.1. Natural sources

In addition to synthetic derivatives, several lipophenols have been isolated from natural sources. They can be related to analogues of n-3 PUFA lipophenols, since they are linked to n-3 unsaturated carbon chain (C11–C21) with skipped Z-double bonds separated by bis-allylic positions and starting from the C3 of the alkyl chain. At the difference with synthetic n-3 PUFA lipophenols, the presence of an alkenyl part directly linked to the aromatic cycle, without ester function, is widely represented (Fig. 2).

Usually, the crude extract rich in n-3 PUFA lipophenols is obtained through extraction process (using water, ethanol, ethyl acetate, methanol, diethyl ether, methylene chloride, chloroform, petroleum ether) from the natural sources. Purification by chromatographic methods (typically, silica gel column) is performed to lead to isolated compounds. The percentage values given in the following section are calculated as a fraction of the weight

of isolated lipophenol related to the weight of the extract. In some cases percentage refers to dried or fresh matter and is mentioned with (% from DM or FM).

Most of the natural n-3 PUFA lipophenols (Fig. 2) have been isolated from vegetables or animals from marine origin. Hemiketal spiralisone **25** was isolated from *Zonaria spiralis* (5.3%) [40], a marine brown algae, together with the chromone **26** (1.6%), which was also found in several other brown algae of the *Zonaria* genus, like *Zonaria tournefortii* [41]. Chromone **26** is presented to be a possible artifact of **25**, by dehydration, favored by mildly acidic conditions. *Z. tournefortii* is also a source of acylphloroglucinol (ACP) derivatives **37** [42] (8% and 0.3% from DM), in addition to other brown marine algae like *Zonaria diesingiana* (5.3%) or *Zonaria farlowii* (11% and 0.13% from fresh alga) [9]. The later also contains the specific ACP derivative **38** (2.2%) [9]. Other algae, such as *Cystophora torulosa* was shown to contain ACP **40** (0.19%) and 5-alkenylresorcinol (AR) **30** derivatives [43] (15% in mixture with other alkyl resorcinols), *Chorthippus scalaris* to contain **40** and **39**, while from *Chrysanthemoides monilifera* and *Cordyline congesta* **39** was isolated (<0.07% from DM) [44]. In addition to marine vegetables, some animal marine sources have been found to produce n-3 PUFA lipophenols. The 5-alkenylresorcinols (AR) **29**, **30**, **31**, **35** and **36** have been isolated from the sponge *Haliciona* sp (between 0.22 and 0.67%) [45], while tyramine derivative **28** can be found in octocoral *Muricea austera* from the Pacific coast of Panama [46].

Apart from marine sources, natural n-3 PUFA phenols also have been identified in different and various plant species. The macamide **27** is present in Peruvian plant *Lepidium meyenii* (Maca), however its proportion in Maca extract is very low (less than 0.01% from DM) [47]. Leaves and stems of *Philodendron scadens* subsp. *oxycardium* contain the anacardic acid derivative **42** (0.016% of FM) and the AR **29** (0.005% from FM), which is the major allergen compound and a weapon defense of the plant [48]. The AR **29** has various origins and can also be isolated from liverwort *Omphalantus filiformis* [49] (mainly in the cuticle) and leaves of *Stylogyne turbacensis* [50]. Anacardic acid derivative **42** is also present in various other sources and has been isolated from leaves of *Anacardium spondias* [39], and leaves and stems of *Spondias mombin* [51]. The AR **32** comes from ground aerial part of the tree *Lithraea molleoides* (0.16%) [52], while AR **34** was extracted from wheat bran oil (0.007% from the oil) [53]

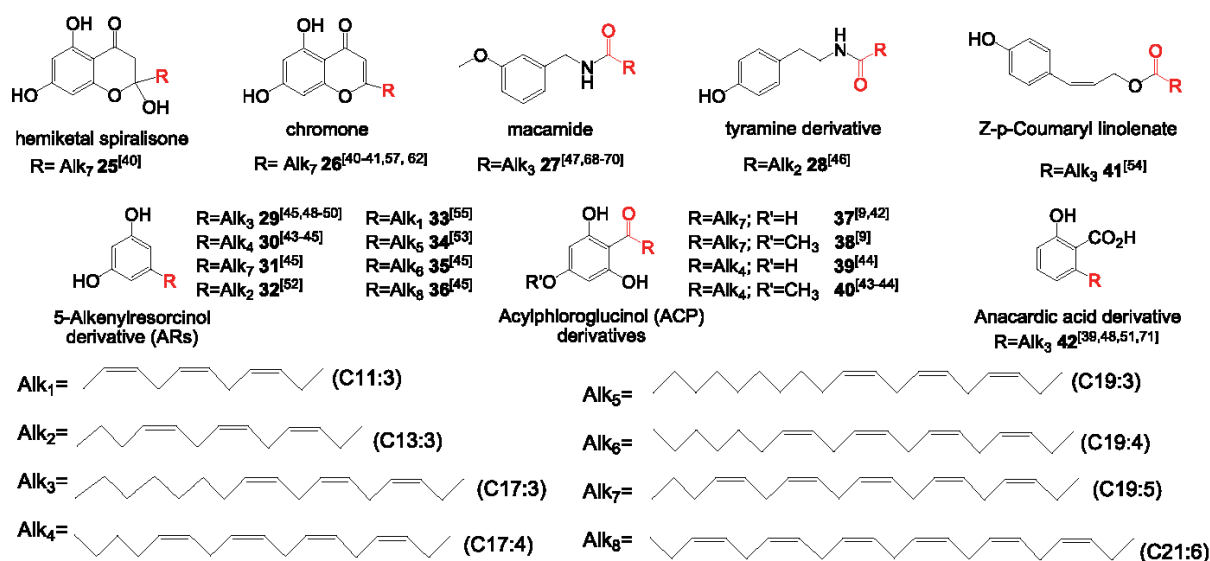
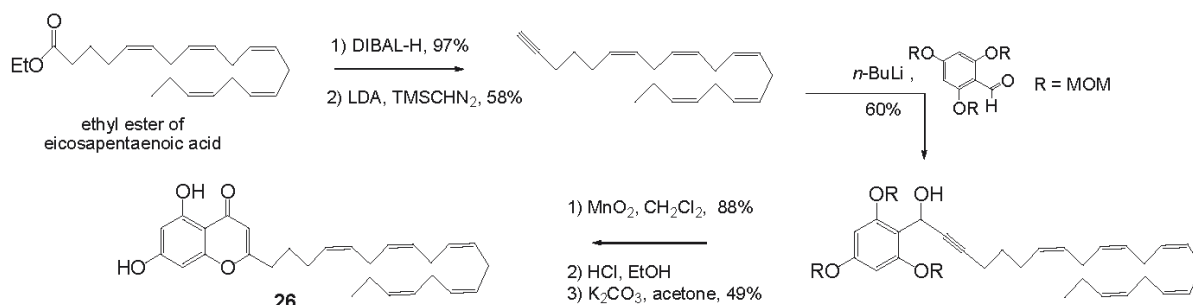


Fig. 2. Chemical structures of natural n-3 PUFA lipophenols.

Scheme 2. Total synthesis of chromone **26** [57].

and traces of *Z-p-O*-coumaryl linolenate **41** has been observed in the peel of *cv. Annurca* Apple fruits [54].

Finally, AR **33** has been isolated from a microorganism, heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. This compound can potentially be a defense toxin against the predatory ciliate *Dileptus margaritifer* [55].

Globally, the richest sources of lipophenol derivatives are from marine origin, especially algae: 1.6 % to 11% (weight % extract) for the genus *Zonaria*, and up to 15% (weight % extract) of some alk(en)ylresorcinols for the genus *Cystophora*. The marine sponge *Haliclona* sp. contains five different AR in amounts ranging from 0.22% to 0.58% (weight % extract). In addition, most of the natural n-3 lipophenols derivatives are also found in plants, mainly in the leaves and stems.

3.2. Biosynthesis and total synthesis

Zhang et al. [40] proposed a biosynthetic pathway, starting from the monomeric phloroglucinol to access the racemic spiralisone **25** and chromone derivative **26**, found in various sources of algae: after formation of an acylphloroglucinol intermediate in the presence of acetyl-CoA, elongation via a Claisen condensation on an activated fatty acid would lead to the incorporation of the polyunsaturated part. The resulting acylphloroglucinol β -diketone would undergo intramolecular cyclization to afford the spiralisone derivative, then the chromone upon dehydration. While following the same reflection, El Hattab et al. [56], supposed that Claisen condensation could be performed on a pentaketide precursor to form directly the acylphloroglucinol β -diketone.

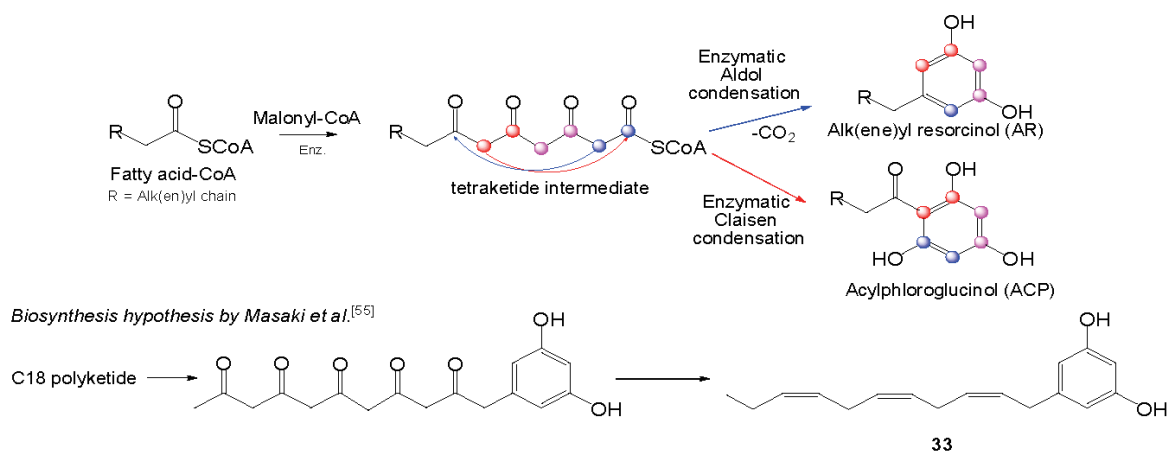
From the chemical point of view, the first total synthesis of **26** was reported by Anwar et al. [57] (Scheme 2), in six steps starting from an ester of EPA, in a 14% overall yield. The ethyl ester of EPA is first transformed into a terminal alkyne through its hemireduction to the aldehyde, followed by a Colvin rearrangement. This alkyne is then coupled with 2,4,6-tris(methoxymethoxy)benzaldehyde using *n*-BuLi. After oxidation of the obtained secondary alcohol, and deprotection of the phloroglucinol moiety, intramolecular Michael addition under basic conditions, afforded the desired chromone **26**.

AR and ACP represent the largest family of natural lipophenols. In plant, their biosynthesis is believed to follow the polyketide pathway (Scheme 3): in a few words, a fatty acylCoA starter undergoes three condensation reactions with malonylCoA leading to a tetraketide intermediate [56,58], which can undergo two ring formation mechanisms: an aldol condensation (followed by an easy loss of carboxyl) would conduct to AR structures, while Claisen condensation allows to the formation of ACP. However, hypothesis of polyunsaturated long-chain AR biosynthesis has also been proposed for AR compound **33**, in which the polyunsaturated part would be formed after cyclization and decarboxylation of a C18-polyketide [55,59] (Scheme 3).

4. n-3 PUFA lipophenol activities

4.1. Antioxidant and anticarbonyl stress activity

Most of the combinations of n-3 PUFA with natural antioxidants such as flavonoids, have been proposed to increase their



Scheme 3. Biosynthesis of AR and ACP.

lipophilicity for two main purposes: (1) to increase their preservative effects against oxidation [10,14] of lipophilic food matrices; (2) to circumvent their use limitation, due to their low skin/cell permeability, solubility or bioavailability in the dermocosmetic, nutraceutical or therapeutic applications, benefitting additional health promoting effects related to the n-3 PUFA moiety.

To date, many *in-vitro* tests (test-tube or in cell assays) are available to detect, quantify and compare antioxidant capacity and ability of chemicals to protect a substrate against oxidation, but unfortunately none of them are universal. When comparing antioxidant results, it should always be kept in mind that the result of those tests will depend not only on the direct activity of phenolic compounds, but also on other parameters, such as their own solubility, as well as the one of the substrate (to be protected from oxidation) and on the lipidic and/or aqueous medium in which the assays are performed. Using two different methods, discrepancies between the found activities are unavoidable. Different experimental conditions in terms of solubility, of accessibility of the oxidant to the oxidation site, of the location and/or of the distribution of the antioxidant, will make the antioxidant potencies difficult to compare [60,61]. Efficacy of antioxidant linked to PUFA compared to the initial phenol is mainly reported using homogeneous DPPH radical-scavenging activity assay, sometimes ABTS, FRAP or ORAC assays. In the case of protection of lipophilic food matrix, β -carotene linoleate method, rancimat test, or thiobarbituric assay (compared to α -tocopherol or butylated hydroxytoluene (BHT) activity) have been employed. It was surprising to observe, that, to the best of our knowledge, most of the evaluation of antioxidant activity of n-3 PUFA phenol were performed in cell free assay. Unfortunately, such assays do not take into account the enzymatic cleavage of the ester bounds, which, in some lipophenolic structures, could free the lipid part and unmask the active phenolic functions.

All n-3 PUFA-phenol esters tested in literature showed radical scavenging activity in the DPPH radical assay [10,12,14,17,33,36]. It is worthy of note that even though the structures contain an easily oxidizable PUFA, the lipidic part appears to be protected from oxidation by conjugation with phenolic residue. To date there is not a clear correlation between the introduction of the lipid part and the increase or the decrease in the radical scavenging capacity of the phenolic derivative. There is an important relationship between the hydrophobic nature of the new lipophenol and its activity, which will depend on the nature of both the lipid and the phenolic part and also on the binding position.

According to Zhong et al. [33] EPA and DHA tetra esters of EGCG (3', 5', 3'', 5'' O esters, **1**) exhibited both a greater antioxidant activity in scavenging DPPH[•] (determined by electron paramagnetic resonance-EPR) than EGCG itself. In this study, Zhong et al. suggest that the lipophenol with enhanced lipophilicity may have greater accessibility to the lipophilic DPPH radical than the hydrophilic flavonoid. In addition, it is proposed by the authors that acylation on 3', 5', 3'' and 5'' positions, may reduce electron density of the O-H bond at position 4' and 4'' (due to the electron withdrawing property of both acyl groups in ortho position), thus enhancing the ability to scavenge radical in these position. On the contrary, quercetin (penta, tetra, and tri) ALA esters **3** display a lower antioxidant activity with respect to free quercetin in both DPPH (IC₅₀: 4.72 vs triesters: 107.26 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and ABTS assay (TEAC: 1930 vs triesters 1.33 mg g^{-1}) [36]. Triesters, in which the OH at positions 5 and 3 are free, display a higher activity than pentaesters having only 5-OH free. This result highlighted the relevance of a free OH at the 3 position for the design of lipophenolic quercetin antioxidant, compared to free OH at the 5 position able to create intramolecular H-bonding with the carbonyl function. It is worthy of note that the antioxidant activity of PUFA-quercetin increases with the number of unsaturations in the FA. Similarly, when exposed to DPPH[•], free DHCA manifested higher radical scavenging ability (62%), than its lipid (ALA-

acyl glycerol) conjugate (compound **14**, only 19%) [17]. According to Sabally team, this huge drop in its radical scavenging ability could be attributed to limitation in conformational changes in the lipophenol derivative. Mbatia et al. [10] reported the same observation with ALA, EPA and DHA vanillyl esters **10**, whose the radical scavenging activities were lower than for vanillyl alcohol itself. A great increase in hydrophobicity may have resulted in decreased vanillyl esters solubility in the tests medium. Again, with the rutin **5**, phloridzin **6** and isoquercitrin **7** PUFA-derivatives, and even though the omega-3 acids were linked to the sugar moieties (which is not considered to be the crucial part for a molecule to display such a property), only the PUFA-rutin esters **5** had the same [10] or just a weaker [14] capacity to scavenge radicals than the free rutin, in the DPPH assay. Despite a substantial antioxidant activity in FRAP and DPPH assays, phloridzin **6** and isoquercitrin **7** esters (ALA, EPA, DHA) have a lower free radical scavenging activity than the parent compounds. This effect may be attributed to the steric hindrance of PUFA since the number of double bonds of the FA seems to influence the antioxidant capacity. However, the correlation is not working in the same way, depending on the antioxidant assay performed.

When protection of acyl glycerol enriched in PUFA from oxidation (TBARS assay) is tested in a lipophilic medium, rutin and vanillyl-PUFA esters **5** and **10** showed lower antioxidant activity than BHT but were stronger than the lipophilic α -tocopherol, in oil emulsion [10]. However, none of them was better antioxidant than any of these two references in fish oil system. In contrast, rutin-ALA ester **5** exhibited the best inhibition of lipid peroxidation in β -carotene linoleate system comparable to that of BHT [14]. Inhibition was higher than rutin and as active as rutin-palmitate and stearate. Those results reported by Viskupicova et al. also clearly demonstrate that hydrophobicity has an impact on the antioxidant capacity of rutin derivatives in lipophilic food systems (sun flower oil), since better protections were observed using long-chain FA (C16–C18) compared to shorter ones (C4–C10). In this case, the numbers of double bond in C18 FA did not influence the activity. Natural *Z-p*-coumaril linolenate **41** showed the same ability (50%) to inhibit the production of peroxides in the methyl linoleate autoxidation assay as its linoleic analogue [54].

Oxidative and carbonyl stress are closely related since most of toxic carbonyl stressors may come from lipid peroxidation end products. Recently, Crauste et al. [37] developed lipophenol derivatives in order to reduce oxidative and carbonyl stress in retina pathologies. PUFA such as DHA was selected because of its high proportion in retina cell membranes, suggesting a possible vectorization to target retina tissues. Isopropyl-phloroglucinol-DHA conjugate **15** was able to protect ARPE-19 and primary cells of the retinal pigment epithelium (RPE) against both H₂O₂ and *trans*-retinal stress (Crauste et al. to be published and [37]). In ARPE-19 cells assay, DHA lipophenolic conjugate allowed to increase cell survival up to 40% in presence of a toxic concentration of *trans*-retinal, while free DHA and isopropyl-phloroglucinol mixture was inactive. Protection against *trans*-retinal toxicity could be attributed to the trapping of the toxic aldehyde (carbonyl scavenger) leading to a chromene derivative. Among several PUFA conjugates ALA and DHA phloroglucinol **15** presented higher *in vitro* protection against carbonyl stress, and saturated C22 fatty acid conjugation led to a weak activity (Crauste et al. unpublished result).

Interestingly, natural EPA chromone analogue **26** showed cellular protective effects of HepG2 cells against cellular lipid peroxidation (CLPAA assays), and reactive oxygen species (CAA assays) [62]. The activity of more lipophilic chromone **26** was similar to quercetin in the CLPAA assay (respectively IC₅₀: 14 and 10 μM) but was less active in the CAA assay (respectively IC₅₀: 160 and 71 μM).

Most of the results reported in literature with the DPPH assay, are consistent with a decrease of radical scavenging capacity after

introduction of a lipidic moiety on phenolic structure. However, different experiment performed in microsomal suspension, in emulsion system or in cellular media, may probably lead to different conclusions, regarding the capacity of lipophenol to maintain antioxidant activity and better protection in lipophilic biological or food system media. Additional *in vitro* and cellular assays must be necessary to fully address the question of lipophenol antioxidant activity.

