HAL
open science

Influence de la localisation d'antioxydants sur la peroxydation des lipides membranaires : étude du mode d'action de dérivés PBN et de composés phénoliques

Larissa Socrier

▶ **To cite this version:**

Larissa Socrier. Influence de la localisation d'antioxydants sur la peroxydation des lipides membranaires : étude du mode d'action de dérivés PBN et de composés phénoliques. Biotechnologie. Université de Technologie de Compiègne, 2017. Français. NNT : 2017COMP2382 . tel-02060926

HAL Id: tel-02060926

https://theses.hal.science/tel-02060926v1

Submitted on 7 Mar 2019

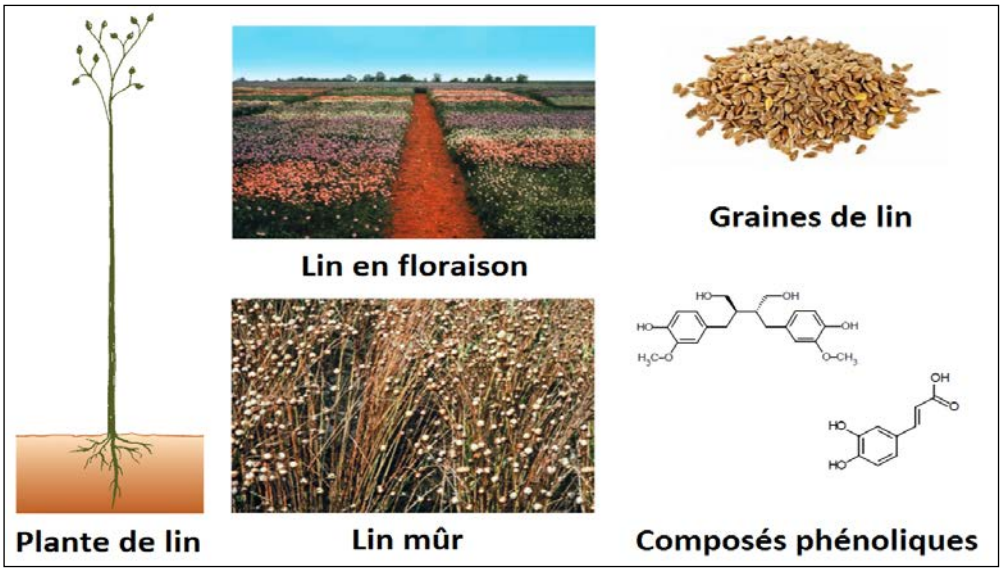
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Larissa SOCRIER**

Influence de la localisation d'antioxydants sur la peroxydation des lipides membranaires : étude du mode d'action de dérivés PBN et de composés phénoliques

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 29 novembre 2017
Spécialité : Biotechnologie : Unité de recherche Génie Enzymatique et Cellulaire - GEC (FRE-3580)

D2382

Université de Technologie de Compiègne

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne

Ecole Doctorale : Sciences Pour l'Ingénieur (ED 71)

Spécialité : Biotechnologie

Par Larissa SOCRIER

Influence de la localisation d'antioxydants sur la peroxydation des lipides membranaires :

Etude du mode d'action de dérivés PBN et de composés phénoliques.

Soutenue publiquement le 29 Novembre 2017 devant le Jury composé de :

-Mme Touria Cohen-Bouhacina, Professeur.	Rapporteur, Université de Bordeaux.
-Mr Patrick Trouillas, Professeur.	Rapporteur, Université de Limoges.
-Mr Karim El-Kirat-Chatel, Professeur.	Président de Jury, Université de Technologie de Compiègne.
-Mr François Mesnard, Professeur.	Examinateur, Université de Picardie Jules Vernes.
-Mr Grégory Durand, Maître de conférences.	Examinateur, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse.
-Mme Sandrine Morandat, Maître de conférences.	Directeur de thèse, Université de Technologie de Compiègne.

RESUME EN FRANÇAIS :

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) sont essentielles à la survie des cellules car elles interviennent dans divers processus physiologiques comme la défense immunitaire ou encore la régulation de voies de signalisation cellulaires. Cependant, un excès d'EROs peut créer un déséquilibre de la balance EROs/antioxydants appelé « stress oxydant ». Le stress oxydant étant impliqué dans l'étiologie de plus de 200 pathologies, l'action des antioxydants est cruciale pour limiter les effets délétères des EROs.

Les antioxydants utilisés par les cellules peuvent être de nature chimique. Parmi ceux-ci, l'*α-phenyl-N-tert-butyl nitrone* (PBN) est particulièrement efficace en milieu biologique pour piéger les radicaux. Cependant, comme cette molécule présente le désavantage majeur de mal cibler les membranes, des nitrones amphiphiles dérivées de la PBN ont été synthétisées. Le premier chapitre décrit l'étude des interactions de nitrones dérivées du cholestérol avec les lipides membranaires. Ces travaux ont souligné l'influence du groupement polaire sur la nature des interactions avec les lipides membranaires. Aussi, l'étude des propriétés antioxydantes a permis de mettre en évidence l'importance de la localisation membranaire et l'influence de l'orientation du groupement PBN sur l'activité protectrice des dérivés. Le second chapitre décrit les résultats des expériences menées avec une deuxième série de dérivés amphiphiles, présentant la particularité d'avoir une chaîne perfluorée comme groupement hydrophobe. Bien que la localisation membranaire de ces dérivés soit nécessaire pour obtenir un effet protecteur significatif, la nature de l'antioxydant semble être ici le paramètre le plus important. Enfin, la combinaison d'antioxydants de nature différente sur une même molécule semble être une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité antioxydante et créer un effet de synergie.

En outre, pour se défendre, les cellules utilisent aussi des antioxydants issus de l'alimentation, en particulier des fruits et légumes. Parmi ces derniers, les composés phénoliques sont reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes constituent les 4 classes principales de composés phénoliques. Les lignanes sont particulièrement présents dans les graines de lin *(Linum usitatissimum)*. Le lin est la plante qui contient le plus de secoisolaricirésinol diglucoside. Afin de mieux comprendre leur fonctionnement et leurs interactions avec les lipides membranaires, plusieurs molécules appartenant à cette classe de composés ainsi que des acides hydroxycinnamiques ont été purifiées à partir du lin. Le troisième chapitre décrit les résultats des expériences menées avec les composés phénoliques extraits du lin. De manière générale, les composés testés se sont avérés efficaces pour protéger les lipides membranaires de l'oxydation. L'étude de leurs interactions avec les lipides membranaires a permis de montrer que le mode d'action des lignanes, qui pénètrent les membranes, est plus efficace que celui des acides hydroxycinnamiques.

MOTS-CLES : antioxydants, nitrones amphiphiles, lin, composés phénoliques, stress oxydant, peroxydation lipidique, modèles membranaires, biophysique

RESUME EN ANGLAIS:

Title: Influence of the location of antioxidants on membrane lipid peroxidation: study of the mechanisms of action of PBN derivatives and phenolic compounds.

Reactive oxygen species (ROS) are essential in living cells as they intervene in several physiological processes like the immune system and signaling pathways. However, an excess of the production of ROS can alter the equilibrium with antioxidants. This imbalance is called oxidative stress. As oxidative stress has been reported to be implicated in more than 200 diseases, the action of antioxidants to limit the deleterious effects of ROS is crucial.

The antioxidants used by the cells can be chemical. Among them, *α-phenyl-N-tert-butyl nitrone* (PBN) is widely used in biological systems to neutralize ROS. Because this molecule possesses a poor ability to target membranes, our collaborators synthesized amphiphilic nitrones bearing a PBN moiety. The first chapter describes the interactions of cholesterol derived PBN derivatives with the membrane. Results underlined the influence of the polar moiety on the nature of their interactions with membrane lipids. In addition, the evaluation of the antioxidant properties revealed the importance of the membrane localization of the nitrone moiety on the protective activity of the derivatives. The second chapter deals with a second set of amphiphilic nitrones that have the particularity of bearing a perfluorinated chain that constitutes the hydrophobic moiety. We noticed the membrane localization is important for the antioxidant efficiency; however the nature of the antioxidant moiety remains the most important parameter in this case. Finally, the strategy of grafting two different antioxidants on the same carrier seems to be promising to enhance the protective effect and create a synergistic antioxidant effect.

However, cells also use natural antioxidants to defend themselves. These antioxidants come from food, especially from vegetables and fruits. Among them, phenolic compounds are known for their beneficial effects on health. Flavonoïds, phenolic acids, stilbenes and lignans constitute the 4 main classes of phenolic compounds. Lignans are particularly present in flaxseed *(Linum usitatissimum).* Flaxseed is the plant that possesses the highest quantity of secoisolariciresinol diglucoside. In order to understand their mechanisms of action and their interactions with membranes, lignans as well as hydroxycinnamic acids were purified from flaxseed. The third chapter describes the results obtained on model membranes. Generally speaking, both classes of compounds are efficient against lipid oxidation. Studying their interactions with membrane lipids allowed us to show that the mechanism of lignans, that penetrate membranes, is more efficient than the mechanism of hydroxycinnamic acids.

KEY-WORDS: antioxidants, amphiphilic nitrones, flaxseed, phenolic compounds, oxidative stress, lipid oxidation, model membranes, biophysics

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à un financement ministériel au sein du laboratoire du laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire - FRE 3580 CNRS, dont je remercie les membres pour leur accueil. Je souhaite remercier Yannick, Adrian, Mounir, Mariano et Abdelatif pour m'avoir aidé à préparer mes congrès et présentations ainsi que pour leurs nombreux conseils pour l'avenir. J'ai aussi une pensée pour Morgane, Carol et les Valéries que je remercie pour leur simplicité et leur gentillesse. J'ai aussi une pensée pour tous les hispanophones du labo qui m'ont permis d'améliorer significativement mon espagnol.

Je souhaite aussi remercier Madame Touria Cohen-Bouhacina et Monsieur Patrick Trouillas qui ont accepté d'évaluer ce travail. Merci aussi à Messieurs Karim El-Kirat-Chatel, François Mesnard et Grégory Durand qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci à Madame Sandrine Morandat de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse dans de bonnes conditions. Merci aussi pour ton encadrement, les conseils dispensés, les expériences relatées et la confiance accordée durant ces trois années. J'espère que tu finiras par décrocher ton « graal ».

Merci aux collaborateurs et en particulier à Anthony, d'avoir mis à ma disposition des échantillons dès que j'en avais besoin. Un petit clin d'œil à mes stagiaires Yiming, Margaux et Ana Milena qui m'ont bien soulagée de quelques manips. Merci pour votre implication dans ce projet. Quant à Aurélien, je te remercie pour ta sympathie ainsi que le chaource et le vin que tu me ramenais de temps en temps de ton village. Je pars en laissant le « dico du créole » sur le frigo, ça te fera un souvenir tropical supplémentaire en plus de la doucelette coco, du jambon noël, de la cannelle et de la citronnelle. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse.

Enfin, je souhaite dédier ce travail à mes proches qui n'ont cessé de me soutenir et de m'encourager durant ces trois années. Mèci an pil pou toute foss la zot ba mwen. Mem si téni distans, zot té toujou la pou couté lè man té bousoin palé. Zot té toujou ka raplé mwen bod' lanmè pa lwen ek sa ki la pouw la riviè paka chayé-ï. Man fini pa rivé, malgré toute cé anbich la ki té ni assou chimen mwen é cé pass zot té la, alow travaye ta a cé ta zot tou.

Table des matières

Liste des Abréviations vi

Liste des Figures viii

Liste des Tableaux x

Introduction générale 1

Rappels bibliographiques 4

Chapitre I. Le stress oxydant 4

1. Les principales espèces réactives de l'oxygène 4
2. Les cibles des EROs 6
3. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène 11
4. La régulation endogène des EROs 13

Chapitre II. Les antioxydants chimiques 16

1. Généralités 16
2. Les molécules pièges ou « spin traps » 17
3. Mode de fonctionnement de la PBN 19
4. Les nitrones amphiphiles 22

Chapitre III. Les antioxydants de la plante de lin 29

1. La plante de lin 29
2. La graine de lin 30
3. Les composés phénoliques présents dans la graine de lin 32

Chapitre IV. Les effets protecteurs des composés phénoliques 41

1. Le mode d'action des composés phénoliques 41
2. Les bienfaits des composés phénoliques sur la santé 47

Chapitre V. Les lipides et les membranes cellulaires 50

1. Les membranes cellulaires 50
2. Les modèles membranaires biomimétiques utilisés 58

Résultats 71

Chapitre I. Les nitrones dérivées du cholestérol 71

1. Introduction 71
2. Article 1 72

Chapitre II. Les nitrones fluorées 111

1. Introduction 111
2. Article 2 112

Chapitre III. Les composés phénoliques 142
1. Introduction 142
2. Article 3 143
Discussion 187
Chapitre I. Interactions des dérivés PBN avec les lipides membranaires 187
Chapitre II. Interactions des composés phénoliques avec les membranes 193
Perspectives 197
Communications scientifiques 201
Références bibliographiques 203

Liste des Abréviations

A

AAPH : 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride

ADN : acide désoxyribonucléique

Anhydro : anhydrosécoisolaricirésinol

AP-1 (de l'anglais « activator protein 1 ») : protéine activatrice 1

ARN : acide ribonucléique

AGPI : acide gras polyinsaturé

B

BDE (de l'anglais « bond dissociation enthalpy ») : énergie de dissociation d'une liaison

BHA (de l'anglais « butylated hydroxyanisole ») : hydroxyanisole butylé

BHT (de l'anglais « butylated hydroxtoluene ») : hydroxytoluène butylé

C

Caf : acide caféique

CafG : acide caféique glucoside

Coum : acide coumarique

CoumG : acide coumarique glucoside

D

DMPC : 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DLPC : 1,2-Dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DLPE, 1,2-Dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

E

EROs : espèces réactives de l'oxygène

F

FAOSTAT (de l'anglais «Food and agriculture organization of the United nations »): Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Fer : acide férulique

FerG : acide férulique diglucoside

G

GUVs (de l'anglais « giant unilamellar vesicles ») : liposomes géants unilamellaires

I

IL : interleukine

L

Larici : laricirésinol

LDG : laricirésinol diglucoside

LUVs (de l'anglais « large unilamellar vesicles ») : grands liposomes unilamellaires

M

MDA : malondialdéhyde

MLVs : (de l'anglais « multilamellar vesicles ») : liposomes multilamellaires

O

OG : octyl gallate

P

PBN : α-phényl-*N*-tert-butyl nitrone

Pino : pinorésinol

PDG : pinorésinol diglucoside

PG : propyl gallate

S

SOD : superoxyde dismutase

Séco : sécoisolaricirésinol

SDG : sécoisolaricirésinol diglucoside

SUVs (de l'anglais « small unilamellar vesicles ») : petits liposomes unilamellaires

T

TBARS (de l'anglais « thiobarbituric acid reactive substances ») : substances réactives de l'acide thiobarbiturique

TBHQ : tert-butylhydroquinone

TEAC (de l'anglais « Trolox equivalent antioxidant capacity ») : capacité antioxydante équivalente au Trolox

Trolox : acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique

TPSA (de l'anglais « Topological polar surface area ») : surface polaire topologique

Liste des Figures

Rappels bibliographiques

Chapitre I. Le stress oxydant

Figure 1. Les quatre étapes de la réduction monoélectronique de l'oxygène. 4
Figure 2. Réaction d'Haber-Weiss. 6
Figure 3. Formation de radicaux hydroxyles dans les cellules du système immunitaire. 6
Figure 4. Modifications de la guanine et la thymine par les radicaux hydroxyles. 7
Figure 5. Schéma général de la peroxydation lipidique. 10

Chapitre II. Les antioxydants chimiques

Figure 1. Formules chimiques d'antioxydants de synthèse fréquemment utilisés dans l'industrie et en milieu biologique. 17
Figure 2. Les nitrones et leurs propriétés. 18
Figure 3. Effet d'un antioxydant retardateur sur la consommation d'oxygène 20
Figure 4. Formule chimique de l'acide lactobionique 23
Figure 5. Formule chimique des nitrones bi-acylées 24
Figure 6. Formule chimique de nitrones mono-acylées 25
Figure 7. Formule chimique de nitrones fluorées. 26
Figure 8. Formule chimique du chol-PBN-L et du L-PBN-chol. 27
Figure 9. Formule chimique de nitrones à double motif antioxydant 28

Chapitre III. Les antioxydants de la plante de lin

Figure 1. Plante de lin 29
Figure 2. Coupe d'une graine de Lin. 31
Figure 3. Voie de l'acide shikimique chez les plantes 33
Figure 4. Les différentes classes de composés phénoliques. 34
Figure 5. Squelette de base des flavonoïdes. 35
Figure 6. Squelette de base des sous-classes des flavonoïdes 36
Figure 7. Formule générale des acides phénoliques. 37
Figure 8. Voie de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques 38
Figure 9. Noyaux de base des lignanes 39
Figure 10. Voie de biosynthèse du sécoisolaricirésinol 40

Chapitre IV. Les effets protecteurs des composés phénoliques

Figure 1. Sites de chélation des ions métalliques des flavonoïdes 42
Figure 2. Mécanisme de détoxification des EROs grâce aux composés phénoliques par transfert d'un atome d'hydrogène ou transfert d'un électron 46
Figure 3. Eléments structuraux des flavonoïdes nécessaires à l'efficacité antioxydante 47

Chapitre V. Les lipides et les membranes cellulaires

Figure 1. Représentation d'une membrane cellulaire. 50
Figure 2. Quelques exemples de glycérophospholipides. 53
Figure 3. Quelques exemples de sphingolipides. 54
Figure 4. Structure du Cholestérol. 55
Figure 5. Etats physiques adoptés par une bicouche lipidique en phase aqueuse 57
Figure 6. Représentation schématique d'une lame de Wilhelmy à l'interface air/eau. 59
Figure 7. Interaction d'un composé amphiphile avec une monocouche de lipide. 61

Figure 8. Isotherme de compression théorique obtenue en comprimant une monocouche de lipide étalée à l'interface air/eau. 63
Figure 9. Représentation schématique de liposomes. 66
Figure 10. Quelques modes de préparation des liposomes. 67

Résultats

Chapitre I. Les nitrones dérivées du cholestérol

Figure. 1 LogP des cholestéryl-PBNs 76
Figure. 2 Isothermes de compression des mélanges binaires DLPC/cholestéryl-PBNs et DLPC/cholestérol à différents ratios molaires 85
Figure. 3 Evolution du diamètre hydrodynamique des liposomes de DLPC contenant 30% (mol) de cholestéryl-PBNs 89
Figure. 4 Inhibition par le cholestérol et le chol-PBN de l'oxydation induite par l'AAPH..... 91
Figure. 5 Effect du cholestérol, des cholestéryl-PBNs et de la PBN sur l'oxydation des liposomes de DLPC induite par l'AAPH 94
Figure. 6 Effect du cholestérol, des cholestéryl-PBNs et de la PBN sur l'oxydation des liposomes de DLPC induite par la réaction de Fenton 97
Supp. 1 Inhibition par le cholestérol, les cholestéryl-PBNs et la PBN de l'oxydation des liposomes de DLPC induite par l'AAPH 107
Supp. 2 Inhibition par le cholestérol, les cholestéryl-PBNs et la PBN de l'oxydation des liposomes de DLPC induite par la réaction de Fenton 109

Chapitre II. Les nitrones fluorées

Figure. 1 Structure chimique des molécules étudiées. 116
Figure. 2 Activité des composés à l'interface air/eau (Gibbs monolayers) 122
Figure. 3 Détermination de la pression malximale d'insertion (PIM) des dérivés fluorés dans des monocouches de DLPC 124
Figure. 4 Inhibition par le FATxPBN de l'oxydation induite par l'AAPH et détermination de l'IC50 de chaque composé 128
Figure. 5 Temps de latence nécéssaire pour atteindre 10 et 20 % d'oxydation 129
Supp. 1 Correlation entre l'enfouissement et les propriétés hydrophobes des dérivés..... 140

Chapitre III. Les composés phénoliques

Figure. 1 Structure chimique et LogP des composés phénoliques étudiés.. 149
Figure. 2 Effet du seco et du coum sur l'oxydation des liposomes de DLPC induite par l'AAPH..... 156
Figure. 3 Effet de l'injection dans la sous-phase des composés phénoliques sur les monocouches de DLPC . 160
Figure. 4 Activité antioxydante de la fraction membranaire des lignanes contre l'oxydation des liposomes de DLPC induite par l'AAPH. 163
Supp. 1 Structure chimique des composés glucosides purifiés..... 175
Supp. 4 Evaluation de la fuite calcique due à l'insertion des composés dans la membrane. 181
Supp. 5 Quantification des lignanes aglycones insérés dans des liposomes de DLPC.. 182
Supp. 6 Corrélation entre le LogP le TPSA des composés phénoliques 183
Supp. 7 Correlation entre l'IC_{50} et le LogP et le TPSA des lignanes.. 184

Discussion

Chapitre I. Interactions des dérivés PBN avec les lipides membranaires

Figure 1. Inhibition de l'oxydation des lipides par les cholestéryls-PBN au sein d'une membrane de DLPC... 189
Figure 2. Effet protecteur des dérivés fluorés contre la peroxydation lipidique.. 191

Chapitre II. Interactions des composés phénoliques avec les membranes

Figure 1. Mode d'action proposé pour les composés phénoliques testés..... 195

Liste des Tableaux

Rappels bibliographiques

Chapitre III. Les antioxydants de la plante de lin

Tableau 1. Profil des acides gras présents dans l'huile de lin.. 32

Résultats

Chapitre I. Les nitrones dérivées du cholestérol

Tableau 1. Résumé des résultats des isothermes de compression des monocouches des cholestéryl-PBN et du cholestérol 84

Tableau 2. Excès d'énergie libre des monocouches de DLPC contenant 30% de cholestéryl-PBN à 30 mN/m . 86

Tableau 3. GP des liposomes de DLPC contenant 30% mol de cholestéryl-PBNs avec du Prodan ou du Laurdan à 37°C 88

Tableau 4. IC_{50} (µM) et plateau d'oxidation (%) des cholestéryl-PBNs. 95

Chapitre II. Les nitrones fluorées

Tableau 1. LogP des antioxydants. 122

Tableau 2. Pression d'insertion maximale et $\Delta\pi_{30mN/m}$ des composés fluorés 124

Tableau 3. Distance des composés du centre de la bicouche 125

Tableau 4. IC_{50} (µM) des antioxydants 129

Chapitre III. Les composés phénoliques

Tableau 1 Contribution de la fraction membranaire des lignanes aglycones à l'inhibition de l'oxydation des liposomes de DLPC induite par l'AAPH. 164

Tableau 2 TPSA des composés phénoliques. 166

Tableau supp. 2 Caractérisation LC-MS des composés purifiés 176

Tableau supp. 3 Carctérisation par RMN des composés purifiés 178

Introduction générale

Introduction générale

L'apparition et l'accumulation du dioxygène sur Terre il y a 2,5 milliards d'années a conduit les êtres vivants à évoluer pour s'adapter à un nouvel environnement. Cette adaptation s'est traduite par l'apparition d'enzymes permettant la consommation et l'élimination des métabolites du dioxygène. Ainsi, le dioxygène est devenu indispensable à la survie de tous les animaux, plantes et bactéries, à l'exception de certains organismes.

Le dioxygène participe à la respiration cellulaire en intervenant dans plusieurs voies métaboliques comme la chaîne respiratoire mitochondriale qui aboutit à la synthèse d'ATP. A la fin de ce processus, le dioxygène est réduit en eau. Cette réduction nécessite l'ajout de quatre électrons, qui peuvent s'additionner un par un, entrainant ainsi la formation d'intermédiaires plus réactifs ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et $HO^{\cdot}$) appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs). Ces intermédiaires participent à divers processus physiologiques comme la défense immunitaire, l'apoptose ou encore les voies de signalisation cellulaire.

Comme les EROs sont hautement réactifs et capables de dégrader les macromolécules biologiques, les cellules contrôlent leur proportion par le biais d'antioxydants endogènes qui sont souvent de nature enzymatique. Cependant, il arrive que ces systèmes soient submergés par une production excessive d'EROs. En effet, certains facteurs externes comme l'exposition aux rayonnements et à la pollution ou encore la consommation d'alcool et de tabac peuvent entraîner une surproduction d'EROs, créant ainsi un déséquilibre entre les EROs et les antioxydants appelé stress oxydant. Bien que le stress oxydant ne soit pas une maladie, la dégradation des macromolécules biologiques, en particulier des lipides membranaires, crée un contexte favorisant l'apparition de maladies diverses comme l'athérosclérose, la maladie de Parkinson ou encore certains cancers. Ainsi, plus de 200 pathologies en lien avec le stress oxydant ont été recensées.

Pour lutter contre les effets délétères des EROs, en plus des systèmes de défense endogène, les cellules peuvent utiliser des antioxydants exogènes qui peuvent être naturels ou de nature chimique. Comme les antioxydants naturels présentent en général une faible biodisponibilité, des antioxydants synthétiques ont été développés dans le but d'améliorer certaines propriétés des antioxydants naturels. A titre d'exemple on peut citer le Trolox, un analogue de la vitamine E qui présente la particularité d'être plus soluble en milieu aqueux que cette dernière.

D'autres chercheurs se sont tournés vers les nitrones, initialement utilisées pour identifier les EROs par résonance de spin électronique. Parmi, ces composés, l'α-phényl-N-tert-Butyl-Nitrone (PBN) est certainement le plus utilisé pour piéger les radicaux libres en milieu biologique. Cette molécule, du fait de ses faibles propriétés hydrophobes, présente le désavantage de mal cibler les membranes. Ainsi, des concentrations importantes sont nécessaires pour observer un effet antioxydant marqué. Pour palier ce problème, nos collaborateurs de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron ont synthétisé des dérivés PBN amphiphiles avec l'objectif de favoriser un ancrage membranaire.

Les antioxydants naturels sont plus abondants que les antioxydants chimiques car ils sont apportés par l'alimentation. Parmi ces derniers, les composés phénoliques sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Plus de 8 000 composés phénoliques ont été recensés. Ils sont répartis en six classes majoritaires : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les coumarines, les tannins et les lignanes. Les lignanes sont surtout présents dans le lin *(Linum usitatissimum)*, particulièrement cultivé en France pour ses fibres et son huile riche en acides gras polyinsaturés. Ces composés phénoliques, étant moins répandus que les autres, sont peu étudiés. Cependant, plusieurs études suggèrent leur implication dans la prévention de pathologies neurodégénératives et cardiovasculaires.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux types d'antioxydants : des dérivés PBN et des composés phénoliques extraits du lin (acides hydroxycinnamiques et lignanes) avec l'objectif de mieux comprendre leur mécanisme d'action contre la peroxydation lipidique. A l'aide de systèmes biomimétiques simplifiés (monocouches de Langmuir et liposomes) et d'une approche multi-technique (diffusion de la lumière, spectroscopie de fluorescence, tensiométrie de surface), nous avons pu étudier les interactions de ces composés avec les membranes. Ce manuscrit de thèse est organisé de la façon suivante :

Dans une première partie consacrée à des rappels bibliographiques, nous avons présenté le stress oxydant, les antioxydants chimiques et naturels, l'organisation des membranes ainsi que les systèmes biomimétiques utilisés. Ensuite, dans une seconde partie, nous avons détaillé par le biais de trois articles les résultats des expériences obtenues avec les molécules de synthèse et naturelles testées. Les mécanismes d'action proposés ont été discutés dans une troisième partie. Pour finir, nous proposons quelques perspectives d'avenir quant à la caractérisation de ces composés en milieu biologique et leur utilisation en milieu industriel.

Rappels bibliographiques

Rappels bibliographiques

Chapitre I. Le stress oxydant

Le dioxygène est un élément essentiel à la survie des organismes aérobies car il intervient durant la phosphorylation oxydative, processus cellulaire qui aboutit à la formation d'ATP. Le dioxygène intervient à la fin de ce processus en tant qu'accepteur final d'électrons. Ainsi, la réduction monoélectronique du dioxygène en eau se fait en quatre étapes pendant lesquelles des métabolites partiellement réduits de du dioxygène sont générés (Cf. figure 1).

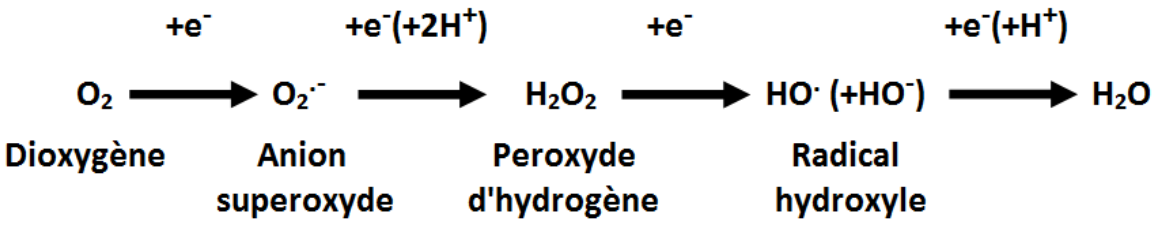


Figure 1. Les quatre étapes de la réduction monoélectronique de du dioxygène.

Ces métabolites présentent la particularité d'être plus réactifs que du dioxygène et sont couramment appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs). L'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles constituent les principales EROs (Gardès-albert *et al*., 2003; Lushchak, 2014).

1. <u>Les principales espèces réactives de l'oxygène</u>

   a. L'anion superoxyde (**$O_2^{\cdot-}$**)

L'anion superoxyde est formé suite à l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Il est produit dans la mitochondrie au cours de la respiration cellulaire qui permet la formation d'ATP et la réduction du dioxygène en eau. Il peut aussi être produit par des enzymes tel que la xanthine oxydase, les cyclo- et lipo-oxygénases ou encore la NADPH oxydase. Bien qu'il fasse partie des espèces radicalaires, l'anion superoxyde est peu réactif car il n'est pas

capable de traverser les membranes. Ainsi, il se retrouve piégé dans le compartiment où il a été formé. La demi-vie de l'anion superoxyde en milieu aqueux est très courte car il peut se dismuter spontanément en dioxygène et peroxyde d'hydrogène avec une constante de vitesse moyenne de $5x10^5$ $M^{-1}.s^{-1}$. Cette réaction peut être accélérée significativement par la superoxyde dismutase qui peut atteindre une constante de vitesse de $1,6x10^9$ $M^{-1}.s^{-1}$ (Thannickal et Fanburg, 2000).

b. Le peroxyde d'hydrogène (**H_2O_2**)

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas une espèce radicalaire à proprement parler. Il est formé par la dismutation spontanée ou enzymatique de l'anion superoxyde. Les effets délétères de cette molécule viennent du fait qu'elle intervient dans la formation d'espèces très réactives. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène permet la formation de radicaux hydroxyles par oxydation des métaux de transition.

Par ailleurs, sous l'action de la myéloperoxydase, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec des ions chlorure pour former l'acide hypochloreux. Ce dernier intervient dans la défense immunitaire en détruisant l'ADN des bactéries, ce qui permet d'inhiber leur réplication (Rosen *et al*., 1990).

c. Le radical hydroxyle (**$HO^{\cdot}$**)

Avec une demi-vie de 10^{-10}s, le radical hydroxyle est l'une des espèces réactives les plus nocives. Sa demi-vie étant très courte, ce radical est capable de s'attaquer sans spécificité aux macromolécules biologiques dès lors qu'il est formé (Phaniendra *et al*., 2015).

Il est principalement formé par la réaction d'Haber-Weiss qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en ions et radicaux hydroxyles. Cette réaction a lieu en deux étapes

(Cf. figure 2). La première permet le recyclage des ions métalliques par oxydation de l'anion superoxyde. La réaction de Fenton va ensuite permettre la formation de radicaux hydroxyles par réduction du peroxyde d'hydrogène.

$$O_2^{\cdot -} + \text{Ion métallique}^{+} \longrightarrow O_2 + \text{Ion métallique}^{(n-1)+} \quad (1)$$

$$H_2O_2 + \text{Ion métallique}^{+} \longrightarrow HO^{\cdot} + HO^{-} + \text{Ion métallique}^{(n+1)+} \quad (2)$$

Figure 2. Réaction d'Haber-Weiss.

De plus, dans les cellules du système immunitaire, la réaction entre l'acide hypochloreux formé par la myéloperoxydase et l'anion superoxyde génère aussi des radicaux hydroxyles (Cf. figure 3) (Nordberg et Arnér, 2001).

$$Cl^{-} + H_2O_2 \longrightarrow HOCl + 2H_2O$$

$$O_2^{\cdot -} + HOCl \longrightarrow HO^{\cdot} + Cl^{-} + O_2$$

Figure 3. Formation de radicaux hydroxyles dans les cellules du système immunitaire.

2. <u>Les cibles des EROs</u>

Au sein des cellules, les EROs peuvent être produites au sein de divers compartiments cellulaires comme les peroxysomes, le réticulum endoplasmique ou encore la mitochondrie qui est responsable de la production de 90% des EROs (Lushchak, 2014).

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, les EROs peuvent s'attaquer aux macromolécules biologiques dans le but de réguler les processus cellulaires. De ce fait, le maintien de l'homéostasie redox est essentiel à la survie des cellules. Cependant, la dérégulation des processus physiologiques ou encore l'exposition à des facteurs externes comme la pollution, la consommation d'alcool et de tabac et les radiations lumineuses

peuvent entrainer une production excessive d'EROs que les cellules ne peuvent contrôler (Phaniendra *et al*., 2015). Ainsi, le déséquilibre de la balance EROs/antioxydants en faveur des EROs prend le nom de « stress oxydant » (Sies, 1991).

a. Oxydation des acides nucléiques

L'oxydation de l'ADN est un facteur d'instabilité majeur du génome. En effet, les EROs seraient responsables de 10^4 lésions par cellule par jour (Fraga *et al*., 1990). Les radicaux hydroxyles sont à l'origine de la majorité des dommages infligés à l'ADN (Phaniendra *et al*., 2015). Ces lésions peuvent être multiples, allant des cassures simples et double brin à l'oxydation des bases azotées et la formation de dimères de bases (Kryston *et al*., 2011).

A titre d'exemple, l'hydroxylation de la guanine en position 8 puis son oxydation en 8-oxo-guanine et l'hydroxylation de la thymine en position 5 et 6 pour former la thymine glycol (Cf. figure 4) constituent deux des modifications les plus fréquentes de l'ADN qui sont engendrées par les radicaux hydroxyles (Melis, van Steeg et Luijten, 2013).

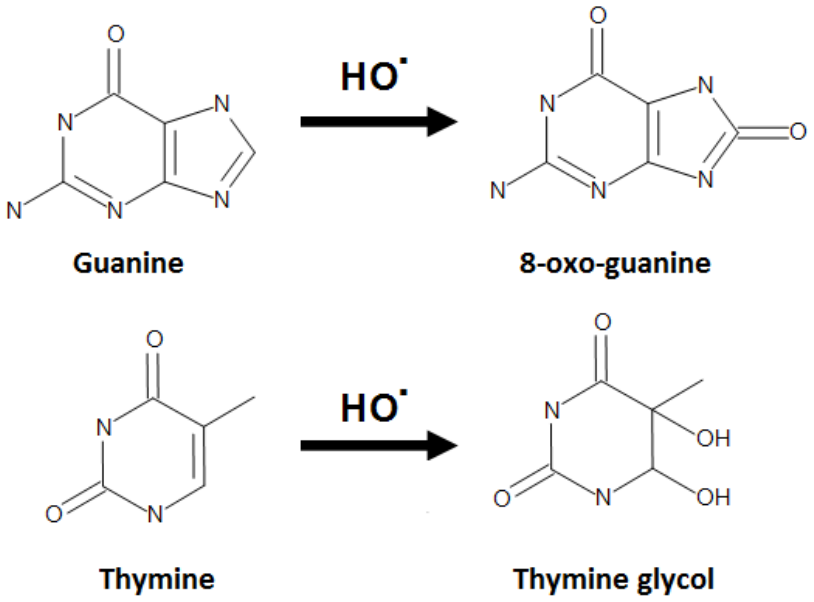


Figure 4. Modifications de la guanine et la thymine par les radicaux hydroxyles.

Les mécanismes de réparation par excision de base (BER) ou par excision de nucléotide (NER) permettent de réparer ces lésions. Cependant, ces systèmes peuvent être débordés si les EROs sont en excès. L'accumulation des lésions va altérer les processus de réplication et de transcription de l'ADN, conduisant ainsi à la mort cellulaire ou la cancérogenèse.

Les EROs peuvent aussi s'attaquer à l'ARN. Ce dernier est plus vulnérable que l'ADN car il n'a qu'un seul brin et est localisé dans le cytosol près des mitochondries. L'oxydation de la guanine en 8-oxo-guanine est la modification la plus fréquente de l'ARN (Li *et al*., 2014). Les modifications de l'ARN peuvent altérer la traduction et donc la synthèse de protéines.

b. Oxydation des protéines

Les protéines étant abondantes au sein des cellules, elles constituent une cible importante des EROs. Ces dernières peuvent attaquer les protéines à plusieurs endroits : au niveau de leur squelette ou au niveau des chaînes latérales des acides aminés.

Les EROs, en particulier le radical hydroxyle, sont capables d'extraire un atome d'hydrogène sur les carbone-α de la chaîne polypeptidique, entrainant la formation de radicaux peroxyles. Ces derniers vont ensuite former des dérivés carbonés ou des amides, entraînant la fragmentation des protéines (Höhn *et al*., 2013). Le radical hydroxyle peut aussi attaquer les acides aminés de manière individuelle. Ainsi, la méthionine et la cystéine sont particulièrement sensibles à ce dernier. L'attaque des groupements thiols de ces acides aminés entraîne la formation de sulfoxydes de méthionine et de ponts disulfures (Phaniendra *et al*., 2015). De plus, l'exposition à certains agents toxiques peut entraîner une oxydation spécifique des protéines. Zhou et ses collaborateurs ont suggéré que l'interaction spécifique entre les domaines en doigt de zinc et l'arsenic entraîne une oxydation spécifique des cystéines des protéines en doigt de zinc par les EROs (Zhou *et al*., 2015).

La plupart des modifications étant irréversibles, la dégradation par le protéasome constitue le mécanisme principal d'élimination des protéines oxydées. Cependant, des systèmes spécifiques de réparation existent pour certains acides aminés. Ainsi, les sulfoxydes de méthionine et les ponts disulfures peuvent être régénérés par en méthionine et cystéine par la méthionine sulfoxyde réductase et la protéine disulfure isomérase (Nordberg et Arnér, 2001). L'oxydation des acides aminés entraîne une dénaturation et une perte de fonction des protéines, la perte de l'activité enzymatique, la perte de fonction des récepteurs et des protéines de transport.

c. Peroxydation des lipides

Par ailleurs, les lipides membranaires, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI), sont sensibles à l'action des radicaux libres. L'attaque des EROs va entraîner une réaction de dégradation en chaîne des lipides appelée peroxydation lipidique (Cf. figure 5). Cette réaction a lieu en trois étapes (initiation, propagation et terminaison) et présente la particularité d'être auto-catalytique car une fois initiée, elle se propage et s'accélère seule (Wheatley, 2000).

Les EROs vont initier la réaction en arrachant des atomes d'hydrogène allyliques, ce qui permet la formation de radicaux alkyles ($L_1^{\cdot}$). Ces derniers vont se stabiliser par réarrangement de leurs doubles liaisons et former des diènes conjugués qui présentent la particularité d'absorber la lumière à 234 nm.

Au cours de la propagation, les diènes conjugués réagissent avec le dioxygène ce qui permet la formation de radicaux peroxyles ($L_1OO^{\cdot}$) qui vont être réduits en hydroperoxydes (L_nOOH) après avoir arraché des atomes d'hydrogène aux chaînes acyles voisines. Ces derniers peuvent être réduits ou oxydés par des ions métalliques (Me^+) ou se scinder sous

l'effet de la chaleur (Δ) ou des ultra-violets (UV). Les radicaux nouvellement formés ($LnO^{\cdot}$, $LnOO^{\cdot}$ et $HO^{\cdot}$) vont amplifier la réaction en attaquant d'autres chaînes acyles (L_4H) (Schaich, 2005). La réaction prend fin lorsque deux espèces radicalaires ($LnO^{\cdot}$, $LnOO^{\cdot}$ et $HO^{\cdot}$) s'annihilent ou se scindent pour former des produits non radicalaires.

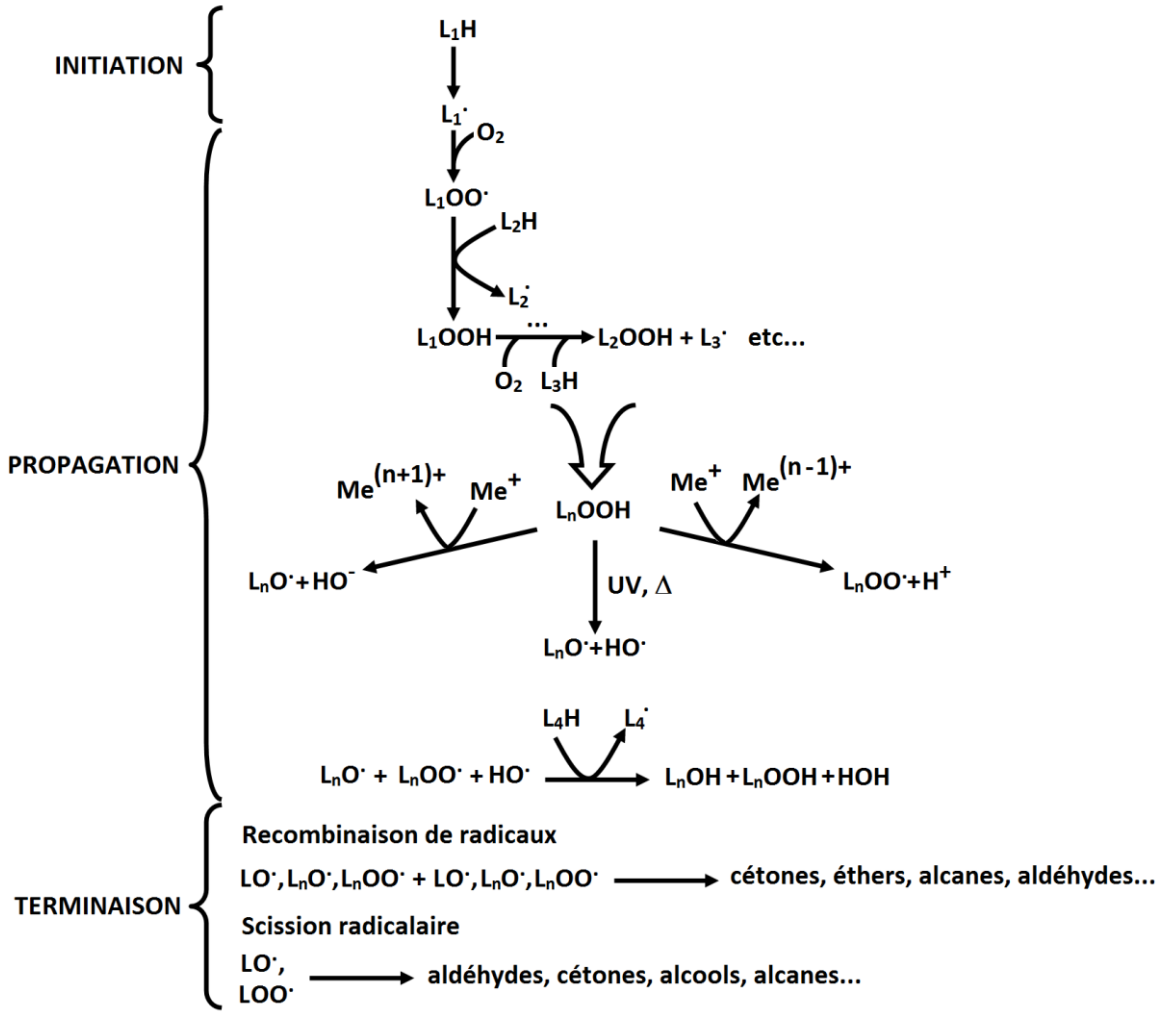


Figure 5. Schéma général de la peroxydation lipidique. Réalisé à partir de Schaich, 2005.

– Rôle des AGPI au sein des cellules

Les AGPI sont impliqués dans le maintien de la structure des membranes ainsi que dans certains processus fonctionnels. En effet, contrairement aux acides gras saturés qui plus linéaire, les AGPI peuvent adopter plusieurs conformations grâce à la présence des doubles liaisons qui forment des « coudes » au sein de leur chaîne acyle. Ainsi, les AGPI permettent d'éviter l'agglomération des acides gras saturés en packs, ce qui permet d'augmenter la fluidité membranaire elle-même impliquée dans les interactions protéine-protéine (Niu *et al*., 2004). Par conséquent, l'oxydation des AGPI peut perturber l'organisation de la membrane en modifiant la fluidité, la perméabilité, la modification du transport des ions voire l'inhibition de processus métaboliques (Catalá, 2012).

3. Le rôle des espèces réactives de l'oxygène

Bien qu'elles soient très réactives vis-à-vis des macromolécules biologiques, les EROs sont nécessaires au bon fonctionnement des cellules car elles interviennent dans divers processus physiologiques.

a. La défense immunitaire

La pénétration de microorganismes dans l'organisme entraine l'activation des cellules du système immunitaire qui vont éliminer ces derniers par phagocytose. Une fois les microorganismes internalisés, les enzymes présentes dans ces cellules libèrent des EROs qui vont s'y attaquer. Ainsi, les anions superoxyde libérés par la NADPH oxydase vont être utilisés par la SOD et la myéloperoxydase pour générer du peroxyde d'hydrogène et de l'acide hypochloreux. La décomposition de ces espèces en radicaux hydroxyles va permettre la destruction de l'ADN bactérien et donc l'inhibition de la réplication des bactéries (Nordberg et Arnér, 2001).

b. L'apoptose

De nombreuses études suggèrent l'implication des EROs dans l'apoptose (Waris et Ahsan, 2006; Zuo *et al.*, 2015). En effet, l'augmentation de la production intracellulaire des EROs est fréquemment observée au cours du processus apoptotique (Dröge, 2002).

Ainsi les EROs seraient capables d'oxyder les porines mitochondriales, ce qui faciliterait la libération du cytochrome c dans le cytosol et donc l'induction de l'apoptose par la voie des caspases (Zamzami *et al.*, 1995; Simon *et al*., 2000).

Les EROs peuvent aussi activer des enzymes qui vont générer des médiateurs impliqués dans l'apoptose. A titre d'exemple, l'activation de la sphingomyélinase par les EROs va permettre la sécrétion de céramides, médiateurs intracellulaire de l'apoptose des granulocytes (Simon *et al.*, 2000; Circu et Aw, 2010).

c. Implication dans les voies de signalisation

Les EROs sont capables de réguler les voies de signalisation cellulaire en modifiant l'activité des macromolécules biologiques. Ainsi, l'oxydation des groupements thiols des cystéines peut affecter l'activité de protéines impliquées dans la transduction du signal comme la protéine kinase C ou encore la tyrosine kinase. Ce mécanisme est néanmoins réversible car les groupements thiols oxydés peuvent être régénérés par la thioredoxine de sorte que les protéines recouvrent leur activité de départ (Babior, 1997; Schieber et Chandel, 2014).

De plus, certains facteurs de transcription comme le nuclear factor kappa-B (NF-κB) sont sensibles aux EROs. Ainsi, un excès d'EROs dans le cytosol favorise la dégradation de la protéine inhibitrice I-κB, ce qui va entrainer la surexpression de cytokines et de molécules d'adhérence cellulaire (Baeuerle et Henkel, 1994).

4. La régulation endogène des EROs

Bien que le stress oxydant ne soit pas une maladie, la dégradation excessive des macromolécules biologiques créé des conditions favorables à l'apparition de diverses pathologies. Ainsi plus de 200 maladies ou complications en lien avec le stress oxydant ont été recensées (Defraigne et Pincemail, 2009).

Pour lutter contre ces effets délétères, les cellules disposent de systèmes capables de neutraliser les EROs. Ces systèmes, dits antioxydants, contrecarrent les effets des EROs en retardant, en inhibant ou en éliminant l'oxydation des macromolécules biologiques (Halliwell, 2007). Les antioxydants biologiques sont caractérisés par les propriétés suivantes :

- ils sont capables de réagir avec une grande variété d'espèces réactives,
- ils sont présents en quantité suffisante dans les cellules : la plupart des EROs ayant une demi-vie courte, la probabilité qu'ils réagissent avec un antioxydant donné est proportionnelle à la concentration de ce dernier,
- ils sont synthétisés de manière endogène ou apportés par l'alimentation (Arrigoni et De Tullio, 2002; Rose et Bode, 1993).

La régulation endogène des EROs est principalement effectuée par des enzymes qui peuvent neutraliser directement les EROs mais d'autres systèmes non enzymatiques existent également tels que le glutathion et l'ubiquinone.

a. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les enzymes de type SOD sont des métalloprotéines qui permettent d'éliminer l'anion superoxyde. A ce jour, trois types de SOD ont été découvertes. La SOD1 à cofacteur Zn^{2+} ou Cu^{2+} est une enzyme dimérique de 32 kDa présente dans le cytosol, la SOD2 à cofacteur Mn^{2+} est un tétramère de 96 kDa présent dans les mitochondries. La SOD3 extracellulaire à

cofacteur Zn^{2+} ou Cu^{2+} est présente dans les fluides cellulaires comme la lymphe, le plasma ou encore le liquide synovial (Matés *et al*., 1999). Ces enzymes catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène comme indiqué ci-dessous :

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

b. La catalase

La catalase est une protéine héminique tétramérique de 240 kDa, principalement localisée dans les peroxysomes et la mitochondrie (Matés *et al*., 1999). Elle a une action complémentaire de celle de la SOD car elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau selon la réaction indiquée ci-dessous :

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

c. Les glutathion peroxydases (GPx)

Les enzymes de type GPx sont des enzymes à cofacteur sélénium présentes dans le cytosol et la mitochondrie. Il existe cinq isoformes mais leurs niveaux d'expression varient en fonction des tissus. Ainsi, les GPx1 et 4 sont ubiquitaires tandis que les GPx2, 3 et 5 sont respectivement présentes dans le tractus gastro-intestinal, le plasma et l'épididyme (Dasuri *et al*., 2013; Matés *et al*., 1999). Ces enzymes permettent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et des hydroperoxydes en alcools selon les réactions indiquées ci-dessous :

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow H_2O + GSSG$$

$$LOOH + 2GSH \longrightarrow LOH + GSSG$$

d. Autres systèmes non enzymatiques

- Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide constitué de glutamine, de cystéine et de glycine qui existe sous forme oxydée ou réduite. Il est localisé dans trois compartiments cellulaires : le cytosol (80-85%), les mitochondries (10-15%) et le réticulum endoplasmique (>1%).

La forme réduite, qui constitue 98% du glutathion intracellulaire, participe à l'action antioxydante en éliminant directement les EROs ou en tant que cofacteur des enzymes GPx. Le glutathion peut être ensuite régénéré par les glutathion réductases, enzymes à cofacteur NADPH (Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013; Lu, 2013).

- L'ubiquinone

Aussi appelée coenzyme Q, cette molécule liposoluble est majoritairement présente dans la mitochondrie car elle intervient dans la synthèse d'ATP en permettant le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le coenzyme Q protège les membranes de l'oxydation en neutralisant les hydroperoxydes et en permettant la régénération du tocophérol (Crane, 2001; Nerdal *et al*., 2015).

D'autres molécules endogènes comme l'acide lipoïque, l'arginine ou encore la transferrine peuvent avoir une action antioxydante avec des mécanismes similaires à ceux énoncés ci-dessus (Dasuri *et al*., 2013).

Chapitre II. Les antioxydants dérivés des nitrones

1. Généralités

L'utilisation d'antioxydants de synthèse pour piéger les radicaux libres est très répandue dans l'industrie cosmétique et agroalimentaire car la dégradation des AGPI peut conduire à une détérioration des qualités organoleptiques des produits (Carocho et Ferreira, 2013; Lee *et al.*, 2006).

Pour garantir une durée de vie suffisante à leurs produits, les industriels ont recours à de nombreuses molécules de synthèse (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). Parmi ces composés, l'hydroxyanisole (BHA) et l'hydroxytoluène butylés (BHT) ou encore le tert-butylhydroquinone (TBHQ) sont les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire alors que le propyl gallate (PG) et l'octyl gallate (OG) (Cf. figure 1) sont couramment utilisés en cosmétique (Fernandez *et al*., 2012; Sanhueza *et al*., 2000). L'ajout de ces molécules permet de conserver la fraicheur, la valeur nutritive, la saveur et la couleur des produits.

En outre, d'autres molécules ont été développées dans le but d'améliorer certaines propriétés des molécules naturelles. C'est le cas de l'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique (Trolox), analogue de la vitamine E qui présente la particularité d'être plus soluble dans l'eau que cette dernière.

Comme la plupart des EROs sont générées en milieu aqueux et que le Trolox est soluble dans l'eau (au contraire de la vitamine E), plusieurs chercheurs s'en sont servis pour lutter contre le stress oxydant en milieu biologique. Ainsi, il a été démontré que le Trolox est capable de protéger les thymocytes de l'apoptose induite par le peroxynitrite (Salgo et Pryor, 1996) et le peroxyde d'hydrogène (Forrest *et al.*, 1994) ou encore de préserver les cœur des rats de l'ischémie (Sagach *et al.*, 2002). En outre, le Trolox est considéré comme un antioxydant de référence (Gülçin, 2006). En effet, le test de capacité antioxydante

équivalente au Trolox (TEAC) est fréquemment utilisé pour évaluer l'activité globale des denrées alimentaires pour lesquelles une évaluation individuelle des antioxydants est difficile car mélangés au sein d'une matrice (van den Berg *et al.*, 1999).

D'autres molécules chimiques comme les nitrones sont également utilisées pour piéger les radicaux libres en milieu biologique. Ces molécules possèdent des propriétés particulières qui seront abordées dans les paragraphes suivants.

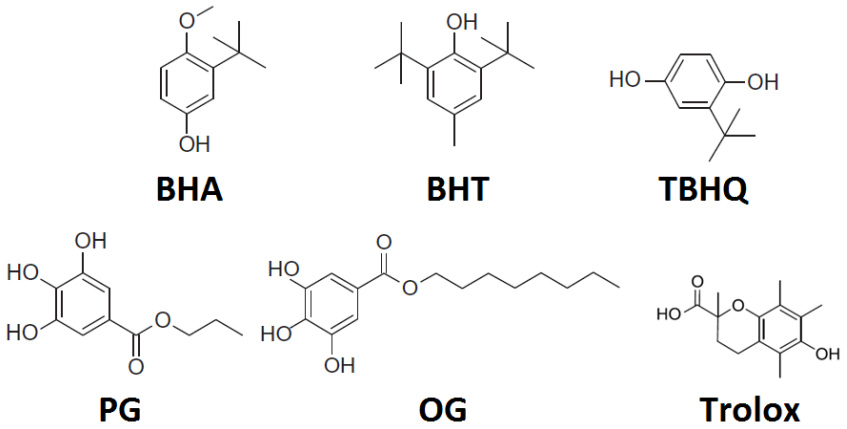


Figure 1. Formules chimiques d'antioxydants de synthèse fréquemment utilisés dans l'industrie et en milieu biologique.

2. <u>Les molécules pièges ou « spin traps »</u>

Par définition, les radicaux libres sont des espèces qui possèdent au moins un électron non apparié sur leur couche externe. La présence d'électrons non appariés confère à ces espèces des propriétés paramagnétiques. Ainsi, sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, ces radicaux acquièrent une aimantation dirigée dans le même sens que le champ d'excitation. Ces propriétés constituent la base de la résonance paramagnétique électronique (RPE), technique utilisée pour détecter et identifier les radicaux libres transitoires intervenant dans la majorité des réactions chimiques (Chachaty, 1977).

Aussi appelée résonance de spin électronique, la RPE possède une limite de détection comprise entre 0,01 et 1 µM, ce qui rend difficile la détection des radicaux libres *in vivo*.

En effet, la demi-vie et la concentration des radicaux libres en milieu biologique étant faibles, ils n'atteignent quasiment jamais les concentrations requises pour être détectés par RPE. Pour pallier ce problème, de nombreux auteurs se sont tournés vers la technique du piégeage de spins (« spin trapping ») qui consiste à faire réagir les radicaux libres avec des molécules pièges (« spin traps »). Les molécules pièges sont capables de former une liaison covalente avec des radicaux instables ce qui aura pour effet de former des espèces radicalaires plus stables que les radicaux d'origine (Cf. figure 2B). Les nouveaux radicaux formés ayant une demi-vie plus importante que les radicaux initiaux, ils sont plus facilement détectés par RPE (Finkelstein *et al*., 1980).

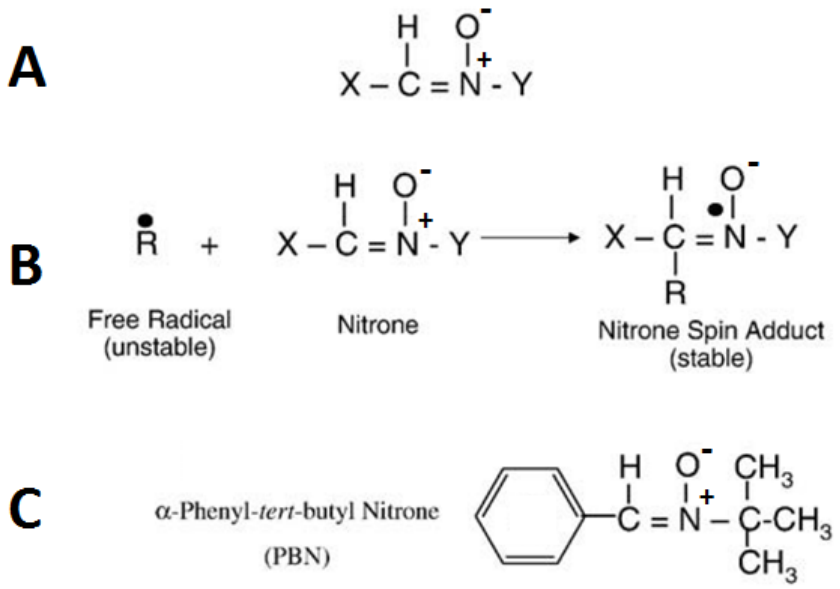


Figure 2. Les nitrones et leurs propriétés. (A) Structure générale des nitrones, (B) Réaction de piégeage des radicaux, (C) Formule chimique de la PBN. Adapté de (Floyd *et al.*, 2008).

Les nitrones, en particulier, l'α-phenyl-*N*-tert-butyl nitrone (PBN) et la dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO), font partie des composés les plus utilisés en tant que molécules pièges. La PBN étant plus hydrophobe (Janzen *et al*., 1996), sa capacité à diffuser à travers les membranes est plus élevée. Ainsi, de nombreux auteurs considèrent que la PBN est un meilleur candidat pour piéger les radicaux libres en milieu biologique.

Les études *in vitro* menées par Fevig et Thomas vont en ce sens (Fevig *et al*., 1996; Thomas *et al*., 1996). Ces derniers ont évalué la capacité de nitrones à protéger des liposomes de phosphatidylcholine de blé grâce au dosage des TBARS. Les résultats obtenus ont mis en évidence une corrélation entre les propriétés hydrophobes et l'efficacité antioxydante : plus le composé est hydrophobe, meilleure est la protection contre les radicaux.

En outre, la PBN présente l'avantage d'être moins toxique que la DMPO. En effet, la concentration causant la mort de 50% des cellules bovines (IC_{50}) a été évaluée à 9,4 mM pour la PBN et 138 µM pour la DMPO (Kotake *et al*., 1998).

L'utilisation de la PBN en tant qu'agent thérapeutique dans des modèles animaux remonte aux années 1980. En effet, Novelli et ses collaborateurs ont montré qu'une injection de PBN protégeait les rats d'une mort certaine causée par un choc ischémique et une injection d'endotoxine (Novelli *et al*., 1989, 1986).

Depuis, d'autres chercheurs ont mis en évidence chez les rats la capacité de la PBN à prévenir les dommages auditifs (Rao et Fechter, 2000), occulaires (Ranchon *et al*., 2001) ou encore les dysfonctionnements rénaux causés par un stress oxydant récurrent (Cadenas et Barja, 1999). Plus récemment, des études menées *in vivo* ont montré que la PBN favorise la guérison de diverses pathologies comme les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou encore les cancers (Floyd *et al*., 2008).

3. Mode de fonctionnement de la PBN

Bien que l'utilisation de la PBN en milieu biologique soit répandue, son mode d'action n'a pas encore été élucidé. Puisque la PBN est capable de piéger de nombreux radicaux transitoires, plusieurs auteurs ont attribué ses effets biologiques à cette propriété (Ferger,

2000). Pour mieux comprendre le mode d'action de la PBN, Barclay et Vinqvist ont étudié *in vitro* l'effet de la pression partielle du dioxygène sur sa capacité à piéger les radicaux (Barclay et Vinqvist, 2000). Les expériences réalisées avec des liposomes de DLPC ont montré que la PBN ne se comporte pas comme un antioxydant de type briseur de chaîne (de l'anglais «chain breaker antioxidant»). En effet, ces derniers inhibent l'oxydation des lipides en ralentissant la consommation de dioxygène. Une fois l'antioxydant consommé, la consommation de dioxygène retourne rapidement à son niveau initial. En revanche, en présence de PBN, la consommation de dioxygène ralentit légèrement par rapport au témoin, mais elle ne retourne pas à son niveau initial. Cet effet a été observé plus récemment avec des liposomes de phosphatidylcholine de blé (Arshad *et al.*, 2013). Comme Barclay et Vinqvist, les auteurs ont qualifié la PBN d'antioxydant retardateur (Cf. figure 3).

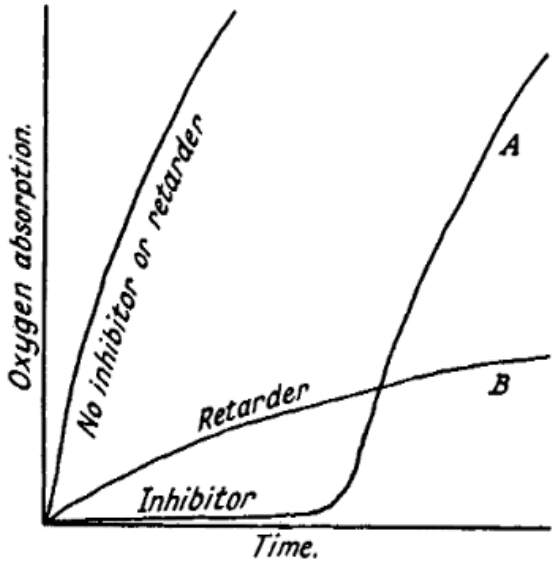


Figure 3. Effet d'un antioxydant retardateur sur la consommation de dioxygène. Tiré de Waters et Wickham-Jones, 1951.

Plusieurs études ont mis en évidence les effets de la PBN sur l'expression de divers gènes (Kotake, 1999). La PBN serait capable de protéger les rongeurs d'un choc à l'endotoxine en inhibant l'expression des facteurs de nécrose tumorale (TNF-α et β), de l'interféron (INF-γ), de certaines interleukines (IL-1, 3, 4 et 5) et du facteur de transcription NF-κB (Pogrebniak *et al*., 1991; Sang *et al*., 1999).

Plus récemment, Tomita et ses collaborateurs ont suggéré que l'activation des gènes AP-1 et c-fos constitue l'évènement clé à l'origine de l'effet protecteur de la PBN (Tomita *et al.*, 2005). En effet, ils ont montré que sous l'effet d'un stress lumineux, les cellules rétiniennes des rats meurent par apoptose. Les expériences d'immunohistochimie et de Western Blot ont révélé une surexpression des gènes AP-1 et c-fos mais pas du gène de la caspase 3. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de processus cellulaires comme la différentiation ou encore l'apoptose car elles permettent aux cellules de répondre à divers stimuli externes.

En revanche, suite à un prétraitement avec la PBN, l'expression d'AP-1 et c-fos est inhibée et les cellules rétiniennes survivent, même si elles sont soumises à un stress lumineux. Ainsi, *in vivo*, la PBN n'est pas qu'un piégeur de radicaux, elle agirait aussi comme un facteur de transcription capable de réguler l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose.

La plupart des études menées avec la PBN ont été faites en milieu biologique. Ainsi, peu de travaux relatent son activité directe contre la peroxydation lipidique. Néanmoins, Velasco et ses collaborateurs ont montré que la PBN peut être utilisée pour augmenter la stabilité oxydative des huiles (Velasco *et al.*, 2005). Les résultats obtenus par résonance de spin électronique ont permis de montrer que l'effet de la PBN varie selon l'huile utilisée et sa teneur initiale en vitamine E. Plus la concentration en vitamine E est faible, plus la PBN est

efficace contre les radicaux peroxyles. Les auteurs ont attribué cet effet à un phénomène de compétition entre ces molécules, dû aux différences entre leurs constantes de vitesses, estimées à $1,34*10^{\wedge 5}$ $M^{-1}s^{-1}$ pour la PBN contre $5.10^{\wedge 5}$ $M^{-1}s^{-1}$ pour la vitamine E (Barclay et Vinqvist, 2000). Plus récemment, Pingret et ses collaborateurs ont utilisé la PBN pour mettre en évidence les effets néfastes des sondes à ultrasons sur la dégradation des huiles (Pingret *et al.*, 2012).