4.2. Anti-cancer activity

Why using n-3 PUFAs to enhance anti-cancer activity of phenolic compounds? The answer could be explained by several rational points. First of all epidemiological studies pointed out that diet rich in n-3 PUFAs may lower proportion of cancer incidents. Indeed, n-3 PUFAs and PUFA metabolites are involved in various cellular processes that may help to lower tumor progression or to protect healthy tissues during chemotherapy: inflammation, cellular adhesion, energy metabolism, apoptosis signaling pathway... As an example, PUFA metabolites such as eicosanoids, resolvins or protectins are reported as potent anti-inflammatory derivatives that may affect tumor growth due to the close relation between inflammation and cancer. According to PUFA activities in this domain, it appears interesting to conjugate PUFAs to obtain a synergism with cytotoxic drugs. Moreover, it has been demonstrated that PUFA uptake is considerably elevated in tumor tissues, thanks to tumor-specific transport of HSA-bound complex. Here, PUFAs are used as biochemical precursors and energy sources for the cell. Based on this observation, PUFA conjugates are perfect candidates to not only investigate improvement in pharmacokinetics and distribution of poorly bioavailable drugs, but also acquire at the same time a specific accumulation of the cytotoxic drug in tumor cells and tissues.

Among lipophilic anti-cancer derivatives, the most studied was the one linked on doxorubicin drug (DOX), responsible for DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II, which has been used for the treatment of various types of cancer. DOX-ALA and DOX-DHA **24** have been developed to reduce systemic toxicity and enhance therapeutic index. *In vitro* activities of DOX-hyd-DHA (linked through a cleavable hydrazone bound, **24a**) were lower than DOX against L1210 leukemia cell lines. Whereas, *in vivo* activities in mice models (mice injected with L1210 leukemia and B16 melanoma cells, IP administration, optimal dose 16 mg/kg and 30 mg/kg respectively) improved the lifespan, lowered the weight loss and doubled the tumor growth inhibition [63]. In the study reported by Effenberger et al. [64], DOX-hyd-ALA **24a** showed an advantage in avoiding multidrug resistance induction. The cytotoxic mode of action was largely apoptotic in 518A2, HL-60, KB-V.1 and MCF-7 cancer cell lines. Involvement of caspase-3, -8 and -9, were different depending on the tested cell lines. In addition, significant increase in ROS has been observed. However, saturated heptadecanoyl analogue reduced metabolic activity of the cell lines more than the unsaturated DOX-hyd-ALA. In parallel, Liang et al. [65] studied *in vitro* (MCF-7, MDA-MB-231, and HepG2) and *in vivo* (mice) activities of DOX-ALA and DOX-PA (palmitate) either linked through an hydrazone bound (DOX-Hyd-ALA **24a**) or by the daunosamine residue (DOX-ami-ALA **24b**). In this study, saturated or unsaturated fatty acid on the 3' amino group lead to a decrease in antitumor activity compared to DOX and DOX-hyd-ALA. DOX-hyd-ALA showed the highest cytotoxicity, stability in bloodstream, and fastest release of DOX in acidic tumor cells. As observed by Huan et al. [25] for DOX-ami-ALA, increase in cytotoxicity of DOX-Hyd-ALA was correlated to rapid internalization/uptake of the PUFA conjugate compared to free DOX. Regarding DOX release, cellular uptake and cytotoxicity, DOX-Hyd-ALA presented an advantageous biological profile compared to DOX, DOX-PA or DOX-ami-ALA. To end, *in vivo* evaluation of DOX-hyd-ALA in tumor-bearing nude mice (IV administration 7.5 mg/kg, compound in solution in normal saline containing 5% v/v

PEG400), enhanced therapeutic efficacy of DOX with less systemic toxicity and greatly increased the content of DOX in tumor tissue with a significant decrease of its proportions in other organs.

Another inhibitor of DNA topoisomerase II, the 4' demethyl deoxy podophyllotoxin (DDPT **23**), showed strong *in vitro* toxicity, but without *in vivo* activity. FA-DDPT have been synthesized with the hope that esterification with FAs would reduce the metabolic excretion and enhance its *in vivo* efficiency [27]. Despite a lower cytotoxicity in *in vitro* assays (A-549 and SK-MEL-2 cell lines), long chain FA (C16–C22) presented better *in vivo* antitumor activity (60 mg/kg) than short alkanoyl acid derivatives (C2–C6), probably due to an increased resistance to esterase, that delay the metabolic excretion of phenolic hydroxyl group. The number of double bonds seems to play a role in the *in vivo* and *in vitro* activities, with a different (positive or negative) correlation depending on the length of the FA.

Other examples can be described, such as Dohevanil (DHA vanillyl amide **11**), a PUFA analogue of capsaicin, that induced caspase-dependent apoptosis MCF-7 cells (via a caspase-3 independent pathway), with better efficiency than capsaicin [26]. The conjugation of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) with unsaturated FA (**21**) was able to considerably enhance inhibition of DNA polymerase replicative α and mitochondrial γ , compared to the initial phenol [20]. The inhibition effect of acyl conjugates ranked as follow C18:1 > C20:5 > C22:5 > C18:2 > C18:3, with saturated derivative C18:0 acyl juglone as active as the individual compound. The same influence of the FA part was observed for the growth inhibition of human colon carcinoma cultured cell (HCT116), suggesting that cancer cell growth prevention by those derivatives may be attributed to DNA polymerase inhibition. However, it is worthy of note that conjugation of cytotoxic derivatives with PUFA does not necessarily lead to an increase of the activity. Ahn et al. [23] synthesized acyl shikonin analogues, including shikonin-ALA **22**, which showed negligible DNA-topoisomerase I inhibition in a cell free enzymatic assay.

Significant ameliorations of *in vitro* and *in vivo* activities were also reported with flavonoid polyphenols. Rutin-ALA **5**, allowed overcoming solubility problems compared to native compounds, and was able to decrease the production of VEGF, a regulator of tumor induced neoangiogenesis, in K562 lymphoblastoid cell lines [11]. In this assay, C18 fatty acid esters of rutin having one, two or three double bonds presented the same activities, and rutin was not active at all.

A mixture of EGCG and tetra/penta esters of DHA (**1**), was evaluated in azoxymethane-induced colonic carcinogenesis mice [31] (oral diet, supplementation in EGCG-PUFA 0.5%). The mixture was able to reduce the total number of colon large aberrant crypt foci (ACF), a predictive biomarker of colorectal cancer. Increased activity compared to EGCG was attributed to an improve lipophilicity, that may alters *in vivo* metabolism. Pro-inflammatory mediators such as nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), known to be involved in carcinogenesis promotion, were down-regulated by the mixture in a dose-dependent manner. Hypothesis of a synergism between the polyphenol and the FAs part is expressed by the author.

5 α -reductases are microsomal enzymes, that catalyze the reduction of double bond of a variety of steroid derivatives, and which may be involved in development and progression of prostate cancer. Since EGCG and ALA have been identified separately to inhibit such enzyme, Hiipakka et al. [34] and Lin et al. [35] studied the activity of EGC-ALA conjugates **2**, replacing the gallate moiety by ALA or by its saturated analogue. Probably due to a combined functionality of both phenolic and PUFA parts, the EGC-ALA conjugate showed potent 5 α -reductase type 1/2 inhibition (IC₅₀ = 7 μ M for type 1) compared to EGCG, EGC (IC₅₀ > 100 μ M) or saturated stearate lipophenol (IC₅₀ = 42 μ M) in whole cell-assay. Results were different in cell free assay depending on the study performed. Unlike Lin et al. [35] who

reported increased activity of EGC-ALA or EGC-stearate ($IC_{50} = 0.73$ – $0.78 \mu M$) compared to EGCG ($IC_{50} = 6.29 \mu M$), Hiipakka et al. [34] presented a close significant activity for EGCG and EGC-ALA, and a weak inhibition using EGC-stearate.

Interesting results were reported by Siddiqui team [24,66], which tried for once, to enhance anticancer properties of n-3 PUFAs in breast cancer, by making phenolic ester. DHA and EPA esters of propofol **19**, demonstrated greater potency for inhibiting cell growth (MDA-MB-231), slowing migration, increasing cellular adhesion, and initiating apoptosis compared to the combination of propofol with DHA or EPA. By comparing stability and activity of ester and amide analogues of propofol-DHA, it was demonstrated that first, this ester linkage should not be cleaved in biological media, and second, that the activity depends on this stability. Moreover, unlike free DHA activity, there was no observed effect on PPAR α or PPAR γ , suggesting that DHA-propofol action followed an independent mode of action (probably inhibition of histone deacetylase – HDAC).

Among the natural products, cytotoxicity of the ALA-alkylresorcinol analogue **29** was observed on human breast cancer (MCF-7) and human lung cancer (NCI-H460) cell lines [50]. The n-6 LA analogue was equipotent compared to **29**. After comparison with per-acetylated analogues it was concluded that free phenolic hydroxyl groups are required for the anticancer activity. Another natural liphenolic AR (**34**), showed a growth inhibition on human colon cancer cell lines, HCT-116 and HT-29 (MTT assay) [53]. Saturated or longer carbon chain analogues were tested and the results seemed to indicate that increasing the length of the side chain diminished the inhibitory activity (range from C17 to C25) and the existence of one double bond at least improved the activity. However, according to the authors the anticancer effects of ARs were very limited.

4.3. Interaction with endocannabinoid system

Research of cannabimimetic that could modulate endogenous cannabinoid system (ECS), have prompted researchers to develop FA amide based on the anandamide structure. Bezuglov et al. [18] reported activity of dopamine-EPA and dopamine-DHA conjugates **12**, showing significant *in vivo* activity (IP administration 10 mg/kg, compound in solution in physiologic saline/tween20 mixture) in the tetrad test (production of catalepsy, hypothermia, analgesia and inhibition of locomotion), used for evaluation of cannabimimetic properties of drugs. The results suggested that they belong to the family of CB1-cannabinoid receptor agonist, and highlight the importance of at least 4 double bonds in the chemical structure of cannabimimetic. In addition, Bisogno et al. [19] studied the biochemical properties of unusual n-3 PUFA-dopamine (stearidonoyl C18:4, eicosapentaenoyl C20:5, docosapentaenoyl C22:5) and ALA-dopamine, and reported their inhibition of protein of endogenous endocannabinoid system such as fatty acid amide hydrolase (FAAH), and anandamide transporter, as well as the binding to cannabinoid receptor CB1. The presence of the catechol structure of dopamine is believed to stabilize the enzyme substrate complex in the active site of FAAH and enhance affinity with CB1.

Looking for the development of novel analgesic derivatives, Melck et al. [67] designed PUFA derivatives based on capsaicin and anandamide structures, able to interact with endocannabinoid receptors, while preserving their capability to activate vanilloid receptors (TRVP1). Among them, *N*-acyl-vanillyl-amide-ALA **11**, inhibited anandamide accumulation (RBL-2H3 cells), was a weak inhibitor of FAAH, presented selectivity for CB1 vs. CB2 receptor and was able to interact with TRVP1. However, omega-6 analogue (C20:4, arvanil) was a better candidate to develop “hybrid” cannabinoid/vanilloid agonist derivative. Following the same goal, *N*-acyl-tetrahydroisoquinoline-DHA **9** was tested on TRPV1 receptor expressed in HEK293 cells and exhibited partial agonist effect [30].

Regarding natural lipophenols, maca extract, which presents weak concentration of macamide **27** (an analogue of *N*-acyl-vanillylamide-ALA **11**), exhibits *in vitro* and *in vivo* (IV administration in a mixture water/poly-vinyl-pyrrolidone, 3 mg/kg) neuroprotective activity, as reported by Pino-Figuera et al. [68]. In addition, thanks to structural similarity to endocannabinoid, isolated macamide **27**, has been found to interfere with different proteins of the ECS [69,70]: inhibition of FAAH enzyme and moderate binding affinity for CB1 receptor. It was reported that those activities are significantly improved if the lipophilic chain is replaced by the LA analogue. Contradictory results describing the importance of the methoxy group was presented depending of the research team and the test performed.

4.4. Anti-inflammatory activity

Various studies support beneficial effects of polyphenols in chronic inflammatory diseases that may be explained, in part, by inhibition of transcription factor NF- κ B activation, involved in gene expression of pro-inflammatory mediators such as INOS and COX-2. Since n-3 PUFAs and their metabolites are reported to exhibit an inhibitory effect on inflammation, Zhong et al. [32] evaluated the potency of a mixture of EGCG-DPA (docosapentaenoyl, C22:5 n-3) tetra and penta esters **1** to inhibit the production of pro-inflammatory mediators, nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂), in lipopolysaccharides (LPS)-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. At a concentration ranges around 50 μ g/ml, EGCG-DPA esters inhibited NO and PGE₂ production in a greater extent than did the free FA. As observed for, pure EGCG-DHA, EPA and Stearic tetra esters, EGCG-DPA exhibited down regulation effect of iNOS and COX-2 biosynthesis, while DPA alone exerted insignificant effect on their transcription. Contribution of DPA to anti-inflammatory activity may pass through a different mechanism. Enhance cellular absorption and additional contribution of the fatty acid side chain, are proposed to comment increase efficiency of lipophenols.

Greater inhibitory effect of the inflammatory cytokine TNF- α production, was also found using Juglone-PUFA **21** (DHA, EPA and ALA) compared to the juglone, in cultured mouse macrophage RAW264.7 [20]. Close activity was also observed for saturated analogues having C18 and C12 chain length, while C6, C2 and C3 derivatives were poorly active. Comparable activities were reported for those esters in a mouse ear inflammatory test, to reduce inflammation caused by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA).

Inspired by the discovery of C22 enone FA (EFOX, electrophilic oxo derivatives), DHA and DPA metabolites generated during inflammation process by COX-2, Dang et al. [29], compared the anti-inflammatory activity of a wide range of *N*-acyl FAs (saturated FA and PUFA) including *N*-acyl-dopamine **12**, *N*-acyl vanillylamine **11**, and their enone fatty acid analogues. *N*-acyl dopamine conjugates exhibited the most potent inhibitory activity on the production of NO, cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , in LPS-activated RAW264.7. The activity was strongly dependent on the nature of the fatty acid part, in the order, enone FAs, PUFAs, monosaturated and saturated FAs, suggesting the interest of PUFA metabolites in the activity of PUFA-phenols.

4.5. Enzymatic inhibitor

Some n-3 lipophenols have been investigated as enzyme inhibitors [12,13,21,22], using the lipid chain as hydrophobic part which would modulate the affinity for the enzyme. Interesting comparison of the tyrosinase enzyme inhibition of phloridzin and isoquercitrin esters (**6** and **7**) was performed using stearic, oleic (OA), linoleic (LA), ALA, EPA and DHA fatty acids [12]. The precursor phloridzin exhibited weaker tyrosinase inhibition as compared to

isoquercitrin (at 1 mM, 16% and 54% respectively). In both cases, introduction of specific n-3 FAs in the polyphenol structure lead to a strong increase in inhibition potential. However, depending on the polyphenols studied, introduction of DHA or ALA did not influence the activity in the same way: phloridzin activity was especially enhanced using DHA (91% of inhibition), while isoquercitrin needs ALA linkage to reach around 86% of inhibition on the same target. Surprisingly, inversion of PUFA i.e. used ALA on phloridzin and DHA on isoquercitrin, drops inhibitory activity below precursor's one. Depending on the polyphenol structure and their flexibility, the molecule must be able to adjust differently the position of the FA and the phenolic function to obtain better interaction with the active site of the enzyme. Moreover, number of double bonds in the lipidic chain will necessarily change the flexibility of the lipophenol conjugate and thus influence its conformation. Those results highlight that for a same target, different kinds of PUFA may be beneficial to increase the affinity of polyphenolic drugs for the active site.

Among, serine protease enzymes, namely Trypsin, Thrombine, Urokinase and Elastase, the acylation of rutin with medium to long FA (C16–C22, including ALA **5**), provide significant improvement inhibitory activity only on Thrombine protease [13]. Viskupicova et al., suggested that the enhanced hydrophobicity, would provide interaction with hydrophobic region of the enzyme. The hypothesis was supported by QSAR analysis, showing correlation (correlation coefficient 0.7) between inhibitory activity and molecular volume, polar surface area and number of hydrogen bond acceptors. The chain length (C16–C18) appears to be a deciding factor for the activity while the number of double bond was less significant.

Those reported enzymatic cell free assays, point it out that lipophenol derivatives might exert their activity not only by increasing cell membrane penetration or fostering a synergistic effect between the phenolic and the n-3 PUFA, but that the entire lipophenol structures might be indispensable and responsible for increasing bioactivity. In future, molecular modeling would have to confirm this fact. Moreover, extra or intracellular proteins that are reported to bind phenolic or PUFA derivatives (such as albumin, PPAR...), should be considered as potential target to study the activity of this new kind of lipophenol derivative.

This reflection could also be supported by natural lipophenol activities, bearing a non-hydrolysable n-3 PUFA part. *In vitro* cell free assays of hemiketal spiralisone **25** and chromone **26** (both EPA analogues) highlighted inhibitory activities (with $IC_{50} < 10 \mu M$) against kinase targets, casein kinase 1 δ (CK1 δ), cyclin-dependent kinase 5 (CDK5/p25) and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), which are involved in Alzheimer's disease [40]. Interestingly the crude alga *Z. spiralis* extract presented kinase inhibitory potency, most probably linked to the cumulative effect of multiple moderately potent spiralisone inhibitors. This effect was especially showed for the inhibition of β -secretase BACE which is also involved in Alzheimer's disease. In addition, another example is given by the reported activity of the natural alkenylphenol ALA-anacardic acid derivative **42** [71]. In order to reduce bacteria resistance to antibiotics, **42** was tested for its inhibitory activity on bacterial β -lactamases, enzymes responsible for the inactivation of β -lactam antibiotics. It proved its efficiency against β -lactamase enzyme of *Escherichia coli* J14 (TEM-1) ($IC_{50} = 5 \mu M$), and had a lower but significant level of inhibition against β -lactamases of *E. coli* K12 (PSE4) ($IC_{50} = 10.1 \mu M$), *Enterobacter cloacae* P99 ($IC_{50} = 16.5 \mu M$) and *Pseudomonas aeruginosa* A ($IC_{50} = 40.5 \mu M$). For the two last one, **42** displayed a better activity than the β -lactam drug clavulanic acid.

4.6. Antibacterial and antiparasitic activities

Several natural lipophenolic compounds showed antibacterial activities. In addition to inhibition of kinase, hemiketal spiralisone **25** and chromone **26** exhibited moderate growth inhibitory activ-

ity ($IC_{50} = 2.5–10 \mu M$) against gram positive bacteria *Bacillus subtilis* (ATCC 6051 and 6633) [40]. The antibacterial properties of the crude *Z. spiralis* extract was more expanded than isolated lipophenols. This could be explained by the cumulative concentration effect of multiple mildly bioactive spiralisones.

EPA-acylphloroglucinol derivatives **37** and **38** displayed antibacterial activity (measures of microbial growth inhibition), tested *in vitro* on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* [9]. The compound **38** bearing a methoxy group is more active than **37** for the inhibition of *S. aureus*, while **37** is more potent than **38** against *B. subtilis*. Moreover, anacardic acid derivative **42** showed pronounced antibacterial effects on *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* and *Mycobacterium fortuitum* [51], as its LA analogue. According to mono-saturated and longer carbon chain derivative evaluations, it was reported that the antibacterial activity drops with the decreasing number of unsaturation and with the increasing number of carbon on the lipid chain. The natural compound **42** also displayed weak antibacterial activity against Gram-positive organism (*Staphylococci* spp) [71].