Il a été démontré que la PBN est capable de protéger les souris d'une dégradation neuronale causée par une exposition à l'acide kaïnique (Zaja-Milatovic *et al*., 2008). Le suivi de l'apparition des isoprostanes F_2 et F_4, bio-marqueurs de l'oxydation des lipides *in vivo* (Cracowski, 2004), a permis aux auteurs d'évaluer l'effet de la PBN sur les symptômes causés par l'acide kaïnique.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse indiquent qu'une injection de PBN permet de diminuer les crises d'épilepsie et les convulsions causés par la dégradation des membranes neuronales. Puisque la PBN ne diminue pas l'intensité des crises, les auteurs ont suggéré que ses effets protecteurs seraient dus à sa capacité à capturer les EROs. La protection des lipides diminuerait la dégradation des membranes, ce qui limiterait les dommages neuronaux.

4. Les nitrones amphiphiles

Bien que la PBN soit un peu plus hydrophobe que la DMPO, sa capacité à s'ancrer dans les membranes reste faible. En outre, la réaction de piégeage des radicaux étant en compétition avec d'autres réactions (réduction monoélectronique, décomposition…), il convient d'utiliser des concentrations importantes de PBN (10 à 100 mM) pour favoriser la capture des EROs et obtenir une activité protectrice significative (Floyd *et al.*, 2008; Patrick, 2014). Pour palier ces

problèmes et mieux contrôler la biodisponibilité *in vivo* de la PBN, plusieurs chercheurs ont modifié ses propriétés chimiques (Kuroda *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1996).

Depuis le début des années 2000, le Dr Grégory Durand et l'équipe de Chimie Bioorganique et systèmes amphiphiles de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS) se sont spécialisés dans la synthèse de nitrones amphiphiles dérivées de la PBN.

L'ajout de groupements hydrophiles et/ou hydrophobes de nature différente a permis de modifier le profil d'hydrophobicité de la PBN. Dans la stratégie de synthèse utilisée par l'équipe, l'acide lactobionique (Cf. figure 4) a le plus souvent été utilisé comme groupement hydrophile. L'ajout de groupements hydrophobes de nature différente a permis de synthétiser plusieurs dérivés. Ainsi, on distingue quatre principales catégories de nitrones amphiphiles.

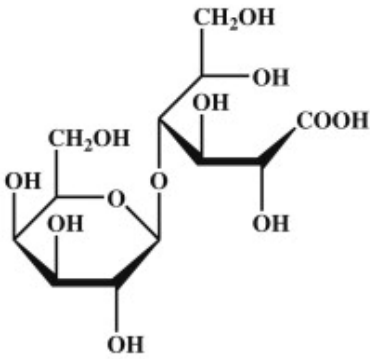


Figure 4. Formule chimique de l'acide lactobionique. Tiré de Gutiérrez *et al.*, 2012.

– Les nitrones acylées

Dans un premier temps, des nitrones possédant deux chaînes acyles de 11 et 17 carbones (B_{11}PBN et B_{17}PBN, Cf. figure 5) ont été synthétisées (Morandat *et al*., 2003). L'ajout de deux groupements hydrophobes a été fait avec l'objectif de permettre aux composés de s'insérer et de rester dans les membranes. Une fois enfoui dans les membranes, le motif PBN devrait permettre une meilleure protection des phospholipides membranaires. Les expériences de

tensiométrie de surface réalisées avec la DLPC et la DLPE ont permis de montrer que le composé B_{11} présente des interactions répulsives avec ces lipides contrairement au composé B_{17}. Suite à ces résultats, les auteurs ont suggéré que B_{17} devrait être un meilleur antioxydant que B_{11}.

Plus récemment, deux autres nitrones by-acylées, avec des chaines acyles de longueur intermédiaire (B_{13}PBN et B_{15}PBN, Cf. figure 5) ont été synthétisées (Ortial *et al.*, 2014). Les expériences de stress oxydant ont montré que les quatre composés présentent une activité protectrice mais qu'elle varie selon le système biomimétique utilisé.

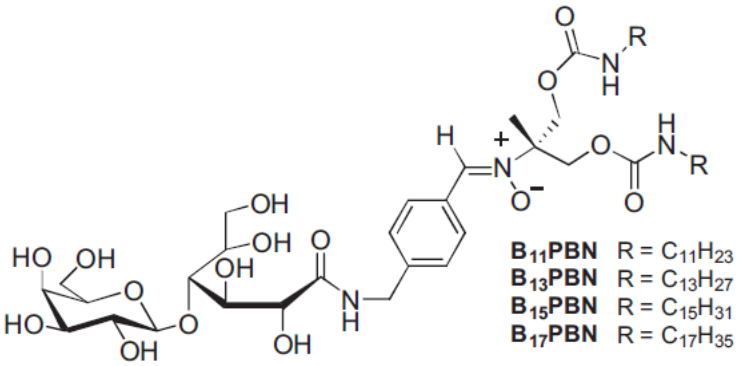


Figure 5. Formule chimique des nitrones bi-acylées. Tiré de Ortial *et al.*, 2014.

D'autres nitrones, ne possédant qu'une chaîne acyle, ont été synthétisées avec l'objectif d'améliorer la biodisponibilité de la PBN et de conserver sa capacité à traverser les membranes (Cf. figure 6). L'ajout d'une seule chaîne acyle devrait permettre aux composés de traverser la membrane plasmique pour rejoindre la mitochondrie, responsable de 90% de la production d'EROs (Lushchak, 2014).

Ainsi, de nombreux dérivés comme le LPBNAH (Poeggeler *et al.*, 2005), le LPBNSH (Asanuma *et al.*, 2007), le TGPBNAH (Durand *et al.*, 2007) ou encore le LPBNH15 (Durand *et al.,* 2010). Des tests préliminaires ont été réalisés avec la plupart des dérivés sur des

systèmes biologiques. De manière générale, ces derniers présentent une activité antioxydante beaucoup plus importante que celle de la PBN.

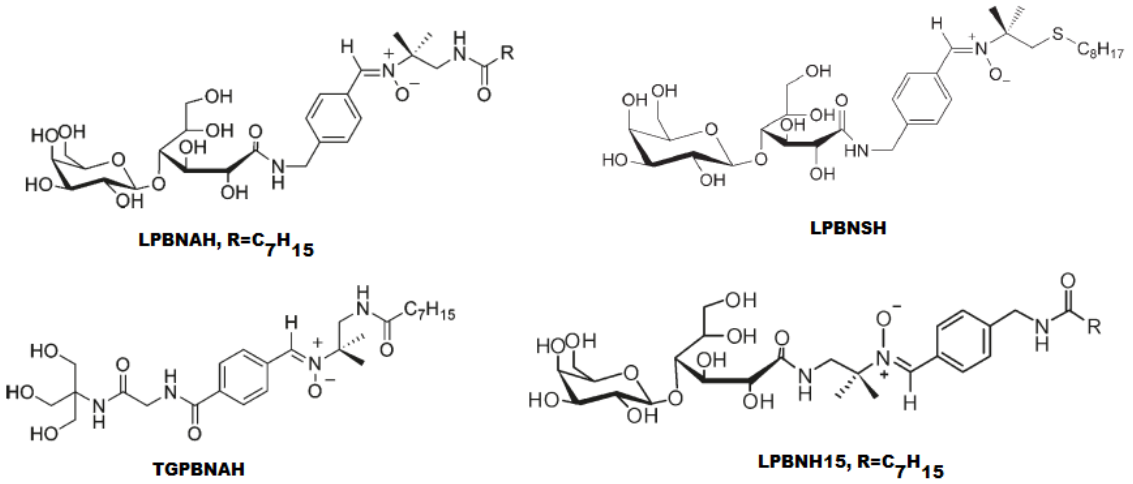


Figure 6. Formule chimique de nitrones mono-acylées. Tiré de Asanuma *et al.*, 2007; Durand *et al.*, 2010, 2007 et de Poeggeler *et al.*, 2005.

– Les nitrones fluorées

De manière générale, ces nitrones sont similaires aux nitrones mono-acylées, sauf que leur chaîne acyle présente la particularité d'être perfluorée. L'ajout d'une chaîne carbonée fluorée présente l'avantage de limiter l'effet cytolytique des dérivés car les chaînes perfluorées présentent un effet détergent moindre que leur équivalent carboné (Der Mardirossian *et al.,* 1998). A titre d'exemple, l'utilisation de surfactants perfluorés permet de purifier des enzymes membranaires en conservant une activité enzymatique élevée (Talbot *et al.*, 2009). De plus, comme la contribution hydrophobe d'un groupement difluorométhylène est deux fois plus importante que celle d'un groupement méthylène (Kissa, 1994), les chaînes fluorées permettent d'augmenter plus rapidement le caractère hydrophobe tout en conservant la solubilité en milieu aqueux.

Ainsi, plusieurs dérivés à chaînes courtes (entre 6 et 8 carbones) comme le TA1PBN (Ouari *et al.*, 1999), le FAPBN (Ortial *et al.*, 2006) ou encore le LPBNAF (Durand *et al.*, 2007) ont pu

être synthétisés (Cf. figure 7). Comme pour les nitrones acylées, les tests d'activité antioxydante ont révélé que ces composés présentent une efficacité bien plus élevée que la PBN.

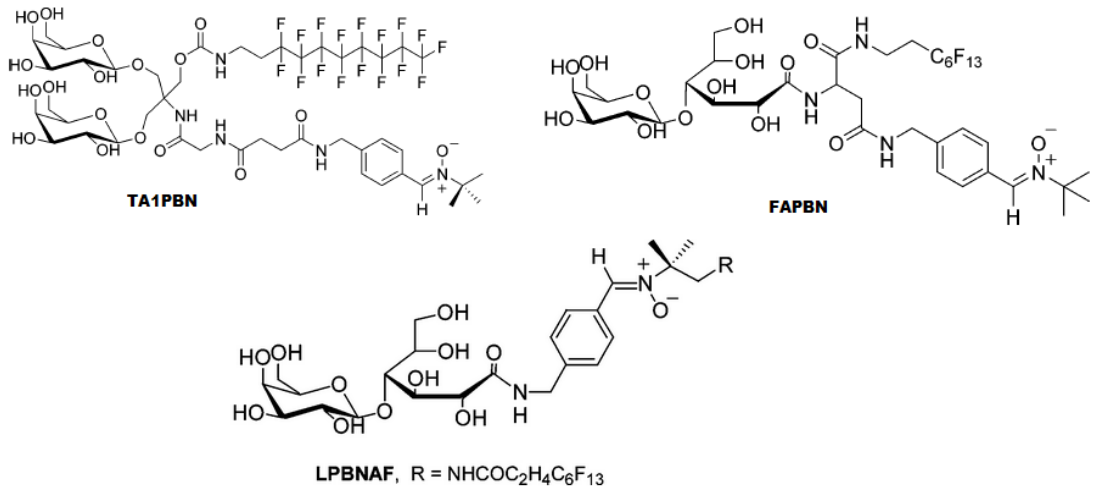
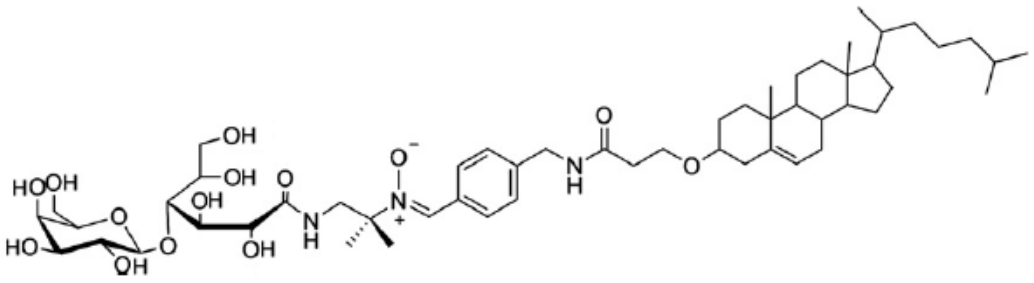


Figure 7. Formule chimique de nitrones fluorées. Tiré de Durand *et al.*, 2007; Ortial *et al.*, 2006 et de Ouari *et al.*, 1999.

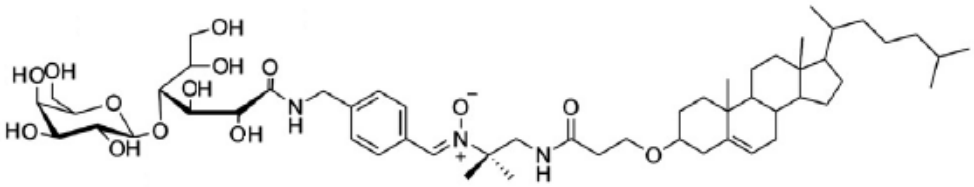
– Les nitrones dérivées du cholestérol

Les stéroïdes étant impliqués dans de nombreux processus biologiques, plusieurs chercheurs ont synthétisé des nitrones dérivées du cholestérol (Weintraub et Tiernan, 1974).

Plus récemment, deux nouveaux dérivés, le chol-PBN-L et le L-PBN-chol ont été synthétisés avec un groupement cholestérol (Cf. figure 8), avec l'objectif d'améliorer le profil d'hydrophobicité et l'affinité de la PBN pour la membrane. Ces dérivés, qui ne diffèrent que par la position des substituants sur la PBN, ont été testés sur des rats. L'analyse des cellules rétiniennes de rats à la suite d'une exposition à un stress lumineux a révélé que l'effet protecteur de ces molécules est supérieur à celui de la PBN (Choteau *et al.*, 2010).



Chol-PBN-L



L-PBN-Chol

Figure 8. Formule chimique du chol-PBN-L et du L-PBN-chol. Tiré de Choteau *et al.*, 2010.

– Les nitrones à double motif antioxydant

Des nitrones mixtes ont été synthétisées avec l'objectif de créer un effet de synergie entre deux antioxydants (Cf. figure 9). Ainsi, le dérivé PBNLP combine à la fois le dérivé LAMPBN et l'acide lipoïque, antioxydant endogène qui fait ici office de groupement hydrophobe (Durand *et al.*, 2003). Bien que les tests d'oxydation réalisés sur des hématies aient permis de montrer que ce dérivé possède une activité antioxydante significative, il s'avère qu'aucun effet de synergie entre le LAMPBN et l'acide lipoïque n'ait été observé. En effet, l'activité antioxydante du dérivé PBNLP n'est que légèrement significative à celle du LAMPBN et de l'acide lipoïque.

Le FATXPBN, dont la synthèse a été mise au point plus récemment (Rosselin *et al.*, 2016), possède un motif PBN et un motif Trolox, analogue synthétique de la vitamine E. Les tests d'activité antioxydante menés *in vitro* et *ex vivo* ont montré que ce composé est capable de

réduire 98% des cations ABTS et de protéger une aorte de rat exposée à un stress glycémique, l'hyperglycémie favorisant l'expression de la NADPH oxydase.

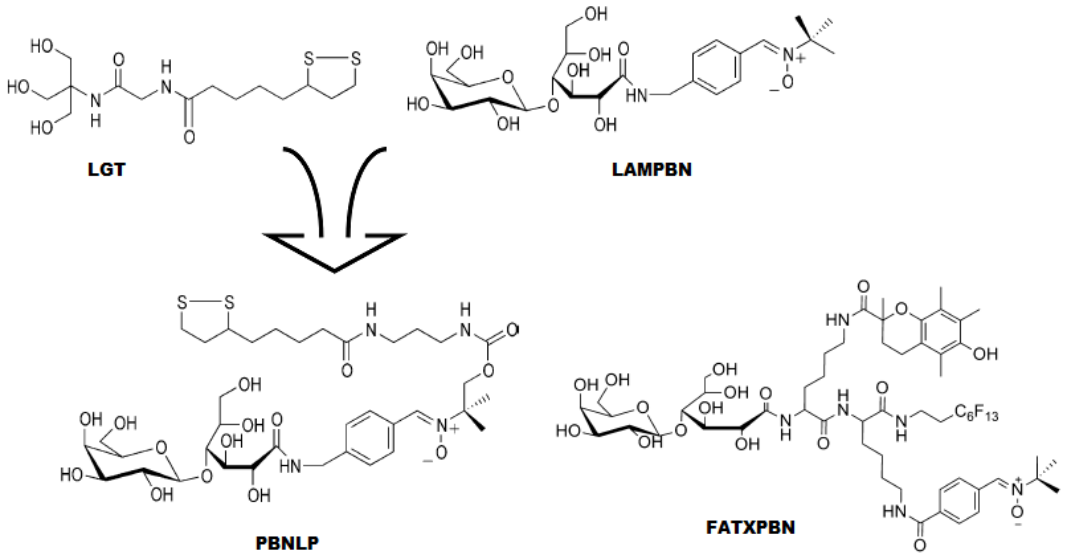


Figure 9. Formule chimique de nitrones à double motif antioxydant. Tiré de Durand *et al.*, 2003 et de Rosselin *et al.*, 2016.

Chapitre III. Les antioxydants de la plante de lin

1. La plante de lin

Le lin est une plante annuelle autogame de la famille des Linacées particulièrement cultivée pour sa haute teneur en fibres et en huile (Cf. figure 1). C'est l'une des premières plantes domestiquées par l'homme, les premières traces de son utilisation datent de 8 000 ans avant JC en Turquie (van Zeist et Bakker-Heeres, 1975).

Il existe plus de 200 espèces de lin, dont la plus connue est *Linum usitatissimum* (Diederichsen, 2007). Deux variétés sont fréquemment cultivées : la variété fibre (« flax type ») pour sa paille riche en fibres et la variété oléagineuse (« linseed type ») pour ses graines riches en huile. D'un point de vue phénotypique, la différence entre les deux se situe au niveau du tronc. Le lin oléagineux possède plus de ramifications au niveau des branches, d'où une production plus importante de graines.

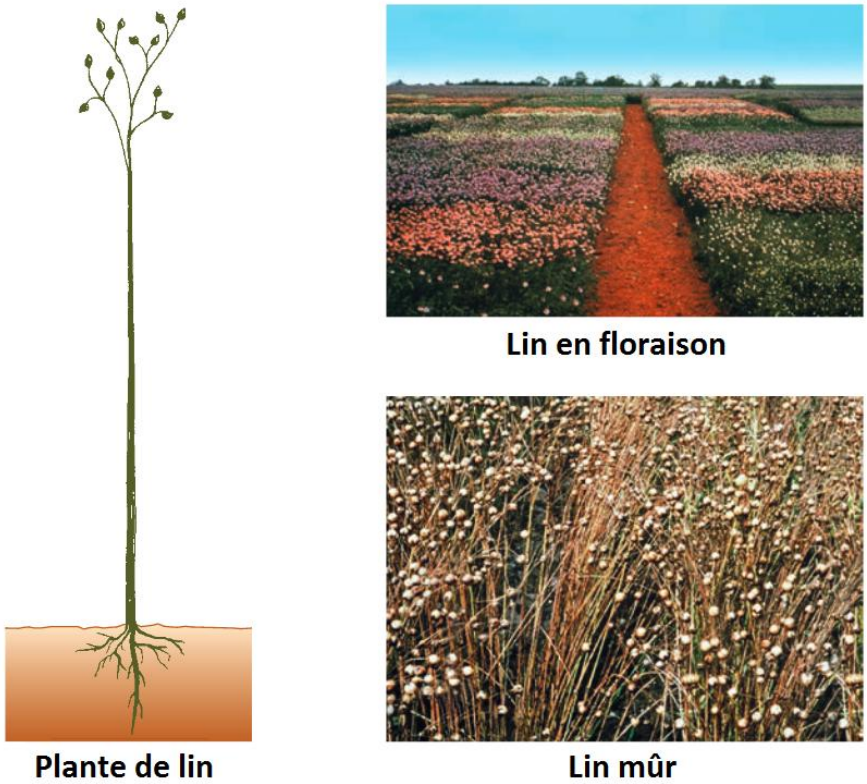


Figure 1. Plante de lin. Tiré de Gonser *et al.*, 1999.

La culture du lin est particulièrement développée en France. Ainsi, la surface de lin cultivée représente 57 000 hectares pour le lin fibreux et 12 000 hectares pour le lin oléagineux avec des productions respectives de 74 000 et 16 000 tonnes, ce qui fait de la France le premier producteur mondial de lin fibreux et le troisième producteur européen de lin oléagineux en 2014 (FAOSTAT, 2017). En 2009, la production se concentre surtout dans le centre (35%), l'Ouest-Atlantique (35%) et le Nord (12%) (Labalette *et al*., 2011).

L'utilisation des fibres pour la fabrication de vêtements remonte à 5 000 ans, les égyptiens s'en servant pour fabriquer des tissus et embaumer les momies. Cependant, avec l'essor du coton (85% de la consommation mondiale de textile dès les années 1930), la part du lin dans l'industrie textile a considérablement diminué à tel point qu'aujourd'hui, le lin est considéré comme un tissu noble (Gonser *et al*., 1999).

Le regain d'intérêt observé depuis les années 1990 est dû à une diversification des usages de la fibre de lin. En effet, de par leurs propriétés mécaniques (bonne résistance à la rupture et faible densité), les fibres de lin sont de plus en plus utilisées par les industriels pour fabriquer des matériaux composites. Ainsi, les fibres de lin sont utilisées pour fabriquer des cadres de vélos, des papiers spéciaux ou des matériaux isolants (Akin *et al*., 2005; Czemplik, M., 2011; Flynn *et al*., 2016).

2. La graine de lin

Les graines de lin sont contenues dans des capsules qui peuvent contenir jusqu'à 10 graines. Elles sont ovales, avec une taille moyenne comprise en 4 et 6 mm (Cf. figure 2). La graine de lin est constituée de 30 à 40% d'huile, 20 à 25% de protéines et de 20 à 28% de fibres (Acıkgoz *et al*., 2004; Dixit *et al*., 2012).

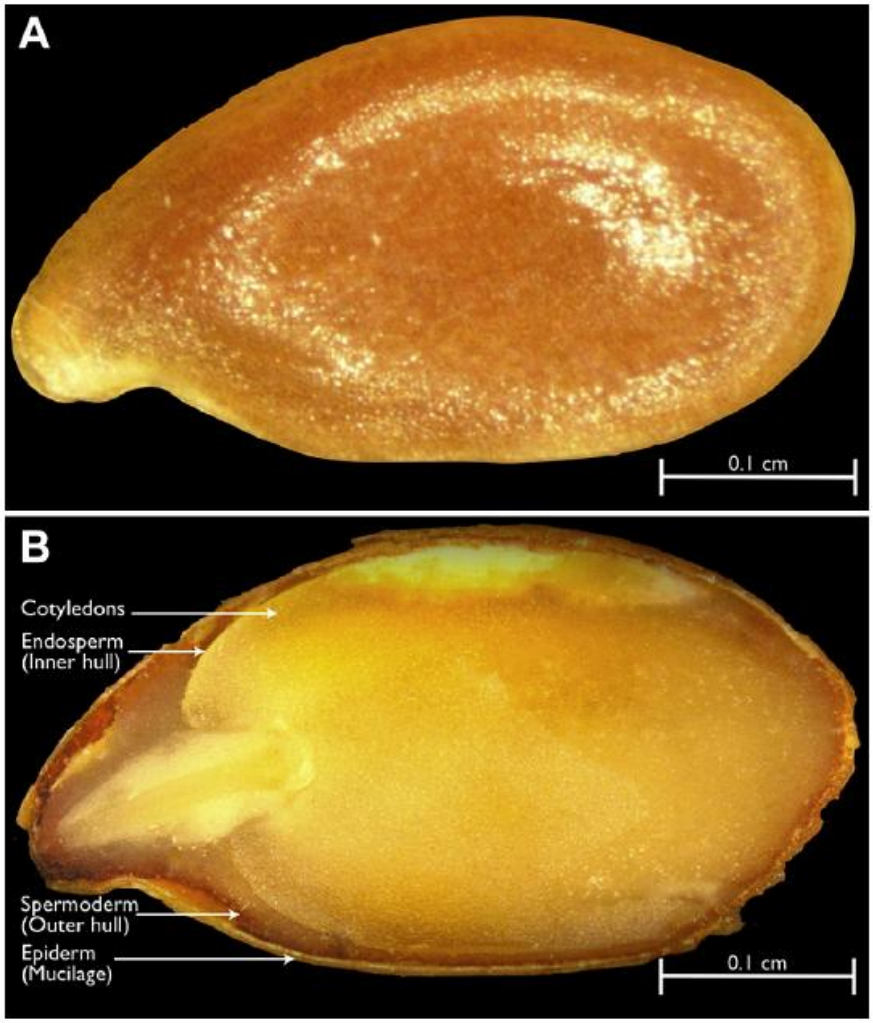


Figure 2. Coupe d'une graine de Lin. Tiré de Shim *et al*., 2014.

L'intérêt croissant pour le lin oléagineux est du à son huile riche en acides gras insaturés qui lui confèrent des propriétés siccatives (Cf. Tableau 1). De ce fait, l'huile de lin est fréquemment utilisée pour la fabrication de peinture et d'encre car l'oxydation des acides gras insaturés permet une polymérisation et un séchage plus rapide (Labalette *et al*., 2011).

Cependant, les graines de lin sont surtout utilisées dans le domaine agroalimentaire car les AGPI présents dans l'huile ont des effets bénéfiques sur la santé. En effet, certains AGPI essentiels comme l'acide linoléique (ω-6) et linolénique (ω-3) ne peuvent être synthétisés

par l'homme (Calder, 2014). Par ailleurs, une fois l'huile extraite, les tourteaux dégraissés peuvent aussi être valorisés par l'alimentation animale.

Tableau 1. Profil des acides gras présents dans l'huile de lin. Tiré de Shim *et al*., 2014.

Acide	**Palmitique 16 : 0**	**Stéarique 18 : 0**	**Oléique 18 : 1, ω-9**	**Linoléique 18 : 2, ω-6**	**Linolénique 18 : 3, ω-3**
Pourcentage massique	5,5	3,5	19,1	15,3	56,6

3. Les composés phénoliques présents dans la graine de lin

a. Généralités sur les composés phénoliques

Les graines de lin contiennent aussi des composés phénoliques qui interviennent dans la défense antimicrobienne de la plante. Ces métabolites secondaires, localisés dans les téguments (spermoderme et épiderme) de la graine, sont issus du métabolisme de l'acide shikimique (Quideau *et al*., 2011). A partir d'intermédiaires issus de la glycolyse (phospho-énol-pyruvate) et de la voie des pentoses phosphates (erythrose-4-phosphate), les plantes vont synthétiser l'acide shikimique puis le chorismate qui servira de précurseur à la synthèse des acides aminés aromatiques (Cf. figure 3). Ces derniers serviront de précurseurs à la synthèse de diverses molécules. Le tryptophane permettra la synthèse de composés antimicrobiens tandis que la phénylalanine et la tyrosine serviront de précurseurs à la synthèse des composés phénoliques (Maeda et Dudareva, 2012).

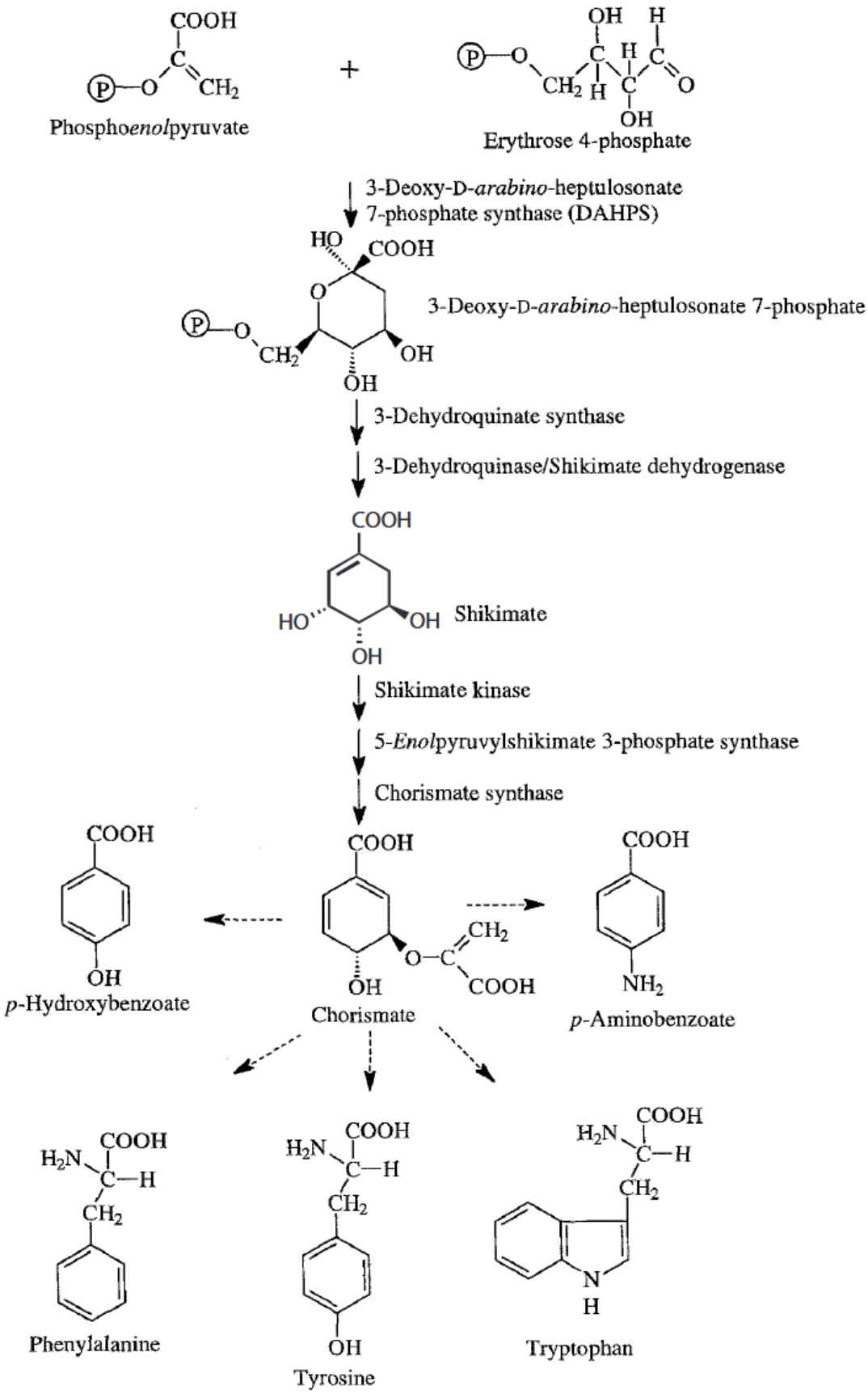


Figure 3. Voie de l'acide shikimique chez les plantes. Adapté de Weaver et Herrmann, 1997.

D'un point de vue structurel, les composés phénoliques possèdent au moins un cycle phényle et n'ont pas de groupement fonctionnel azoté. En 2009, plus de 8000 composés phénoliques ont été identifiés (Pandey et Rizvi, 2009). Bien qu'il existe une base commune, plusieurs déterminants structuraux permettent de différencier les composés phénoliques. Dans un premier temps, le squelette carboné de base permet d'identifier six grandes catégories: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les coumarines, les lignanes et les tannins (Cf. figure 4).

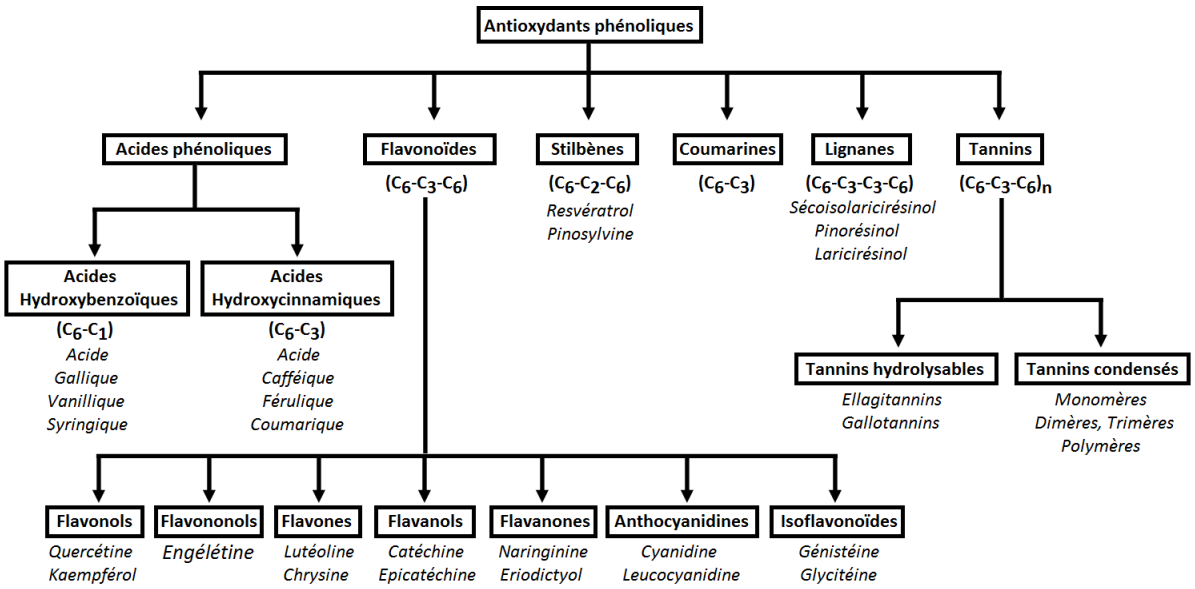


Figure 4. Les différentes classes de composés phénoliques. Entre parenthèses le squelette carboné de base. Adapté de Shahidi et Ambigaipalan, 2015.

Les flavonoïdes, les acides phénoliques et les lignanes sont les trois types de composés phénoliques présents dans le lin (Alu'datt *et al*., 2013).

b. Les flavonoïdes

Avec plus de 6 000 molécules identifiées à ce jour, les flavonoïdes sont les composés phénoliques les plus répandus et les plus étudiés. Le squelette de base est celui du diphénylpropane (C_6-C_3-C_6), au sein duquel deux cycles phényles (A et B) sont reliés par trois atomes de carbone qui forment généralement un hétérocycle (C) (Cf. figure 5).

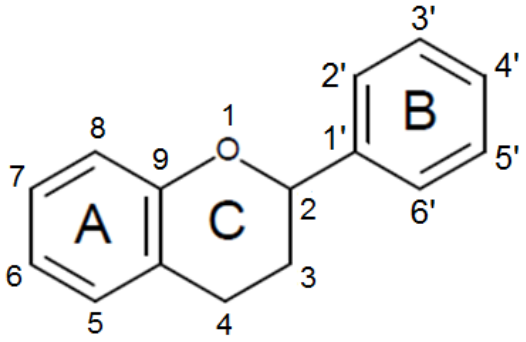


Figure 5. Squelette de base des flavonoïdes.

Selon le nombre de groupements méthoxyles, hydroxyles et leur position, les flavonoïdes sont généralement répartis en sept classes : les flavonols, les flavononols, les flavones, les flavanols, les flavanones, les anthocyanidines et les isoflavonoïdes (Cf. figure 6).

Les flavones et les flavonols sont tous deux caractérisés par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C ainsi que par la présence d'un groupement carbonyl en position 4. Cependant, la présence d'un hydroxyle en position 3 chez les flavonols permet de différencier ces deux sous-classes. Les flavononols et les flavonones ont respectivement la même structure de base que les flavonols et les flavones, sauf que ces flavonoïdes n'ont pas de double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C. Les flavanes comme les anthocyanines n'ont pas de groupement carbonyle en position 4 du cycle C. Les flavanols présentent la même structure que les flavanes avec en plus un hydroxyle en position 3. Pour finir, les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du

cycle phényle B sur l'hétérocycle C. En effet, de manière générale, le cycle C est substitué par le cycle B en position 3 alors que chez les isoflavonoïdes cette substitution s'effectue en position 2 (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

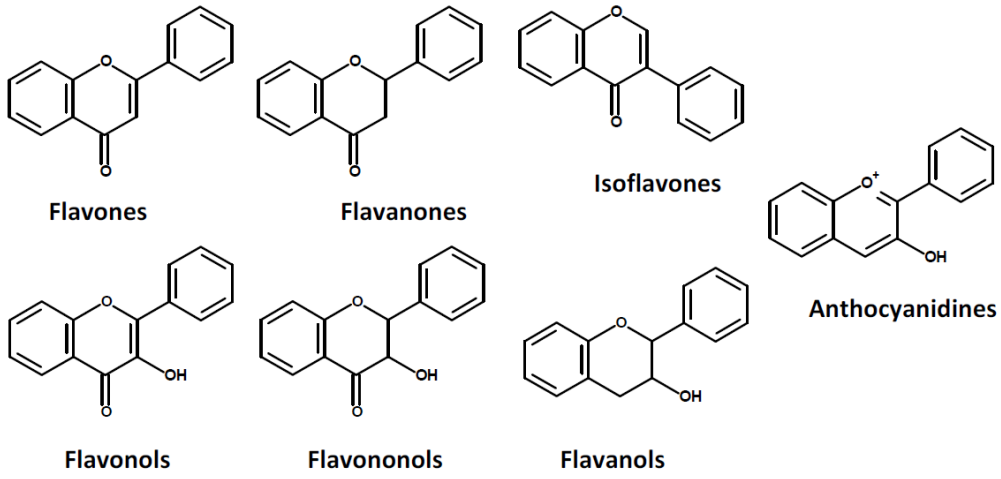


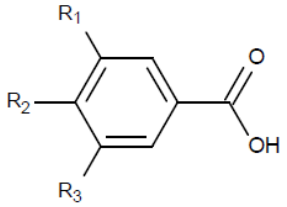
Figure 6. Squelette de base des sous-classes des flavonoïdes. Adapté de Pandey et Rizvi, 2009 et de Shahidi et Ambigaipalan, 2015.

Les flavonoïdes sont majoritairement présents dans les plantes sous forme de glucosides mais les aglycones peuvent être présents de façon occasionnelle. Les flavonoïdes sont très répandus dans le monde végétal mais sont présents en faible quantité dans le lin. La quantité de flavonoïdes présents dans le lin varie selon les conditions de culture mais reste très faible. En général on retrouve entre 0,3 et 0,7 g de flavonoïdes par kg de lin (Kasote, 2013).

c. Les acides phénoliques

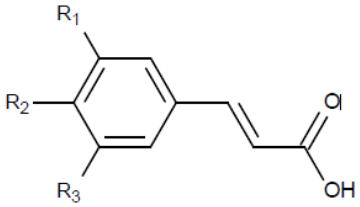
Les acides phénoliques sont largement répandus dans le monde végétal. Ils peuvent être divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque qui ont un squelette de base de type C_6-C_1 et les dérivés de l'acide cinnamique ayant un squelette de base de type C_6-C_3 (Cf. figure 7).

De manière générale, les acides hydroxycinnamiques sont plus répandus que les acides hydroxybenzoïques qui ne sont présents en grande quantité que dans certains végétaux comme le radis noir et l'oignon (Shahidi et Naczk, 1996).



Acide	R_1	R_2	R_3
p-Hydroxybenzoïque	HO	H	H
Vanillique	OCH_3	OH	H
Syringique	OCH_3	OH	OCH_3
Gallique	OH	OH	H

Acide hydroxybenzoïque



Acide	R_1	R_2	R_3
p-Coumarique	HO	H	H
Cafféique	OH	OH	H
Férulique	OCH_3	OH	H
Sinapique	OCH_3	OH	OCH_3

Acide hydroxycinnamique

Figure 7. Formule générale des acides phénoliques.

Ces composés, synthétisés par les substitutions successives de la phénylalanine ou de la tyrosine, comptent parmi les acides phénoliques les plus répandus avec l'acide sinapique dans le monde végétal (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

Les acides phénoliques sont présents en faible quantité dans le lin. En effet, dans 1 kg de lin on en retrouve environ 8 à 10 g dont la moitié est estérifiée (Alu'datt *et al*., 2017). L'acide férulique est le plus abondant, devant l'acide coumarique et l'acide caféique (Wang *et al*., 2017). L'acide coumarique est un précurseur majeur de la synthèse des autres acides hydroxycinnamiques (Cf. figure 8). Ce dernier peut être directement généré par la désamination de la tyrosine. Dans le cas de la phénylalanine, la désamination aboutit à la formation de l'acide cinnamique qui sera ensuite hydroxylé en position quatre. L'acide

caféique et l'acide férulique sont formés par l'hydroxylation et la méthylation successives de l'acide coumarique. Ces composés sont présents dans le lin sous forme libre, glucoside ou estérifiée par l'acide quinique (Robbins, 2003).

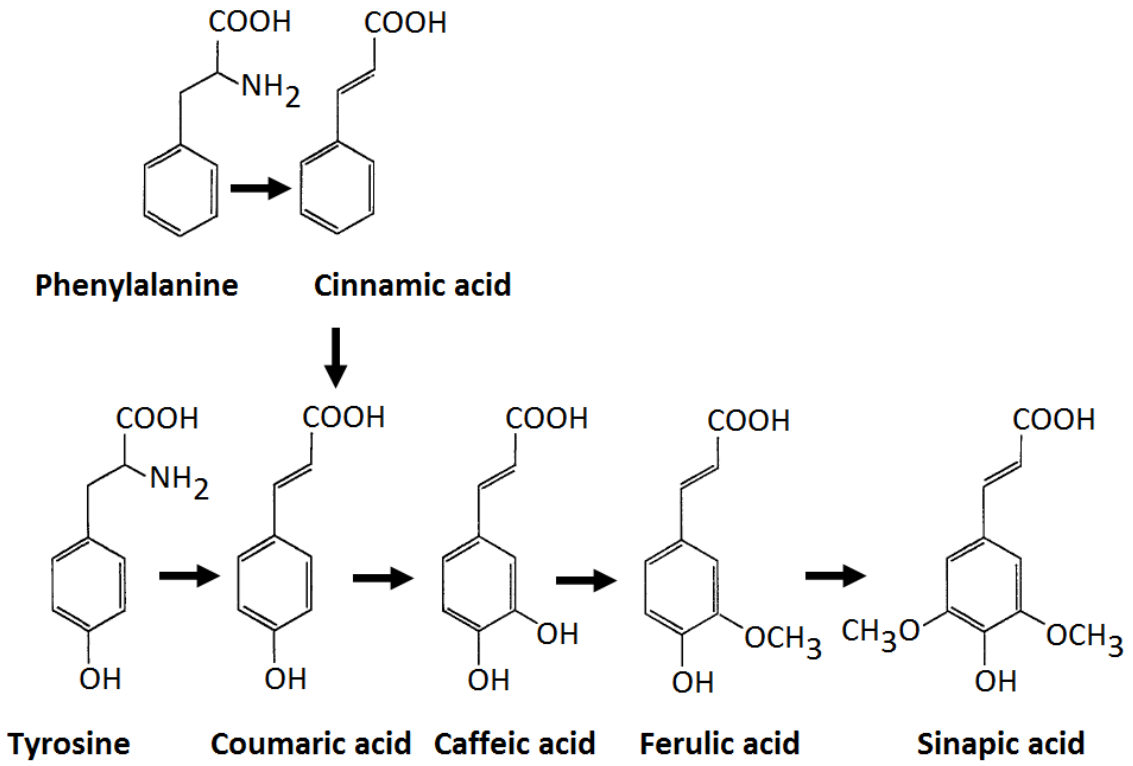


Figure 8. Voie de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques. Adapté de Rice-Evans *et al.*, 1996.

d. Les lignanes

Les lignanes sont des composés phénoliques dont le squelette de base (C_6-C_3-C_3-C_6) est constitué de deux unités phénylpropane. Ils sont répartis en quatre catégories (Cf. figure 9) : les lignanes, les lignolides (dérivés de la butanolide), les monoépoxylignanes (dérivés du tétrahydrofurane) et les biepoxylignanes (dérivés du tétrahydronaphtalène) (Shahidi et Naczk, 2006).

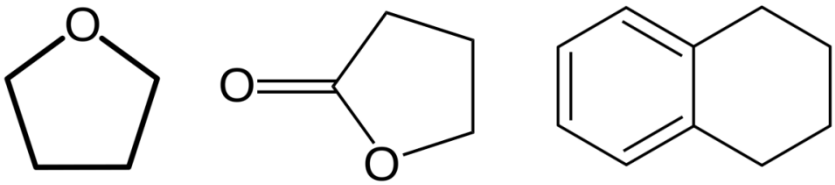


Figure 9. Noyaux de base des lignanes. Tétrahydrofurane (Gauche), Butanolide (Milieu) et Tétrahydronaphtalène (Droite).

Les lignanes sont surtout présents dans les plantes riches en fibres telles que le blé, l'avoine et l'orge mais le lin est la plante qui en contient le plus. En effet, le lin contient en moyenne 800 fois plus de lignanes que les autres plantes (Alu'datt *et al*., 2017). Avec une quantité de SDG comprise entre 6 et 29 g par kg (Kasote, 2013), les lignanes semblent être les composés phénoliques les plus abondants du lin.

Dans la voie de biosynthèse des lignanes (Cf. figure 10), l'alcool coniférylique constitue le précurseur de départ. La condensation de ce dernier par la protéine dirigeante aboutit à la formation de pinorésinol. L'ouverture successive des cycles centraux par la pinorésinol/laricirésinol réductase permet la formation du laricirésinol puis du sécoisolaricirésinol. Dès lors, deux voies sont possibles : le sécoisolaricirésinol peut être oxydé en matairésinol par la sécoisolaricirésinol déshydrogénase ou être glycosylé par la sécoisolaricirésinol diglucosyl transférase.

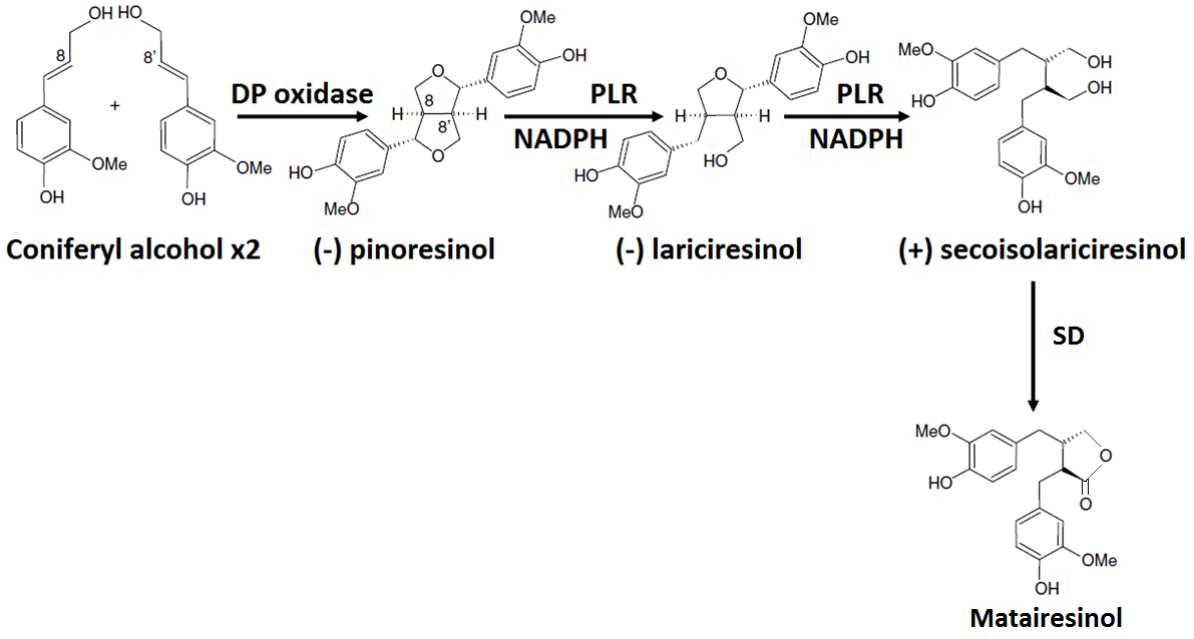


Figure 10. Voie de biosynthèse du sécoisolaricirésinol. Adapté de Hano *et al.*, 2006. PLR : pinoresinol-lariciresinol reductase, DP oxidase : dirigent protein-oxidase complex, SD : secoisolariciresinol dehydrogenase.

Chapitre IV. Les effets protecteurs des composés phénoliques

Bien que le sujet soit controversé, plusieurs études épidémiologiques suggèrent que les composés phénoliques sont capables de prévenir l'apparition de diverses maladies comme le diabète, les cancers, la maladie de Parkinson ou encore l'athérosclérose. Certains chercheurs ont attribué ces effets à leur capacité à piéger les EROs. Cependant, il a également été démontré que les composés phénoliques sont capables de modifier l'activité d'enzymes en lien avec la production ou l'élimination des EROs. Ainsi, plusieurs modes d'action ont été mis en évidence allant de la chélation des ions métalliques à l'inhibition d'enzymes produisant des EROs.

1. Le mode d'action des composés phénoliques

a. Mécanismes intervenant en amont de la production des EROs

– La chélation des métaux

Les composés phénoliques peuvent avoir une action antioxydante en chélatant les ions métalliques (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}) qui interviennent dans les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton qui permettent la conversion de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en radicaux hydroxyles.

La capacité des composés phénoliques à capturer les ions métalliques est due à la présence d'un groupement catéchol (1,2-dihydroxybenzène) ou galloyle (1,2,3-trihydroxybenzène) sur le squelette de base (Khokhar et Owusu Apenten, 2003; Moran *et al*., 1997). Ainsi, parmi les composés phénoliques, les flavonoïdes et les acides phénoliques constituent les principaux chélateurs de métaux. Les flavonoïdes sont capables de fixer les ions métalliques grâce au groupement catéchol du cycle B et grâce au couplage des fonctions hydroxyles et cétones des cycles A et C (Cf. figure 1) (Pietta, 2000).

Néanmoins, le groupement catéchol du cycle B reste le site de fixation majeur des ions métalliques (Brown *et al*., 1998).

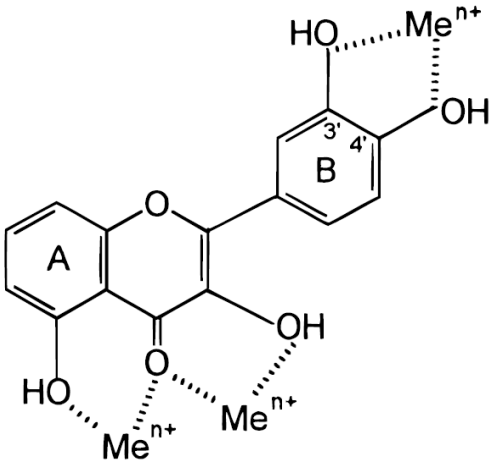


Figure 1. Sites de chélation des ions métalliques des flavonoïdes. Tiré de Pietta, 2000.

Parmi les flavonoïdes, la quercétine est particulièrement reconnue pour sa capacité à piéger les ions métalliques. Ainsi, plusieurs études *in vitro* ont montré que ce composé présente une activité antioxydante importante et est capable de former des complexes avec des ions Cd^{2+} (Chlebda *et al*., 2010; Kopacz et Kuzniar, 2003). Ferrali et ses collaborateurs ont montré que la quercétine est capable de protéger les membranes des érythrocytes de l'oxydation en régulant l'activité d'agents pro-oxydants par chélation des ions Fe^{2+} intracellulaires (Ferrali *et al*., 1997).

Comme indiqué par Rice-Evans et ses collaborateurs, la structure de base des acides phénoliques est proche de celle du noyau B des flavonoïdes (Rice-Evans *et al*., 1996), ce qui explique leur pouvoir chélatant. Andjelkovic et ses collaborateurs ont comparé la capacité à chélater les ions Fe^{2+} de sept acides phénoliques. Les résultats obtenus par spectroscopie d'absorption indiquent que les acides caféique, gallique, protocatéchique et chlorogénique - porteurs d'un groupement catéchol ou galloyle - sont capables de chélater les ions Fe^{2+}

contrairement aux acides férulique, synringique et vanillique qui n'en n'ont pas (Andjelkovic *et al*., 2006).

Bien que les flavonoïdes et les acides phénoliques soient les principaux chélateurs de métaux, d'autres composés phénoliques peuvent aussi présenter cette activité. A titre d'exemple, Fucassi et ses collaborateurs ont récemment montré, par des études *in vitro,* que le SDG est capable de former des complexes avec des métaux de transition (Fe^{2+}, Cu^{2+}) ainsi qu'avec des métaux lourds (Pb^{2+}) (Fucassi *et al*., 2014).

– L'inhibition d'enzymes produisant des EROs

Plusieurs études ont souligné la capacité des composés phénoliques à inhiber l'activité d'enzymes productrices d'EROs. Ainsi, Cos et ses collaborateurs ont montré que la lutéoline est l'inhibiteur le plus efficace de la xanthine oxydase (Cos *et al*., 1998). Plus récemment, Di Majo et ses collaborateurs ont montré *in vitro* que des concentrations de 1µM de quercétine, de kaempférol, de catéchine ou d'épicatéchine permettent de diminuer significativement la production de peroxyde d'hydrogène par inhibition de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (Di Majo *et al*., 2014).

Luceri et ses collaborateurs ont montré que les polyphénols extraits du thé ou du vin inhibent la propagation du cancer du côlon chez les rats en modulant l'expression d'enzymes cibles. Ainsi, en présence de ces polyphénols, les niveaux d'expression de la cyclooxygénase 2 et de la NO synthase des cellules cancéreuses sont réduits, ralentissant ainsi la progression tumorale (Luceri *et al*., 2002).

b. Mécanismes intervenant en aval de la production des EROs

– L'activation d'enzymes éliminant les EROs

Les composés phénoliques peuvent avoir une action antioxydante indirecte, en activant la production des enzymes détoxifiantes des cellules. A titre d'exemple, il a été reporté que l'épigallocatéchine gallate, composé phénolique présent dans le thé vert, est capable d'induire l'expression de la glutathion-S-transférase et de la glutathion peroxydase (Na et Surh, 2008). De même, une alimentation riche en flavonoïdes permet d'augmenter les niveaux d'expression de la catalase et de la superoxyde dismutase dans les globules rouges de rats (Kaviarasan *et al*., 2008).

– Le piégeage des EROs

Les composés phénoliques peuvent neutraliser les EROs en transférant un atome d'hydrogène à un radical hautement réactif afin de former une molécule plus stable. Le transfert peut-être direct et couplé au transfert d'un électron comme indiqué ci-dessous :

$$\mathbf{ArO\text{-}H + R^{\bullet} \longrightarrow ArO^{\bullet} + R\text{-}H}$$

Le transfert peut aussi être indirect. Deux mécanismes ont été décrits (Cf. figure 2). Le premier consiste à céder un électron à un radical hautement réactif. Ceci entraîne la formation d'un radical phénoxyle cationique $ArOH^{+\cdot}$ et d'un anion R^{-}. Le cation $ArOH^{+\cdot}$ va ensuite se dissocier de matière hétérolytique en radical phénoxyle $ArO^{\cdot}$ et en proton H^{+}. Pour finir, le proton H^{+} va neutraliser l'anion R^{-}. Ce mécanisme de transfert peut être influencé par le potentiel d'ionisation des fonctions hydroxyles des composés phénoliques. Ainsi, un potentiel d'ionisation est faible favorise le transfert d'électron.

Le second mécanisme met séquentiellement en œuvre la perte d'un proton et le transfert d'un électron. Dans un premier temps, on observe la dissociation homolytique du noyau phénoxyle ArOH en anion ArO^- et en proton H^+. L'anion ArO^- va ensuite transférer un électron à un radical libre ce qui aboutira à la formation d'un radical phénoxyle $ArO^\cdot$ et d'un anion R^- qui sera neutralisé par un proton H^+ (Quideau *et al.*, 2011; Trouillas *et al.,* 2008).

La capacité d'un antioxydant à céder un atome d'hydrogène peut être évaluée par la mesure de l'énergie de dissociation d'une liaison (de l'anglais « Bond Dissociation Enthalpy », BDE). Ce paramètre traduit la capacité des hydroxyles des composés phénoliques à céder un atome d'hydrogène. Plus le BDE est faible, plus le transfert vers les EROs sera facile (Trouillas *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre le BDE et la capacité des composés phénoliques à piéger les radicaux libres et suggéré que le transfert d'atome d'hydrogène est le mécanisme prépondérant des composés phénoliques pour neutraliser les EROs (Calliste *et al*., 2010).

Ainsi, les composés phénoliques peuvent inhiber l'oxydation des lipides en neutralisant la formation des radicaux peroxyles dans la membrane. Ils peuvent agir comme des briseurs de chaîne (de l'anglais «chain breaker antioxidant») en inhibant la propagation de la peroxydation lipidique. Les radicaux phénoxyles formés présentent l'avantage d'être moins réactifs que les radicaux libres car stabilisés par la délocalisation des électrons (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

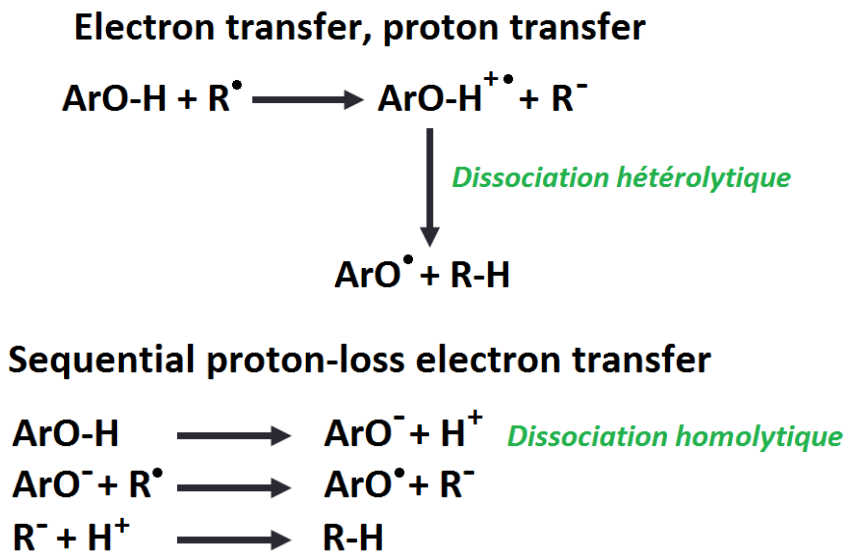


Figure 2. Mécanismes indirects de détoxification des par transfert d'un atome d'hydrogène. Transfert d'un électron et d'un proton (haut), mécanisme séquentiel de perte d'un proton et de transfert d'électron (bas).

De nombreux auteurs se sont appuyés sur la capacité anti-radicalaire des composés phénoliques pour étudier l'influence d'éléments structuraux sur le pouvoir antioxydant (Cao *et al.*, 1997; Karamac *et al.*, 2017; Nenadis *et al.*, 2003). De manière générale, la présence de glycosylations, de méthylations ainsi que le nombre et la configuration des groupements hydroxyles influence l'activité antioxydante (Heim *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques méthylés ou glucosides sont moins efficaces que les versions non méthylées ou aglycones (Cai *et al.*, 2006; Eklund *et al.*, 2005). En plus d'occuper des hydroxyles susceptibles de piéger des radicaux, les sucres et les groupements méthyles modifient le caractère lipophile et la planéité des composés phénoliques, ce qui altère leur capacité à piéger les radicaux intra-membranaires (Heim *et al.*, 2002).

Par ailleurs, dans le cas des flavonoïdes, trois éléments structuraux (Cf. figure 3) sont nécessaires pour que l'activité anti-radicalaire soit efficace (Procházková *et al.*, 2011):

- le cycle B doit posséder un groupement catéchol pour favoriser la délocalisation des électrons,
- le cycle C doit posséder une double liaison entre les carbones 2 et 3 conjuguée avec une fonction cétone en position 4,
- des fonctions hydroxyles doivent être présentes sur le cycle A en position 3 et sur le cycle C en position pour former des liaisons hydrogènes avec le groupement carbonyle du cycle C en position 4.

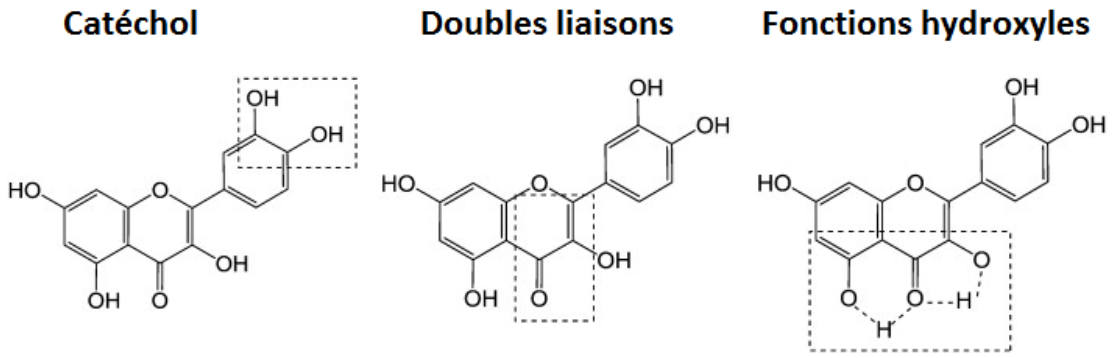


Figure 3. Eléments structuraux des flavonoïdes nécessaires à l'efficacité antioxydante. Adapté de (Procházková *et al.*, 2011).

En outre, le degré de polymérisation peut aussi influencer l'activité des flavonoïdes. A titre d'exemple, Vennat et ses collaborateurs ont montré que des dimères et trimères de procyanidine sont plus efficaces que les monomères de flavonoïdes pour piéger le radical superoxyde (Vennat *et al*., 1994).

2. <u>Les bienfaits des composés phénoliques sur la santé</u>

De nos jours, du fait de leur forte teneur en composés phénoliques, il est particulièrement recommandé de manger plusieurs fruits et légumes par jour pour rester en bonne santé. L'organisation mondiale de la santé préconise un apport quotidien minimal de 400 g pour prévenir l'apparition de diverses pathologies. En effet, plusieurs études

épidémiologiques font état d'une diminution du risque de maladies avec une alimentation riche en composés phénoliques (Del Rio *et al*., 2013). Les composés phénoliques seraient particulièrement efficaces contre les maladies cardiovasculaires. En effet, un régime alimentaire riche en flavonoïdes diminuerait de 65% le risque de mortalité en cas de maladie coronarienne (Arts et Hollman, 2005).

D'après Pandey et Rizvi, la consommation de thé et d'oignons, riches en catéchines (en particulier la quercétine) s'avère bénéfique pour la santé (Pandey et Rizvi, 2009). En effet, certaines études menées *in vitro* ont montré que la quercétine à une activité anti-diabète (Vessal *et al*., 2003), anticancéreuse (Russo *et al*., 2014) et des effets protecteurs contre les maladies neurodégénératives (Heo et Lee, 2004).

De même, une consommation régulière de café vert, riche en acides phénoliques, peut aider à diminuer l'absorption des graisses et augmenter la vitesse du métabolisme, ce qui permettrait de limiter la prise de poids et de prévenir l'obésité (Stelmach *et al*., 2015). De plus, une étude épidémiologique récente a montré qu'une consommation régulière de café vert limite l'apparition de maladies neurodégénératives (démence) chez les sujets âgés de plus de 60 ans (Noguchi-Shinohara *et al*., 2014).

De nombreuses études ont suggéré les bienfaits d'une consommation régulière de graines de lin. A titre d'exemple, d'après Cunnane et ses collaborateurs, la consommation de 50 g de graines de lin par jour permet de diminuer la concentration plasmatique de LDL-cholestérol de 8% chez les jeunes adultes, ce qui suggère que les composés phénoliques présents dans le lin inhiberaient le développement de maladies comme l'athérosclérose (Cunnane *et al*., 1995). Les composés phénoliques du lin présenteraient aussi une activité anticancéreuse puisque la consommation quotidienne d'une portion de 25 g de graines de lin a été associée à la diminution de la prolifération des tumeurs mammaires (Thompson *et*

al., 2005). Plus récemment, une étude a été suggéré qu'un apport quotidien de 30 g de lin par jour permet de diminuer les pressions artérielles systoliques et diastoliques de patients atteints de maladies cardiovasculaires (Rodriguez-Leyva *et al*., 2013).

Par ailleurs, de nombreux auteurs ont tenté d'évaluer la consommation quotidienne en composés phénoliques, mais les résultats varient fortement en fonction des pays et du régime alimentaire (Manach *et al*., 2004). Scalbert et Williamson ont cependant indiqué que la consommation quotidienne de composés phénoliques pouvait atteindre 1 g par jour (Scalbert et Williamson, 2000). Bien que les aglycones soient absorbés au niveau de l'intestin, la plupart des composés phénoliques des denrées alimentaires sont sous forme de glucosides, d'esters ou de polymères qui ne peuvent être absorbés. L'hydrolyse par les enzymes intestinales et/ou la flore microbienne est donc nécessaire à leur absorption (Pandey et Rizvi, 2009). Une fois métabolisés, les composés phénoliques circulent dans le sang associés à des protéines, en particulier l'albumine mais les concentrations plasmatiques varient selon la nature des composés phénoliques et la source alimentaire. Ainsi, l'ingestion de 200 mg de naringénine de raisins permet d'atteindre une concentration plasmatique de 6 µmol/L (Manach *et al*., 2004). L'hydrolyse enzymatique s'accompagne de modifications telles que la méthylation, la sulfatation ou encore la glucurono-conjugaison qui permet l'élimination des composés dans l'urine. Ces processus sont si efficaces que les concentrations plasmatiques d'aglycones sont généralement faibles. Les effets des composés phénoliques sur la santé dépendent donc aussi bien de la consommation quotidienne de fruits et légumes que de leur biodisponibilité (Pandey et Rizvi, 2009; Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

Chapitre V. Les lipides et les membranes cellulaires

Les lipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire hydrophile et d'un groupement hydrophobe. En milieux aqueux, ils s'associent de manière à réduire au maximum le contact entre leur partie hydrophobe et l'eau. Ainsi, les lipides peuvent former des assemblages supramoléculaires de nature variée. La bicouche lipidique, qui constitue l'architecture de base des membranes biologiques, est le principal assemblage formé par les lipides membranaires.