ALA-Anacardic acid derivative **42** is not only an antibacterial agent but presents also antiparasitic (molluscicidal) activity against the snail *Biomphalaria glabrata* ($LC_{50} = \pm 1$ ppm), an intermediate host in the schistosome life cycle [51]. The tyramine derivative **28** displayed moderate antiprotozoal activity ($IC_{50} = 38 \mu M$) against *Plasmodium falciparum* as reported by Gutierrez et al. [46]. Complementary assays with synthesized analogues suggested that longer FA lead to increased antiplasmodial activity, while the presence of polar groups on the FA chain decreased the activity. The ALA-AR analogue **29** could also be considered as antiparasitic agent, as its LA analogue [50]. *In vitro* tests of **29** exhibited moderate activity ($IC_{50} = 25 \mu M$) against intracellular form of the parasite *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease), and a significant activity ($IC_{50} = 0.6 \mu M$) against a unicellular kinetoplastid protozoan parasite *Leishmania donovani* (human visceral leishmaniasis). As observed for cytotoxicity activity (part 4.2.), free phenolic hydroxyl groups are required for the antiparasitic activity. It was also demonstrated the importance of the *bis*-allylic positions. Moreover, this compound showed a stronger antiparasitic activity compared to catechol, suggesting the importance of the lipid part in the activity. Another AR **32** displayed paralyzing effects on the nematodes *Trichostrongylus colubriformis* (infective larvae for sheep) [52]. It was less potent compared to LA analogue, and more active than the analogue *trans* n-3 (Z,Z,E). Unfortunately, *in vivo* evaluation (50 mg/kg) showed a lack of activity probably due to enzymatic degradation, weak bioavailability and difference in life stage of the parasite.

While the mechanism of action of those natural lipophenols has not been entirely studied, the literature highlights their interesting biological properties as antibacterial and/or antiparasitic derivatives, suggesting that they may serve a defensive role in plants [58] and in human. Additionally, regarding antibacterial and antiparasitic activities of LA and saturated analogues of some of the reported lipophenols, the PUFA part on those compounds was not absolutely necessary to exert an activity.

5. From administration to the cells

As reported all along the review, biological activity of n-3 lipophenol has been mainly evaluated by *in vitro* (cellular or cellular free) assay, a few studies reported *in vivo* evaluations on mice or rats, but currently no clinical test on human is reported for such derivatives. For cellular assays, due to the weak solubility of lipophenols in aqueous media, the tests are performed using the solubility of compound in DMSO or Ethanol (with a final concentration below 0.1%), that allows the lipophenol derivative to be solubilized in the cell culture medium and to access cell. To illustrate this fact, Huang et al. reported that despite weaker aqueous

solubility, doxorubicine conjugated with ALA was taken up more rapidly and in greater amount by cancerous cell lines compared to free doxorubicine [25]. For *in vivo* administration, since DMSO and ethanol are not acceptable vehicles, the lipophenol could be dissolved in physiologic saline solution in the presence of PEG [35] or using small proportion of detergent such as Tween20 [18], to afford lipophenol solution able to be injected by IV or IP processes. Formation of complex with albumin, as performed in the case of PUFA administration [72], may also be an alternative for *in vivo* administration, since both PUFA [5,6] and polyphenol [73] are known to bind with several sites of albumin, without necessarily affecting their activity [74].

Once administered, what would be the stability of those types of derivatives? Most of the n-3 lipophenol have been synthesized by forming an ester bond between the phenolic and the PUFA parts. After oral administration, lipophenol linked through ester linkage may probably be cleaved during the digestive process. One can imagine that they will be highly metabolized, or rapidly eliminated as are most of the polyphenols after oral ingestion. However Zhong et al. reported an increased activity of the EGCG-PUFA esters (**1**) compared to EGCG after oral administration [31]. Liang et al. studied the stability of DOX-hyd ALA **24a** and DOX-ami-ALA **24b** in rat serum [65]. The results clearly demonstrate the stability of the hydrazone and the amide bond that released less than 25% of Doxorubicine in 48 h. Siddiqui et al. studied the stability of Propofol-DHA (**19**), a diisopropylphenol conjugate of DHA, in human and mouse serum at 37 °C for 2 h [66]. Probably because of steric hindrance of the isopropyl groups, the ester linkage was not cleaved at all. However this could be different with other lipophenols, depending on the chemical structure of the compounds. In future it would be important to study their stability inside of the cell, in presence of cellular esterases.

In the systemic circulation, after IV or IP administration, the biodistribution of the lipophenol will necessarily depend on their ability to bind plasma protein. The degree of binding to the major plasma protein, albumin, may have consequences on the rate of clearance of metabolites and for their delivery to cells and tissues. One of the mechanisms of free PUFA transport is based on their binding with HSA, allowing them to reach lipophilic membrane despite their poor solubility in water [3,75]. This major plasma protein is also able to extensively bind polyphenol depending on their chemical structure [73]. Acylation of polyphenol may probably decrease the affinity of the phenolic part for albumin but the PUFA part should be able to compensate this loss of affinity. Lipophenol binding to human plasma albumin has been reported for DOX-hyd-ALA **24a** which presents a protein binding rate of 98.7%. After IV administration (7.5 mg/kg) this compound was able to reach heart, liver, lung and kidney and specifically the tumor tissue (12 µg/g of tissue). This result could be compared to the one of other PUFA conjugate, such as DHA-Paclitaxel, which showed an extensive bonding with HSA (99.6%) and was relatively stable in blood circulation despite ester linkage between the two parts of the conjugate. Stability and metabolism of each lipophenol derivative will necessarily depend on their chemical structure and remains to be investigated individually for each of them in order to adapt, linker, formulation, doses, way of administration, and reach optimum systemic concentration and cellular uptake.

6. Conclusions and future directions

Chemical structures of natural and synthetic n-3 PUFA phenol derivatives have been reviewed. The design of the entitled compounds is most of the time aiming at enhancing biological efficiency by increasing lipophilicity of naturally “water soluble” polyphenolic molecules. From the synthetic point of view, access to n-3 lipophenols is easily performed using classical coupling reagents

used in organic chemistry. Efficient utilization of enzymatic system such as CALB lipase was used to perform controlled introduction of PUFA moiety on sugar residues of flavonoids. Chemical protection/deprotection strategies have also been successful to access mono PUFA-polyphenolic conjugates. Regioselective functionalization of the phenolic part by the fatty acid(s) is a tedious task yet, even though enzymatic reactions are helpful for some positions. In future, screening and modification of enzymatic lipase would offer additional possibility for lipophenol synthesis. Moreover new pathways have to be explored in the field to successfully complete the full range of lipophenol derivatives using practical syntheses.

Regarding n-3 lipophenol evaluations, those derivatives have showed a wide range of interesting biological activities: antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-bacterial, anti-parasitic activities... Depending on the target and on the lipophenol structures, the role of the n-3 PUFA part was significantly different and the beneficial effect of the introduction of the PUFA moiety has to be assessed. The question of the stability and the metabolism of n-3 lipophenolic structures in biological media have not been fully explored and additional studies must be performed in future to give a better understanding of *in vitro* and *in vivo* mechanisms of those PUFA-phenol conjugates, to highlight the role of each part in the observed activity. Further developments in this field should take into account the increasing amounts of evidence that non enzymatic oxidized polyunsaturated fatty acids (iso-, phyto- and neuroprostanes) are biologically potent compounds that could be considered to produce new series of active lipophenols.

Following the same goal, traditional medicinal chemistry approach should help to design selected linkers (covalent, hydrolyzable, ...) between the PUFA and the phenolic part depending on the way of administration and on the tissue to target. Appropriate formulations (albumin complex, emulsion, ...) of such derivatives will also help to modulate ADME profile and to increase therapeutic index of those new lipophenol derivatives.

Acknowledgments

The authors are grateful to Université of Montpellier for financial support.

References

- [1] N. Siriwardhana, N.S. Kalupahana, N. Moustaid-Moussa, Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, *Adv. Food. Nutr. Res.* 65 (2012) 211–222.
- [2] J.P. Vanden Heuvel, Nutrigenomics and nutrigenetics of omega3 polyunsaturated fatty acids, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 108 (2012) 75–112.
- [3] R.P. Bazinet, S. Laye, Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (2014) 771–785.
- [4] K.B. Pandey, S.I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2 (2009) 270–278.
- [5] B.X. Huang, C. Dass, H.Y. Kim, Probing conformational changes of human serum albumin due to unsaturated fatty acid binding by chemical cross-linking and mass spectrometry, *Biochem. J.* 387 (2005) 695–702.
- [6] I. Petúpas, T. Grune, A.A. Bhattacharya, S. Curry, Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, *J. Mol. Biol.* 314 (2001) 955–960.
- [7] M. Suh, A.A. Wierzbicki, E. Lien, M.T. Clandinin, Relationship between dietary supply of long-chain fatty acids and membrane composition of long- and very long chain essential fatty acids in developing rat photoreceptors, *Lipids* 31 (1996) 61–64.
- [8] R. Pamplona, Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity, *BBA Bioenergetics* 1777 (2008) 1249–1262.
- [9] W. Gerwick, W. Fenical, Phenolic lipids from related marine-algae of the order dictyotales, *Phytochemistry* 21 (1982) 633–637.
- [10] B. Mbatia, S.S. Kaki, B. Mattiasson, F. Mulaa, P. Adlercreutz, Enzymatic synthesis of lipophilic rutin and vanillyl esters from fish byproducts, *J. Agric. Food. Chem.* 59 (2011) 7021–7027.
- [11] F. Mellou, H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos, F.N. Kolisis, Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells, *Process Biochem.* 41 (2006) 2029–2034.

- [12] K.S. Ziaullah, S.N. Bhullar, H.P. Warnakulasuriya, Rupasinghe, Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant capacity and tyrosinase inhibition activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 684–692.
- [13] J. Viskupicova, M. Danhelova, M. Majekova, T. Liptaj, E. Sturdik, Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: a quantum-chemical QSAR analysis, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27 (2012) 800–809.
- [14] J. Viskupicova, M. Danhelova, M. Ondrejovic, T. Liptaj, E. Sturdik, Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods, *Food Chem.* 123 (2010) 45–50.
- [15] M.M. Zheng, L. Wang, F.H. Huang, P.M. Guo, F. Wei, Q.C. Deng, C. Zheng, C.Y. Wan, Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 95 (2013) 82–88.
- [16] A. Torres de Pinedo, P. Penalver, D. Rondon, J.C. Morales, Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure, *Tetrahedron* 61 (2005) 7654–7660.
- [17] K. Sabally, S. Karboune, R. St-Louis, S. Kermasha, Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids, *J. Biotechnol.* 127 (2006) 167–176.
- [18] V. Bezuglov, M. Bobrov, N. Gretskeya, A. Gonchar, G. Zinchenko, D. Melck, T. Bisogno, V. Di Marzo, D. Kuklev, J.C. Rossi, J.P. Vidal, T. Durand, Synthesis and biological evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 447–449.
- [19] T. Bisogno, D. Melck, M. Bobrov, N.M. Gretskeya, V.V. Bezuglov, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo, *Biochem. J.* 351 (Pt 3) (2000) 817–824.
- [20] S. Maruo, I. Kuriyama, K. Kuramochi, K. Tsubaki, H. Yoshida, Y. Mizushima, Inhibitory effect of novel 5-O-acyl juglones on mammalian DNA polymerase activity, cancer cell growth and inflammatory response, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 5803–5812.
- [21] N. Matsuyama, T. Kosaka, M. Fukuhara, Y. Soda, K. Mizuno, Polyunsaturated fatty acid anilides as inhibitors of acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 2039–2042.
- [22] S. Pany, A. Majhi, J. Das, PKC activation by resveratrol derivatives with unsaturated aliphatic chain, *PLoS One* 7 (2012) e52888.
- [23] B.Z. Ahn, K.U. Baik, G.R. Kweon, K. Lim, B.D. Hwang, Acylshikonin analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 1044–1047.
- [24] K.A. Harvey, Z. Xu, P. Whitley, V.J. Davisson, R.A. Siddiqui, Characterization of anticancer properties of 2,6-diisopropylphenol-docosahexaenoate and analogues in breast cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 1866–1874.
- [25] M.L. Huan, S.Y. Zhou, Z.H. Teng, B.L. Zhang, X.Y. Liu, J.P. Wang, Q.B. Mei, Conjugation with alpha-linolenic acid improves cancer cell uptake and cytotoxicity of doxorubicin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2579–2584.
- [26] N. Tuoya, Y. Baba, Y. Shimoiishi, M. Murata, M. Tada, K. Koseki, Takahata, apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells, *Life Sci.* 78 (2006) 1515–1519.
- [27] Y.J. You, Y. Kim, N.H. Nam, B.Z. Ahn, Antitumor activity of unsaturated fatty acid esters of 4'-demethyldeoxydopoyllotoxin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 2629–2632.
- [28] P. Burch, A. Chicca, J. Gertsch, K. Gademann, Functionally optimized neurotogenic farnesone C analogs: SAR-study and investigations on their mode of action, *ACS Med. Chem. Lett.* 5 (2014) 172–177.
- [29] H.T. Dang, G.J. Kang, E.S. Yoo, J. Hong, J.S. Choi, H.S. Kim, H.Y. Chung, J.H. Jung, Evaluation of endogenous fatty acid amides and their synthetic analogues as potential anti-inflammatory leads, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 1520–1527.
- [30] D.K. O'Dell, N. Rimmerman, S.R. Pickens, J.M. Walker, Fatty acyl amides of endogenous tetrahydroisoquinolines are active at the recombinant human TRPV1 receptor, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 6164–6169.
- [31] Y. Zhong, Y.S. Chiou, M.H. Pan, C.T. Ho, F. Shahidi, Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in mice, *J. Funct. Foods* 4 (2012) 323–330.
- [32] Y. Zhong, Y.S. Chiou, M.H. Pan, F. Shahidi, Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages, *Food Chem.* 134 (2012) 742–748.
- [33] Y. Zhong, F. Shahidi, Lipophilized epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives as novel antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 6526–6533.
- [34] R.A. Hiipakka, H.Z. Zhang, W. Dai, Q. Dai, S.T. Liao, Structure-activity relationships for inhibition of human 5 alpha-reductases by polyphenols, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1165–1176.
- [35] S.F. Lin, Y.H. Lin, M. Lin, Y.F. Kao, R.W. Wang, L.W. Teng, S.H. Chuang, J.M. Chang, T.T. Yuan, K.C. Fu, K.P. Huang, Y.S. Lee, C.C. Chiang, S.C. Yang, C.L. Lai, C.B. Liao, P. Chen, Y.S. Lin, K.T. Lai, H.J. Huang, J.Y. Yang, C.W. Liu, W.Y. Wei, C.K. Chen, R.A. Hiipakka, S. Liao, J.J. Huang, Synthesis and structure-activity relationship of 3-O-acylated (-)-epigallocatechins as Salpa-reductase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 6068–6076.
- [36] F. Mainini, A. Contini, D. Nava, P.A. Corsetto, A.M. Rizzo, E. Agradi, E. Pini, Synthesis, molecular characterization and preliminary antioxidant activity evaluation of quercetin fatty esters, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 90 (2013) 1751–1759.
- [37] C. Crauste, C. Vigor, P. Brabet, M. Picq, M. Lagarde, C. Hamel, T. Durand, J. Vercauteren, Synthesis and evaluation of polyunsaturated fatty acid-phenol conjugates as anti-carbonyl-stress lipophenols, *Eur. J. Org. Chem.* (2014) 4548–4561.
- [38] I. Matuszewska, A. Leniewski, P. Roszkowski, Z. Czarnocki, Synthesis of a novel class of fatty acids-derived isoquinolines, *Chem. Phys. Lipids* 135 (2005) 131–145.
- [39] D.D. Wang, T.J. Girard, T.P. Kasten, R.M. LaChance, M.A. Miller-Wideman, R.C. Durlley, Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids toward soluble tissue factor-factor VIIa complex, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 1352–1355.
- [40] H. Zhang, X. Xiao, M.M. Conte, Z. Khalil, R.J. Capon, Spiralisones A-D: acylphloroglucinol hemiketals from an Australian marine brown alga, *Zonaria spiralis*, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 9671–9676.
- [41] C. Tringali, M. Piattelli, 2 chromone derivatives from the brown alga *Zonaria-Tournefortii*, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 1509–1512.
- [42] V. Amico, R. Currenti, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, A phloroglucinol derivative from the brown alga *Zonaria-Tournefortii*, *Phytochemistry* 20 (1981) 1451–1453.
- [43] R.P. Gregson, R. Kazlauskas, P.T. Murphy, R.J. Wells, New metabolites from brown alga *Cystophora-Torulosa*, *Aust. J. Chem.* 30 (1977) 2527–2532.
- [44] R. Kazlauskas, L. King, P.T. Murphy, R.G. Warren, R.J. Wells, New metabolites from the brown algal Genus *Cystophora*, *Aust. J. Chem.* 34 (1981) 439–447.
- [45] R.A. Barrow, R.J. Capon, Alkyl and alkenyl resorcinols from an Australian marine sponge, *Haliclona Sp* (Haplodiscerida, Haliclonidae), *Aust. J. Chem.* 44 (1991) 1393–1405.
- [46] M. Gutierrez, T.L. Capson, H.M. Guzman, J. Gonzalez, E. Ortega-Barria, E. Quinoa, R. Riquera, Antiplasmodial metabolites isolated from the marine octocoral *Muricea austera*, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1379–1383.
- [47] M.M. McCollom, J.R. Villinski, K.L. McPhail, L.E. Craker, S. Gafner, Analysis of macamins in samples of *Maca* (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS, *Phytochem. Anal.* 16 (2005) 463–469.
- [48] T. Refßstrup, O. Hammershoy, P.M. Boll, H. Schmidt, *Philodendron-scandens* Koch Et Sello subsp *oxycardium* (Schott) Bunting, a new source of allergenic alkyl resorcinols, *Acta Chem. Scand. B* 36 (1982) 291–294.
- [49] M. Tori, K. Nakashima, Y. Asakawa, Sesquiterpenes and a phenolic compound from the liverwort *Omphalanthus-Filiformis*, *Phytochemistry* 38 (1995) 651–653.
- [50] C. Jimenez-Romero, D. Torres-Mendoza, L.D.U. Gonzalez, E. Ortega-Barria, K.L. McPhail, W.H. Gerwick, L. Cubillas-Rios, Hydroxyalkenylresorcinols from *Stylogne turbacensis*, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 1249–1252.
- [51] J. Corthout, L. Pieters, M. Claeys, S. Geerts, D. Vandenberghe, A. Vlietinck, Antibacterial and molluscicidal phenolic-acids from *Spondias Mombin*, *Planta Med.* 60 (1994) 460–463.
- [52] S. Valcic, G.A. Wachter, C.M. Eppler, B.N. Timmermann, Nematicidal alkylene resorcinols from *Lithraea molleoides*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1270–1273.
- [53] Y.D. Zhu, D.R. Conklin, H.D. Chen, L.Y. Wang, S.M. Sang, 5-Alk(en)ylresorcinols as the major active components in wheat bran inhibit human colon cancer cell growth, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 3973–3982.
- [54] G. Cefarelli, B. D'Abrosca, A. Fiorentino, A. Izzo, P. Monaco, Isolation, characterization, and antioxidant activity of E- and Z-p-coumaryl fatty acid esters from cv. Annurca apple fruits, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3525–3529.
- [55] M.E. Masaki, S. Hiro, Y. Usuki, T. Harumoto, M.N. Terazima, F. Buonanno, A. Miyake, H. Iio, Climacostol, a defense toxin of *Climacostomum virens* (protozoa, ciliata), and its congeners, *Tetrahedron* 60 (2004) 7041–7048.
- [56] M. El Hattab, N. Bouzidi, A. Ortalo-Magne, Y. Daghbouche, M. Richou, S.E. Chitour, B. de Reviere, L. Piovetti, Eicosapentaenoic acid: possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonaria tournefortii* (JV Lamouroux) Montagne, *Biochem. Syst. Ecol.* 37 (2009) 55–58.
- [57] H.F. Anwar, T.V. Hansen, First total synthesis of a polyunsaturated chromone metabolite isolated from the brown algae *Zonaria tournefortii*, *Org. Lett.* 11 (2009) 587–588.
- [58] S.R. Baerson, J. Schroder, D. Cook, A.M. Rimando, Z. Pan, F.E. Dayan, B.P. Noonan, S.O. Duke, Alkylresorcinol biosynthesis in plants: new insights from an ancient enzyme family?, *Plant Signal. Behav.* 5 (2010) 1286–1289.
- [59] A. Kozubek, J.H.P. Tyman, Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity, *Chem. Rev.* 99 (1999) 1–25.
- [60] M. Laguerre, E.A. Decker, J. Lecomte, P. Villeneuve, Methods for evaluating the potency and efficacy of antioxidants, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13 (2010) 518–525.
- [61] I. Pinchuk, H. Shoval, Y. Dotan, D. Lichtenberg, Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays, *Chem. Phys. Lipids* 165 (2012) 638–647.
- [62] Y.M.A. Mohamed, A. Vik, T. Hofer, J.H. Andersen, T.V. Hansen, Polyunsaturated fatty acid-derived chromones exhibiting potent antioxidant activity, *Chem. Phys. Lipids* 170 (2013) 41–45.
- [63] Y. Wang, L. Li, W. Jiang, Z. Yang, Z. Zhang, Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2974–2977.
- [64] K. Effenberger, S. Breyer, R. Schobert, Modulation of doxorubicin activity in cancer cells by conjugation with fatty acyl and terpenyl hydrazones, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1947–1954.
- [65] C.H. Liang, W.L. Ye, C.L. Zhu, R. Na, Y. Cheng, H. Cui, D.Z. Liu, Z.F. Yang, S.Y. Zhou, Synthesis of doxorubicin alpha-linolenic acid conjugate and evaluation of its antitumor activity, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1378–1390.
- [66] R.A. Siddiqui, M. Zerouga, M. Wu, A. Castillo, K. Harvey, G.P. Zaloga, W. Stillwell, Anticancer properties of propofol-docosahexaenoate and propofol-eicosapentaenoate on breast cancer cells, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) R645–R654.
- [67] D. Melck, T. Bisogno, L. De Petrocellis, H. Chuang, D. Julius, M. Bifulco, V. Di Marzo, Unsaturated long-chain N-acyl-vanillyl-amides (N-AVAMs): vanilloid