1. Les membranes cellulaires

a. Un assemblage supramoléculaire complexe

Les membranes biologiques sont des structures continues délimitant deux compartiments aqueux, relativement imperméables aux molécules hydrophiles. D'un point de vue structural, ce sont des architectures protéo-lipidiques constituées de lipides assemblés en bicouche auxquelles des protéines plus ou moins glycosylées sont associées (Cf. figure 1) (Rothfield, 1971).

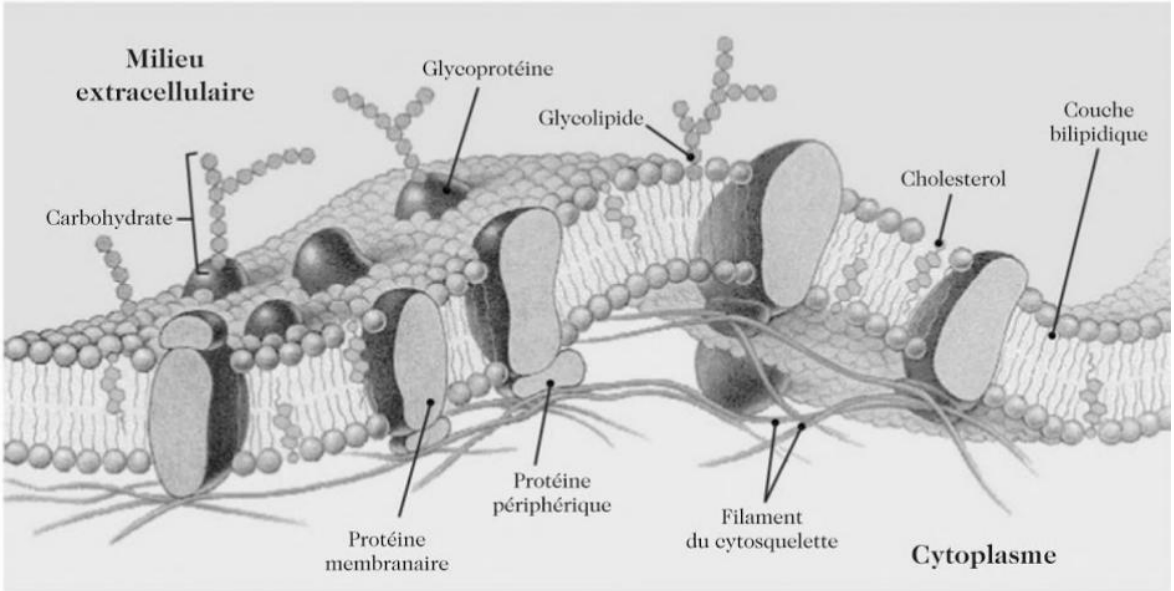


Figure 1. Représentation d'une membrane cellulaire. Tiré de Lahmani et Houdy, 2015.

D'après Singer et Nicolson, les propriétés amphipatiques des lipides leur permettent de s'auto-assembler de sorte que les chaines acyles se font face et les têtes polaires sont en contact du milieu intra ou extracellulaire (Singer et Nicolson, 1972). Ainsi, les lipides constituent une matrice au sein de laquelle quelques protéines sont dispersées. Des interactions de faible énergie (liaisons de van der Waals, interactions hydrophobes) permettent le maintien de cet assemblage. Les protéines et les lipides étant constamment animés de mouvements (rotation autour d'un axe perpendiculaire au plan de la membrane et diffusion dans le plan de la membrane), la membrane est qualifiée de « mosaïque fluide ».

Bien que ce modèle serve encore de base aujourd'hui, de nombreux travaux ont permis de le compléter. Ainsi, Engelman a suggéré que les protéines transmembranaires sont bien plus nombreuses que ce qui est indiqué dans le modèle de Singer et Nicolson, ce qui a pour effet de limiter la fluidité membranaire (Engelman, 2005).

D'autres auteurs ont suggéré l'existence de nano domaines lipidiques enrichis en cholestérol et sphingomyéline appelés « rafts » (Brown et Rose, 1992; Simons et Van Meer, 1988). Ces domaines transitoires seraient impliqués dans le transport intracellulaire des lipides et dans les voies de signalisation (Simons et Ikonen, 1997).

Plus récemment, il a été suggéré que d'autres paramètres tels que le degré de courbure et l'état physique des phospholipides doivent être intégrés pour appréhender la structure et la dynamique des membranes (Goñi, 2014).

Les membranes jouent un rôle capital dans la survie des cellules. Elles permettent de délimiter le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire et les organites. La compartimentation des macromolécules permet d'augmenter la vitesse et la spécificité des processus cellulaires comme la réplication de l'ADN (noyau) et la synthèse des protéines et lipides (réticulum endoplasmique). De plus, comme elles ont une perméabilité sélective et

qu'elles permettent l'ancrage de protéines impliquées dans le transport de molécules, les membranes participent à la régulation des flux cellulaires.

De part la présence de protéines impliquées dans la transduction de signaux extérieurs, les membranes interviennent dans les voies de signalisation cellulaires et permettent aux cellules de s'adapter à leur environnement.

b. Les principaux lipides membranaires

Les lipides présentent une grande diversité moléculaire puisque les cellules eucaryotes possèdent en moyenne plus de 1000 lipides différents (van Meer *et al*., 2008). Les lipides sont distribués de manière asymétrique au sein des deux feuillets membranaires. Trois catégories majeures de lipides composent les membranes : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols.

– Les glycérophospholipides

Aussi appelés phosphoglycérides, ils constituent 40 à 60% de la fraction totale des lipides membranaires. Ils sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée en position 1 et 2 par des chaînes acyles (Cf. figure 2). De manière générale, la chaîne acyle en position 1 possède 16 à 18 carbones et est saturée. La chaîne acyle en position 2 est plus longue et possède le plus souvent 1 ou plusieurs doubles liaisons en configuration *cis*. Le troisième carbone du glycérol est estérifié par un groupement phosphate chargé négativement à pH physiologique sur lequel peut être greffée une tête polaire variable (éthanolamine, sérine, choline, inositol ou glycérol) (Eeman et Deleu, 2010).

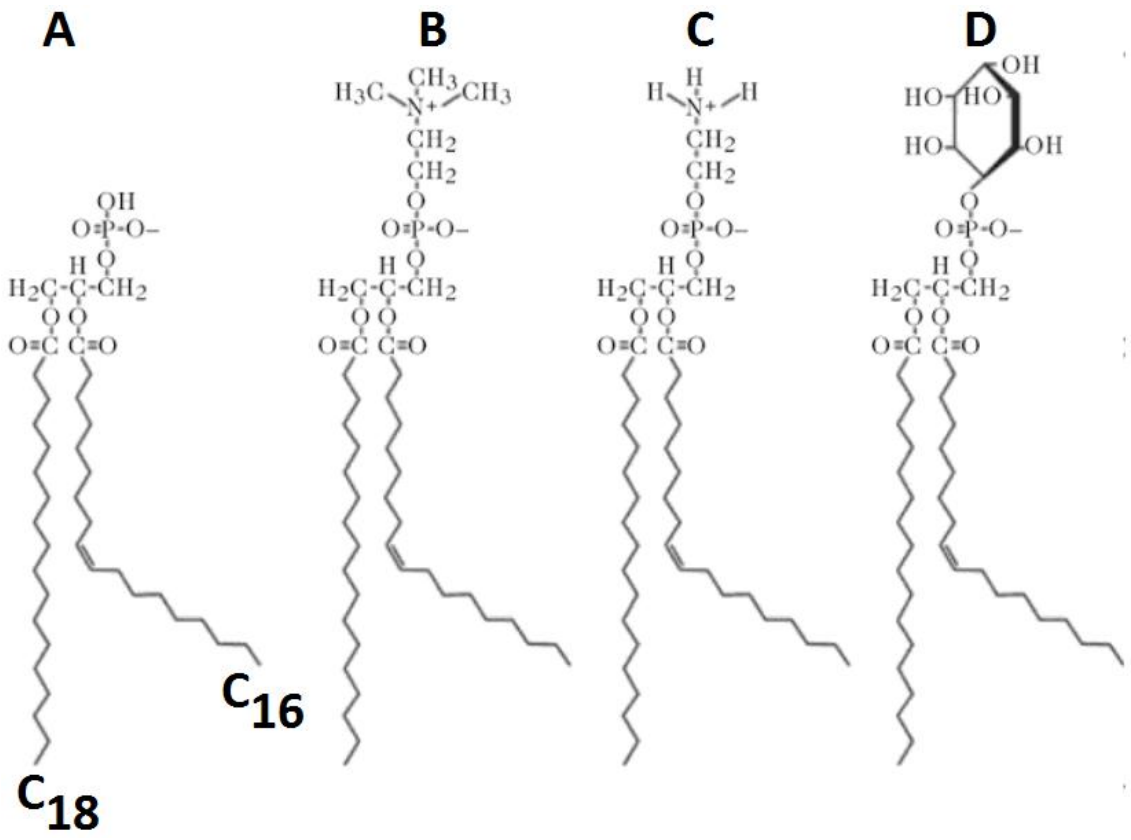


Figure 2. Quelques exemples de glycérophospholipides. (A) Acide phosphatidique, (B) phosphatidylcholine, (C) phosphatidyléthanolamine, (D) phosphatidylinositol. Adapté de Lahmani et Houdy, 2015.

– Les sphingolipides

Cette classe de lipides est similaire à celle des glycérophospholipides, sauf que le glycérol est remplacé par une molécule de sphingosine (Cf. figure 3). La sphingosine est un alcool aminé possédant une chaîne acyle insaturée de 18 carbones. L'addition d'une chaîne acyle sur la fonction amine permet de former la céramide qui constitue la base des sphingolipides. Des sphingolipides plus complexes peuvent ensuite être formés par addition d'un groupement polaire sur la fonction hydroxyle de la céramide. Ainsi, l'ajout d'un groupement phosphocholine permet la formation de la sphingomyéline qui représente 10 à 20 % mol des principaux lipides membranaires (Lahmani et Houdy, 2015; Munro, 2003).

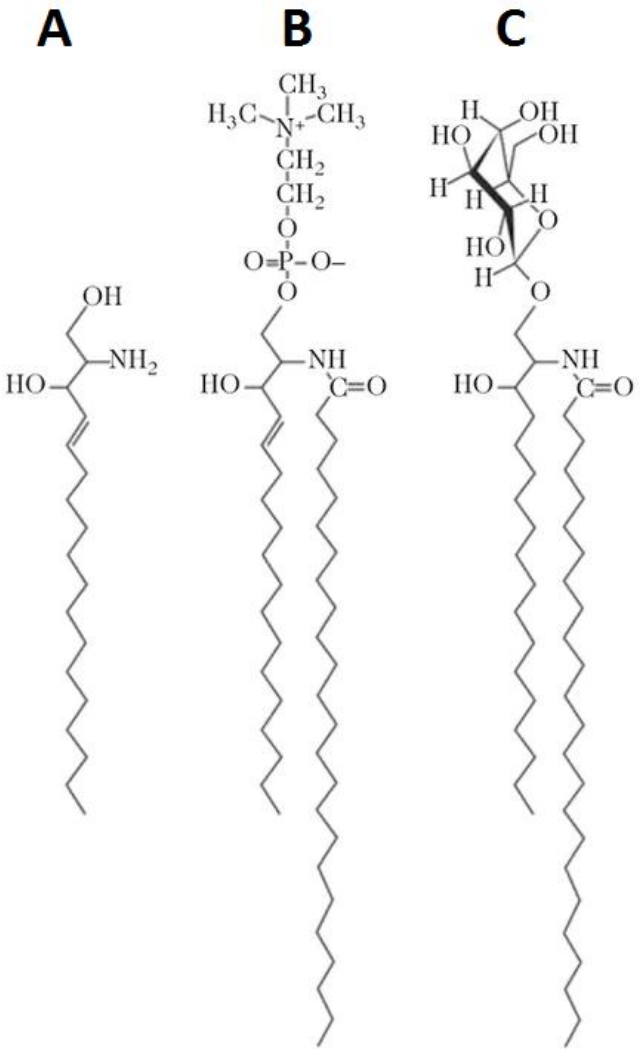


Figure 3. Quelques exemples de sphingolipides. (A) Sphingosine, (B) sphingomyéline, (C) galactocérébroside. Adapté de Lahmani et Houdy, 2015.

– Les stérols

Les stérols sont particuliers car contrairement aux autres ils possèdent un noyau stérane constitué de 3 cycles à 6 atomes de carbone et d'un cycle à 5 atomes de carbone. Ce squelette tétracyclique leur confère une grande hydrophobicité et la configuration *trans* des quatre cycles est à l'origine de la planéité et la rigidité des stérols. Ils sont considérés comme une sous-classe de stéroïdes et diffèrent de ces derniers par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3. L'ergostérol, le stigmastérol et le cholestérol sont les trois principaux stérols. Le cholestérol est le plus abondant chez les mammifères (Cf. figure 4). Ce

lipide constitue 30 à 50% de la fraction totale des lipides des érythrocytes (Eeman et Deleu, 2010; Ohvo-Rekilä *et al*., 2002).

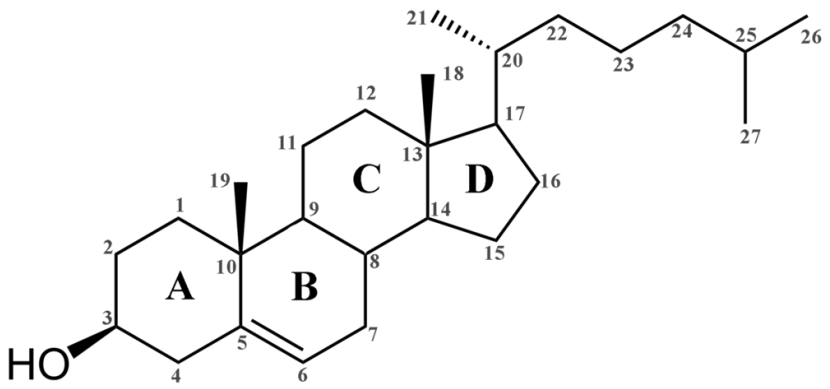


Figure 4. Structure du cholestérol.

c. Thermotropisme des membranes

Les lipides, au sein d'une membrane, peuvent présenter une organisation spécifique selon leur nature et la température. Cette organisation particulière dépend de l'arrangement spatial des atomes de la molécule dans la bicouche et plus particulièrement des carbones des chaînes acyles. On distingue plusieurs organisations membranaires, également appelées phases, qui dépendent de la température (Cf. figure 5).

A une température suffisamment basse, dans des conditions où l'agitation thermique est faible, toutes les chaînes adoptent une organisation « *tout-trans* » : elles sont parallèles les unes aux autres, en contact étroit et étirées au maximum. Les chaînes sont dites en organisation ordonnée (L_β) et on utilise le terme « gel » pour décrire l'état de cette phase lamellaire. Les lipides étant fortement compactés, la diffusion latérale, c'est-à-dire la capacité d'un lipide à échanger de place avec son voisin s'en trouve fortement réduite. Dans une phase gel, le coefficient de diffusion latérale est d'environ 10^{-11} $cm^2.s^{-1}$ (Eeman et Deleu, 2010).

Une élévation de la température entraîne une mobilité accrue autour des liaisons C-C (pour les chaînes saturées ou insaturées). La probabilité d'une isomérisation *trans*-gauche augmente, et au-delà d'une température donnée, on observe une transition coopérative: les chaînes passent d'une organisation ordonnée (L_β) à une organisation désordonnée (L_α). On parle alors de la transition de phase gel - fluide (Luzzati et Tardieu, 1974).

Au sein d'une phase fluide les isomérisations *trans*-gauche diminuent l'état de compaction des lipides, ce qui favorise les mouvements de diffusion rotationnelle et latérale. Ainsi, le coefficient de diffusion latérale est 1000 fois plus grand que dans une phase gel (10^{-8} $cm^2.s^{-1}$ contre 10^{-11} $cm^2.s^{-1}$). La température de passage entre les phases $L_{\beta'}$ et L_α est appelée température de transition de phase et est notée T_m. La T_m peut être influencée par la longueur et le degré d'insaturation des chaines acyles (Eeman et Deleu, 2010; Goñi, 2014).

Dans le cas de certains lipides comme la phosphatidylcholine, la dimension de la tête polaire est supérieure à celui de l'encombrement de deux chaînes hydrocarbonées en contact étroit et étirées au maximum. De ce fait, la conformation la plus stable des chaînes hydrocarbonées dans la phase gel cristalline est obtenue lorsque les chaînes sont inclinées par rapport au plan de la bicouche ($L_{\beta'}$).

Avant la transition $L_{\beta'}$ - L_α, une pré-transition permet d'aboutir à une phase intermédiaire appelée $P_{\beta'}$ (« ripple phase »). Lors de cette pré-transition, les chaînes hydrocarbonées se redressent, ce qui entraîne une distorsion de la bicouche et la formation d'ondulations périodiques à la surface de la membrane. Cette pré-transition, qui se fait à une température légèrement inférieure à la T_m, pourrait être due à une augmentation des interactions entre les têtes polaires et le solvant (Heimburg, 2000).

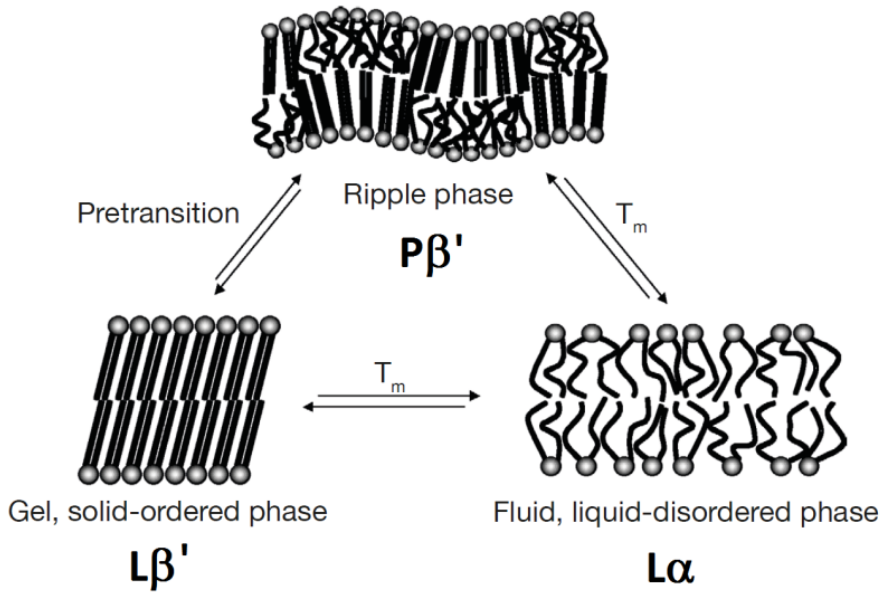


Figure 5. Etats physiques adoptés par une bicouche lipidique en phase aqueuse. Adapté de Eeman et Deleu, 2010.

La fluidité membranaire, qui désigne l'ensemble des mouvements animant les protéines et lipides constituant la bicouche, dépend fortement de la conformation des chaînes. Lorsque celles-ci sont ordonnées, les interactions entre elles sont fortes, les mouvements sont limités et la fluidité est faible. Le passage à l'état désordonné s'accompagne d'une augmentation importante de la fluidité. En temps normal, la conformation des chaînes des lipides membranaires est généralement désordonnée (phase L_α).

Plusieurs études ont montré qu'il était possible de discriminer les phases L_β et L_α au sein des membranes liposomales et à cet effet, l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles à la polarité du milieu environnant est particulièrement répandu (Bagatolli, 2006; Parasassi *et al*., 1991; Tian *et al*., 2017). Bien que la phase L_α ait été caractérisée dans les membranes des cellules épithéliales (Yamamoto *et al*., 2014), des globules rouges (Vest *et al*., 2006) ou encore des macrophages (De La Haba *et al*., 2013), la phase L_β semble ne pas exister car à ce jour, aucune étude n'en a mentionné l'existence.

2. Les modèles membranaires biomimétiques utilisés

Les membranes biologiques étant très complexes, de nombreux systèmes biomimétiques simplifiés ont été développés afin d'étudier les propriétés, la structure ou encore les interactions de molécules avec les lipides membranaires. Parmi ces systèmes, on retrouve :

- les monocouches de Langmuir qui permettent de mimer un demi-feuillet membranaire à la surface de l'eau ;
- les liposomes, vésicules fermées constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux ;
- les bicouches supportées, membranes lipidiques posées sur un support solide ;
- les membranes suspendues qui sont des bicouches maintenues sur un support solide par le biais d'un espaceur ;
- ou encore les « black lipid membranes », bicouches lipidiques planes à travers un orifice.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons travaillé avec deux systèmes : les monocouches de Langmuir et les liposomes.

a. Les monocouches de Langmuir

Les monocouches de Langmuir sont des films monomoléculaires organisés à la surface de l'eau qui permettent de mimer un feuillet membranaire. Une fois déposés à la surface de l'eau, les lipides s'organisent de telle sorte que les têtes polaires des phospholipides soient au contact de l'eau et les chaînes acyles au contact de l'air.

Ce système membranaire présente plusieurs avantages par rapport aux autres modèles membranaires. En effet, les monocouches sont simples à préparer. Pour ce faire, il suffit de dissoudre les lipides dans un solvant organique (chloroforme, hexane…) et de les déposer goutte à goutte à la surface de l'eau. De plus, il est possible de changer facilement les conditions expérimentales (la nature du lipide, le degré de compaction des lipides, la

composition de la sous-phase, le pH et la température). Les monocouches de Langmuir permettent d'étudier l'affinité d'une molécule pour un lipide donné, la nature des interactions avec ce lipide ou encore sa capacité d'insertion au sein des membranes.

– La mesure de la tension de surface

La tension de surface peut être évaluée grâce à plusieurs techniques mais dans le cas des monocouches de Langmuir, la balance de Wilhelmy (Cf. figure 6) reste la plus utilisée (Neindre, 2014). Ce dispositif est constitué d'une lame suspendue à un capteur et immergée dans le tampon de sous-phase. Lorsqu'elle est immergée dans la sous-phase, la lame est soumise à trois forces : son poids, la poussée d'Archimède et la tension superficielle. La résultante de ces trois forces (F) entraîne la lame vers le bas et peut être calculée avec la formule ci-dessous :

$$F = P + 2 * \gamma * (e + l) cos\, \theta - A$$

avec P le poids de la lame, γ la tension superficielle, e l'épaisseur de la lame, l la largeur de la lame, θ l'angle de contact entre la lame et l'eau, A la poussée d'Archimède.

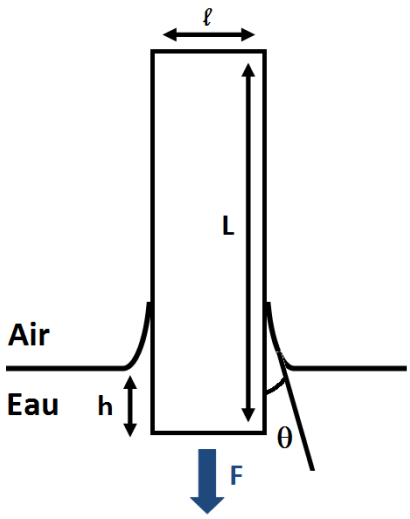


Figure 6. Représentation schématique d'une lame de Wilhelmy à l'interface air/eau.

La présence d'une monocouche à la surface de l'eau exerce une force sur la lame. La lame utilisée étant mouillante (papier Whatmann), l'angle de contact θ devient nul. Puisque cosθ=1 et que e << l, la variation de force (ΔF) en présence de la monocouche se calcule à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\Delta F = \mathrm{P} + 2 * \gamma * l - \mathrm{A}$$

La lame étant maintenue en position fixe, P et A ne varient pas, contrairement à la tension de surface qui varie en selon la composition de la monocouche et la quantité de lipides déposée. Ainsi, la variation de force s'exprime par la relation ci-dessous :

$$\Delta F = 2 * \gamma * l = 2 * l * (\gamma_0 - \gamma)$$

avec γ la tension superficielle de l'eau pure et γ_0 la tension superficielle en présence de la monocouche. La différence entre γ_0 et γ est communément appelée pression de surface (π) et s'exprime selon la relation suivante (Maget-Dana, 1999) :

$$\pi = (\gamma_0 - \gamma) = \frac{\Delta F}{2 * l}$$

– Les adsorptions dans des monocouches à aire constante

Il est possible d'étudier l'affinité d'une molécule pour un lipide donné ainsi que sa capacité à s'insérer au sein de membranes en l'injectant à concentration constante dans la sous-phase de monocouches préparées à différentes pressions de surface initiales (Cf. figure 7). Une fois injectée, la molécule va remonter la sous-phase et interagir avec la monocouche lipidique. Si les interactions sont suffisamment importantes, on observera une variation de la tension de surface. Le report de la variation de tension de surface en fonction des pressions initiales permet de tracer une droite. Si la pente est négative, alors il sera possible de déterminer la pression d'insertion maximale (PIM).

La PIM, qui correspond à l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses, désigne la pression initiale à partir de laquelle la molécule ne peut plus pénétrer dans la monocouche et augmenter la tension de surface.

La pression des membranes biologiques étant comprise entre 30 et 35 mN/m (Marsh, 1996), des valeurs de PIM supérieures à 30 mN/m suggèrent une capacité à pénétrer des membranes à pression physiologique.

De plus, l'extrapolation à partir d'une pression initiale de 30 mN/m permet de déterminer un second paramètre appelé $\Delta\pi_{30}$ mN/m. Ce paramètre reflète la quantité de composé associée à la monocouche et permet d'évaluer son affinité pour un lipide donné. Ainsi, plus le $\Delta\pi_{30}$ mN/m est important, plus la quantité de molécules associée à la monocouche est grande (Calvez *et al*., 2009).

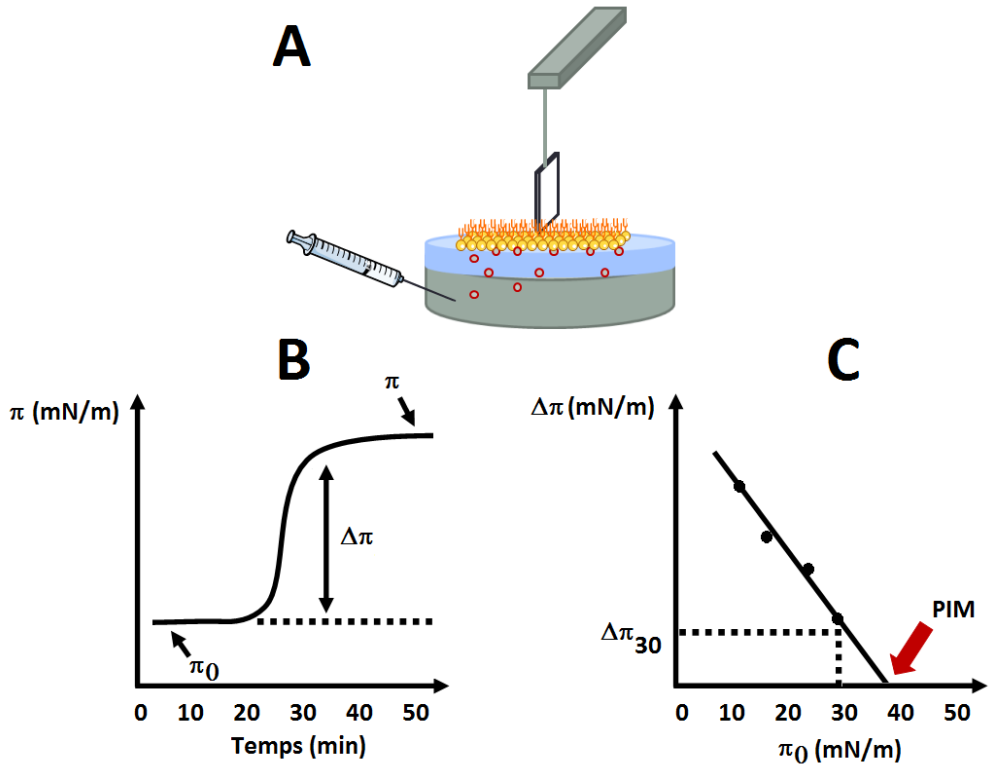


Figure 7. Interaction d'un composé amphiphile avec une monocouche de lipide. (A) Injection du composé dans la sous-phase d'une monocouche de Langmuir, (B) Cinétique d'insertion du composé au sein de la monocouche, (C) Représentation de la variation de pression en fonction de la pression initiale.

– Les isothermes de compression

La compression d'une monocouche à vitesse constante entraîne des changements d'état physiques reflétant son degré d'organisation. Les lipides étant amphipatiques, la quantité de matière déposée à la surface de l'eau ne varie pas pendant la compression. Ainsi, il est possible de calculer l'aire moléculaire occupée par un lipide grâce à la formule ci-dessous :

$$Aire\ moléculaire = \frac{Aire\ cuve}{c * V * Na}$$

avec c la concentration de la solution de lipides, V le volume déposé, Na le nombre d'Avogadro.

Le report de l'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire permet d'obtenir une isotherme de compression (π-A) (Cf. figure 8). Le module d'élasticité (K_s), qui peut être déterminé pour chaque point de l'isotherme, permet de traduire les changements d'état physique de la monocouche durant la compression (Ambike *et al*., 2011; Davies, 1962).

$$K_s = -A * \frac{d\pi}{dA}$$

Au début de la compression, les lipides disposent d'une grande surface d'étalement et interagissent très peu entre eux : les chaînes acyles sont couchées sur la surface de l'eau : la monocouche est dite en phase gaz. A ce stade, la pression de surface est faible et les valeurs de K_s sont inférieures à 12,5 mN/m. Lorsque la compression se poursuit, les chaînes acyles des phospholipides se redressent et interagissent de plus en plus jusqu'à atteindre la phase liquide-expansé, caractérisée par un K_s compris entre 13 et 50 mN/m.

La phase liquide-condensé est caractérisée par une forte cohésion latérale entre les chaînes acyles. La pression de surface est élevée et K_s est compris entre 100 et 250 mN/m. Selon le lipide utilisé et les conditions expérimentales (nature de la sous-phase,

température), il peut exister une transition pendant laquelle la pression de la monocouche n'augmente plus bien que l'aire moléculaire diminue. Cette transition correspond à une coexistence entre les phases liquides-expansé et liquide-condensé.

La phase solide est atteinte lorsque les chaînes acyles sont perpendiculaires à la surface de l'eau. L'état de compaction des chaînes acyles est maximal et la monocouche forme un film monomoléculaire organisé à la surface de l'eau (K_s supérieur à 250 mN/m). Si la compression se poursuit, le film finit par se rompre : c'est le collapse. Ce dernier est caractérisé par la perte du caractère bidimensionnel de la monocouche et la formation de structures 3D (multicouches, micelles).

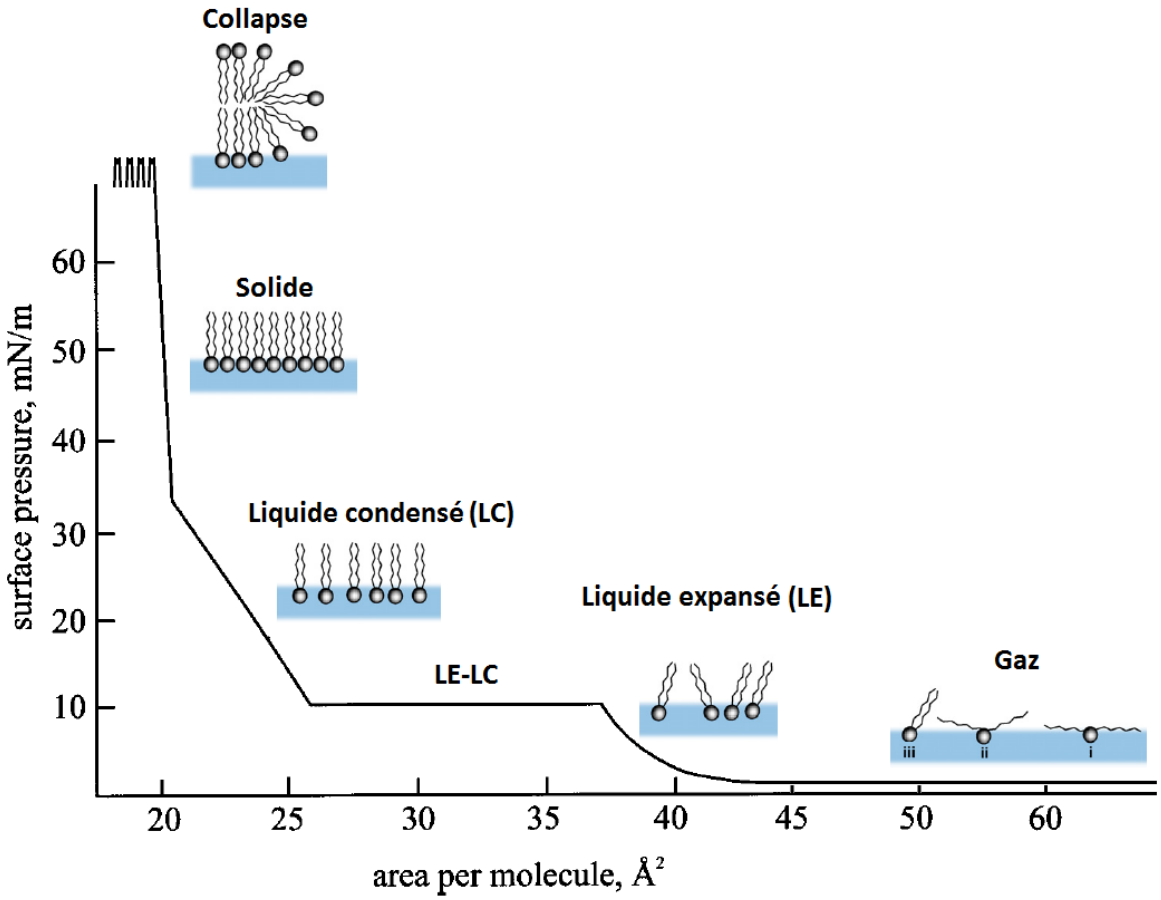


Figure 8. Isotherme de compression théorique obtenue en comprimant une monocouche de lipide étalée à l'interface air/eau. Adapté de Kaganer *et al.*, 1999 et de Moghaddam *et al.*, 2011).

D'un point de vue thermodynamique, il est possible d'étudier les interactions entre un lipide et une molécule grâce à l'isotherme de compression du mélange binaire. Plusieurs paramètres comme la pression de collapse idéale et l'aire moléculaire idéale permettent d'étudier la miscibilité et l'idéalité d'un mélange binaire. Cependant, seule la détermination de l'excès d'énergie libre du mélange (ΔG_{ex}) permet d'étudier la nature des interactions (Dynarowicz-Łątka et Kita, 1999). Grâce à la relation de Goodrich, il est possible de calculer ΔG_{ex}:

$$\Delta G_{ex} = \int_0^{\pi} A_{\mathrm{m}}\, d\pi - x1 \int_0^{\pi} A_1\, d\pi - x2 \int_0^{\pi} A_2\, d\pi$$

avec A_m, l'aire moléculaire du mélange binaire, A_1 et x_1 l'aire moléculaire et la fraction molaire du composé 1, A_2 et x_2 l'aire moléculaire et la fraction molaire du composé 2 (Goodrich, 1957).

Des valeurs positives de ΔG_{ex} indiquent que les interactions entre les constituants de la monocouche sont plus faibles que celles impliquant les molécules des constituants purs, ce qui favorise une ségrégation de phase entre les composants du mélange. En revanche, des valeurs négatives indiquent les interactions sont favorables et que les constituants de la monocouche interagissent fortement à l'interface air/eau. Un ΔG_{ex} égal à zéro signifie que les composés n'interagissent pas entre eux: dans ce cas le mélange est considéré comme idéal (Maget-Dana, 1999).

– Les monocouches : un outil d'étude des interactions agents exogènes/membrane

Les monocouches constituent un modèle membranaire très utilisé pour étudier l'effet d'agents externes sur l'organisation des lipides. Ainsi, de nombreux auteurs ont utilisé des monocouches de lipides pour étudier la capacité de peptides antimicrobiens (Maget-Dana,

1999; Nowotarska *et al*., 2014), de nanoparticules (Faye *et al.*, 2013), d'acides nucléiques (Stefaniu *et al*., 2014), de protéines (Boisselier *et al*., 2017), de médicaments (Silva *et al.*, 2013) ou encore d'analogues de sidérophores qui sont des chélateurs de fer sécrétés par les microorganismes (Antonietti *et al*., 2017) à interagir avec la membrane.

L'interaction d'antioxydants avec la membrane (en particulier les composés phénoliques) a aussi été décrite. A titre d'exemple, Fadel et ses collaborateurs ont montré que le degré d'insaturation et la nature de la tête polaire des phospholipides influencent la capacité d'insertion de l'acide rosmarinique et qu'il présente une affinité élevée pour les lipides zwitterioniques insaturés (Fadel *et al*., 2011).

Plus récemment, De Athayde Moncorvo Collado et ses collaborateurs ont étudié la cinétique d'adsorption de flavonoïdes et de stilbènes avec des monocouches de DMPC, DPPC et cholestérol. Les composés phénoliques qu'ils ont testés sont capables de s'insérer dans les trois types de monocouches mais leur capacité d'insertion diminue en présence de cholestérol (De Athayde Moncorvo Collado *et al*., 2016).

b. Les liposomes

Les liposomes, aussi appelés vésicules lipidiques, sont des sphères constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de délimiter plusieurs compartiments aqueux (Cf. figure 9).

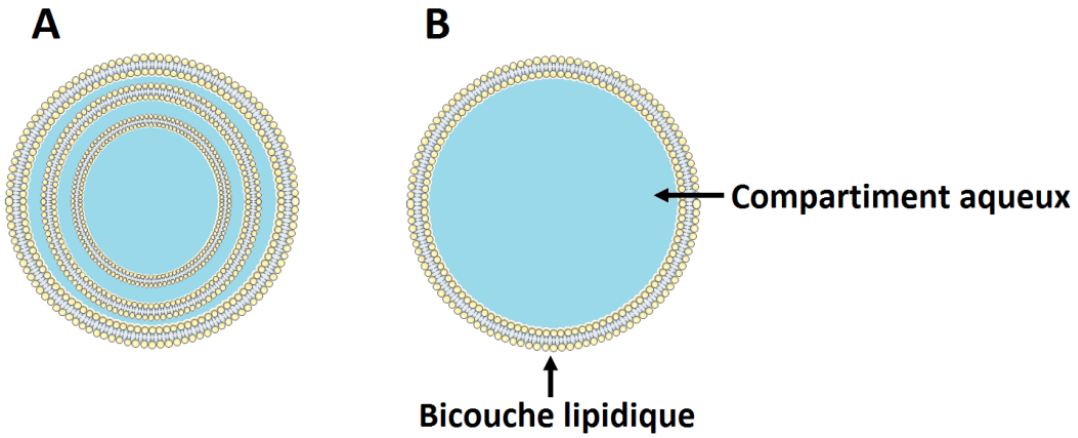


Figure 9. Représentation schématique de liposomes. (A) Liposome multilamellaire, (B) liposome unilamellaire.

Selon le mode de préparation (Cf. figure 10), les liposomes peuvent être classés en quatre catégories. Les liposomes multilamellaires ou MLVs ont une taille comprise entre 0,5 et 10 µM. Ils sont obtenus après hydratation et agitation d'un film lipidique préalablement formé sur une paroi de verre. Selon le lipide utilisé, les conditions expérimentales doivent être ajustées de sorte que la température soit supérieure à la température de transition de phase du lipide lors de l'agitation. Les MLVs présentent la particularité d'être constitués de plusieurs couches lipidiques séparées par une fine pellicule d'eau. Les petits liposomes unilamellaires ou SUVs ont une taille inférieure à 100 nm. Ils peuvent être obtenus par la sonication des MLVs, qui permet d'éliminer les couches concentriques.

Les grands liposomes unilamellaires ou LUVs, dont la taille est comprise entre 100 nm et 1 µM, peuvent être préparés par plusieurs méthodes comme la réversion de phase et la technique d'extrusion à travers des membranes de polycarbonate, qui reste la plus utilisée.

Les liposomes géants unilamellaires ou GUVs peuvent être formés par un champ électrique alternatif après hydratation d'un film lipidique. Leur taille (supérieure à 5 µM) permet leur manipulation individuelle et une observation directe par microscopie confocale (Eeman et Deleu, 2010).

Les vésicules une fois formées sont peu stables sur le long terme car elles sont susceptibles de s'agréger. En outre, l'utilisation d'une sonde de sonication présente le désavantage de chauffer l'échantillon, ce qui peut oxyder les acides gras polyinsaturés.

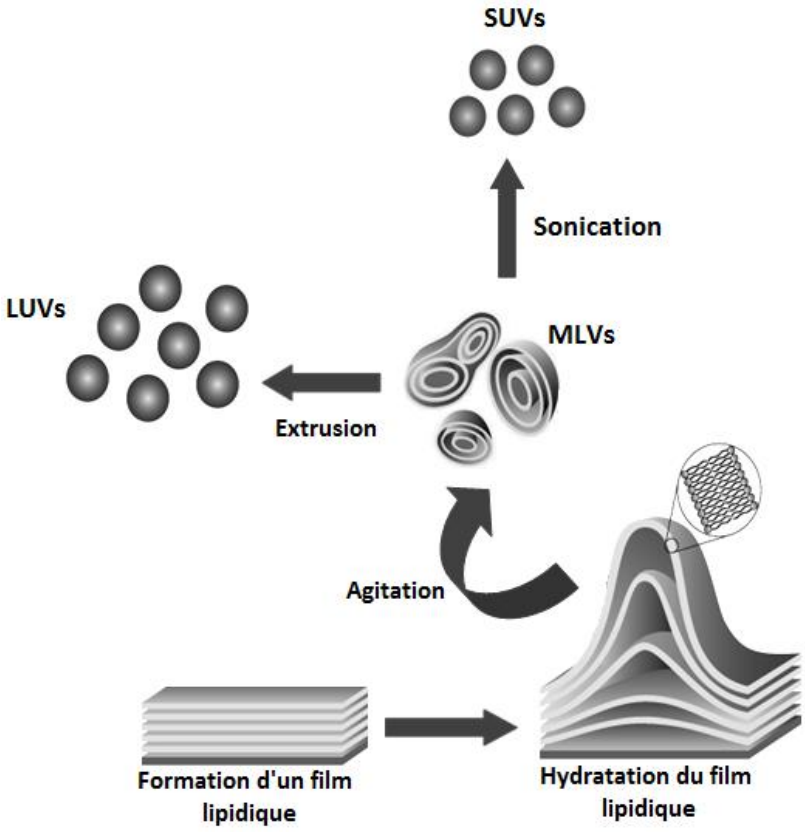


Figure 10. Quelques modes de préparation des liposomes. Adapté de Avanti Polar. Inc.

Les liposomes reflètent d'avantage la complexité de la membrane car contrairement aux monocouches de Langmuir, ils sont constitués de deux feuillets lipidiques. Comme ils permettent de mimer la bicouche lipidique, les liposomes sont fréquemment utilisés pour étudier les processus membranaires, la reconnaissance moléculaire ou encore l'adhésion cellulaire (Lorin *et al*., 2004). Ainsi, les liposomes ont été utilisés pour étudier l'ancrage de protéines à la membrane (Francois-Moutal *et al*., 2014), l'effet de protéines sur l'organisation des lipides membranaires (Cheniour *et al*., 2017), les interactions de nanoparticules avec les lipides membranaires (Chen et Bothun, 2014).

Les liposomes sont fréquemment utilisés pour la vectorisation de substances bioactives en thérapeutique et en cosmétologie. Ils permettent de transporter des médicaments et des substances bioactives (antioxydants, collagène…). Selon leur profil d'hydrophobicité, ces substances bioactives peuvent être logées dans la membrane ou dans le compartiment aqueux interne (Lorin *et al*., 2004).

Les liposomes constituent aussi un modèle privilégié pour l'étude de l'oxydation des lipides. Depuis les années 1980, de nombreux auteurs ont ainsi pu étudier l'influence de molécules exogènes sur l'oxydation des lipides (Chatterjee et Agarwal, 1988). Les effets protecteurs des composés phénoliques de l'huile d'olive (Paiva-Martins *et al*., 2003), des baies (Heinonen *et al*., 1998) ou encore du vin (Furlan *et al*., 2015) ont ainsi été mis en évidence.

Plus récemment, Azouzi et ses collaborateurs ont mis en évidence la capacité de la sérotonine à protéger les membranes de liposomes de l'oxydation. Les simulations réalisées par modélisation moléculaire ayant montré que cette molécule est localisée entre le groupement glycérol et les têtes polaires des phospholipides, les auteurs ont suggéré que la sérotonine protégeait les membranes en inhibant la diffusion des EROs au sein de la membrane (Azouzi *et al*., 2017).

c. Limitations des monocouches de Langmuir et des liposomes

Bien que les modèles membranaires aient permis la compréhension de nombreux processus membranaires, il convient de garder à l'esprit que ces modèles ne permettent pas de reproduire la complexité des membranes cellulaires. En effet, même si l'on peut facilement changer la composition lipidique, les monocouches de Langmuir ne permettent de mimer qu'un seul des feuillets membranaires.

Les liposomes, bien qu'ils possèdent deux feuillets membranaires, ne permettent pas de reproduire la distribution asymétrique des lipides. Les liposomes présentent aussi le désavantage d'avoir un rayon de courbure plus prononcé que les membranes naturelles, ce qui entraîne une augmentation de la tension à la surface de la membrane. Plus ils sont petits, plus le rayon de courbure est prononcé et plus la tension à la surface de la membrane est forte.

En outre, le nombre d'éléments pouvant être incorporés à ces systèmes reste limité à cause des contraintes expérimentales. Ainsi, dans la plupart des études menées avec des systèmes biomimétiques, trois à quatre lipides sont utilisés alors que les membranes cellulaires possèdent plus de 1000 lipides (Chatterjee et Agarwal, 1988; Eeman et Deleu, 2010).

Résultats

Résultats

Chapitre I. Les nitrones dérivées du cholestérol

1. Introduction

La PBN, bien que largement utilisée en milieu biologique pour sa capacité à piéger les radicaux libres, présente le désavantage de peu cibler les membranes, ce qui limite sa capacité à protéger les lipides de l'oxydation. Pour pallier ce problème, plusieurs chercheurs ont modifié la PBN en lui ajoutant un groupement hydrophobe, avec l'objectif de l'ancrer dans les membranes. L'implication des stéroïdes dans de nombreux processus biologiques a conduit plusieurs d'entre eux à synthétiser des nitrones dérivées du cholestérol dès les années 1970 (Weintraub et Tiernan, 1974).

Dans ce chapitre, nous avons étudié les interactions de trois nitrones dérivées du cholestérol avec les lipides membranaires. Ces molécules, nommées chol-PBN-L, L-PBN-chol et chol-PBN ont été synthétisées par l'équipe du Dr Grégory Durand de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron. Dans un premier temps, les expériences de tensiométrie de surface ont montré le caractère amphiphile de ces composés et souligné l'influence du groupement polaire sur la nature des interactions avec les lipides. Dans un second temps, l'étude des propriétés antioxydantes nous a permis de mettre en évidence l'importance de la localisation membranaire et l'influence de l'orientation du groupement PBN sur l'activité protectrice des dérivés.

2. Article 1

Cholesterol-nitrone conjugates as protective agents against lipid oxidation: A model membrane study

Larissa Socrier[a], Marie Rosselin[b], Fanny Choteau[b], Grégory Durand[b] and Sandrine Morandat[a]*

[a]Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, CNRS, Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, FRE 3580, Centre de recherches Royallieu – CS 60 319 - 60 203 Compiègne cedex, France ;

[b]Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM) & Université d'Avignon, Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, 301 rue Baruch de Spinoza, F-84916 Avignon Cedex 9, France.

*Corresponding author: Sandrine Morandat

E-mail address: sandrine.morandat@utc.fr. Tel: +33 3 44 23 44 18; Fax: +33 3 44 20 39 10

Accepté. DOI : 10.1016/j.bbamem.2017.09.026.

Journal : *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) – Biomembranes.

Abstract

Free radical scavengers such as α-phenyl-N-tert-butylnitrone (PBN) have been widely used as protective agents in several biological models. We recently designed two PBN derivatives by adding a cholesterol moiety to the parent nitrone to increase its lipophilicity. In addition to the cholesterol, a sugar group was also grafted to enhance the hydrophilic properties at the same time. In the present work we report on the synthesis of a third derivative bearing only a cholesterol moiety and the physical chemical and antioxidant characterization of these three derivatives. We demonstrated they were able to form stable monolayers at the air/water interface and with the two derivatives bearing a sugar group, repulsive interactions with 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC) were observed. We next investigated the interaction with DLPC on a liposome model.

Fluorescence spectroscopy experiments showed the addition of a cholesterol moiety causes an ordering effect whereas the presence of the sugar group led to a disordering effect. The protective effect against lipid oxidation was then investigated using dynamic light scattering and the formation of conjugated dienes was quantified spectrophotometrically. Two oxidizing systems were tested, *i.e.* the AAPH-thermolysis which generates peroxyl radicals and the Fenton reagent which is responsible of the formation of hydroxyl radicals.

Due to their membrane localization, the three cholesteryl-PBN derivatives are able to prevent lipid oxidation with the two types of radical inducers but with a different mode of action.

Key words: lipid oxidation, amphiphilic nitrone, antioxidant, model membranes

1. Introduction

In living organisms, redox homeostasis, which is defined as the equilibrium between intracellular levels of anti and pro-oxidant species, is essential to maintain cell functions. Under normal conditions, the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are maintained low by various antioxidant systems. Some pro-oxidant species are physiologically produced by diverse cellular mechanisms and are involved in several physiological processes. For instance, the rapid release of ROS during the oxidative burst allows phagocytes to degrade internalized particles or bacteria [1]. ROS are also involved in signaling pathways [2,3] and regulation of blood pressure [4,5].

However, ROS are not always produced by cells in a controlled manner. Indeed, some of them can also originate from the deregulation of physiological processes or from a dysfunction of the mitochondrial electron transport chain which can release superoxide anions [6]. Moreover, external factors such as environmental pollution, sunlight, smoking, pathogens also trigger the production of pro-oxidants [7]. Imbalance in favor of pro-oxidants leads to oxidative stress [8]. Oxidative stress itself is not a disease, but it creates a favorable context to the appearance of a large variety of diseases, as it targets the biomolecules modifying then their structures and functions. Indeed, ROS have been reported to play a role in the early stages of neurodegenerative diseases [9,10], cardiovascular diseases [11] or cancers [12]. Membrane lipids, especially polyunsaturated lipids (PUFAs), remain one of the most important target of ROS. PUFAs are degraded by ROS through a chemical process called lipid peroxidation. This process can be divided in three major steps: initiation, propagation and termination [13]. To counteract the deleterious effects of excess of pro-oxidants, living cells use various antioxidants defense systems [10]. These systems are composed of enzymatic and non-enzymatic antioxidants [14,15] having either an endogenous or an

exogenous origin [16]. However, to increase the panel of efficient antioxidant molecules, numerous synthetic compounds have been designed. Among them, free radical scavengers such as α-phenyl-N-tert-butylnitrone (PBN) have been widely used as a protective agent in several biological models [17]. Indeed, exposure to PBN favors the size decrease of rat gliomas [18] or protects the retina tissue from light damages [19,20]. PBN also protects edible oils from rancidity [21].

Nevertheless, PBN presents a major disadvantage as it requires injection of high concentrations to be efficient [22]. To overcome this limitation, new amphiphilic PBN derivatives (cholesteryl-PBNs, Fig. 1) were designed. For example, Ayuso and co-workers designed cholesteroNitrones by combining PBN to a cholesterol moiety and showed those compounds have a promising neuroprotection activity [23]. In our case, we first added a cholesterol moiety with the expectation that increased hydrophobicity will favor the anchorage to membranes. As reported by Hardy and co-workers who designed a cholesteryl ester analogue of the spin trap DEPMPO [24], the presence of a cholesterol moiety does not hinder the antioxidant activity of the nitrone group and increased lipophilicity may be beneficial to easily target cell membranes. Secondly, a sugar moiety was added, to enhance the hydrophilic properties and obtain amphiphilic nitrones. To finish, the position of both cholesterol and sugar group was interchanged as it has previously been reported that the position of the substituants on the nitrone group affects its reactivity [25], thus modifying its antioxidant efficiency.

In the present work, we have studied the physical-chemical properties of these compounds with biomimetic systems, as well as their protective effect against lipid oxidation initiated by the peroxyl radical generator AAPH or the Fenton reaction. For the sake of comparison, we have synthesized a third derivative bearing only a cholesterol moiety. The

data obtained highlight the importance of the orientation of the nitrone moiety in the antioxidant efficiency.

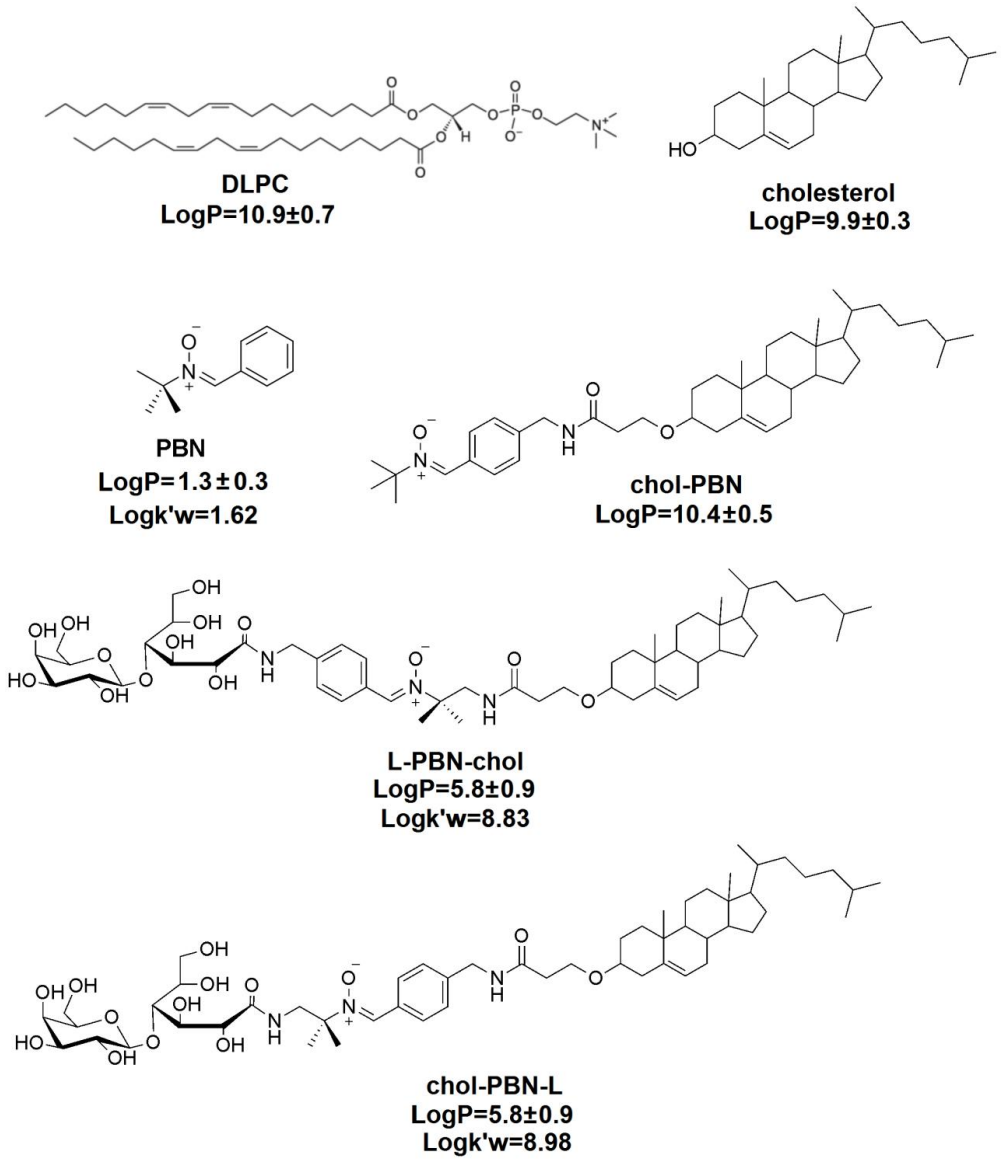


Fig. 1 Cholesteryl-PBNs LogP. Log k'_w were previously determined by Choteau *et al.,* [26].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and synthesis

1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Cholesterol, 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), hydrogen peroxide, 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), α-phenyl-N-tert-butylnitrone (PBN), Laurdan (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphtalene) and Prodan (6-propionyl-2-dimethylaminonaphtalene) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ferrous sulfate was purchased from Carlo Erba (Milan, Italy). The water used in all assays was purified using a Millipore filtering system (Bedford, MA), yielding ultrapure water (18.2MΩ × cm).

All reagents for the synthesis were from commercial sources and were used as received. Solvents were distilled and dried according to standard procedures. Aluminum sheets coated with silica gel (40-63 µm) were used for TLC analysis and the detection of the compound was achieved by UV light (254 nm) exposure and by spraying an ethanolic solution of 5% sulphuric acid or of 2% ninhydrin, and then by heating at ~ 150°C. Flash chromatography was carried out on silica gel (40-63µm). Size exclusion chromatography was carried out on Sephadex LH-20 resin. The NMR spectra were recorded on a Bruker AC400 at 400 MHz for ^{1}H experiments and at 100 MHz for the ^{13}C experiments. Chemical shifts are given in ppm relative to the solvent residual peak as a heteronuclear reference for ^{1}H and ^{13}C. Abbreviations used for signal patterns are: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublets; t, triplet; ddt, doublet of doublet of triplets; m, multiplet. HR-MS (ESI+) was determined on a QStar Elite mass spectrometer equipped with a TOF analyzer. L-PBN-chol and chol-PBN-L were synthesized according to the procedure described by Choteau *et al.,* [26]. L-PBN-chol indicates that the lactobionamide (L) is attached to the

nitrone by the phenyl ring (P) and the cholesterol by the N-tert-butyl group (N). On the contrary in chol-PBN-L, the lactobionamide (L) is attached on the N-tert-butyl position (N) and the cholesterol group is attached on the phenyl ring (P).

Chol-PBN was synthesized as follows: cholesterol-CHO [26] (0.18 g, 3.1×10^{-4} mol) and *N-tert*-butylhydroxylamine (0.05 g, 3.4×10^{-4} mol, 1.1 equiv.) were dissolved in 10 mL of an anhydrous 3:2 mixture of THF/AcOH (v/v) in the presence of 4 Å molecular sieves. The solution was stirred at 60° overnight under argon atmosphere. The crude mixture was filtered through a pad of Celite and the solvents were removed under vacuum. The resulting crude residue was purified by flash chromatography (EtOAc/MeOH, 98:2 v/v) followed by size exclusion chromatography (CH_2Cl_2/MeOH 1:1 v/v) to give the desired compound (0.13 g, 1.95×10^{-4} mol) in 59 % yield, as a white powder. Rf 0.27 (EtOAc/MeOH 8:2 v/v). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.25 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.33 – 5.22 (m, 1H), 4.47 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.15 (ddt, *J* = 11.2, 8.4, 4.5 Hz, 1H), 2.51 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.26 (ddd, *J* = 13.3, 4.8, 2.1 Hz, 1H), 2.13 – 2.04 (m, 1H), 2.03 – 1.91 (m, 2H), 1.88 – 1.75 (m, 4H), 1.61 (s, 9H), 1.54 – 1.45 (m, 4H), 1.42 – 1.30 (m, 6H), 1.25 (s, 2H), 1.13 (m, 4.5 Hz, 5H), 1.02 (m, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.87 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H), 0.67 (s, 3H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 171.7, 140.5, 140.4, 130.2, 129.4, 129.1, 127.6, 121.9, 79.4, 70.8, 64.0, 56.7, 56.1, 50.1, 43.2, 42.3, 39.7, 39.5, 38.9, 37.3, 37.1, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.9, 28.3, 28.3, 28.2, 28.0, 24.3, 23.8, 22.8, 22.6, 21.1, 19.3, 18.7, 11.9. HR-MS (ESI+, m/z) calcd for $C_{42}H_{67}N_2O_3$ [$(M+H)^+$] 647.5152, found 647.5142. Cholesteryl-PBNs LogP values were calculated with the software ACD/ChemSketch version 14.01. www.acdlabs.com.

2.2. Monolayer studies

All the experiments were performed at constant temperature (21.0 ± 0.1°C). The Langmuir trough from Nima (Coventry, England) is equipped with two moveable Teflon barriers to allow the continuous compression of monolayers at the air–water interface. The dimensions of the trough are 65 × 13.2 cm^2 when the barriers are opened. The trough is equipped with a Wilhelmy-type pressure measuring system.

In these experiments, we used a subphase of 720 mL of Hepes buffer (10mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4). DLPC alone or mixed with cholesteryl-PBNs were spread in hexane/ethanol 9:1 (v/v) at the air–water interface. After 15 min solvent evaporation, the monolayers were compressed at a rate of 30 cm^2/min up to collapse. Free excess energy of mixing (ΔG_{ex}) values were calculated with Matlab Academic version 2015b. The MathWorks, Inc. Natic, MA (USA).

2.3. Preparation of liposomes

DLPC alone or DLPC/cholesteryl-PBNs mixtures in chloroform were dried under a stream of nitrogen and then kept under high vacuum for 2 h to obtain a solvent-free film. The dry film was then dispersed in Hepes buffer to obtain multilamellar vesicles (MLVs). Then, pure DLPC or DLPC/cholesteryl-PBNs SUVs and LUVs were prepared as described by Fadel *et al.* [27]. Liposomes size distribution was determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano-S, Malvern) and was unimodal.

2.4. Fluorescence spectroscopy

The generalized polarization (GP) of Laurdan and Prodan was determined in SUVs of DLPC alone or mixed with 30 mol % of cholesteryl-PBNs or cholesterol and the fluorescent probe. The final probe/DLPC molar ratios were 1/110 for Laurdan and 3/110 for Prodan. Liposomes were then diluted at a final DLPC concentration of 0.1 mg/mL and were incubated at 37°C during 10 minutes. Fluorescence measurements were performed by exciting Laurdan and Prodan at 360 nm. The GP values were calculated by measuring the fluorescence emission intensities at 435 (I_B) and 490 nm (I_R) for Laurdan and at 440 (I_B) and 480 nm (I_R) for Prodan according to the following equation [28]:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \ (eq. 1)$$

The intrinsic fluorescence of cholesteryl-PBNs was verified by exciting at 360 nm DLPC/cholesteryl-PBNs SUVs containing no fluorescent probe and the emission intensities collected at the wavelengths of the two probes were not significant.

2.5. Dynamic light scattering (DLS) experiments

The hydrodynamic diameter of liposomes was measured during oxidation by dynamic light scattering with a Zetasizer Nano-S, Malvern. SUVs made of DLPC alone or mixed with cholesteryl-PBNs at 5, 10, 20 and 30% molar ratio were prepared in Hepes buffer at a final DLPC concentration of 0.4 mg/mL. Cholesterol was tested at the same concentrations for the control assay. Lipid peroxidation was initiated either by adding AAPH at a final concentration of 8 mM, or by adding hydrogen peroxide and ferrous sulfate respectively at 4 mM and 0.4 mM. The samples were immediately incubated at 37°C. The hydrodynamic diameter was measured and diameter increase percentages were calculated with the following equation:

$$Diameter\ increase\ (\%) = \frac{Diameter_{sample} - Diameter_{T=0}}{Diameter_{T=0}} * 100\ (eq.2)$$

2.6. Antioxidant efficiency of cholesteryl-PBNs

The antioxidant efficiency of the derivatives was assessed by measuring the formation of conjugated dienes [13], a first product of PUFAs peroxidation [13,29]. Liposomes of DLPC alone or mixed with cholesteryl-PBNs or cholesterol at different concentrations were prepared in Hepes buffer. Lipid peroxidation was initiated either by adding AAPH at a final concentration of 2 mM, or by adding hydrogen peroxide and ferrous sulfate respectively at 1 mM and 0.1 mM. The final concentration of DLPC for each assay was kept constant at 0.1 mg/mL. For the control assay, DLPC/cholesterol liposomes were tested at each ratio of cholesteryl-PBNs tested. The samples were immediately incubated at 37°C. Conjugated dienes formation was measured with a Specord S300 UV–VIS spectrophotometer (Jena, Germany) at 234 nm. Results are expressed as percentages of peroxidation, calculated as follows:

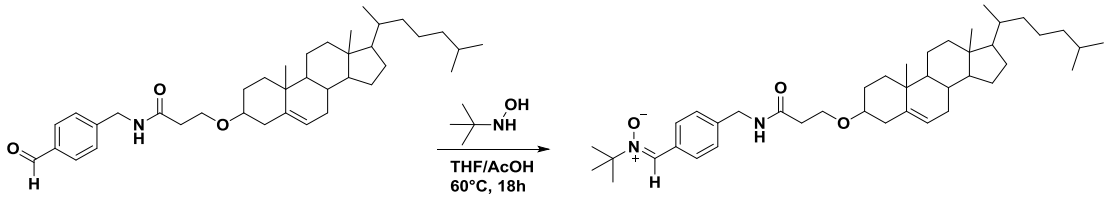
$$Lipid\ oxidation\ (\%) = \frac{Absorbance_{sample}}{Absorbance\ max_{Control}} * 100\ (eq.3)$$

The curves were fitted by applying a dose-response model with variable slope with the software GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis

L-PBN-chol, chol-PBN-L were synthesized as described previously [26]. Chol-PBN was prepared using a connected synthetic route by condensation between *N-tert*-butylhydroxylamine and the benzaldehyde cholesterol-PBN [26] under argon atmosphere, in dry 3:2 THF/AcOH mixture (v/v) and in the presence of molecular sieves. After purification by flash chromatography followed by size-exclusion chromatography, chol-PBN was obtained in 59% yield (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of chol-PBN.