- receptor ligands that inhibit anandamide-facilitated transport and bind to CB1 cannabinoid receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) 275–284.
- [68] A. Pino-Figueroa, D. Nguyen, T.J. Maher, Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1199 (2010) 77–85.
- [69] Z. Hajdu, S. Nicolussi, M. Rau, L. Lórantfy, P. Forgo, J. Hohmann, D. Csupor, J. Gertsch, Identification of endocannabinoid system-modulating N-Alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1663–1669.
- [70] H. Wu, C.J. Kelley, A. Pino-Figueroa, H.D. Vu, T.J. Maher, Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 5188–5197.
- [71] N.J. Coates, M.L. Gilpin, M.N. Gwynn, D.E. Lewis, P.H. Milner, S.R. Spear, J.W. Tyler, Sb-202742, a novel beta-lactamase inhibitor isolated from *Spondias Mombin*, *J. Nat. Prod.* 57 (1994) 654–657.
- [72] M.O. Trepanier, J. Lim, T.K. Lai, H.J. Cho, A.F. Domenichiello, C.T. Chen, A.Y. Taha, R.P. Bazinet, W.M. Burnham, Intraperitoneal administration of docosahexaenoic acid for 14 days increases serum unesterified DHA and seizure latency in the maximal pentylenetetrazol model, *Epilepsy Behav.* 33 (2014) 138–143.
- [73] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747.
- [74] O. Dangles, C. Dufour, S. Bret, Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin, *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2* (1999) 737–744.
- [75] A.A. Spector, Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain, *J. Mol. Neurosci.* 16 (2001) 159–165.

Lipids

Total Syntheses of Two bis-Allylic-Deuterated DHA Analogues

Mélissa Rosell, Maxime Villa, Thierry Durand, Jean-Marie Galano, Joseph Vercauteren, and Céline Crauste*^[a]

Abstract: The deuteration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) at their bis-allylic positions is known to limit harmful lipid peroxidation, which leads to the damage of cell membranes. Therefore, to impede toxic lipid peroxidation in retina tissue, we have designed and synthesized two deuterated analogues of docosahexaenoic acid (DHA; C22:6, *n*-3), which is the main lipid constituent of retina membranes. To avoid its oxidative degradation into toxic carboxyethylpyrrole (CEP) adducts, whilst preserving enzymatic metaboliza-

tion into a healthy neuroprotective derivative (NPD1), deuterium was incorporated at specific 6- and 6,9-bis-allylic positions. A convergent synthetic strategy, based on a Wittig olefination, was developed to obtain both deuterated DHA species. Common aldehyde intermediates were synthesized from another PUFA, eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5, *n*-3). Deuterium atoms were introduced through either the reduction of an ester with a deuterated reagent or a nucleophilic reaction with deuterated paraformaldehyde.

Introduction

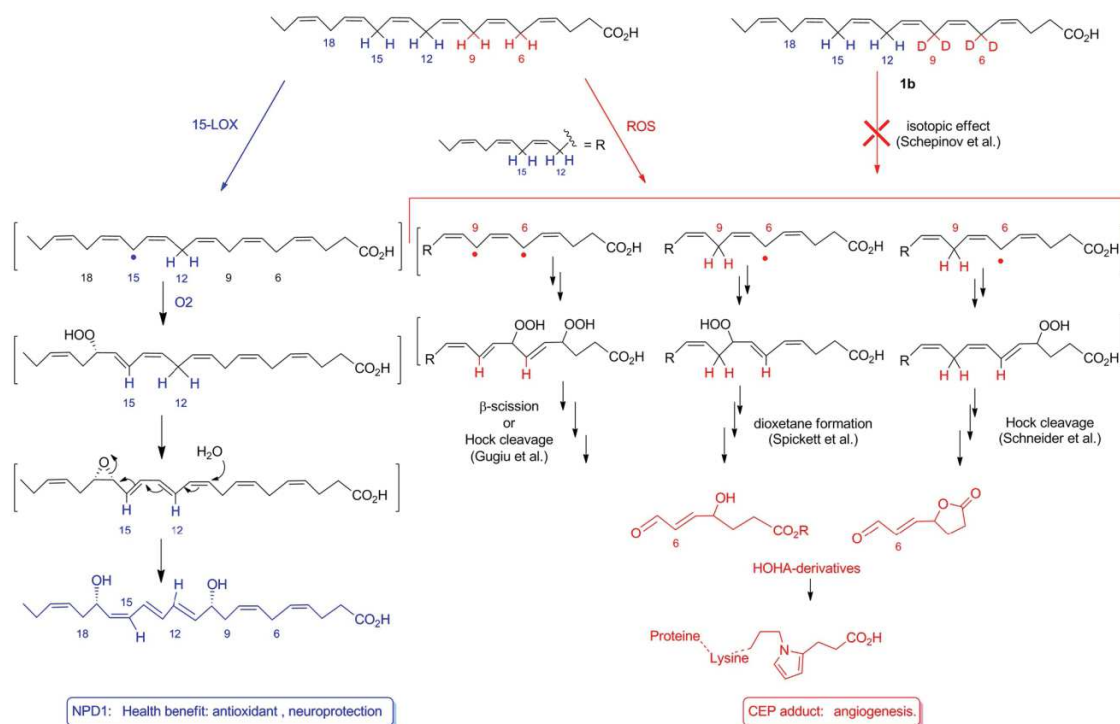
Docosahexaenoic acid (DHA; C22:6, *n*-3), a polyunsaturated fatty acid (PUFA) that is highly enriched in the membranes of retina and brain tissue, is necessary for brain and retina development in infants^[1] and for the retention of normal function in adults.^[2] Like many PUFAs, DHA supplementation has been widely studied and has been shown to have a positive effect on several inflammatory diseases.^[3] Furthermore, DHA supplementation is also considered to be an effective strategy for the prevention of cardiovascular disease^[4] and neurological disorders.^[5] However, the effect of DHA on oxidative damage in retina and brain pathologies remains controversial. Conflicting data on DHA supplementation (in clinical studies or in animal models) have shown either beneficial^[6] or no effect^[7] on the impediment of retina degeneration, thereby leading to the hypothesis that DHA activity may also depend on DHA metabolites and, thus, on patient metabolism. In fact, because of its chemical structure and the presence of six double bonds and five highly oxidizable bis-allylic positions, this lipid derivative is susceptible to enzymatic and non-enzymatic oxidations. In both cases, conversion occurs through the abstraction of a hydrogen atom from one of the bis-allylic position, as initiated

either by reactive oxygen species (ROS; [•]OOR, [•]OR, [•]OH, or NO₂[•]) or by specific enzymes, and leads to an unstable pentadienyl radical that can rearrange in different ways to form cyclic or non-cyclic metabolites. As a result, enzymatic and non-enzymatic conversions of DHA can lead to a large variety of bioactive "mediators" (neuroprotectin, resolvin, neuroprostane, neurofurane, neuroketal, etc.), depending on the position of the first abstracted hydrogen atom, the enzyme involved, the partial pressure of oxygen, and the importance of oxidative stress.^[8]

There is recent compelling evidence that non-enzymatic and enzymatic oxidized metabolites of DHA may contribute to its positive as well as negative biological activities (in vitro and in vivo). These cell mediators, signaling molecules, and biologically active secondary metabolites can either be protective or toxic towards the cells. For example, neuroprotectin D1 (NPD1), which is biosynthesized by 15-lipoxygenase (15-LOX) from enzymatic bis-allylic hydrogen abstraction at the 15 position (followed by epoxide rearrangement and hydrolysis), has shown interesting antioxidant properties in retina cells,^[9] anti-inflammatory activity,^[10] and neuroprotective properties^[11] (Scheme 1). Coming from a non-enzymatic pathway, 4-F₄-neuroprostane is generated by the free-radical oxidation of DHA and has shown powerful antiarrhythmic activity.^[12] Unfortunately, the ROS-initiated oxidation of PUFAs in cell membranes also leads to lipid peroxides, DNA deterioration, and, thus, is involved in carcinogenesis. The end-products of DHA peroxidation include small electrophilic carbonyl species, such as *trans*-4-hydroxy-hex-2-enal (4-HHE). Such a reactive aldehyde is prone to nucleophilic attack by cellular components (DNA or proteins), thereby causing irreversible damage to the cells,^[13] yet it is surprisingly also responsible for antioxidant defenses through the activation of the Nrf2/keap1 pathway in the

[a] M. Rosell, M. Villa, Dr. T. Durand, Dr. J.-M. Galano, Prof. J. Vercauteren, Dr. C. Crauste
 Institut des Biomolécules Max Mousseron
 IBMM, UMRS247 CNRS-UM-ENSCM
 Faculté de Pharmacie
 15 avenue C. Flahault, BP 14491
 34093 Montpellier Cedex 5 (France)
 Fax: (+33) 4-11-75-95-66
 E-mail: celine.crauste@umontpellier.fr

Supporting information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/ajoc.201600565>.



Scheme 1. DHA oxidation yields toxic or beneficial metabolites for retina cells.

cells.^[14] In an analogous manner to the formation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) through *n*-6 lipid peroxidation,^[15] 4-hydroxy-7-oxo-hept-5-enoic acid (HOHA; Scheme 1) is generated from DHA oxidation, which is, most likely, initiated by H-abstraction at the 6- or, 6- and 9-positions. Protein lysyl ϵ -amino residues readily add onto such HOHA compounds (free acid, lactone, or even phosphatidylethanolamine derivatives) to generate 2- ω -carboxyethylpyrroles (CEP adducts), which induce angiogenesis in the retina, a pathological development that is associated with the advanced stages of age-related macular degeneration (AMD).^[16]

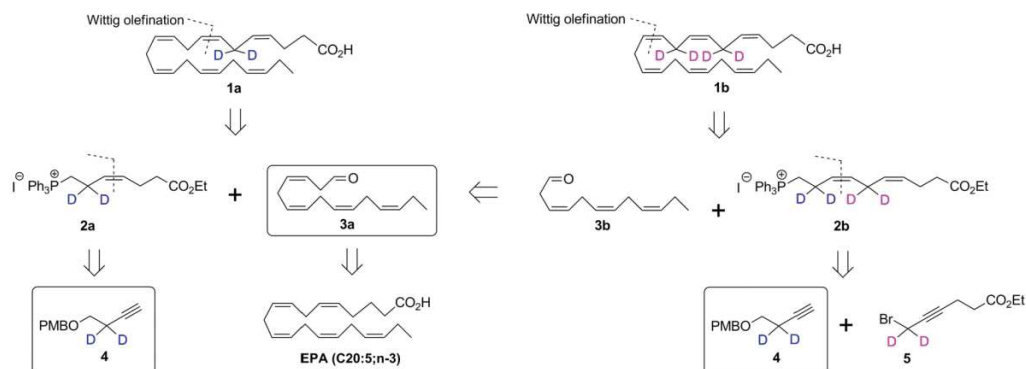
Recently, Shchepinov and co-workers^[17] prepared analogues of linoleic and linolenic acids that were deuterated at their bis-allylic sites and found that they slowed down bis-allylic abstraction ($k_H/k_D=23$ in the case of (11,11- D_2)-linoleic acid) during the tocopherol-mediated peroxidation process. This result was attributed to the primary kinetic deuterium isotope effect, which was linked to the replacement of two hydrogen atoms on those positions.^[17d] This work showed that such deuterated PUFAs were much more reluctant to undergo oxidation than nondeuterated lipids, but were also able to protect adjacent nondeuterated PUFAs from lipid peroxidation.

As part of our ongoing interest in the development of DHA conjugates for applications in pharmacological issues related to the treatment of retina pathologies,^[18] we applied this strategy to the DHA and herein, we report the first total syntheses of two DHA analogues that were regioselectively deuterated at

the 6- and 9-bis-allylic positions (**1a** and **1b**, respectively; Scheme 2). Such compounds could, on the one hand, increase the protection of retina cell membranes against peroxidation by impeding the formation of toxic HOHA derivatives and, thus, of the deleterious CEP adducts (Scheme 1), whilst on the other hand, retain their enzymatic metabolization into the beneficial NPD1, owing to the presence of more abstractable hydrogen atoms at the required 15- and 12-positions (Scheme 1). Moreover, in these specific deuterated DHA analogues, the oxidation reaction may be oriented to selectively target the bis-allylic positions, thereby leading to a restricted number of biological mediators. Therefore, these compounds would be efficient biological tools for better identifying which DHA metabolites are involved in health benefits and which have toxic effects.

Results and Discussion

Deuterium-labeled compounds can be used in a wide range of applications and their synthesis has been extensively studied. The incorporation of deuterium through H/D exchange has been achieved by using iridium or ruthenium complexes on aliphatic or aromatic substrates,^[19] and even at the allylic position after alkene isomerization.^[20] However, these methods were not designed to selectively incorporate deuterium atoms at the bis-allylic positions of DHA.



Scheme 2. Retrosynthetic analysis of (6,6-D₂)-DHA and (6,6,9,9-D₄)-DHA through common intermediates **4** and **3a**.

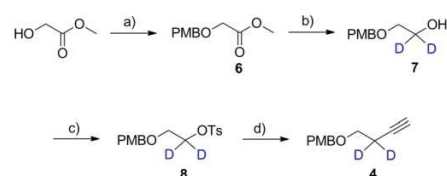
To access (6,6-D₂)-DHA (**1a**) and (6,6,9,9-D₄)-DHA (**1b**), we developed a convergent synthetic strategy based on a Wittig reaction for the formation of a double bond at the 7- or 10-positions of the DHA skeleton (Scheme 2). Aldehyde **3a** and alkyne **4** were identified as common intermediates in the retrosyntheses of both deuterated PUFAs. Indeed, compound **1a** could be obtained from a Wittig olefination reaction between compound **3a** and the ylide that is generated from phosphonium salt **2a**. Aldehyde **3a** could also serve as a precursor to aldehyde **3b**, which could be involved in the key Wittig coupling reaction for the synthesis of compound **1b**.

Aldehyde **3a** could be obtained from the natural PUFA eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5, *n*-3), which would allow us to directly incorporate the remaining four double bonds into the C22 lipid skeleton. Then, deuterium atoms could be incorporated during the syntheses of phosphonium salts **2a** and **2b**, which could occur from a common deuterated alkyne (synthon **4**). This synthon could either be deprotonated and involved in a reaction with oxetane to give compound **2a**, or coupled with deuterated propargylic bromide derivative synthon **5** to obtain the second phosphonium salt (**2b**).

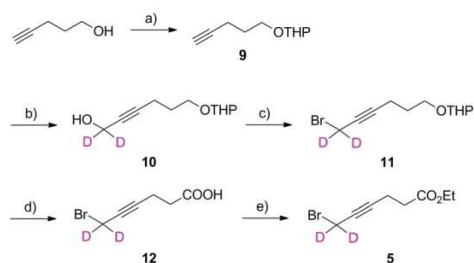
Synthesis of Deuterated Synthons **4** and **5**

Two methods of deuteration were employed to produce deuterated synthons **4** and **5**. The synthesis of synthon **4** (Scheme 3) started with the protection of the methylglycolate with a *p*-methoxybenzyl (PMB) group under acidic conditions to give compound **6**. Reduction^[21] of the ester group by using LiAlD₄ afforded deuterated intermediate **7**, which was converted into the corresponding tosyl ester (**8**). Finally, nucleophilic substitution with the lithium acetylide ethylenediamine complex (LiCCH₂EDA)^[22] led to the desired deuterated terminal alkyne (**4**) in 61% yield in four steps.

A different procedure was used to introduce the deuterium atoms into synthon **5** (Scheme 4). After the protection of 5-pentyn-1-ol with a tetrahydropyran (THP) group,^[23] terminal alkyne **9** was deprotonated by using a Grignard reagent. Then, nucleophilic attack on deuterated *para*formaldehyde afforded alcohol **10**, which was further converted into the correspond-



Scheme 3. Synthesis of deuterated alkyne **4**: a) PMBTCA, CSA, CH₂Cl₂, RT, 96% yield; b) LiAlD₄, Et₂O, 0 °C, 91% yield; c) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 97% yield; d) LiCCH₂EDA, DMSO, 10 °C to RT, 77% yield. PMBTCA = *p*-methoxybenzyl trichloroacetimidate, Ts = *p*-methylphenylsulfonyl, CSA = camphorsulfonic acid.

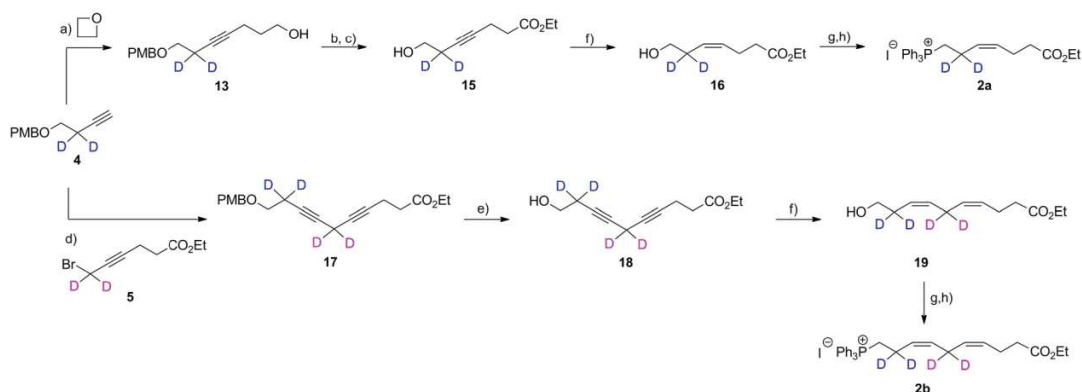


Scheme 4. Synthesis of deuterated bromide **5**: a) DHP, PTSA, CH₂Cl₂, RT, 91% yield; b) EtMgBr then (CD₂O)_{*n*}, THF, reflux, 86% yield; c) CBr₄, PPh₃, imidazole, CH₂Cl₂, -40 °C, 60% yield; d) Jones reagent (2.17 M), acetone, 0 °C, 87% yield; e) H₂SO₄ (cat.), EtOH, 30 °C, 90% yield. PTSA = *p*-toluenesulfonic acid

ing bromide derivative (**11**) by using the Appel reagent. Cleavage of the THP group and oxidation were performed at the same time by using Jones conditions to give acid **12**. A final Fischer esterification afforded the deuterated propargylic bromide derivative synthon (**5**) in 37% yield in five steps.

Synthesis of Phosphonium Salts **2a** and **2b**

For the syntheses of compounds **2a** and **2b**, deuterated alkyne **4** was chosen as a common starting material



Scheme 5. Synthesis of deuterated phosphonium salts **2a** and **2b**: a) *n*BuLi, BF₃·Et₂O, THF, –78 °C, 79% yield; b) Jones reagent (2.17 M), acetone, 0 °C, 94% yield; c) EtOH, H₂SO₄ (cat), 35 °C, 86% yield; d) CuI, NaI, K₂CO₃, DMF, RT, 75% yield; e) DDQ, CH₂Cl₂/water, RT, 94% yield; f) P2-Ni, EDA, EtOH, 0 °C, 90% yield (6% over-reduction) for compound **16** and 78% yield (13% over-reduction) for compound **19**; g) I₂, PPh₃, imidazole, CH₂Cl₂, 0 °C to RT; h) PPh₃, MeCN, reflux, 87% yield for compound **2a** and 93% yield for compound **2b** (over two steps).

(Scheme 5). Our synthesis of compound **2a** began with ring-opening of the oxetane after the deprotonation of compound **4** by using *n*BuLi in the presence of Lewis acid BF₃·Et₂O (79% yield).^[24] Jones oxidation of alcohol **13** afforded acid **14**, which was followed by esterification and deprotection of the PMB group. Reduction of alkyne **15** with the P2-Ni catalytic system^[25] (Brown's catalyst; Ni(OAc)₂ in the presence of NaBH₄, poisoned by ethylenediamine) yielded alkene **16** (90% yield), with a small amount of over-reduction (6%). Then, the iodine derivative was obtained from alcohol **16** by using the Appel reagent and was finally transformed into the corresponding phosphonium salt (**2a**) through nucleophilic displacement with triphenylphosphine.

The synthesis of compound **2b** (Scheme 5) started with the preparation of skipped-diene unit **17**. The coupling reaction between terminal alkyne **4** and deuterated propargylic bromide **5** was achieved by using Caruso conditions in the presence of CuI (75% yield),^[26] and deprotection of the PMB group gave the tetradeuterated skipped-diene alcohol (**18**).

To prevent the formation of over-reduced byproducts during the reduction of skipped-diene **18** into skipped-diene **19**, three different hydrogenation reactions^[27] were tested and compared: Lindlar catalyst,^[28] Rosenmund catalyst,^[29] and Brown's catalyst. The proportion of over-reduction was estimated from the integration of the CH₂–OH signal in the ¹H NMR spectrum (Figure 1).

Increasing the number of equivalents of ethylenediamine and decreasing the reaction time and temperature allowed us to limit the formation of the over-reduction side-product to 13% (the over-reduced side product was removed during the final purification of compound **1b**) with the P2-Ni catalytic system (78% yield). The Lindlar and Rosenmund catalysts afforded higher proportions of the over-reduction side-product (23% and 32%, respectively; Figure 1) and also suffered from a lack of reproducibility. Finally, phosphonium salt **2b** was synthesized from skipped-diene alcohol **19** in two steps by using similar conditions as for the synthesis of compound **2a**.

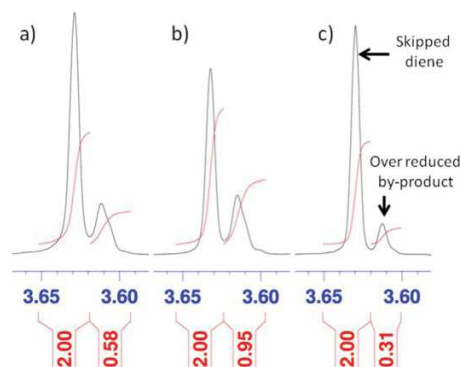
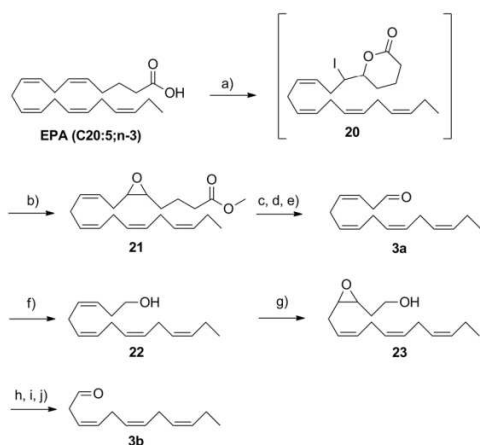


Figure 1. ¹H NMR signals of the CH₂–OH group during the hydrogenation of compound **18**. Percentage over-reduction: a) Lindlar catalyst (Pd/CaCO₃, poisoned with quinoline), 23%; b) Rosenmund catalyst (Pd/BaSO₄, poisoned with quinoline), 32%; c) Brown's catalyst (Ni(OAc)₂ in the presence of NaBH₄, poisoned with ethylenediamine), 13%.

Synthesis of Aldehydes **3a** and **3b**

Aldehydes **3a** and **3b** were prepared from the polyunsaturated fatty acid EPA (Scheme 6). This strategy allowed us to access chemical synthons that already contained three or four (*Z*) double bonds in their backbones. EPA was extracted from cod liver oil by using a process that was developed to concentrate PUFAs starting from fish oil.^[18b] The synthesis of epoxyester **21** began by treating EPA with γ -collidine (2,4,6-trimethylpyridine) in the presence of a small excess of I₂ (2 equiv), as described by Itoh et al.,^[30] to give iodolactone intermediate **20**. By using such a procedure, epoxide **21** was obtained in 95% yield in two steps after opening of the iodolactone. This procedure was preferred to that reported by Jakobsen et al.,^[31] in which large excesses of I₂ (8 equiv), KI, and KHCO₃ were required and which led to a low yield of the product and difficult purification of the iodolactone. Aldehyde **3a** was finally ob-



Scheme 6. Synthesis of aldehydes **3a** and **3b** from EPA: a) I_2 , γ -Collidine, MeCN, 0 °C; b) K_2CO_3 , MeOH, RT, 95% yield (over two steps); c) Ac_2O , AcOH, 45 °C; d) LiOH, water/MeOH, RT; e) $NaIO_4$, water/MeOH, RT, 87% yield (over three steps); f) $NaBH_4$, MeOH, 0 °C, 64% yield (over four steps from compound **21**); g) $VO(acac)_2$, *t*BuOOH, toluene, 0 °C to RT, 73% yield; h) Ac_2O , AcOH, 45 °C; i) LiOH, water/MeOH, RT; j) $NaIO_4$, water/MeOH, RT, 62% yield (over three steps). Ac_2O =acetic anhydride, AcOH=acetic acid, $VO(acac)_2$ =Vanadyl acetylacetonate.

tained from compound **21** in three steps in a one-pot procedure:^[32] the epoxide was opened by using acetic anhydride in acetic acid; the resulting acetylated intermediate was saponified to give a vicinal diol; and the diol was oxidized by using sodium periodate ($NaIO_4$) to afford the desired aldehyde (**3a**) in 87% crude yield. This latter compound was used without purification by column chromatography on silica gel because of its susceptibility towards degradation into the corresponding α,β -unsaturated aldehyde. However, purification by aqueous washing and filtration through Celite® allowed us to isolate the desired aldehyde in high purity (which was necessary for a successful Wittig olefination reaction).

We envisaged a synthesis of aldehyde **3b** from compound **3a** in five steps as described by Wang et al.^[33] Thus, the reduction of compound **3a** with $NaBH_4$ afforded homoallylic alcohol **22**, which was treated with vanadyl acetylacetonate ($VO(acac)_2$) and *t*BuOOH to give intermediate epoxide alcohol **23**. Ring-opening of the epoxide was first performed with perchloric acid, which led to an unstable triol intermediate that was treated with sodium periodate to promote oxidative cleavage. However, disappointingly, under these conditions, compound

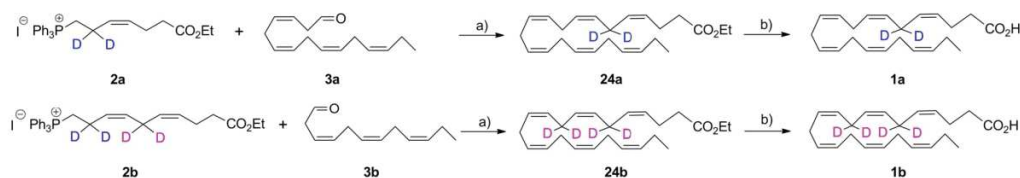
3b was isolated in unacceptable purity for its use in the Wittig reaction. Thus, we employed the procedure that we previously used to synthesize compound **3a** and optimized the reaction conditions to obtain the desired aldehyde **3b** in high purity from epoxide alcohol **23**. Thus, opening of the epoxide and protection of the resulting alcohol by using acetic anhydride, followed by mild saponification with LiOH and oxidative cleavage, led to aldehyde **3b** (62% crude yield in three step without purification by column chromatography on silica gel). Two determining factors were identified for obtaining the aldehyde (**3b**) in acceptable purity: epoxide **23** had to be used no more than one week after its preparation (because of possible degradation) and the reaction time of the epoxide-opening/acetylation reaction needed to be limited to form only the mono- and diacetylated derivatives, because the triacetylated compound appeared to be less reactive towards saponification.

Final Steps in the Synthesis of the Deuterated DHA Analogues

Both deuterated DHA skeletons were obtained thanks to the key Wittig olefination reaction. During the optimization of the synthesis of the DHA ethyl esters (**24a** and **24b**; Scheme 7), we found that several parameters were important for the success and reproducibility of the reaction. As shown in Table 1, the temperature of the reaction must reach room temperature after the addition of both reactants (Table 1, entries 1 and 2). The order of addition also played a significant role: more-reproducible yields were obtained when the aldehyde was poured into the ylide (Table 1, entries 2 and 3). Moreover, increasing the number of equivalents of aldehyde (1.7 equiv) allowed us to slightly improve the reaction yield (Table 1, entries 3 and 4). The final essential parameter for obtaining an acceptable reaction yield was the purity of the aldehyde (Table 1, entries 5 and 6). As a result, optimized Wittig conditions gave compounds **24a** and **24b** in 40% and 51% yield, respectively (Table 1, entries 4 and 6). A final saponification step allowed us to obtain (6,6- D_2)-DHA (**1a**) in 8.3% global yield in 17 steps and (6,6,9,9- D_4)-DHA (**1b**) in 1.5% overall yield in 26 steps. Both deuterated DHA analogues were purified by using semi-preparative HPLC to remove the over-reduced byproducts that were obtained during the hydrogenation step.

Conclusion

We have reported the first total syntheses of DHA derivatives that were deuterated at specific 6- or 6,9-bis-allylic positions.



Scheme 7. Final steps to deuterated DHA analogues **1a** and **1b**: a) $NaHMDS$, -50 °C to -20 °C, THF, then compound **3a** or **3b**, -78 °C to RT, 40% yield for compound **2a** and 51% yield for compound **2b**; b) LiOH, EtOH/water (1:1), 60 °C, 77% yield for compound **1a** and 84% yield for compound **1b**.

Table 1. Optimization of Wittig olefination reaction.^[a]

Entry	T [°C]	Aldehyde (equiv)	Product	Yield [%]
1 ^[b]	−78	0.95	24a	6
2 ^[b]	−78 to RT	0.95	24a	12
3 ^[c]	−78 to RT	0.95	24a	31
4 ^[c]	−78 to RT	1.7	24a	40
5 ^[c]	−78 to RT	2	24b	17 ^[d]
6 ^[c]	−78 to RT	1.7	24b	51
7 ^[c]	−78 to RT	1.5	24b	48

[a] The ylide was generated in situ by the addition of NaHMDS (1 equiv) at −50 °C. [b] The ylide was added to the aldehyde at −78 °C. [c] The aldehyde was added to the ylide at −78 °C. [d] The purity of the aldehyde was below 70% (as estimated by using NMR analysis).

The deuterium atoms were either introduced through the reduction of an ester group by using LiAlD₄ or through the nucleophilic substitution of a deprotonated alkyne on deuterated paraformaldehyde. The key Wittig olefination reactions between deuterated ylides and EPA-derived aldehydes were optimized to highlight the essential parameters that were necessary for obtaining good reproducibility and robustness of this approach. As such, although this strategy comprised multiple steps, the target deuterated DHA analogues were obtained on a scale of hundreds of milligrams, which was sufficient to allow their use in both in vitro and in vivo studies.

These new deuterated DHA compounds could allow us to better understand the beneficial or deleterious effects of DHA-oxidized metabolites and to explain some of the paradoxical studies that have reported no increase in the susceptibility of DHA-enriched cells under specific oxidative conditions.^[34] Moreover, these compounds could act as a starting point for the development of new therapeutic DHA analogues that are less prone to deleterious non-enzymatic oxidation, whilst preserving their enzymatic metabolism into neuroprotectins, for example. Finally, studies on the effect of the incorporation of bis-allylic deuterium in both of the synthesized deuterated DHA analogues, and on their inhibition of lipid peroxidation in retinal cells lines, are underway.

Experimental Section

General Methods

All of the reactions that required anhydrous conditions were performed in oven-dried glassware with magnetic stirring under a nitrogen atmosphere unless otherwise noted. Solvents, anhydrous solvents, and reagents were used as received unless otherwise noted. The reactions were monitored by using TLC on plates that were precoated with silica gel 60 (Merck). The reaction components were visualized by using a 254 nm UV lamp, staining with acidic *p*-anisaldehyde solution followed by gentle heating, or staining with KMnO₄ solution in EtOH. Organic layers were dried with MgSO₄ unless otherwise stated. Column chromatography were performed on silica gel 40–63 μm. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 500 MHz in CDCl₃ (internal reference at δ = 7.26 ppm for ¹H NMR and δ = 77.16 ppm for ¹³C NMR) unless otherwise noted. The NMR spectra were assigned with the help of 2D NMR analysis

(¹H–¹H COSY, HSQC, and HMBC). The multiplicities are reported as follows: br = broad, m = multiplet, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, or combinations thereof. MS and HRMS were recorded by using electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) techniques with an atmospheric solids analysis probe (ASAP) on Q-TOF mass spectrometers.

It was necessary to consider the high volatilities of compounds **4**, **6**, and **7** during the different workups in their syntheses.

Intermediates **3**, **4**, and **5** were synthesized on a gram scale; the Wittig and hydrogenation reactions for the synthesis of compounds **1** and **2** were synthesized on a scale of hundreds of milligrams.

Methyl 2-(4-Methoxybenzyloxy)ethanoate (**6**)

A solution of 4-methoxybenzyl alcohol (8.54 g, 61.80 mmol) in dry Et₂O (50 mL) was added dropwise to a suspension of sodium hydride (60% in mineral oil, 148 mg, 6.18 mmol) in dry Et₂O (30 mL) at RT under an inert atmosphere. After 30 min, the mixture was cooled to 0 °C and trichloroacetonitrile (9.82 g, 68 mmol) was added dropwise. After the addition was complete, the reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred for a further 4 h. Then, the solvent was removed under reduced pressure to give the crude intermediate *p*-methoxybenzyl trichloroacetimidate (PMBTCA). Methyl glycolate (3.90 g, 43.30 mmol) was added to a solution of the intermediate in dry CH₂Cl₂ (210 mL) under an inert atmosphere, the mixture was cooled to 0 °C, and (+)-camphor-10-sulfonic acid (1 g, 4.33 mmol) was added. After the addition was complete, the reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred for a further 1 d. The obtained suspension was filtered through a pad of Celite® and the filtrate was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure (600 mbar at 40 °C). The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/Et₂O, 9:1 to 6:4) to give the protected alcohol (**8**; 8.74 g, 96% yield) as a pale-yellow oil.

*R*_f = 0.44 (*n*-pentane/Et₂O, 7:3); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.30–7.28 (m, 2H; CH_{Ar}), 6.89–6.87 (m, 2H; CH_{Ar}), 4.56 (s, 2H; CH₂(PMB)), 4.07 (s, 2H; CH₂), 3.80 (s, 3H; CH₃(PMB)), 3.75 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.0, 159.6, 129.9 (2C), 129.2, 114.0 (2C), 73.1, 66.9, 55.4, 52.0 ppm.

1,1-Dideuterio-2-(4-methoxybenzyloxy) Ethanol (**7**)

A solution of ester **6** (671 mg, 3.19 mmol) in dry Et₂O (9 mL) was added dropwise to a suspension of lithium aluminum deuteride (LiAlD₄; 134 mg, 3.19 mmol) in dry Et₂O (9 mL) at 0 °C under an inert atmosphere. The mixture was stirred for 2 h at 0 °C and then carefully quenched with an aqueous solution of Rochelle salt (1 M, 5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure (600 mbar at 40 °C). The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/Et₂O, 1:1) to give deuterated alcohol **7** (535 mg, 91% yield) as a colorless oil.

*R*_f = 0.25 (*n*-pentane/EtOAc, 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.28–7.26 (m, 2H; CH_{Ar}), 6.90–6.88 (m, 2H; CH_{Ar}), 4.48 (s, 2H; CH₂(PMB)), 3.80 ppm (s, 3H; CH₃(PMB)), 3.55 ppm (s, 2H; CH₂); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 159.4, 130.2, 129.6 (2C), 114.0 (2C), 73.1, 71.1, 61.4 (quint, ¹J(C,D) = 21.7 Hz), 55.4 ppm.

1,1-Dideuterio-2-(4-methoxybenzyloxy)ethyl 4-Methylbenzenesulfonate (8)

Triethylamine (2.2 mL, 16.30 mmol) and tosyl chloride (3.10 g, 16.30 mmol) were added to a solution of alcohol **7** (1 g, 5.43 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred for 20 h and then quenched with CH_2Cl_2 (120 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (20 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (80 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 7:3 to 1:1) to give activated alcohol **8** (1.77 g, 97% yield) as a white solid.