3.2. Interfacial behaviour of cholesteryl-PBNs

3.2.1. Evaluation of cholesteryl-PBNs amphiphilicity

The Log*P* value of each cholesteryl-PBN was calculated and compared to those of DLPC, cholesterol and PBN (Fig. 1). As one can see, cholesteryl-PBNs have a Log*P* significantly higher than that of PBN, which confirms their increased lipophilicity. Moreover, as expected, the two structural isomers L-PBN-chol and chol-PBN-L are less lipophilic than chol-PBN due to the presence of the lactobionamide group with the Log*P* values being almost two times smaller than that of chol-PBN (5.8 and 10.4 respectively). Log*P* values are in good agreement with the Log k'_W values reported previously [26] and summarized in Fig. 1. The ability of cholesteryl-PBNs to form stable monolayers at the air-water interface was evaluated by deposing each pure compound dissolved in hexane/ethanol 9:1 (v/v) at the surface of Hepes

buffer. After solvent evaporation, the monolayer was compressed to record the π-A isotherm for each cholesteryl-PBN derivative and for cholesterol as control (Fig. 2).

In all cases, the constant compression led to a decrease of the molecular area and an increase of the surface pressure up to the collapse which occurred at high surface pressures traducing the formation of a stable monolayer at the air-water interface. Cholesterol, chol-PBN-L, L-PBN-chol and chol-PBN showed values of collapse pressures ($\pi_{collapse}$) and of molecular areas at collapse ($Amol_{collapse}$) which are very close to each other (Table 1). The values obtained for cholesterol are consistent with the literature [30]. The main differences were obtained for the molecular areas at low surface pressure ($Amol_{1\ mN/m}$) which were more than two times higher for all cholesteryl-PBNs than for cholesterol suggesting that the nitrone and sugar moieties could be lying at the air-water interface at low surface pressures (Table 1). Because the π-A isotherms exhibited the same molecular area at the collapse pressure, one can imagine that the nitrone and sugar moieties could be positioned in the subphase, perpendicular to the subphase plane. Another important difference between cholesterol and cholesteryl-PBNs derivatives lies on the elasticity modulus values. Indeed, according to the K_s values obtained at the collapse pressure (Table 1), cholesterol monolayer form a rigid phase (K_s = 438 mN/m) while chol-PBN and the two other derivatives monolayer are organized in a liquid-condensed phase (K_s ~150 mN/m for chol-PBN and ~100 mN/m for chol-PBN-L and L-PBN-chol).

Table 1 Summary of the results obtained from the π-A isotherms for each pure cholesteryl-PBNs monolayer and for cholesterol.

Compound	$Amol_{1\ mN/m}$ (± 2 Å²)	$Amol_{collapse}$ (± 2 Å²)	$\pi_{collapse}$ (± 1 mN/m)	$Ks_{collapse}$ (± 2 mN/m)
Cholesterol	40	36	38	438
Chol-PBN	79	30	42	154
L-PBN-Chol	101	32	44	96
Chol-PBN-L	90	31	42	114

3.2.2. Interaction of cholesteryl-PBNs with an unsaturated phospholipid

The ability of cholesteryl-PBNs to interact with polyunsaturated phospholipids was investigated by using two model membranes composed of DLPC/cholesteryl-PBNs mixtures: Langmuir monolayers at the air-buffer interface and unilamellar liposomes.

a. Monolayers of mixed DLPC/cholesteryl-PBNs

Different molar ratios (0, 5, 10, 20, 30 and 100%) of DLPC/cholesteryl-PBNs mixtures were prepared and spread at the air-buffer interface. After solvent evaporation, the π-A isotherms were recorded. As one can see in Fig. 2, the π-A isotherm of pure DLPC monolayer was consistent with the literature [31,32]. Moreover, by increasing the amount of cholesteryl-PBNs in the monolayer, a global shift of the π-A isotherms towards the pure compound is observed (Fig. 2). The K_s curves of chol-PBN, chol-PBN-L and L-PBN-chol are displayed in the upper right boxes.

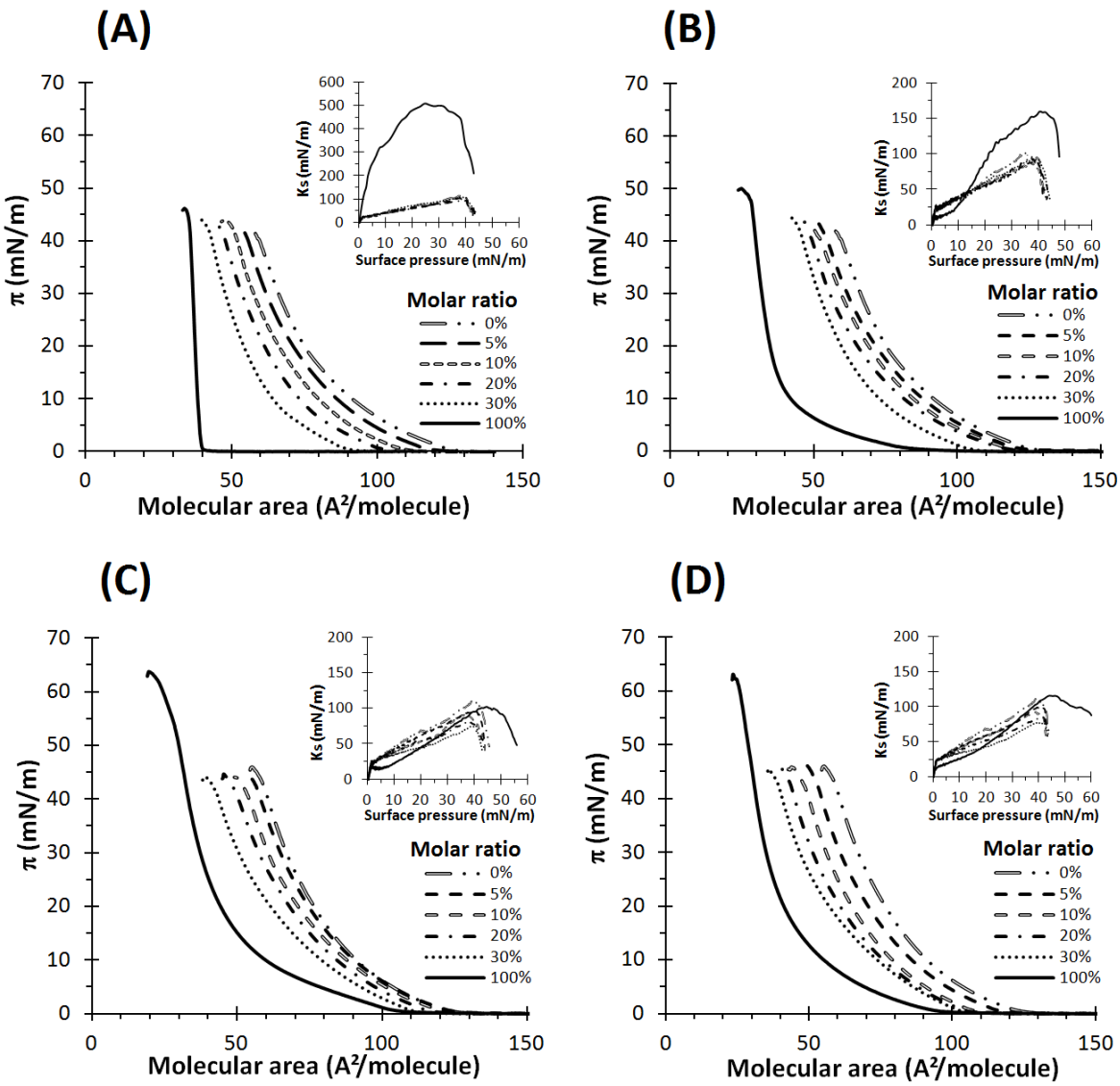


Fig. 2 Pressure-area isotherms of binary DLPC/cholesteryl-PBNs or cholesterol mixtures at different molar ratios. (A) cholesterol, (B) chol-PBN, (C) L-PBN-chol, (D) chol-PBN-L. Eighty nmoles of lipids were spread on Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. The subphase buffer was thermostated at 21°C. The panels represent the elasticity modulus (K_s) of binary DLPC/cholesteryl-PBNs or cholesterol monolayers plotted versus the surface pressure.

For the mixtures, increasing amounts of cholesteryl-PBNs led to a diminution of K_s values for the structural isomers (*i.e.* L-PBN-chol and chol-PBN-L). On the contrary, K_s values remained constant for cholesterol and chol-PBN, suggesting the presence of the sugar group modifies the lateral interactions with DLPC. Thus, by using Goodrich formula [33], we calculated the free excess energy of mixing (ΔG_{ex}) of the monolayers to study the nature of the interactions of each derivative with DLPC (Table. 2). ΔG_{ex} values were calculated at 30

mN/m, average lateral pressure of biological membranes [34] for each DLPC monolayers containing 30 mol% of cholesterol or of cholesteryl-PBNs derivatives.

Table 2 Free excess energy of mixing of DLPC monolayers containing 30% molar ratio of cholesteryl-PBNs monolayers at 30 mN/m.

	Cholesterol	Chol-PBN	L-PBN-chol	Chol-PBN-L
ΔG_{ex} (J/mole)	-124	16	459	402

For cholesterol containing monolayer, ΔG_{ex} value is weak and negative, indicating the interactions with DLPC are poorly attractive. On the contrary, with cholesteryl-PBNs, ΔG_{ex} values become positive, indicating the interactions between DLPC and the derivatives are predominantly repulsive. Repulsive interactions are more pronounced with the derivatives bearing the lactobionamide moiety as ΔG_{ex} values are above 400 J/mole, comparing to chol-PBN with 16 J/mole. These results suggest the formation of chol-PBN-L and L-PBN-chol domains inside the DLPC monolayer while the chol-PBN/DLPC mixtures seem to be monophasic.

b. Liposomes of mixed DLPC/cholesteryl-PBNs

To understand the differences observed between structural isomers and chol-PBN regarding their interactions with DLPC, we performed fluorescence spectroscopy experiments and determined the GP parameter in presence of Laurdan and Prodan to evaluate the depth of cholesteryl-PBNs inside DLPC bilayers. Thanks to its long hydrophobic chain, Laurdan has the ability to insert among the glycerol moieties of the phospholipids contrary to Prodan that is located closer to the phospholipids polar heads. These probes are sensitive to the polarity of their environment and regarding their access to water, a shift in their emission spectrum can be observed [35]. DLPC LUVs containing cholesteryl-PBNs or

cholesterol and a fluorescent probe were prepared in aqueous buffer and incubated at 37°C. Samples were excited at 360 nm and fluorescence emission spectra were recorded between 500 and 600 nm. GP values were calculated with equation 1 and summarized in Table 3.

As shown in Table. 3, GP values are negative, indicating the liposomes membranes are in a liquid disordered state. Interestingly, no significant difference was observed between the cholesteryl-PBNs and cholesterol GP values with Prodan (Table. 3), indicating that the water access to the polar headgroups of the membrane is the same. On the contrary, with Laurdan, which is deeper embedded inside the membrane than Prodan, we observed differences between cholesterol and the cholesteryl-PBNs derivatives (Table 3). As expected, cholesterol induced an ordering effect of the DLPC membrane as shown by the GP values which increase from -0.29 ± 0.04 for pure DLPC to -0.12 ± 0.02 for DLPC/cholesterol vesicles.

For chol-PBN, the GP value does not significantly differ from that of cholesterol traducing that the PBN grafting has no effect on the membrane ordering caused by cholesterol. For the two lactobionamide bearing compounds, the GP values show a disordering effect resulting from the presence of the lactobionamide moiety within the DLPC headgroup. These results are consistent with the free excess energy of mixing values (Table 3) which show repulsive interactions between DLPC and chol-PBN-L or L-PBN-chol.

This suggests that chol-PBN-L and L-PBN-chol should have the same position inside the membrane and an anchorage more superficial than chol-PBN, in agreement with the Log*P* values. We hypothesize that chol-PBN-L and L-PBN-chol should be closer to the lipids polar head, whereas chol-PBN should be closer to the membrane hydrophobic core.

Table 3 GP values of DLPC liposomes containing 30% mol of cholesteryl-PBNs with Prodan and Laurdan 37°C. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

GP value	DLPC	+ Cholesterol	+ Chol-PBN	+ L-PBN-chol	+ Chol-PBN-L
Prodan	-0.47 ± 0.02	-0.49 ± 0.01	-0.49 ± 0.01	-0.49 ± 0.01	-0.50 ± 0.01
Laurdan	-0.29 ± 0.04	-0.12 ± 0.02	-0.14 ± 0.01	-0.17 ± 0.01	-0.21 ± 0.01

3.3. Lipid peroxidation of DLPC/cholesteryl-PBNs liposomes

3.3.1. Effect on their size

Dynamic light scattering experiments were performed to evaluate the impact of cholesteryl-PBNs on the structure of liposomes during the oxidation process. DLPC liposomes containing cholesteryl-PBNs at four molar ratios (5, 10, 20 and 30%) were prepared in aqueous buffer and DLPC/cholesterol vesicles at the same molar ratios were also tested as control. Peroxyl or hydroxyl radicals were generated *in situ* by incubating liposomes at 37°C with AAPH or Fenton reagent respectively. The hydrodynamic diameter was measured before and during oxidation at 30, 60 and 120 minutes.

Before oxidation, the hydrodynamic diameter of the vesicles is 60 ± 5 nm. The percentages of diameter increase were calculated with equation 2. At the lowest molar ratios (*i.e*. 5, 10 and 20%), no significant difference is observed compared to the control, either with AAPH or Fenton reaction (data not shown). Fig. 3 represents the percentages of diameter increase for cholesterol-containing and cholesteryl-PBNs-containing liposomes at 30% molar ratios with peroxyl (Fig. 3A) and hydroxyl (Fig. 3B) radicals, respectively. As expected, a time dependent increase of the hydrodynamic diameter of pure DLPC vesicles is obtained regardless the radical used. This volume variation is already reported in the literature and it corresponds to the formation of oxidation products having a higher molecular area than the non-oxidized lipid [36–38]. In the presence of cholesterol, the

increase of the liposomes diameter is more important with both types of radicals than for DLPC vesicles.

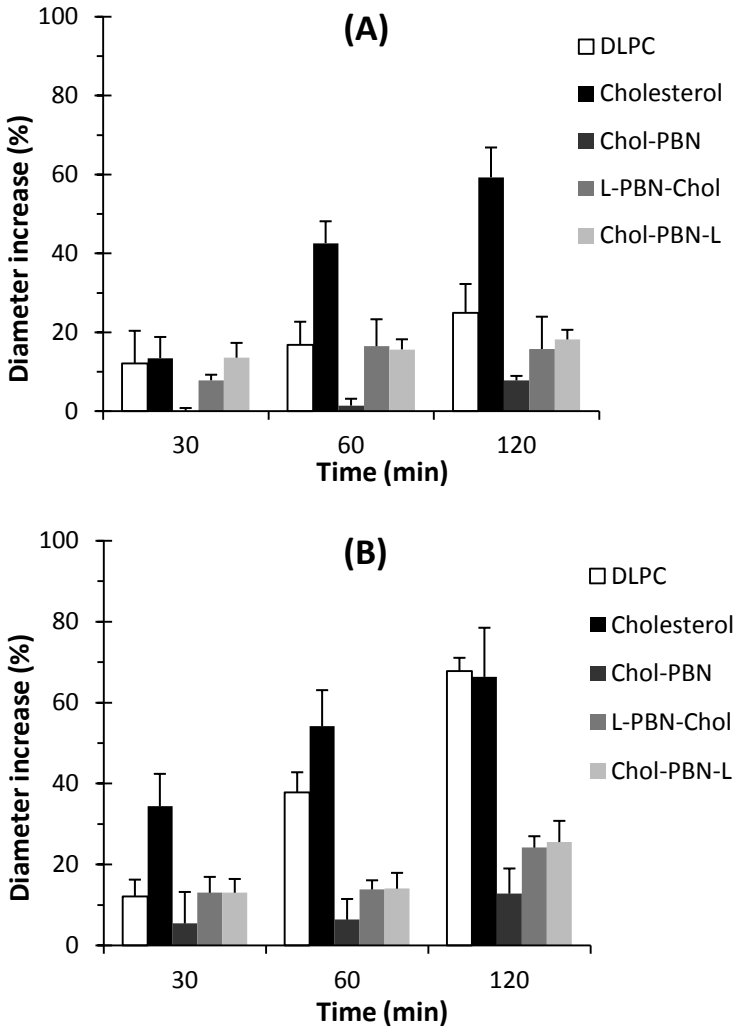


Fig. 3 Evolution of the hydrodynamic diameter of DLPC/cholesteryl-PBNs liposomes during oxidation with the highest molar ratio (*i.e.* 30%). (A) AAPH-induced oxidation, (B) Fenton-induced oxidation. Liposomes were incubated under air atmosphere at 37°C. Hydrodynamic diameter was measured by dynamic light scattering during oxidation at 30, 60 and 120 minutes. Diameter increase percentages were calculated with equation 2. Experiments were conducted by using the same lipid/radical ratios previously described. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

These results are in accordance with the literature where membrane morphology modification due to the formation of cholesterol oxidation products was observed [39–41]. On the contrary, with cholesteryl-PBNs increase in size is moderate, below 20% during the entire experiment with peroxyl radicals (Fig. 3A) and about 20% after 2h with hydroxyl

radicals (Fig. 3B). Among the cholesteryl-PBNs derivatives, the most efficient molecule to prevent SUVs swelling was chol-PBN as even after 2h of oxidation the diameter increase is below 15% for the two radicals. These results strongly suggest the protective effects of these cholesteryl-PBNs derivatives against the formation of DLPC and cholesterol oxidation products.

3.3.2. Effect on the formation of peroxidation products

To evaluate more precisely the ability of the cholesteryl-PBNs derivatives to decrease lipid peroxidation, we performed oxidative stress experiments. Thus, DLPC/cholesteryl-PBNs liposomes were prepared and the lipid oxidation was initiated by adding either AAPH or the Fenton reagent. Absorbance was measured at 234 nm to follow the formation of conjugated dienes during 2h. Then, lipid oxidation percentages were calculated with equation 3. Cholesterol was also tested as control at the same molar ratios. For the sake of the comparison, we have also tested the parent nitrone PBN with DLPC/cholesterol liposomes.

Fig. 4A and 4B show respectively the formation of conjugated dienes and the oxidation percentages over time in presence of cholesterol with a lipid peroxidation initiated by AAPH. As one can see, after 1h and regardless the percentage, the lipid oxidation is always higher in the cholesterol containing vesicles than in pure DLPC liposomes. This result confirms the pro-oxidant activity of cholesterol described in the literature [39,42,43]. With chol-PBN (Fig. 4C and 4D), the oxidation percentages are lower than for pure DLPC (except with 5 and 10 mol% after 1h of oxidation) traducing the antioxidant potency of this compound. Moreover, antioxidant efficiency is more pronounced with higher percentages of chol-PBN and in this regard, antioxidant effect seems to be optimal at 20% molar ratio. The same antioxidant

tendency is obtained for all the cholesteryl-PBNs molecules with both radical initiators (Supp. 1-2).

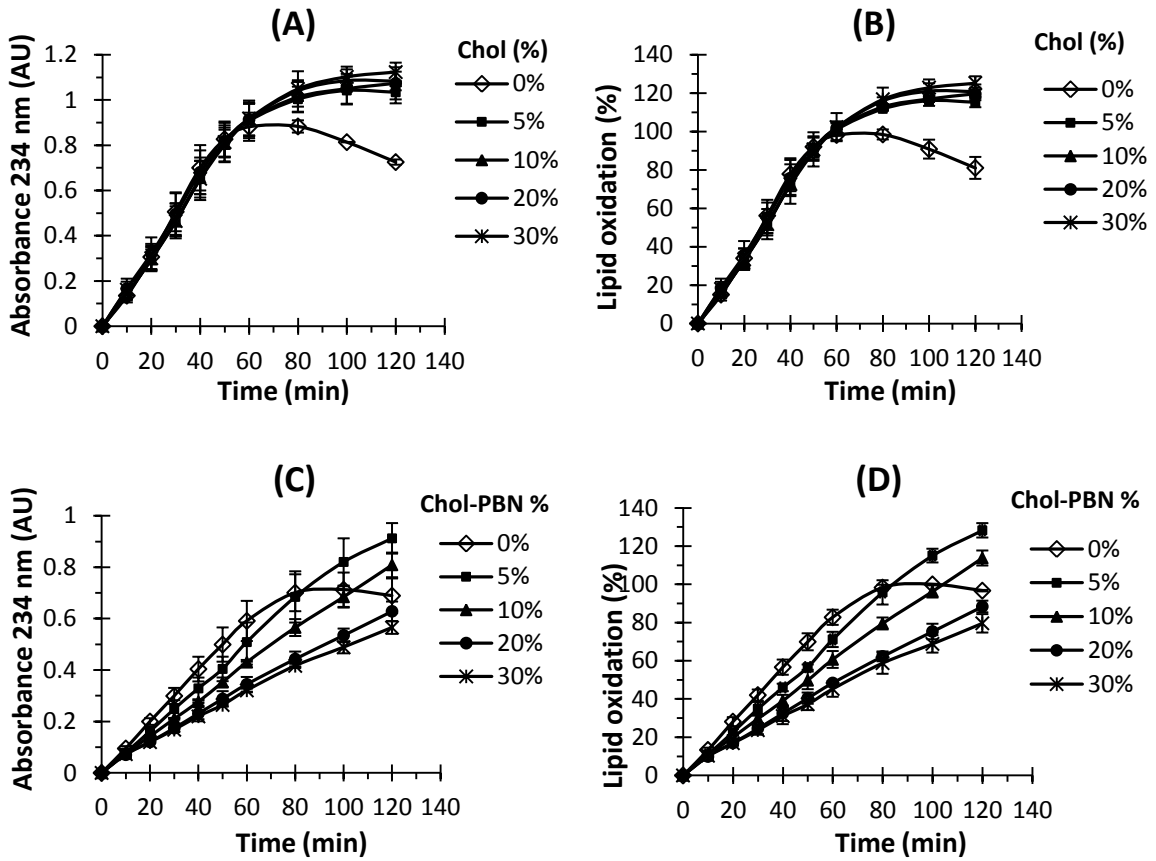


Fig. 4 Inhibition of the AAPH-induced lipid oxidation of DLPC liposomes by cholesterol and chol-PBN. (A) and (C) Absorbance at 234 nm. (B) and (D) Lipid oxidation percentages. Liposomes containing cholesterol or chol-PBN were prepared at four molar ratios: 5, 10, 20 and 30%. DLPC liposomes were also tested as control. Liposomes were incubated under air atmosphere at 37°C. The final DLPC concentration was 0.1 mg/mL. The final AAPH concentration in liposome suspension was 2mM. Absorbance was measured at 234 nm and was normalized to zero by subtracting the initial absorbance (0.90 ± 0.05). Oxidation percentages were calculated with equation 3. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

To allow an efficient comparison between the cholesteryl-PBNs derivatives and the controls (cholesterol and PBN), we have reported the lipid oxidation percentages obtained for DLPC liposomes containing 30% molar ratio of each compound after 30, 60 and 120 min of incubation with AAPH (Fig. 5A). Fig. 5A confirms that cholesterol has a pro-oxidant activity as lipid percentages are more important than those of pure DLPC. On the contrary, with chol-PBN, L-PBN-chol and chol-PBN-L, lipid oxidation levels are lowered compared to pure DLPC and to cholesterol-containing vesicles indicating their antioxidant efficiency. Up to 60 min, no significant differences in the lipid oxidation level were observed among the cholesteryl-PBNs derivatives. Though, after 2h, the L-PBN-chol derivative seems to be more efficient than the two other compounds to reduce lipid peroxidation. According to the mechanism described in the literature, PBN has poor antioxidant efficiency against peroxyl radicals-induced lipid peroxidation because it acts as a retarder by trapping alkyl radicals formed during the initiation process of membrane peroxidation rather than by trapping peroxyl radicals themselves [44].

The lipid oxidation induced by AAPH after 1h of incubation was plotted against the antioxidant concentration in mixed vesicles of DLPC/cholesterol (Fig. 5B), DLPC/chol-PBN (Fig. 5C), DLPC/L-PBN-chol (Fig. 5D), DLPC/chol-PBN-L (Fig. 5E) and DLPC/cholesterol in the presence of PBN (Fig. 5F). In presence of cholesterol, oxidation percentages are slightly higher compared to DLPC, which highlights its pro-oxidant effect. On the contrary, with cholesteryl-PBNs, the higher the molar ratio, the smaller lipid oxidation percentages are. This indicates that the derivatives are efficient in a dose-dependent manner.

The IC_{50}, which is the antioxidant concentration required to reduce the percentage of lipid oxidation by 50% in absence of antioxidant, was determined as well as the lipid oxidation

lower plateau obtained for high antioxidant concentrations and values are reported in Table 4. According to Table 4, chol-PBN-L is the most efficient derivative against AAPH-induced peroxidation with an IC_{50} of 31.6±0.2 µM, when L-PBN-chol presents an IC_{50} of 36.8±0.4 µM. The IC_{50} values of chol-PBN and PBN could not be determined as the oxidation percentages obtained for high concentrations never reached 50% of the initial oxidation rate. For the three cholesteryl-PBN derivatives, the lower plateau reached a lipid oxidation value of ~ 40% which once again confirm the poor antioxidant efficiency of PBN against AAPH-induced peroxidation.

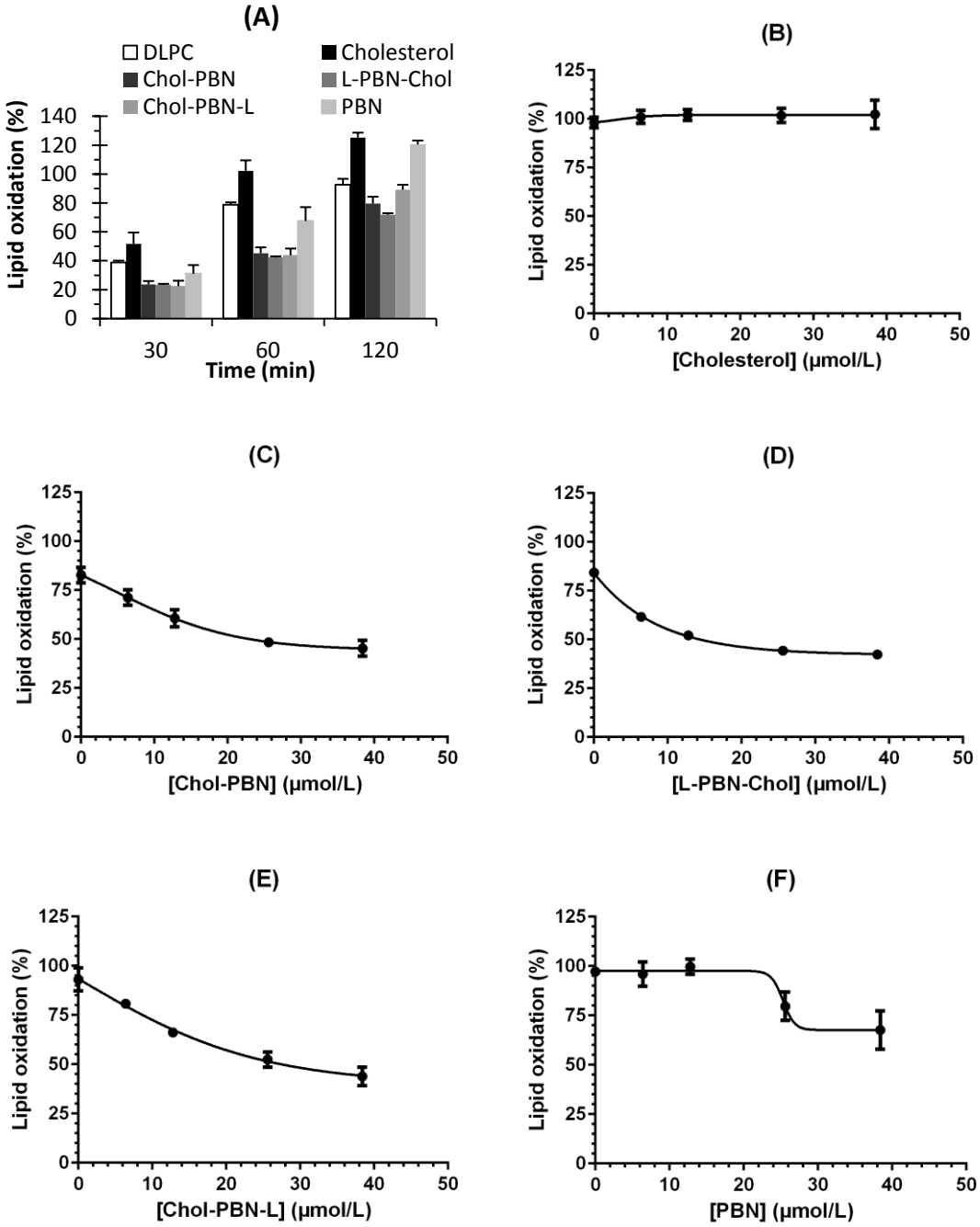


Fig. 5 Effect of cholesterol, cholesteryl-PBNs and PBN on AAPH-induced oxidation of DLPC liposomes. (A) Lipid oxidation of DLPC liposomes containing 30% molar ratio (38.4 µM) of chol, cholesteryl-PBNs and PBN. Evolution of lipid oxidation percentages with increasing concentrations of cholesterol (B), chol-PBN (C), L-PBN-chol (D), chol-PBN-L (E) and PBN (F). DLPC liposomes containing 5, 10, 20 and 30% molar ratio of cholesterol or cholesteryl-PBNs were prepared. PBN was also tested at the same molar ratios by using DLPC/cholesterol liposomes. Lipid oxidation percentages after 60 min were reported over molar ratios. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

In this work, we have shown that with L-PBN-chol, the nitrone moiety is localized deeper in the lipid membrane than with chol-PBN-L and chol-PBN. This orientation of the nitrone moiety brings then the antioxidant group closer to the initial radicals formed in the membrane allowing a better prevention of the radical chain reaction.

Table 4 IC_{50} (µM) and plateau oxidation values (%) of cholesteryl-PBNs.

		Chol-PBN	L-PBN-chol	Chol-PBN-L	PBN
AAPH	IC_{50}	-	36.8 ± 0.4	31.6 ± 0.2	-
	Low plateau	44.3 ± 0.4	42.1 ± 0.5	39.8 ± 7.3	67.6 ± 3.1
Fenton	IC_{50}	7.4 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.3 ± 0.3	-
	Low plateau	31.5 ± 3.6	21.3 ± 1.7	20.0 ± 3.0	62.7 ± 8.4

When the peroxidation is induced by the Fenton reagent, the pro-oxidant effect of cholesterol is even more pronounced than with AAPH (Fig. 6A). Concerning the PBN and the PBN derivatives, they all exhibit antioxidant efficiency even after 2h of incubation with Fenton reagent. Indeed, after 2h, the percentages of lipid oxidation dropped to 48, 35, 36 % for chol-PBN, L-PBN-chol and chol-PBN-L, respectively, and only to 76 % for PBN (Fig. 6A).

Fig. 6B-F shows the lipid oxidation after 60 min obtained for liposomes composed of DLPC/cholesterol (Fig. 6B), DLPC/chol-PBN (Fig. 6C), DLPC/L-PBN-chol (Fig. 6D), DLPC/chol-PBN-L (Fig. 6E) and DLPC/cholesterol in the presence of PBN (Fig. 6F) at different molar ratios. As one can see, cholesterol also have a pro-oxidant effect towards DLPC as oxidation percentages slightly increase with the molar ratio. In presence of cholesteryl-PBNs, oxidation percentages diminish when the concentration of cholesteryl-PBNs increases, showing their dose-dependent antioxidant efficiency. The IC_{50} values obtained are smaller than that determined with AAPH, showing the derivatives are more efficient against Fenton reagent-induced peroxidation (Table 4). Indeed, chol-PBN, L-PBN-chol, and chol-PBN-L exhibit IC_{50} of

7.4 ± 0.4, 5.4 ± 0.2 and 5.3 ± 0.3 μM respectively. The parent nitrone does not show a sufficient antioxidant efficiency to determine its IC_{50}. Moreover, the lipid oxidation observed with high antioxidant concentration is always lower than that obtained with AAPH-induced oxidation which is another proof of the higher efficiency of these components to limit peroxidation induced by Fenton reagent compared to AAPH thermolysis.