R_f = 0.40 (*n*-pentane/ EtOAc , 7:3); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.80–7.77 (m, 2H; $\text{CH}_{\text{Ar(TS)}}$), 7.32–7.30 (m, 2H; $\text{CH}_{\text{Ar(TS)}}$), 7.20–7.17 (m, 2H; $\text{CH}_{\text{Ar(PMB)}}$), 6.87–6.84 (m, 2H; $\text{CH}_{\text{Ar(PMB)}}$), 4.41 (s, 2H; $\text{CH}_2(\text{PMB})$), 3.80 (s, 3H; $\text{CH}_3(\text{PMB})$), 3.62 (s, 2H; CH_2), 2.43 ppm (s, 3H; $\text{CH}_3(\text{TS})$); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 159.4, 144.9, 133.1, 129.9 (2C), 129.7, 129.5 (2C), 128.1 (2C), 113.9 (2C), 73.0, 68.8 (quint, $^1J(\text{C,D}) = 22.7$ Hz), 67.1, 55.4, 21.8 ppm; HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{D}_2\text{O}_5\text{S}$: 338.1157 [M] $^+$; found: 338.1157.

1-((But-3-yn-1,1-dideuterio-1-yloxy)methyl)-4-methoxybenzene (4)

A solution of activated alcohol **8** (664 mg, 1.96 mmol) in dry DMSO (4 mL) was added dropwise to a suspension of LiCCH-EDA (90%, 300 mg, 2.95 mmol) in dry DMSO (2 mL) at 10 °C under an inert atmosphere. The mixture was stirred for 15 min at 10 °C and then allowed to warm to RT. Then, the mixture was stirred for a further 4 h and carefully quenched with CH_2Cl_2 (20 mL), water (10 mL), and brine (10 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (4 \times 10 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure (500 mbar at 40 °C). The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 95:5) to give deuterated alkyne **4** (290 mg, 77% yield) as a pale-yellow oil.

R_f = 0.30 (*n*-pentane/ Et_2O , 9:1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.28–7.26 (m, 2H; CH_{Ar}), 6.89–6.87 (m, 2H; CH_{Ar}), 4.49 (s, 2H; $\text{CH}_2(\text{PMB})$), 3.80 (s, 3H; $\text{CH}_3(\text{PMB})$), 3.56 (s, 2H; CH_2), 1.99 ppm (s, 1H; CH); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 159.4, 130.2, 129.5 (2C), 113.9 (2C), 81.4, 72.8, 69.4, 67.8, 55.4, 19.4 ppm (quint, $^1J(\text{C,D}) = 20.3$ Hz); HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{D}_2\text{O}_2$: 192.1119 [M] $^+$; found: 192.1118.

2-(Pent-4-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran (9)

A solution of 2,4-dihydropyran (DHP; 5.78 g, 68.80 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added dropwise to a solution of pent-4-yn-1-ol (4.82 g, 57.30 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (PTSA) monohydrate (272 mg, 1.43 mmol) in CH_2Cl_2 (60 mL) at RT under an inert atmosphere. The reaction was stirred for 20 h and then quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (50 mL). The mixture was stirred for a further 15 min and then the layers were separated. The aqueous layer was extracted with Et_2O (50 mL). The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2 \times 50 mL) and brine (2 \times 50 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure (600 mbar at 40 °C). The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 95:5) to give protected alcohol **9** (8.77 g, 91% yield) as a colorless oil.

R_f = 0.22 (*n*-pentane/ Et_2O , 95:5); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.58 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 4.1, 3.1$ Hz, 1H; $\text{CH}_{(\text{THP})}$), 3.87–3.79 (m, 2H; $\text{CH}_{2(\text{a})-\text{O}(\text{THP})}$ and $\text{CH}_{2(\text{a})-\text{O}}$), 3.51–3.44 (m, 2H; $\text{CH}_{2(\text{b})-\text{O}(\text{THP})}$ and $\text{CH}_{2(\text{b})-\text{O}}$), 2.29 (tdd, $^3J(\text{H,H}) = 6.6, 2.6, 1.6$ Hz, 2H; $\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}$), 1.93 (t, $^3J(\text{H,H}) = 2.6$ Hz, 1H; $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.82–1.76 (m, 3H; $\text{CH}_{2(\text{a})}-\text{CH}_{(\text{THP})}$ and $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.71–1.66 (m, 1H; $\text{CH}_{2(\text{b})}-\text{CH}_{(\text{THP})}$), 1.58–1.48 ppm (m, 4H; $\text{CH}_{2(\text{THP})}$); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 98.9, 84.1, 68.5, 65.8, 62.3, 30.7, 28.8, 25.6, 19.6, 15.4 ppm.

1,1-Dideuterio-6-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)hex-2-yn-1-ol (10)

A commercial solution of ethyl magnesium bromide (0.90 M in THF, 13.2 mL) was added dropwise to a solution of alkyne **9** (1 g, 5.94 mmol) in dry THF (6 mL) at RT under an inert atmosphere and the mixture was stirred at reflux for 1.5 h. Then, the mixture was cooled to 0 °C, deuterated paraformaldehyde (286 mg, 8.90 mmol) was added, and the mixture was stirred at reflux for a further 15 h. The reaction was cooled to 0 °C and carefully quenched with Et_2O (20 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (10 mL). The obtained suspension was filtered through a pad of Celite® and the solid was washed with Et_2O (2 \times 20 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with Et_2O (3 \times 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 \times 10 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 7:3 to 5:5) to give deuterated alcohol **10** (1.02 g, 86% yield) as a colorless oil.

R_f = 0.16 (*n*-pentane/ Et_2O , 7:3); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.57 (dd, $^3J(\text{H,H}) = 4.2, 3.0$ Hz, 1H; $\text{CH}_{(\text{THP})}$), 3.86–3.77 (m, 2H; $\text{CH}_{2(\text{a})-\text{O}(\text{THP})}$ and $\text{CH}_{2(\text{a})-\text{O}}$), 3.51–3.43 (m, 2H; $\text{CH}_{2(\text{b})-\text{O}(\text{THP})}$ and $\text{CH}_{2(\text{b})-\text{O}}$), 2.31 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, 2H; $\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}$), 1.82–1.74 (m, 3H; $\text{CH}_{2(\text{a})}-\text{CH}_{(\text{THP})}$ and $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.71–1.66 (m, 1H; $\text{CH}_{2(\text{b})}-\text{CH}_{(\text{THP})}$), 1.58–1.47 ppm (m, 4H; $\text{CH}_{2(\text{THP})}$); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 98.9, 85.5, 78.9, 66.0, 62.3, 55.7 (quint, $^1J(\text{C,D}) = 22.3$ Hz), 30.7, 28.8, 25.5, 19.5, 15.7 ppm.

2-(6-Bromo-6,6-dideuteriohex-4-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran (11)

A solution of triphenylphosphine (13.80 g, 52.60 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) was added dropwise under an inert atmosphere to a solution of tetrabromomethane (8.72 g, 26.30 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) at –40 °C. Then, solutions of deuterated alcohol **10** (5.26 g, 26.30 mmol) and imidazole (3.58 g, 52.60 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL each) were added dropwise to the mixture at –40 °C. The reaction was stirred at –40 °C for 2 h and then quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (25 mL) and an aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%, 25 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times 50 mL). The combined organic layers were washed with water (2 \times 100 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was triturated with Et_2O (50 mL) and the suspension was filtered through a pad of Celite® to remove most of the white solid (triphenylphosphine oxide), which was washed with Et_2O (3 \times 50 mL). The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 9:1 to 7:3) to give deuterated bromide derivative **11** (6.92 g, 60% yield) as a colorless oil.

R_f = 0.39 (*n*-pentane/ EtOAc , 9:1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.59 (m, 1H; $\text{CH}_{(\text{THP})}$), 3.88–3.77 (m, 2H; $\text{CH}_2-\text{O}(\text{THP})$ and CH_2-O), 3.53–3.43 (m, 2H; $\text{CH}_{2(\text{b})-\text{O}(\text{THP})}$ and $\text{CH}_{2(\text{b})-\text{O}}$), 2.37 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.1$ Hz, 2H; $\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}$), 1.84–1.77 (m, 3H; $\text{CH}_{2(\text{a})}-\text{CH}_{(\text{THP})}$ and $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.73–1.70 (m, 1H; $\text{CH}_{2(\text{b})}-\text{CH}_{(\text{THP})}$), 1.60–1.50 ppm (m, 4H; $\text{CH}_{2(\text{THP})}$);

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 98.9, 87.6, 75.5, 65.9, 62.3, 30.7, 28.6, 25.6, 19.6, 16.0, 15.5 ppm (quint, $^1\text{J}(\text{C},\text{D})$ = 24.3 Hz); HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{D}_2\text{BrO}_2$: 263.0616 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 263.0616.

6-Bromo-6,6-dideuteriohex-4-ynoic Acid (12)

Jones reagent (2.17 M, 35 mL) was added dropwise to a solution of deuterated bromide derivative **11** (3.95 g, 15 mmol) in acetone (40 mL) at 0°C and the mixture was stirred at 0°C for 30 min. Then, the reaction was quenched with propan-2-ol (45 mL) and Et_2O (200 mL). The suspension is filtered through a pad of Celite[®] and the green solid was washed with Et_2O (4×100 mL). The filtrate was washed with acidified brine (2×100 mL, pH 1), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (8:2 to 6:4, *n*-pentane/ Et_2O) to give acid **12** (2.51 g, 87% yield) as a white solid.

R_f = 0.26 (*n*-pentane/ EtOAc , 1:1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 2.62–2.55 ppm (m, 4H; CH_2); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 178.2, 85.5, 76.3, 33.1, 14.7 ppm (the CD_2 signal was not visible); HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_6\text{H}_6\text{D}_2\text{BrO}_2$: 192.9833 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 192.9836.

Ethyl 6-Bromo-6,6-dideuteriohex-4-ynoate (5)

Concentrated H_2SO_4 (250 μL) was added to a solution of acid **12** (1.93 g, 9.48 mmol) in EtOH (80 mL) and the mixture was stirred at reflux for 1 d. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (20 mL) and the aqueous layer was extracted with *n*-pentane/ Et_2O (1:1, 4×100 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 95:5) to give deuterated ester **5** (2.07 g, 90% yield) as a pale-yellow oil.

R_f = 0.47 (*n*-pentane/ EtOAc , 9:1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.14 (q, 4H; $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 7.1 Hz, 2H; $\text{CH}_{2(\text{ester})}$), 2.56–2.48 (m, 4H; CH_2), 1.25 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 7.1 Hz, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.8, 86.0, 76.0, 60.8, 33.3, 15.0, 14.3 ppm (the CD_2 signal was not visible).

6,6-Dideutero-7-(4-methoxybenzyloxy)hept-4-yn-1-ol (13)

A solution of *n*BuLi (1.6 M in *n*-hexane, 1.64 mL) was slowly added to a solution of alkyne **4** (500 mg, 2.06 mmol) in dry THF (3 mL) at -78°C under an inert atmosphere and the mixture was stirred at -78°C for 30 min. Then, a solution of oxetane (85 μL , 1.30 mmol) in dry THF (2.50 mL) was slowly added to the mixture, followed by the slow addition of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (320 μL , 2.52 mmol). The reaction was stirred at -78°C for 30 min and quenched with EtOAc (10 mL), a saturated aqueous solution of NH_4Cl (5 mL), and brine (5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2×10 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 9:1 to 5:5) to give deuterated alcohol **13** (258 mg, 79% yield) as a pale-yellow oil.

R_f = 0.49 (*n*-pentane/ EtOAc , 1:1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.28–7.25 (m, 2H; CH_a), 6.89–6.86 (m, 2H; CH_b), 4.47 (s, 2H; $\text{CH}_{2(\text{PMB})}$), 3.80 (s, 3H; $\text{CH}_{3(\text{PMB})}$), 3.75–3.72 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.51 (s, 2H; $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.27 (t, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 6.9 Hz, 2H; $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 1.75–1.69 ppm (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 159.3, 130.3, 129.5 (2C), 113.9 (2C), 80.7, 77.6, 72.7, 68.4, 61.9, 55.4, 31.5, 19.7

(quint, $^1\text{J}(\text{C},\text{D})$ = 19.9 Hz), 15.5 ppm; HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{D}_2\text{O}_3$: 250.1538 $[\text{M}]^+$; found: 250.1530.

6,6-Dideutero-7-(4-methoxybenzyloxy)hept-4-ynoic Acid (14)

Jones reagent (2.17 M, 0.28 mL) was added dropwise to a solution of alcohol **13** (100 mg, 0.40 mmol) in acetone (6 mL) at 0°C . The mixture was stirred at 0°C for 1 h. Then, the reaction was quenched with propan-2-ol (0.50 mL) and the suspension was filtered through a pad of Celite[®] and the green solid was washed with EtOAc (15 mL). The filtrate was washed with acidified water (5 mL; pH 1) and acidified brine (10 mL; pH 1), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ EtOAc , 9:1 to 6:4) to give acid **14** (100 mg, 94% yield) as a white solid.

R_f = 0.20 (*n*-pentane/ EtOAc , 1:1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.28–7.25 (m, 2H; CH_a), 6.89–6.86 (m, 2H; CH_b), 4.47 (s, 2H; $\text{CH}_{2(\text{PMB})}$), 3.80 (s, 3H; $\text{CH}_{3(\text{PMB})}$), 3.51 (s, 2H; $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.60–2.42 ppm (m, 4H; CH_2); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 177.9, 159.3, 130.3, 129.5 (2C), 113.9 (2C), 79.1, 78.0, 72.7, 68.3, 55.4, 33.8, 19.7 (quint, $^1\text{J}(\text{C},\text{D})$ = 19.7 Hz), 14.6 ppm; HRMS (ESI⁻): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{D}_2\text{O}_4$: 263.1252 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found: 263.1250.

Ethyl 6,6-Dideutero-7-hydroxyhept-4-ynoate (15)

Concentrated H_2SO_4 (350 μL) was added to a solution of acid **14** (100 mg, 0.38 mmol) in EtOH (7 mL) and the mixture was stirred at 40°C for 4 d under an inert atmosphere. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (10 mL) and water (10 mL) and the mixture was extracted with *n*-pentane/ Et_2O 1:1 (4×10 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 7:3 to 1:1) to give ester **15** (2.07 g, 86% yield) as a pale-yellow oil.

R_f = 0.57 (*n*-pentane/ EtOAc , 1:1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.13 (q, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 7 Hz, 2H; $\text{CH}_{2(\text{ester})}$), 3.64 (s, 2H; $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.50–2.43 (m, 4H; CH_2), 1.24 ppm (t, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 7.5 Hz, 3H; $\text{CH}_{3(\text{ester})}$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 172.4, 80.6, 77.7, 61.2, 60.8, 34.0, 22.6 (quint, $^1\text{J}(\text{C},\text{D})$ = 19.9 Hz), 14.9, 14.3 ppm; HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{D}_2\text{O}_3$: 173.1147 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 173.1147.

(4Z)-Ethyl 6,6-Dideutero-7-hydroxyhept-4-enoate (16)

A solution of NaBH_4 in EtOH (0.50 M, 0.56 mL) was added dropwise to a solution of $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (139 mg, 0.56 mmol) in EtOH (25 mL) at 0°C under a hydrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0°C for 15 min and ethylenediamine (0.22 mL, 3.35 mmol) was added. After a further 15 min at 0°C , a solution of deuterated alkyne **15** (384 mg, 2.23 mmol) in EtOH (15 mL) was added. Before and after each addition, three cycles of vacuum/ H_2 addition were performed. The reaction was stirred for 40 min at 0°C under a hydrogen atmosphere and then quenched with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (30 mL) and brine (30 mL). The reaction mixture was extracted with Et_2O (3×50 mL) and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ EtOAc , 6:4) to give alkene **16** (371 mg, 90% yield) as a pale-yellow oil (with 5% of the over-reduced byproduct).

R_f = 0.30 (*n*-pentane/ EtOAc , 7:3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.50–5.45 (m, 1H; $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.41 (d, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 11 Hz, 1H; $\text{CH}=\text{CD}_2$), 4.10 (q, $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ = 7 Hz, 2H; $\text{CH}_{2(\text{ester})}$), 3.61 (s, 2H; $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.40–2.33

(m, 4H; CH₂), 1.22 ppm (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H; CH_{3(ester)}); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=173.4, 130.8, 127.1, 62.0, 60.5, 34.1, 30.2 (quint, ¹J(C,D)=19.2 Hz), 22.8, 14.3 ppm.

(4Z)-Ethyl 6,6-Dideutero-7-iodohept-4-enoate (16')

Imidazole (348 mg, 5.11 mmol) and triphenylphosphine (671 mg, 2.56 mmol) were added to a solution of I₂ (650 mg, 2.56 mmol) in CH₂Cl₂ (14 mL) under an inert atmosphere. The mixture was cooled to 0 °C and a solution of alcohol **16** (371 mg, 2.13 mmol) in CH₂Cl₂ (14 mL) was added. After the addition was complete, the reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred for a further 2 h. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), water (20 mL), and CH₂Cl₂ (15 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (95:5 *n*-pentane/Et₂O) to give iodide derivative **16'** (538 mg, 89% yield) as a pale-yellow oil.

*R*_f=0.48 (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=5.53–5.48 (m, 1H; CH–CH₂), 5.37 (d, ³J(H,H)=10.5 Hz, 1H; CH–CD₂), 4.12 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H; CH_{2(ester)}), 3.12 (s, 2H; CH₂–I), 2.38–2.33 (m, 4H; CH₂), 1.25 ppm (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H; CH_{3(ester)}); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=173.1, 130.3, 129.3, 60.4, 34.2, 30.8 (quint, ¹J(C,D)=19.7 Hz), 23.1, 14.4, 5.1 ppm; HRMS (ASAP+): *m/z* calcd for C₉H₁₁D₂O₂: 285.0321 [M+H]⁺; found: 285.0317.

(3Z)-(2,2-Dideutero-7-ethoxy-7-oxohept-3-en-1-yl)triphenylphosphonium iodide (2a)

Triphenylphosphine (595 mg, 2.27 mmol) was added to a solution of iodide derivative **16'** (538 mg, 1.89 mmol) in MeCN (15 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at reflux for 20 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 90:10) to give phosphonium salt **2a** (1.02 g, 98% yield) as a clear wax.

*R*_f=0.18 (CH₂Cl₂/MeOH, 7:3); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=7.83–7.68 (m, 15H; CH_{Ar}), 5.64 (d, ³J(H,H)=11 Hz, 1H; CH–CD₂), 5.36–5.31 (m, 1H; CH–CH₂), 4.04 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H; CH_{2(ester)}), 3.65 (d, ²J(H,P)=12 Hz, 2H; CH₂–P), 2.27 (t, ³J(H,H)=7 Hz, 2H; CH₂), 2.13–2.09 (m, 2H; CH₂–CH), 1.19 ppm (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H; CH_{3(ester)}); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=173.1, 135.3 (d, ⁴J(C,P)=3 Hz, 3C), 133.8 (d, ³J(C,P)=10.2 Hz, 6C), 130.7 (d, ²J(C,P)=12.4 Hz, 6C), 130.5 (d, ⁴J(C,P)=1.4 Hz), 127.3 (d, ³J(C,P)=15.8 Hz), 118.0 (d, ¹J(C,P)=85.9 Hz, 3C), 60.5, 33.5, 23.0 (d, ¹J(C,P)=48.5 Hz), 22.7, 20.1–19.5 (m), 14.3 ppm; ³¹P NMR (120 MHz, CDCl₃): δ=23.8 ppm; HRMS (ESI+): *m/z* calcd for C₂₇H₂₈D₂O₂P: 419.2109 [M–I]⁺; found: 419.2110.

Ethyl 6,6,9,9-Tetradutero-10-(4-methoxybenzyloxy)deca-4,7-diyne (17)

A solution of terminal alkyne **4** (1.63 g, 8.50 mmol) in DMF (40 mL) was added to a solution of CuI (3.40 g, 17.80 mmol), NaI (2.67 g, 17.80 mmol), and K₂CO₃ (3.52 g, 25.50 mmol) in DMF (25 mL) at 20 °C. A solution of bromide derivative **5** (1.88 g, 8.50 mmol) in DMF (30 mL) was immediately added to the mixture at 20 °C and the mixture was stirred at 20 °C for 15 h and then quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (100 mL) and brine (100 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3×200 mL). The combined organic layers were washed with brine (2×50 mL)

and water (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/Et₂O, 9:1) to give the coupling product (**17**; 2.12 g, 75% yield) as a pale-yellow oil.

*R*_f=0.20 (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=7.27–7.24 (m, 2H; CH_{Ar}), 6.88–6.86 (m, 2H; CH_{Ar}), 4.47 (s, 2H; CH_{2(PMB)}), 4.14 (q, ³J(H,H)=7.1 Hz, 2H; CH_{2(ester)}), 3.79 (s, 3H; CH_{3(PMB)}), 3.52 (s, 2H; CH₂–O), 2.51–2.45 (m, 4H; CH₂), 1.25 ppm (t, ³J(H,H)=7.1 Hz, 3H; CH_{3(ester)}); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=172.1, 159.3, 130.3, 129.4 (2C), 113.9 (2C), 78.7, 77.4, 75.4, 75.1, 72.7, 68.1, 60.7, 55.4, 33.7, 19.7 (quint, ¹J(C,D)=20.5 Hz), 14.8, 14.3, 9.4 ppm (quint, ¹J(C,D)=20.3 Hz); HRMS (ASAP+): *m/z* calcd for C₂₀H₂₀D₄O₄: 332.1926 [M]⁺; found: 332.1922.

Ethyl 6,6,9,9-Tetradutero-10-hydroxydeca-4,7-diyne (18)

2,3-Dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (DDQ; 1.88 g, 8.26 mmol) was added to a solution of protected alcohol **17** (1.92 g, 5.78 mmol) in CH₂Cl₂/water (10:1, 88 mL) at 0 °C. Then, the mixture was stirred at 0 °C for 4 h and quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (200 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3×100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (6:4 *n*-pentane/Et₂O) to give deprotected alcohol **18** (1.14 g, 94% yield) as a pale-yellow oil.

*R*_f=0.43 (*n*-pentane/EtOAc, 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=4.15 (q, ³J(H,H)=7.1 Hz, 2H; CH_{2(ester)}), 3.69 (d, ³J(H,H)=6.2 Hz, 2H; CH₂–O), 2.52–2.45 (m, 4H; CH₂), 1.85 (t, ³J(H,H)=6.2 Hz, 1H; OH), 1.26 ppm (t, ³J(H,H)=7.1 Hz, 3H; CH_{3(ester)}); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=172.2, 78.8, 77.4, 76.6, 75.0, 61.1, 60.7, 33.7, 22.7 (quint, ¹J(C,D)=20 Hz), 14.8, 14.3, 9.5 ppm (quint, ¹J(C,D)=20.5 Hz); HRMS (ASAP+): *m/z* calcd for C₁₂H₁₃D₄O₃: 213.1429 [M+H]⁺; found: 213.1430.

(4Z,7Z)-Ethyl 6,6,9,9-Tetradutero-10-hydroxydeca-4,7-dienoate (19)

A solution of NaBH₄ in EtOH (0.5 M, 0.56 mL) was added dropwise to a solution of Ni(OAc)₂·4H₂O (38 mg, 0.15 mmol) in EtOH (25 mL) at 0 °C under a hydrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 15 min and a solution of ethylenediamine in EtOH (0.5 M, 1.88 mL) was added. After a further 15 min at 0 °C, a solution of diyne **18** (100 mg, 0.47 mmol) in EtOH (15 mL) was added. Before and after each addition of the reagent, three cycle of vacuum/H₂ addition were performed. The reaction was stirred for 40 min at 0 °C under a hydrogen atmosphere and then quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (15 mL) and brine (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (6:4 *n*-pentane/Et₂O) to give diene **19** (91 mg, 78% yield) as a pale-yellow oil (with 12% of the over-reduced byproduct).

*R*_f=0.24 (*n*-pentane/EtOAc, 6:4); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ=5.52 (d, ³J(H,H)=10.5 Hz, 1H; CD₂–CH=CH–CD₂), 5.41–5.34 (m, 3H; CH), 4.13 (q, ³J(H,H)=7 Hz, 2H; CH_{2(ester)}), 3.64 (s, 2H; CH₂–O), 2.42–2.34 (m, 4H; CH₂), 1.25 ppm (t, ³J(H,H)=7 Hz, 3H; CH_{3(ester)}); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=173.3, 130.4, 129.0, 127.9, 125.8, 61.9, 60.4, 34.2, 30.1 (quint, ¹J(C,D)=19.2 Hz), 25.7–24.9 (m), 22.8, 14.2 ppm;

HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{12}H_{17}D_4O_3$: 217.1742 $[M+H]^+$; found: 217.1741.

(4Z,7Z)-Ethyl 6,6,9,9-Tetradeutero-10-iododeca-4,7-dienoate (19)

Imidazole (429 mg, 6.30 mmol) and triphenylphosphine (826 mg, 3.15 mmol) were added to a solution of I_2 (800 mg, 3.15 mmol) in CH_2Cl_2 (7 mL) under an inert atmosphere. The mixture was cooled to 0 °C and a solution of alcohol **19** (447 mg, 2.10 mmol) in CH_2Cl_2 (7 mL) was added. After the addition was complete, the reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred for a further 4 h. Then, the reaction was quenched with a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (20 mL), water (20 mL), and CH_2Cl_2 (15 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (15 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/Et₂O, 95:5) to give the iodide derivative (634 mg, 93% yield) as a pale-yellow oil.

R_f = 0.55 (*n*-pentane/EtOAc, 95:5); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.49 (d, $^3J(H,H)$ = 11 Hz, 1H; $CD_2-CH-CH-CD_2$), 5.38–5.33 (m, 3H; CH), 4.13 (q, $^3J(H,H)$ = 7 Hz, 2H; $CH_2(ester)$), 3.12 (s, 2H; CH_2-I), 2.41–2.33 (m, 4H; CH_2), 1.25 ppm (t, $^3J(H,H)$ = 7 Hz, 3H; $CH_3(ester)$); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 173.2, 130.4, 128.8, 128.4 (2C), 60.5, 34.3, 30.9 (quint, $^1J(C,D)$ = 19.7 Hz), 25.3 (quint, $^1J(C,D)$ = 19.1 Hz), 23.0, 14.4, 5.1 ppm; HRMS (ASAP+): m/z calcd for $C_{12}H_{16}D_4O_2$: 327.0759 $[M+H]^+$; found: 327.0762.

(3Z,6Z)-(2,2,5,5-Tetradeutero-10-ethoxy-10-oxodeca-3,6-dien-1-yl)triphenylphosphonium iodide (2b)

Triphenylphosphine (583 mg, 2.22 mmol) was added to a solution of the iodide derivative (604 mg, 1.85 mmol) in MeCN (12 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at reflux for 17 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2/MeOH$, 98:2 to 9:1) to give phosphonium salt **2b** (903 mg, quantitative yield) as a clear wax.

R_f = 0.21 ($CH_2Cl_2/MeOH$, 95:5); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.83–7.68 (m, 15H; CH_A), 5.57 (d, $^3J(H,H)$ = 10.5 Hz, 1H; $P-CH_2-CD_2-CH$), 5.33 (d, $^3J(H,H)$ = 11 Hz, 1H; $P-CH_2-CD_2-CH-CH$), 5.28–5.23 (m, 1H; $CH-CH_2$), 5.19 (d, $^3J(H,H)$ = 11 Hz, 1H; $CH-CH-CH_2$), 4.03 (q, $^3J(H,H)$ = 7 Hz, 2H; $CH_2(ester)$), 3.66 (d, $^2J(H,P)$ = 12 Hz, 2H; $P-CH_2$), 2.26–2.14 (m, 4H; CH_2), 1.18 ppm (t, $^3J(H,H)$ = 7.5 Hz, 3H; $CH_3(ester)$); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 173.0, 135.2 (d, $^4J(C,P)$ = 1.8 Hz, 3C), 133.6 (d, $^3J(C,P)$ = 9.9 Hz, 6C), 130.6 (d, $^2J(C,P)$ = 12.4 Hz, 6C), 130.4, 128.4, 128.1, 126.2 (d, $^3J(C,P)$ = 15 Hz), 117.8 (d, $^1J(C,P)$ = 86 Hz, 3C), 60.3, 33.9, 24.9 (quint, $^1J(C,D)$ = 19.2 Hz), 23.0 (d, $^1J(C,P)$ = 48.7 Hz), 22.7, 20.0–19.5 (m), 14.3 ppm; ^{31}P NMR (120 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.1 ppm; HRMS (ESI+): m/z calcd for $C_{30}H_{30}D_4O_2P$: 461.2547 $[M-I]^+$; found: 461.2549.

Extraction of EPA from Cod Liver Oil

Commercial cod liver oil (7.00 g; Cooper, France) was dissolved in a mixture of EtOH/water (95:5, 35 mL) in the presence of NaOH (2.1 g) under an argon atmosphere. The mixture was protected from light by using aluminum foil and heated at 82 °C for 2 h. The ethanolic fraction was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in *n*-hexane (40 mL) after heating. Then, water (35 mL) was added to the organic layer and the unsaponifiable material was removed by repeated extraction of the aqueous

phase with *n*-hexane (4 × 40 mL). The aqueous phase was acidified to pH 2 by using an aqueous solution of HCl (6.0 M). The fatty acids were extracted with *n*-hexane (4 × 35 mL) and the organic phase was concentrated under reduced pressure to give the crude fatty acids (6.47 g) as an oil. Urea (19.40 g) and EtOH (80 mL) were added to the crude residue. The mixture was protected from light by using aluminum foil and heated at 60–70 °C until it turned into a homogeneous clear solution. The mixture was allowed to cool to RT and then cooled at 4 °C for 24 h. The resulting crystals were separated from the liquid by filtration. The filtrate was diluted with water (50 mL) and acidified to pH 4–5 with an aqueous solution of HCl (6.0 M). *n*-Hexane (100 mL) was added and the solution was thoroughly stirred for 1 h. The *n*-hexane layer that contained the liberated fatty acids was separated from the aqueous layer and washed with water (3 × 60 mL). The organic phase was dried with Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to give a crude mixture of PUFAs (820 mg), which was purified by preparative HPLC (column: Atlantis Prep OBDTM; particle size: 10 μ m; dimensions: 19 mm × 250 mm; water/MeOH, 13:87; isocratic flow; photodiode array detector (PDA) detection: 217 nm) to give pure EPA (1.33 g).

R_f = 0.21 (*n*-pentane/EtOAc, 8:2); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.42–5.30 (m, 10H; CH), 2.85–2.80 (m, 8H; $CH_{2(bis-allylic)}$), 2.37 (t, $^3J(H,H)$ = 7.5 Hz, 2H; CH_2-CO), 2.14–2.05 (m, 4H; $CH_2-CH_2-CH_2-CO$ and CH_2-CH_3), 1.75–1.69 (m, 2H; CH_2-CH_2-CO), 0.97 ppm (t, $^3J(H,H)$ = 7.5 Hz, 3H; CH_3).

Methyl 4-(3-((2Z,5Z,8Z,11Z)-Tetradeca-2,5,8,11-tetraen-1-yl)oxiran-2-yl)butanoate (21)

γ -Collidine (2,4,6-trimethylpyridine, 0.26 mL, 2 mmol) and I_2 (250 mg, 1 mmol) were added to a solution of eicosapentaenoic acid (EPA; 150 mg, 0.50 mmol) in MeCN (15 mL) at 0 °C under an inert atmosphere. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and then quenched with a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (10 mL) and EtOAc (30 mL). The layers were separated and the organic layer was washed with brine (3 × 20 mL) and water (10 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude iodolactone was immediately used in the next step without further purification.

K_2CO_3 (150 mg, 0.90 mmol) was added to a solution of the crude iodolactone (400 mg) in MeOH (10 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred for 4 h at RT and quenched with brine (15 mL) and water (20 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-pentane (4 × 30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/EtOAc, 95:5) to give epoxide **21** (158 mg, 95% yield) as a pale-yellow oil.

R_f = 0.25 (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.53–5.27 (m, 8H; CH), 3.66 (s, 3H; $CH_3(ester)$), 2.95–2.92 (m, 2H; $CH_{(epoxide)}$), 2.84–2.78 (m, 6H; $CH_{2(bis-allylic)}$), 2.41–2.35 (m, 3H; CH_2-CO and $CH-CH_{2(a)}-CH_{(epoxide)}$), 2.24–2.18 (m, 1H; $CH-CH_{2(b)}-CH_{(epoxide)}$), 2.08–2.05 (m, 2H; $CH-CH_2-CH_3$), 1.86–1.77 (m, 2H; $CH_2-CH_2-CH_2$), 1.86–1.77 (m, 2H; $CH_{(epoxide)}-CH_2-CH_2$), 0.96 ppm (t, $^3J(H,H)$ = 7.5 Hz, 3H; CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 173.8, 132.2, 130.7, 128.7, 128.6, 127.8, 127.1, 124.4, 56.7, 56.3, 51.7, 33.7, 27.3, 26.3, 25.9, 25.7, 25.6, 22.1, 20.7, 14.4 ppm.

(3Z,6Z,9Z,12Z)-Pentadeca-3,6,9,12-tetraenal (3a)

Acetic anhydride (9 mL) was added to a solution of epoxide **21** (4.48 g, 13.47 mmol) in acetic acid (90 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 45 °C for 2.5 d and the solvents were removed under reduced pressure. The crude diacetate was immediately used in the next step without further purification. A solution of LiOH·H₂O (2.70 g, 64.35 mmol) in water (100 mL) was added to a solution of the diacetate in MeOH (100 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at RT for 21 h, cooled to 0 °C, and carefully quenched with an aqueous solution of HCl (10%) to pH 1. The aqueous layer was extracted with Et₂O (2 × 100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude diol was immediately used in the next step without further purification.

A solution of sodium periodate (6.68 g, 31.23 mmol) in water (49 mL) was added dropwise to a solution of the crude diol in MeOH (180 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at RT for 3 h and then quenched with brine (150 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-pentane (3 × 100 mL) and the combined organic layers were successively washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (100 mL), brine, and water. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. Then, the residue was dissolved in Et₂O (10 mL) and finally filtered through a plug of Celite® and the solvents were removed under reduced pressure to give crude aldehyde **3a** (2.57 g, 87% yield). Purification by column chromatography on normal-phase silica gel was not possible because of isomerization of the desired aldehyde into the α,β-unsaturated aldehyde.

$R_f = 0.47$ (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.68 (t, ³J(H,H) = 2 Hz, 1H; CHO), 5.72–5.67 (m, 1H; CH), 5.62–5.56 (m, 1H; CH), 5.44–5.28 (m, 6H; CH), 3.24–3.22 (m, 2H; CH₂-CHO), 2.84–2.79 (m, 6H; CH₂(bis-allylic)), 2.1–2.04 (m, 2H; CH₂-CH₃), 0.97 ppm (t, ³J(H,H) = 7.5 Hz, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 199.5, 133.3, 132.3, 129.0, 128.9, 127.7, 127.2, 127.1, 118.8, 42.6, 26.1, 25.8, 25.7, 20.7, 14.4 ppm.

(3Z,6Z,9Z,12Z)-Pentadeca-3,6,9,12-tetraen-1-ol (22)

NaBH₄ (1.47 g, 38.86 mmol) was added to a solution of aldehyde **3a** (2.30 g of the crude product, 10.53 mmol) in MeOH (70 mL) at 0 °C under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then quenched with brine (150 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 80 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/Et₂O, 9:1 to 7:3) to give alcohol **22** (1.64 g, 71% yield) as a colorless oil.

$R_f = 0.18$ (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.58–5.53 (m, 1H; CH), 5.44–5.29 (m, 7H; CH), 3.66 (t, ³J(H,H) = 6.5 Hz, 2H; CH₂-O), 2.87–2.80 (m, 6H; CH₂(bis-allylic)), 2.39–2.34 (m, 2H; CH₂-CH₂-O), 2.10–2.04 (m, 2H; CH₂-CH₃), 0.97 ppm (t, ³J(H,H) = 6.5 Hz, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 132.2, 131.3, 128.8, 128.5, 128.1, 128.0, 127.1, 125.8, 62.4, 31.0, 25.9, 25.8, 25.7, 20.7, 14.4 ppm.

2-(3-((2Z,5Z,8Z)-Undeca-2,5,8-trien-1-yl)oxiran-2-yl) Ethanol (23)

Vanadyl acetylacetonate (100 mg, 0.37 mmol) was added to a solution of homoallylic alcohol **22** (1.64 g, 7.44 mmol) in toluene

(60 mL) at 0 °C under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min and a solution of *t*BuOOH (5.5 M in *n*-decane, 2.7 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at RT for 1.5 h and a second portion of *t*BuOOH was added. The mixture was stirred for 4.5 h and then quenched with an aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20%, 100 mL) and water (100 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 60 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/EtOAc, 9:1 to 7:3) to give epoxide **23** (1.29 g, 73% yield) as a pale-yellow oil.

$R_f = 0.26$ (*n*-pentane/EtOAc, 6:4); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.54–5.28 (m, 6H; CH), 3.90–3.82 (m, 2H; CH₂-O), 3.11 (dt, ³J(H,H) = 4.5, 8 Hz, 1H; CH(oxide)), 3.01–2.97 (m, 1H; CH(oxide)), 2.85–2.79 (m, 4H; CH₂(bis-allylic)), 2.46–2.40 (m, 1H; CH-CH₂(a)-CH(oxide)), 2.28–2.22 (m, 1H; CH-CH₂(b)-CH(oxide)), 2.10–2.03 (m, 2H; CH₂-CH₃), 1.93–1.85 (m, 1H; CH(oxide)-CH₂(b)-CH₂), 1.77–1.70 (m, 1H; CH(oxide)-CH₂(a)-CH₂), 0.97 ppm (t, ³J(H,H) = 7.5 Hz, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 132.3, 130.9, 129.0, 127.5, 127.0, 124.1, 60.8, 56.1, 55.1, 30.6, 26.5, 25.9, 25.7, 20.7, 14.4 ppm.

(3Z,6Z,9Z)-Dodeca-3,6,9-trienal (3b)

Acetic anhydride (0.74 mL) was added to a solution of epoxide **23** (200 mg, 0.85 mmol) in acetic acid (7.40 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 45 °C for 23 h and the solvents were removed under reduced pressure. The residue, which was mainly composed of diacetate derivatives, was immediately used in the next step without further purification.

A solution of LiOH·H₂O (93 mg, 2.21 mmol) in water (2.50 mL) was added to a solution of the crude residue in MeOH (2.50 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at RT for 3 h, cooled to 0 °C, and carefully quenched with an aqueous solution of HCl (10%) to pH 1 and then with water (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude triol was immediately used in the next step without further purification.

A solution of sodium periodate (309 mg, 1.44 mmol) in water (2.30 mL) was added dropwise to a solution of the crude triol in MeOH (8.90 mL) at RT under an inert atmosphere. The mixture was stirred at RT for 2.5 h and then quenched with brine (15 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-pentane (3 × 10 mL). The combined organic layers were successively washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2 × 20 mL), brine, and water. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (10 mL) and finally filtered through a plug of Celite®. The solvents were removed under reduced pressure to give crude aldehyde **3b** (93 mg, 62% yield). The product must not be purified by column chromatography on normal-phase silica gel because of degradation.

$R_f = 0.50$ (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.67 (t, ³J(H,H) = 2 Hz, 1H; CHO), 5.71–5.66 (m, 1H; CH), 5.61–5.55 (m, 1H; CH), 5.43–5.26 (m, 4H; CH), 3.24–3.21 (m, 2H; CH₂-CHO), 2.83–2.78 (m, 4H; CH₂(bis-allylic)), 2.10–2.03 (m, 2H; CH₂-CH₃), 0.97 ppm (t, ³J(H,H) = 7.5 Hz, 3H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 199.3, 133.2, 132.2, 129.2, 126.9, 126.8, 118.7, 42.5, 26.0, 25.6, 20.6, 14.3 ppm.

(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Ethyl 6,6-Dideuterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate (24a)

A solution of sodium bis(trimethylsilyl)amide (NaHMDS; 2.0 M in THF, 0.50 mL) was added dropwise to a solution of the deuterated phosphonium salt (**2a**; 548 mg, 1 mmol) in THF (9 mL) at -50°C under an inert atmosphere. Then, the reaction was stirred at -20°C for 30 min and cooled to -78°C . A solution of aldehyde **3a** (371 mg, 1.7 mmol) in THF (9 mL) was cooled to -78°C and added through a cannula to the orange mixture. The reaction was allowed to warm to RT over 1.5 h and then stirred for a further 21 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (30 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-pentane/EtOAc (8:2, 4 \times 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O , 98:2) to give the deuterated DHA ethyl ester (**24a**; 143 mg, 40% yield) as a yellow oil.

$R_f=0.51$ (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta=5.40\text{--}5.29$ (m, 12 H; CH), 4.12 (q, $^3J(\text{H,H})=7$ Hz, 2 H; $\text{CH}_2(\text{ester})$), 2.85–2.79 (m, 8 H; $\text{CH}_2(\text{bis-allylic})$), 2.40–2.33 (m, 4 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CO}$), 2.08–2.04 (m, 2 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 1.25 (t, $^3J(\text{H,H})=7$ Hz, 3 H; $\text{CH}_3(\text{ester})$), 0.96 ppm (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3 H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta=173.2, 132.1, 129.2, 128.6, 128.3$ (2C), 128.3, 128.2, 128.2, 128.1 (2C), 128.0, 127.1, 60.4, 34.4, 25.7 (2C), 25.7, 25.6, 25.1 (quint, $^1J(\text{C,D})=19.4$ Hz), 22.9, 20.7, 14.4, 14.3 ppm; HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{D}_2\text{O}_2$: 359.2919 [$M+\text{H}$] $^+$; found: 359.2918.

(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-6,6-Dideuterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic Acid (1a)

A solution of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (109 mg, 2.60 mmol) in water (1 mL) was added to a solution of ester **24a** (143 mg, 0.40 mmol) in EtOH (1 mL) under an inert atmosphere. The mixture was heated at 65°C for 1 h and an additional portion of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (50 mg, 1.20 mmol) was added. After heating at 65°C for 7 h, the reaction was cooled to RT and quenched with water (10 mL) and an aqueous solution of HCl (1.0 M) to pH 2. The aqueous layer was extracted with *n*-pentane/EtOAc (6:4, 3 \times 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/EtOAc, 9:1 to 7:3) to give (6,6- D_2)-DHA (**1a**; 98 mg, 77% yield) as a yellow oil. A portion of this product was purified by preparative HPLC to remove trace amounts of over-reduced byproducts (column: Waters Symmetry PrepTM (C_{18}); particle size: 7 μm ; dimensions: 7.8 mm \times 300 mm; water/MeCN, 17:83; isocratic flow; UV detection: 217 nm) to give pure deuterated DHA.

$R_f=0.50$ (*n*-pentane/EtOAc, 6:4); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta=5.43\text{--}5.29$ (m, 12 H; CH), 2.86–2.80 (m, 8 H; $\text{CH}_2(\text{bis-allylic})$), 2.43–2.38 (m, 4 H; $\text{HC--CH}_2\text{--CH}_2\text{--CO}$), 2.10–2.04 (m, 2 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 0.97 ppm (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3 H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta=179.5, 132.2, 129.6, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.2, 128.2, 128.0$ (2C), 127.7, 127.1, 34.1, 25.8 (2C), 25.7, 25.7, 25.1 (quint, $^1J(\text{C,D})=19.2$ Hz), 22.6, 20.7, 14.4 ppm; HRMS (ESI $^-$): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{D}_2\text{O}_2$: 329.2450 [$M-\text{H}$] $^-$; found: 329.2446; HPLC (column: Bridge[®] BEH (C_{18}); particle size: 2.5 μm ; dimensions: 2.1 \times 100 mm; water/MeOH, 20:80; isocratic flow; PDA detection: 200–800 nm); $t_R=6.36$ min.

(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Ethyl 6,6,9,9-Tetradeterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoate (24b)

A solution of NaHMDS (2.0 M in THF, 85 μL) was added dropwise to a solution of phosphonium salt **2b** (100 mg, 0.17 mmol) in THF (1.50 mL) at -50°C under an inert atmosphere. The reaction was stirred at -20°C for 30 min and then cooled to -78°C . A solution of aldehyde **3b** (51 mg, 1.70 mmol) in THF (1.50 mL) was cooled to -78°C and added through a cannula to the orange mixture. The reaction was allowed to warm to RT over 1.5 h and then stirred for 21 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NH_4Cl (10 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-pentane/EtOAc (9:1, 4 \times 5 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/ Et_2O 98:2) to give DHA ethyl ester **24b** (31 mg, 51% yield) as a yellow oil.

$R_f=0.53$ (*n*-pentane/EtOAc, 9:1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta=5.40\text{--}5.32$ (m, 12 H; CH), 4.12 (q, $^3J(\text{H,H})=7$ Hz, 2 H; $\text{CH}_2(\text{ester})$), 2.86–2.80 (m, 6 H; $\text{CH}_2(\text{bis-allylic})$), 2.39–2.34 (m, 4 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CO}$), 2.08–2.05 (m, 2 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 1.25 (t, $^3J(\text{H,H})=7$ Hz, 3 H; $\text{CH}_3(\text{ester})$), 0.97 ppm (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3 H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta=173.2, 132.1, 129.2, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1$ (2C), 128.0, 127.1, 60.5, 34.4, 25.7, 25.7, 25.6, 25.1 (quint, $^1J(\text{C,D})=19.4$ Hz), 25.1 (quint, $^1J(\text{C,D})=19.5$ Hz), 22.9, 20.7, 14.4, 14.4 ppm; HRMS (ASAP+): m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{D}_4\text{O}_2$: 361.3045 [$M+\text{H}$] $^+$; found: 361.3046.

(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-6,6,9,9-Tetradeterodocosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic Acid (1b)

A solution of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (72 mg, 1.71 mmol) in water (0.60 mL) was added to a solution of ester **24b** (95 mg, 0.26 mmol) in EtOH (0.6 mL) under an inert atmosphere. The mixture was heated at 65°C for 4 h and an additional portion of $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (33 mg, 3 mmol) was added. After heating at 65°C for 7 h, the reaction was cooled to RT and quenched with water (10 mL) and an aqueous solution of HCl (1.0 M) to pH 2. The aqueous layer was extracted with *n*-pentane/EtOAc (6:4, 3 \times 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and the solvents were removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-pentane/EtOAc, 95:5 to 6:4) to give (6,6,9,9- D_4)-DHA (**1b**; 72 mg, 84% yield) as a yellow oil. A portion of this product was purified by preparative HPLC to remove trace amounts of over-reduced byproducts (column: Waters Symmetry PrepTM (C_{18}); particle size: 7 μm ; dimensions: 7.8 mm \times 300 mm; water/MeCN, 17:83; isocratic flow; UV detection: 217 nm) to give pure deuterated DHA.

$R_f=0.52$ (*n*-pentane/EtOAc, 6:4); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta=5.43\text{--}5.30$ (m, 12 H; CH), 2.86–2.80 (m, 6 H; $\text{CH}_2(\text{bis-allylic})$), 2.43–2.38 (m, 4 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CO}$), 2.09–2.06 (m, 2 H; $\text{CH}_2\text{--CH}_3$), 0.97 ppm (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 3 H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta=179.3, 132.2, 129.6, 128.7, 128.4$ (2C), 128.4, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 127.7, 127.1, 34.1, 25.8, 25.8, 25.7, 25.1 (quint, $^1J(\text{C,D})=19.1$ Hz), 25.1 (quint, $^1J(\text{C,D})=19.5$ Hz), 22.6, 20.7, 14.4 ppm; HRMS (ESI $^-$): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{D}_4\text{O}_2$: 331.2575 [$M-\text{H}$] $^-$; found: 331.2574; HPLC (column: Bridge[®] BEH (C_{18}); particle size: 2.5 μm ; dimensions: 2.1 \times 100 mm; water/MeOH, 20:80; isocratic flow; PDA detection: 200–800 nm); $t_R=4.76$ min.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Montpellier through the PhD support for M.R.

Keywords: deuterium · DHA · lipids · total synthesis · Wittig reactions

- [1] R. Uauy, E. Birch, D. Birch, P. Peirano, *J. Pediatr.* **1992**, *120*, 5168–180.
- [2] J. P. SanGiovanni, E. Y. Chew, *Prog. Retinal Eye Res.* **2005**, *24*, 87–138.
- [3] A. P. Simopoulos, *J. Am. Coll. Nutr.* **2002**, *21*, 495–505.
- [4] K. J. Bowen, W. S. Harris, P. M. Kris-Etherton, *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **2016**, *18*, 69.
- [5] M. Hashimoto, S. Hossain, A. Al Mamun, K. Matsuzaki, H. Arai, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, 1–19.
- [6] a) T. Georgiou, A. Neokleous, D. Nicolaou, B. Sears, *PharmaNutrition* **2014**, *2*, 8–11; b) D. S. Rice, J. M. Calandria, W. C. Gordon, B. Jun, Y. Zhou, C. M. Gelfman, S. Li, M. Jin, E. J. Knott, B. Chang, A. Abuin, T. Issa, D. Potter, K. A. Platt, N. G. Bazan, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6228.
- [7] a) Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group, *JAMA* **2013**, *309*, 2005–2015; b) F. Li, L. D. Marchette, R. S. Brush, M. H. Elliott, K. R. Davis, A. G. Anderson, R. E. Anderson, *Mol. Vision* **2010**, *16*, 1669–1679; c) F. Li, L. D. Marchette, R. S. Brush, M. H. Elliott, Y. Z. Le, K. A. Henry, A. G. Anderson, C. Zhao, X. Sun, K. Zhang, R. E. Anderson, *Mol. Vision* **2009**, *15*, 1185–1193.
- [8] a) L. Balas, T. Durand, *Prog. Lipid Res.* **2016**, *61*, 1–18; b) U. Jahn, J. M. Galano, T. Durand, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5894–5955; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5978–6041; c) C. N. Serhan, N. A. Petasis, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5922–5943.
- [9] a) N. G. Bazan, J. M. Calandria, C. N. Serhan, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2018–2031; b) P. K. Mukherjee, V. L. Marcheselli, C. N. Serhan, N. G. Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8491–8496.
- [10] G. L. Bannenberg, N. Chiang, A. Ariel, M. Arita, E. Tjonahen, K. H. Gotlinger, S. Hong, C. N. Serhan, *J. Immunol.* **2005**, *174*, 4345–4355.
- [11] N. G. Bazan, V. L. Marcheselli, K. Cole-Edwards, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1053*, 137–147.
- [12] a) J. M. Galano, E. Mas, A. Barden, T. A. Mori, C. Signorini, C. De Felice, A. Barrett, C. Opere, E. Pinot, E. Schwedhelm, R. Benndorf, J. Roy, J. Y. Le Guennec, C. Oger, T. Durand, *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2013**, *107*, 95–102; b) J. Roy, C. Oger, J. Thireau, J. Roussel, O. Mercier-Touzet, D. Faure, E. Pinot, C. Farah, D. F. Taber, J. P. Cristol, J. C. Lee, A. Lacampagne, J. M. Galano, T. Durand, J. Y. Le Guennec, *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *86*, 269–278.
- [13] a) E. K. Long, M. J. Picklo, Sr., *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1–8; b) F. J. Van Kuijk, L. L. Holte, E. A. Dratz, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1990**, *1043*, 116–118.
- [14] A. Ishikado, K. Morino, Y. Nishio, F. Nakagawa, A. Mukose, Y. Sono, N. Yoshioka, K. Kondo, O. Sekine, T. Yoshizaki, S. Ugi, T. Uzu, H. Kawai, T. Makino, T. Okamura, M. Yamamoto, A. Kashiwagi, H. Maegawa, *PLoS One* **2013**, *8*, e69415.
- [15] a) B. G. Gugiu, C. A. Mesaros, M. Sun, X. Gu, J. W. Crabb, R. G. Salomon, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 262–271; b) C. Schneider, K. A. Tallman, N. A. Porter, A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20831–20838; c) C. M. Spickett, *Redox Biol.* **2013**, *1*, 145–152.
- [16] a) Q. Ebrahem, K. Renganathan, J. Sears, A. Vasanji, X. Gu, L. Lu, R. G. Salomon, J. W. Crabb, B. Anand-Apte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13480–13484; b) J. G. Hollyfield, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2010**, *51*, 1276–1281; c) J. G. Hollyfield, V. L. Perez, R. G. Salomon, *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 290–298.
- [17] a) A. Y. Andreyev, H. S. Tsui, G. L. Milne, V. V. Shmanai, A. V. Bekish, M. A. Fomich, M. N. Pham, Y. Nong, A. N. Murphy, C. F. Clarke, M. S. Shchepinov, *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *82*, 63–72; b) S. Hill, K. Hirano, V. V. Shmanai, B. N. Marbois, D. Vidovic, A. V. Bekish, B. Kay, V. Tse, J. Fine, C. F. Clarke, M. S. Shchepinov, *Free Radical Biol. Med.* **2011**, *50*, 130–138; c) S. Hill, C. R. Lamberson, L. Xu, R. To, H. S. Tsui, V. V. Shmanai, A. V. Bekish, A. M. Awad, B. N. Marbois, C. R. Cantor, N. A. Porter, C. F. Clarke, M. S. Shchepinov, *Free Radical Biol. Med.* **2012**, *53*, 893–906; d) C. R. Lamberson, L. Xu, H. Muchalski, J. R. Montenegro-Burke, V. V. Shmanai, A. V. Bekish, J. A. McLean, C. F. Clarke, M. S. Shchepinov, N. A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 838–841.
- [18] a) P. Brabet, D. Cia, L. Guillou, C. Hamel, C. Vigor, T. Durand, C. Crauste, J. Vercauteren (Centre Hospitalier Universitaire Montpellier, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université d'Auvergne, Université Montpellier, France), WO2015162265A1, **2015**; b) C. Crauste, C. Vigor, P. Brabet, M. Picq, M. Lagarde, C. Hamel, T. Durand, J. Vercauteren, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 4548–4561.
- [19] a) R. Corberán, M. Sanaú, E. Peris, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3974–3979; b) G. Kohl, R. Rudolph, H. Pritzkow, M. Enders, *Organometallics* **2005**, *24*, 4774–4781; c) M. H. G. Precht, M. Holscher, Y. Ben-David, N. Theysen, R. Loschen, D. Milstein, W. Leitner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2269–2272; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2319–2322; d) C. M. Yung, M. B. Skaddan, R. G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13033–13043.
- [20] G. Erdogan, D. B. Grotjahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10354–10355.
- [21] J. S. Cannon, S. F. Kirsch, L. E. Overman, H. F. Sneddon, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15192–15203.
- [22] R. E. Ireland, L. B. Liu, T. D. Roper, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13221–13256.
- [23] A. Guy, C. Oger, J. Heppekausen, C. Signorini, C. De Felice, A. Furstner, T. Durand, J. M. Galano, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6374–6380.
- [24] G. Dayaker, T. Durand, L. Balas, *Chemistry* **2014**, *20*, 2879–2887.
- [25] C. A. Brown, V. K. Ahuja, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 553–554.
- [26] T. Caruso, A. Spinella, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2071–2073.
- [27] C. Oger, L. Balas, T. Durand, J. M. Galano, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1313–1350.
- [28] B. Kang, R. Britton, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5083–5086.
- [29] K. Mori, T. Ebata, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3471–3478.
- [30] T. Itoh, I. Murota, K. Yoshikai, S. Yamada, K. Yamamoto, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 98–108.
- [31] M. G. Jakobsen, A. Vik, T. V. Hansen, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5837–5839.
- [32] A. K. Holmeide, L. Skattebol, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2271–2276.
- [33] R. Wang, A. He, E. Ramu, J. R. Falck, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1624–1628.
- [34] M. Di Nunzio, V. Valli, A. Bordoni, *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, *67*, 834–843.

Manuscript received: November 29, 2016

Accepted Article published: January 13, 2017

Final Article published: January 31, 2017

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Les stress oxydant et carbonylé interviennent dans le mécanisme physiopathologique de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et de la maladie de Stargardt, constituant ainsi une cible thérapeutique intéressante. Une molécule lead de type lipophénol a préalablement été mise en évidence. Cette molécule est composée d'une partie phénolique de type alkylphloroglucinol, et lipidique de type oméga-3 (acide docosahexaénoïque, C22:6, ω 3, DHA). Afin d'améliorer l'activité antioxydante de ce lipophénol, la synthèse totale de deux DHA deutérés en positions *bis*-allyliques a été réalisée. Leurs couplages au phloroglucinol alkylé a ensuite conduit aux dérivés lipophénoliques deutérés correspondants. L'impact des deutériums sur la diminution de la toxicité cellulaire et de la peroxydation lipidique a ensuite été mis en évidence lors d'une évaluation biologique *in vitro* réalisée en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

TITRE EN ANGLAIS

Synthesis and evaluation of deuterated lipophenol derivatives, a new concept to reduce oxidative and carbonyl stresses damages in retinal pathologies

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Age Related Macular Degeneration (AMD) and Genetic Stargardt's disease share a common cytotoxic mechanism involving carbonyl and oxidative stress. Hence both stresses represent promising therapeutic targets. A lipophenol lead molecule has been previously highlighted. This molecule is composed by an alkylphloroglucinol moiety and a lipid part which is a polyunsaturated fatty acid, the docosahexaenoic acid (DHA, C22:6, ω 3). In order to improve the antioxidant activity of this lipophenol, the total synthesis of two deuterated DHA on *bis*-allylic positions was performed. The cross-coupling between the deuterated DHA and the alkylphloroglucinol moiety led to the corresponding deuterated lipophenols. The impact of the deuterium to limit the cell toxicity and the lipid peroxidation was highlighted thanks to *in vitro* biological studies performed on retinal pigment epithelium cell line.

DISCIPLINE

Chimie Organique, Biologie

MOTS-CLÉS

Stress Oxydant, Stress Carbonylé, Lipophénols, Maladies Rétiniennes, Acides Gras Polyinsaturés, Deuterium

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM): Équipe de Synthèse de Lipides Bioactifs, UMR 5247 CNRS - Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, F-34093 Montpellier cedex 05.