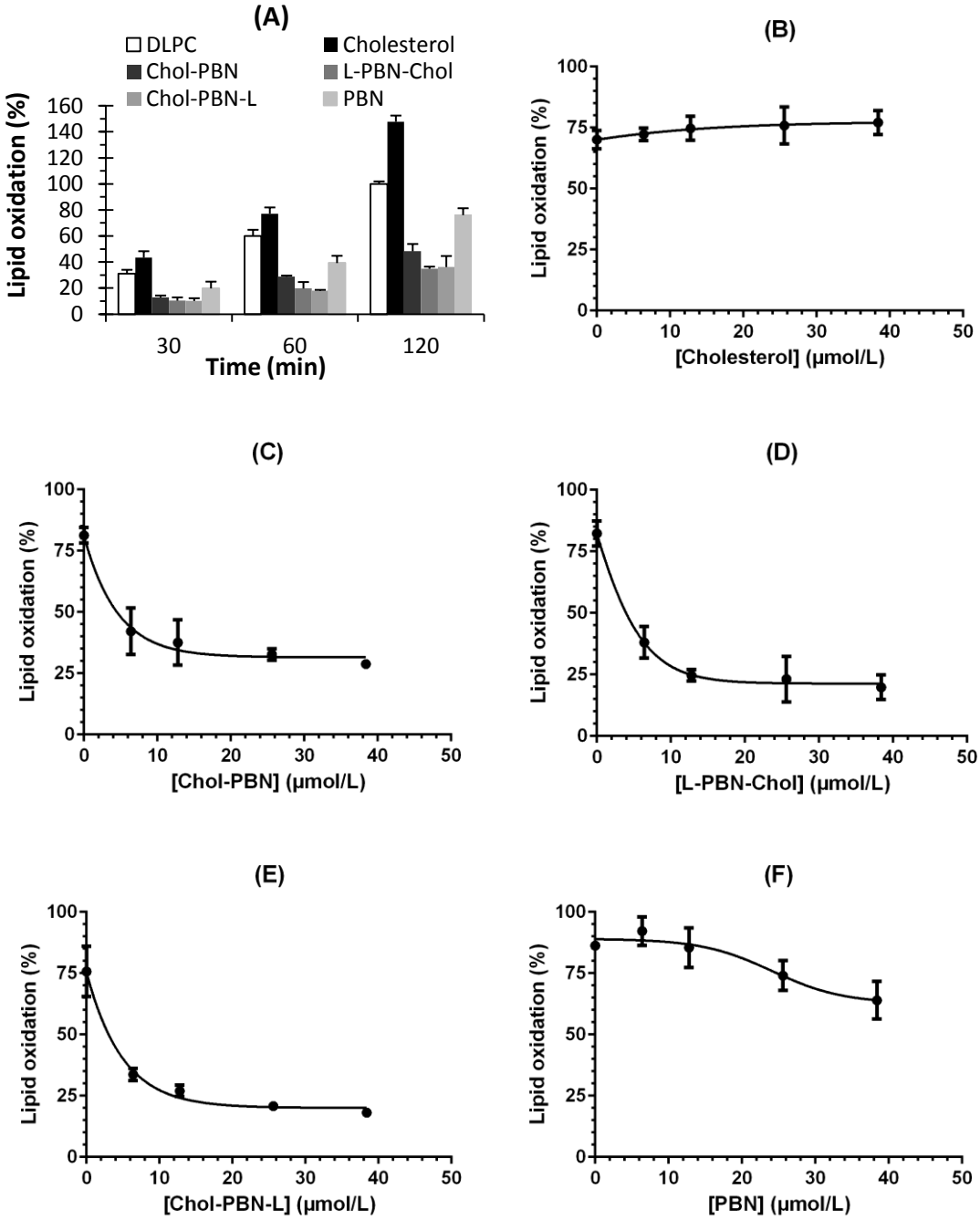


Fig. 6 Effect of cholesterol, cholesteryl-PBNs and PBN on Fenton-induced oxidation of DLPC liposomes. (A) Lipid oxidation of DLPC liposomes containing 30% molar ratio (38.4 µM) of chol, cholesteryl-PBNs and PBN. Evolution of lipid oxidation percentages with increasing concentrations of cholesterol (B), chol-PBN (C), L-PBN-chol (D), chol-PBN-L (E) and PBN (F). DLPC liposomes containing 5, 10, 20 and 30% molar ratio of chol or cholesteryl-PBNs were prepared. PBN was also tested at the same molar ratios by using DLPC/cholesterol liposomes. Lipid oxidation percentages after 60 min were reported over molar ratios. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

There is an apparent discrepancy between the two assays that estimate the oxidation of lipid vesicles. Indeed, based on the DLS measurements, chol-PBN seems to be more efficient than chol-PBN-L and L-PBN-chol whereas the conjugated dienes formation is lower in the presence of the sugar-containing compounds. The increase of the hydrodynamic diameter is an inaccurate method to measure the membrane peroxidation in liposomes. Indeed, the modification of the hydrodynamic diameter of liposomes results from the formation of primary, secondary and final peroxidation products in the membrane while the measurement of conjugated dienes is a characterization of primary peroxidation products only. Then, the DLS measurements can be used as a first approach to characterize antioxidants but not to measure their efficiency and calculate the IC_{50} parameter.

According to the literature, the nitrone moiety is able to promote Fe^{2+} oxidation into Fe^{3+} causing the inhibition of the hydroxyl radicals formation [46] and then the inhibition of the initiation step of lipid peroxidation. However, contrary to AAPH peroxyl radicals that are able to generate alkyl radicals in the membrane, no radicals are formed in the lipid membrane because the Fe^{2+} oxidation of the Fenton reagent does not allow the production of hydroxyl radicals. Regardless the nature of the oxidant, the three cholesteryl-PBN derivatives have shown significant antioxidant efficiency against lipid peroxidation, showing that the membrane localization of the antioxidant molecule is essential with only limited effect of the nature of the interactions (attractive or repulsive) among the components within the membrane.

4. Conclusion

We synthesized a cholesterol-derived nitrone called chol-PBN in which the cholesterol group is attached on the phenyl ring of the nitronyl group. Chol-PBN and two other cholesterol-derived nitrones bearing an additional sugar group, L-PBN-chol and chol-PBN-L were evaluated as potential antioxidants on liposomes. Despite the presence of the sugar moiety which modifies the nature of the interactions with DLPC, the two structural isomers L-PBN-chol and chol-PBN-L showed a good ability to protect DLPC liposomes from oxidation.

Interestingly, while the protective effect is highly pronounced against the Fenton-induced oxidation, we observed significant discrepancies against AAPH peroxyl radicals. Since L-PBN-chol is more efficient and not significantly more deeply embedded inside the membrane than chol-PBN-L, this suggests the difference in the antioxidant potency arises from a different position/localization of the nitronyl group within the membrane. Indeed, the deeper location of the nitrone moiety in L-PBN-chol increases its ability to limit the propagation step of lipid oxidation induced by AAPH thermolysis contrary to chol-PBN-L by direct trapping of alkyl radicals formed in the membrane.

This study is another proof of the absolute prerequisite for the membrane localization of antioxidants to be efficient to prevent lipid peroxidation. The cholesteryl-PBN derivatives are effective molecules against AAPH-induced and Fenton-induced oxidation because they are inserted with the lipid membrane no matter the nature of interactions among the components.

Acknowledgements

L. Socrier was the recipient of a scholarship from the French "Ministère de l'éducation nationale et de la recherche". Dr M. Rosselin and Dr F. Choteau were both recipients of a fellowship from "Région Provence Alpes Côte d'Azur". The Centre national de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de Technologie de Compiègne are gratefully acknowledged for providing facilities. We also thank Dr Bruno Ramaël for the training and the use of MatLab software.

References

[1] H.J. Forman, M. Torres, Signaling by the respiratory burst in macrophages, IUBMB Life. 51 (2001) 365–371. doi:10.1080/152165401753366122.

[2] V.J. Thannickal, B.L. Farnburg, Reactive oxygen species in cell signaling, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 279 (2000) L1005 LP-L1028. http://ajplung.physiology.org/content/279/6/L1005.abstract.

[3] Y.J. Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian, Oxidants as stimulators of signal transduction, Free Radic. Biol. Med. 22 (1996) 269–285. doi:10.1016/S0891-5849(96)00275-4.

[4] C.S. Wilcox, Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function., Curr. Hypertens. Rep. 4 (2002) 160–166. doi:10.1007/s11906-002-0041-2.

[5] Y. Taniyama, K.K. Griendling, Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms, Hypertension. 42 (2003) 1075–1081. doi:10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.

[6] V.I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, Chem. Biol. Interact. 224 (2014) 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.

[7] J. Pincemail, M. Meurisse, R. Limet, J.O. Defraigne, Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer, Vaiss. Coeur, Poumons. 4 (1999) 2–5. http://www.vcp-bhl.be/fr/home?tk_id=nosign.

[8] H. Sies, Oxidative stress: oxidants and antioxidants., Exp. Physiol. 82 (1997) 291–5. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024.

[9] R. Perfeito, T. Cunha-Oliveira, A.C. Rego, Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease—resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse, Free Radic. Biol. Med. 53 (2012) 1791–1806. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.569.

[10] K. Dasuri, L. Zhang, J.N. Keller, Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis, Free Radic. Biol. Med. 62 (2013) 170–185. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016.

[11] F. Bonomini, S. Tengattini, A. Fabiano, R. Bianchi, R. Rezzani, Atherosclerosis and oxidative stress., Histol. Histopathol. 23 (2008) 381–90. doi:10.14670/HH-23.381.

[12] H. Wiseman, B. Halliwell, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer., Biochem. J. 313 (Pt 1 (1996) 17–29.

[13] R. Wheatley, Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation, TrAC Trends Anal. Chem. 19 (2000) 617–628. doi:10.1016/S0165-9936(00)00010-8.

[14] J.M. McCord, B.B. Keele, I. Fridovich, An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68 (1971) 1024–7. doi:10.1073/pnas.68.5.1024.

[15] A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, F. Piemonte, Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification, Clin. Chim. Acta. 333 (2003) 19–39. doi:10.1016/S0009-

8981(03)00200-6.

[16] Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, B.D. Oomah, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4113–4117. doi:10.1021/jf9801973.

[17] G.M. Rosen, E. Finkelstein, Use of spin traps in biological systems, Adv. Free Radic. Biol. Med. 1 (1985) 345–375. doi:10.1016/8755-9668(85)90012-2.

[18] R.A. Floyd, H.C.C.F. Neto, G.A. Zimmerman, K. Hensley, R.A. Towner, Nitrone-based therapeutics for neurodegenerative diseases: Their use alone or in combination with lanthionines, Free Radic. Biol. Med. 62 (2013) 145–156. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.033.

[19] I. Ranchon, S. Chen, K. Alvarez, R.E. Anderson, Systemic Administration of Phenyl- N - tert -Butylnitrone Protects the Retina from Light Damage, Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. (2001) 1375–1379.

[20] I. Ranchon, M.M. LaVail, Y. Kotake, R.E. Anderson, Free radical trap phenyl-N-tert-butylnitrone protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration., J. Neurosci. 23 (2003) 6050–6057.

[21] J. Velasco, M.L. Andersen, L.H. Skibsted, Electron Spin Resonance Spin Trapping for Analysis of Lipid Oxidation in Oils: Inhibiting Effect of the Spin Trap α-Phenyl- N - tert-butylnitrone on Lipid Oxidation, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1328–1336. doi:10.1021/jf049051w.

[22] R.A. Floyd, R.D. Kopke, C.H. Choi, S.B. Foster, S. Doblas, R.A. Towner, Nitrones as therapeutics, Free Radic. Biol. Med. 45 (2008) 1361–1374. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.017.

[23] M.I. Ayuso, M. Chioua, E. Martínez-Alonso, E. Soriano, J. Montaner, J. Masjuán, D.J. Hadjipavlou-Litina, J. Marco-Contelles, A. Alcázar, CholesteroNitrones for Stroke, J. Med. Chem. 58 (2015) 6704–6709. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00755.

[24] M. Hardy, O. Ouari, L. Charles, J.-P. Finet, G. Iacazio, V. Monnier, A. Rockenbauer, P. Tordo, Synthesis and Spin-Trapping Behavior of 5-ChEPMPO, a Cholesteryl Ester Analogue of the Spin Trap DEPMPO, J. Org. Chem. 70 (2005) 10426–10433. doi:10.1021/jo0517390.

[25] M. Rosselin, F. Choteau, K. Zéamari, K.M. Nash, A. Das, R. Lauricella, E. Lojou, B. Tuccio, F.A. Villamena, G. Durand, Reactivities of substituted α-phenyl-N-tert-butyl nitrones, J. Org. Chem. 79 (2014) 6615–6626. doi:10.1021/jo501121g.

[26] F. Choteau, G. Durand, I. Ranchon-Cole, C. Cercy, B. Pucci, Cholesterol-based α-phenyl-N-tert-butyl nitrone derivatives as antioxidants against light-induced retinal degeneration., Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 7405–9. doi:10.1016/j.bmcl.2010.10.037.

[27] O. Fadel, K. El Kirat, S. Morandat, The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ., Biochim. Biophys. Acta. 1808 (2011) 2973–80. doi:10.1016/j.bbamem.2011.08.011.

[28] T. Parasassi, G. De Stasio, A. D'Ubaldo, E. Gratton, Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence., Biophys. J. 57 (1990) 1179–1186. doi:10.1016/S0006-3495(90)82637-0.

[29] E. Schnitzer, I. Pinchuk, D. Lichtenberg, Peroxidation of liposomal lipids, Eur. Biophys. J. 36 (2007) 499–515. doi:10.1007/s00249-007-0146-2.

[30] B.L. Stottrup, S. Keller, Phase behavior of lipid monolayers containing DPPC and cholesterol analogs., Biophys. J. 90 (2006) 3176–3183.

doi:10.1529/biophysj.105.072959.

[31] S. Morandat, G. Durand, A. Polidori, L. Desigaux, M. Bortolato, B. Roux, B. Pucci, PBN derived amphiphilic spin-traps. I/synthesis and study of their miscibility with polyunsaturated phospholipids, Langmuir. 19 (2003) 9699–9705. doi:10.1021/la034470t.

[32] D. Marković, UV-induced reaction kinetics in dilinoleoylphosphatidylcholine monolayers with incorporated photosensitizers, J. Serbian Chem. Soc. 71 (2006) 349–356. doi:10.2298/JSC0604349M.

[33] F.C. Goodrich, Proceedings of the Second International Congress on Surface Activity. Schulman, J. H., Butterworth Press. 1 (1957) 85.

[34] D. Marsh, Lateral pressure in membranes, Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. 1286 (1996) 183–223. doi:10.1016/S0304-4157(96)00009-3.

[35] T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R.M. Rusch, E. Gratton, Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence., Biophys. J. 60 (1991) 179–189. doi:10.1016/S0006-3495(91)82041-0.

[36] S. Ortial, S. Morandat, M. Bortolato, B. Roux, A. Polidori, B. Pucci, G. Durand, PBN derived amphiphilic spin-traps. II/Study of their antioxidant properties in biomimetic membranes, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 113 (2014) 384–393. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.08.034.

[37] R. Volinsky, R. Paananen, P.K.J. Kinnunen, Oxidized phosphatidylcholines promote phase separation of cholesterol-sphingomyelin domains, Biophys. J. 103 (2012) 247–254. doi:10.1016/j.bpj.2012.06.017.

[38] C. Grauby-Heywang, F. Moroté, M. Mathelié-Guinlet, I. Gammoudi, N.R. Faye, T. Cohen-Bouhacina, Influence of oxidized lipids on palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine

organization, contribution of Langmuir monolayers and Langmuir–Blodgett films, Chem. Phys. Lipids. 200 (2016) 74–82. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.07.001.

[39] T. Yoda, M.C. Vestergaard, Y. Akazawa-Ogawa, Y. Yoshida, T. Hamada, M. Takagi, Dynamic Response of a Cholesterol-containing Model Membrane to Oxidative Stress, Chem. Lett. 39 (2010) 1273–1274. doi:10.1246/cl.2010.1273.

[40] W. Kulig, A. Olzyńska, P. Jurkiewicz, A.M. Kantola, S. Komulainen, M. Manna, M. Pourmousa, M. Vazdar, L. Cwiklik, T. Rog, G. Khelashvili, D. Harries, V.V. Telkki, M. Hof, I. Vattulainen, P. Jungwirth, Cholesterol under oxidative stress - How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols, Free Radic. Biol. Med. 84 (2015) 30–41. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.006.

[41] A. Sevanian, A.R. Peterson, The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products, Food Chem. Toxicol. 24 (1986) 1103–1110. doi:10.1016/0278-6915(86)90295-4.

[42] S. Nagatsuka, T. Nakazawa, Effects of membrane-stabilizing agents, cholesterol and cepharanthin, on radiation-induced lipid peroxidation and permeability in liposomes, BBA - Biomembr. 691 (1982) 171–177. doi:10.1016/0005-2736(82)90226-7.

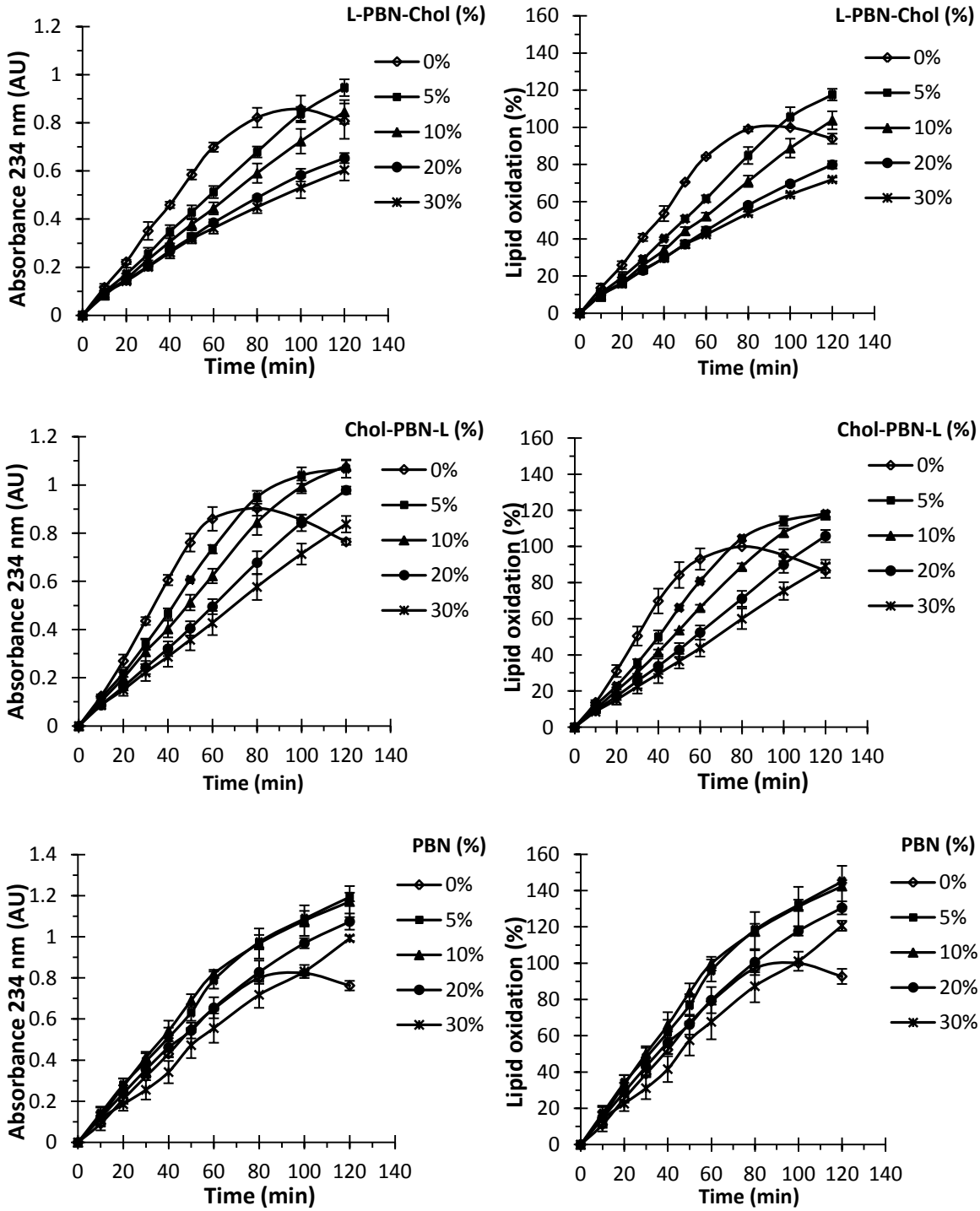
[43] A. López-Revuelta, J.I. Sánchez-Gallego, A. Hernández-Hernández, J. Sánchez-Yagüe, M. Llanillo, Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to t-BuOOH, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids. 1734 (2005) 74–85. doi:10.1016/j.bbalip.2005.02.004.

[44] L.R.C. Barclay, M.R. Vinqvist, Do spin traps also act as classical chain-breaking antioxidants? A quantitative kinetic study of phenyl tert-butylnitrone (PBN) in solution and in liposomes, Free Radic. Biol. Med. 28 (2000) 1079–1090. doi:10.1016/S0891-5849(00)00197-0.

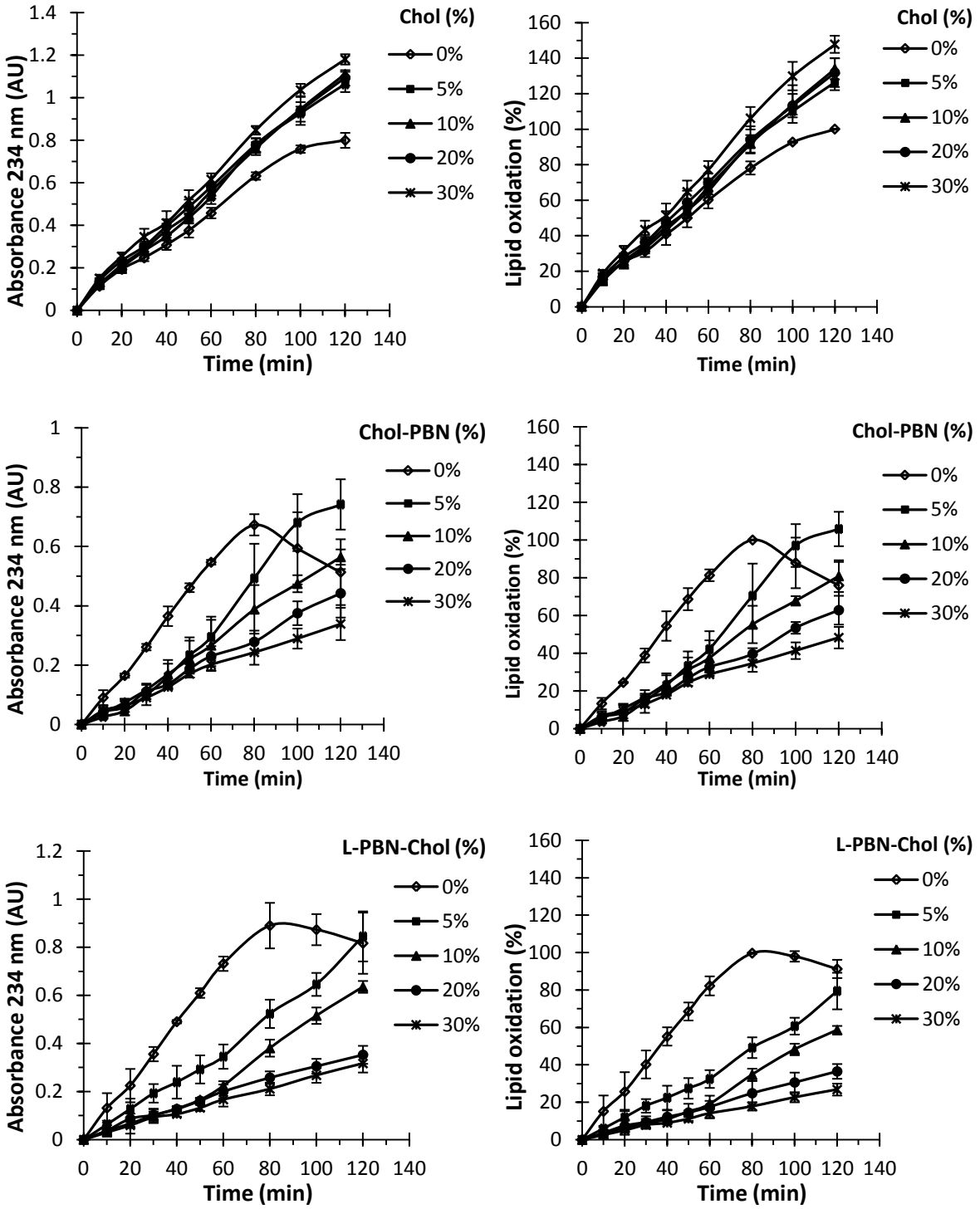
[45] G. Durand, B. Poeggeler, S. Ortial, A. Polidori, F.A. Villamena, J. Böker, R. Hardeland, M.A. Pappolla, B. Pucci, Amphiphilic amide nitrones: A new class of protective agents acting as modifiers of mitochondrial metabolism, J. Med. Chem. 53 (2010) 4849–4861. doi:10.1021/jm100212x.

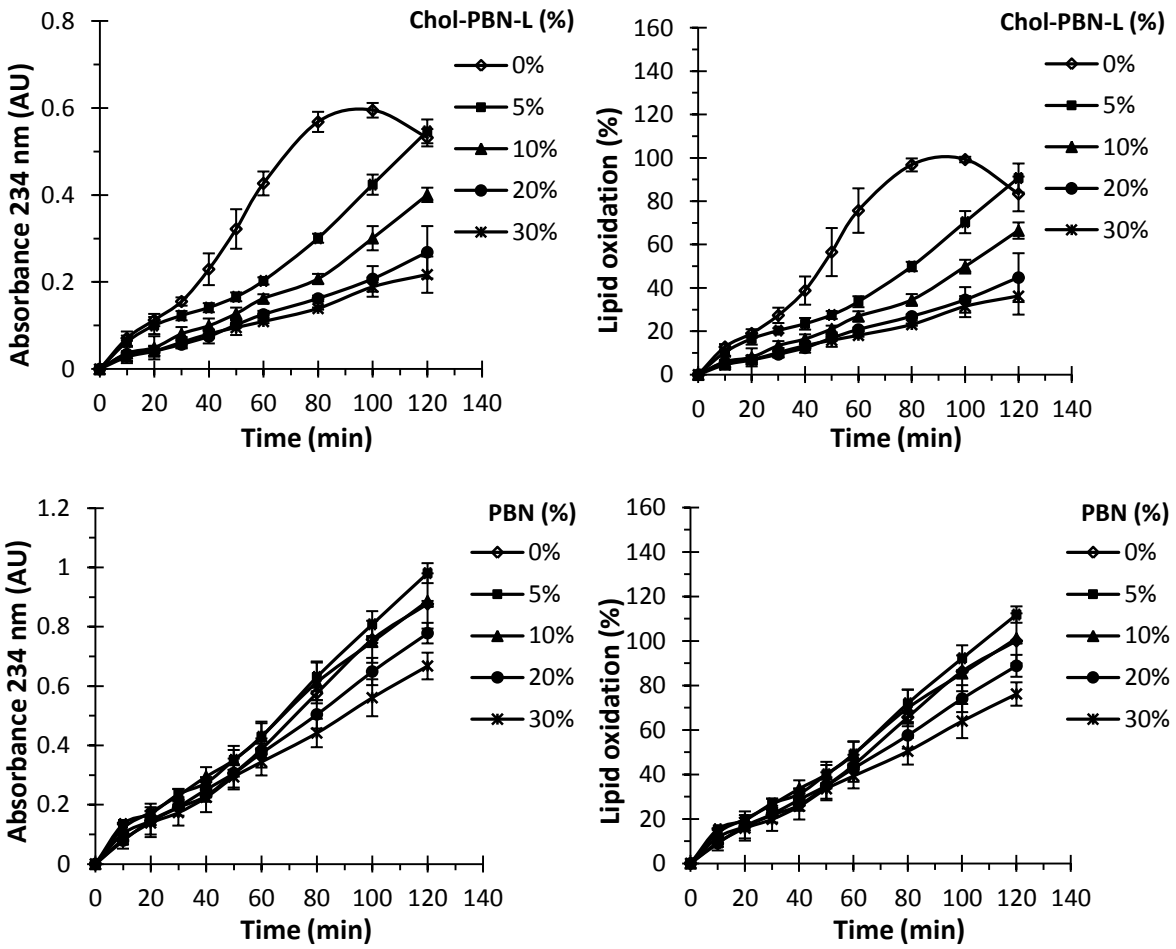
[46] S. Tero-Kubota, Y. Ikegami, T. Kurokawa, R. Sasaki, K. Sugioka, M. Nakano, Generation of free radicals and initiation of radical reactions in nitrones - Fe2+ - phosphate buffer systems., Biochem. Biophys. Res. Commun. 108 (1982) 1025–31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6295366.

Appendix A. Supplementary data



Supp. 1 Inhibition of the AAPH-induced lipid oxidation of DLPC liposomes by Chol, Cholesteryl-PBNs and PBN. (Left) Absorbance at 234 nm. (Right) Lipid oxidation percentages. Liposomes containing Chol, Cholesteryl-PBNs and PBN were prepared at four molar ratios: 5, 10, 20 and 30%. DLPC liposomes were also tested as control. Liposomes were incubated under air atmosphere at 37°C. The final DLPC concentration was 0.1 mg/mL. The final AAPH concentration in liposome suspension was 2mM. Absorbance was measured at 234 nm. Initial absorbencies were 0.90 ± 0.05 and were subtracted from each measurement to start the kinetics at zero. Oxidation percentages were calculated with eq.3. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.


Absorbance 234 nm (AU)
Time (min)
Chol (%)
0%
5%
10%
20%
30%
Lipid oxidation (%)
Chol-PBN (%)
L-PBN-Chol (%)



Supp. 2 Inhibition of the Fenton-induced lipid oxidation of DLPC liposomes by Chol, Cholesteryl-PBNs and PBN. (Left) Absorbance at 234 nm. (Right) Lipid oxidation percentages. Liposomes containing Chol, Cholesteryl-PBNs and PBN were prepared at four molar ratios: 5, 10, 20 and 30%. DLPC liposomes were also tested as control. Liposomes were incubated under air atmosphere at 37°C. The initial DLPC concentration was 0.1 mg/mL. The final H_2O_2 and $FeSO_4$ concentration in liposome suspension were 1 and 0.1 mM respectively. Absorbance was measured at 234 nm and normalized to 0. Initial absorbencies were 0.40 ± 0.05 and were subtracted from each measurement to start the kinetics at zero. Oxidation percentages were calculated with equation 1. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

Conclusions du chapitre

Pour résumer, les résultats des expériences menées avec les cholestéryl-PBNs ont montré que les dérivés sont plus hydrophobes que la PBN et qu'ils ont des propriétés amphiphiles. En outre, la présence du groupement lactobionamide modifie la nature des interactions avec les lipides et crée une ségrégation de phase dans les monocouches. Néanmoins, les dérivés sont capables de prévenir l'oxydation des lipides et de limiter la perte de structure des liposomes. Enfin, nous avons montré que les interactions des dérivés avec les chaînes acyles sont essentielles pour que l'effet antioxydant soit significatif.

Chapitre II. Les nitrones fluorées

1. Introduction

Au cours des 20 dernières années, de nombreux dérivés amphiphiles ont été synthétisés pour améliorer l'activité protectrice de la PBN. Bien que l'ajout d'un groupement hydrophobe favorise le ciblage des membranes, ce dernier présente le risque de créer un effet cytolytique à cause de ses propriétés détergentes. Pour limiter cet effet, certains auteurs ont choisi de greffer à la PBN des chaînes acyles perfluorées car elles présentent un effet détergent moindre que les groupements hydrophobes traditionnels.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'interaction de trois nitrones fluorées synthétisées par le groupe du Dr Grégory Durand avec les lipides membranaires. Nous avons montré que l'ajout de la chaîne perfluorée permet une meilleure insertion des antioxydants au sein des membranes, ce qui se traduit par un effet protecteur plus important que celui des molécules mères. Bien que la localisation membranaire des dérivés soit nécessaire pour obtenir un effet protecteur significatif, la nature de l'antioxydant semble être ici le paramètre le plus important pour l'efficacité antioxydante. Enfin, la combinaison d'antioxydants de nature différente sur une même molécule semble être une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité antioxydante et créer un effet de synergie.

2. Article 2

Nitrone-Trolox conjugate as an inhibitor of lipid oxidation:

Towards synergistic antioxidant effects

L. Socrier[a], M. Rosselin[b], A-M Gomez Giraldo[a], G. Durand[b] and S. Morandat[a]*

[a]Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, CNRS, Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, FRE 3580, Centre de recherches Royallieu – CS 60 319 - 60 203 Compiègne cedex, France;

[b]Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM) & Avignon University, Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, 301 rue Baruch de Spinoza, F-84916 Avignon Cedex 9, France.

*Corresponding author: Sandrine Morandat

E-mail address: sandrine.morandat@utc.fr. Tel: +33 3 44 23 44 18; Fax: +33 3 44 20 39 10

Article soumis pour publication.

Abstract

Free radical scavengers like α-phenyl-*N*-*tert*-butylnitrone (PBN) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) have been widely used as protective agents in various biomimetic and biological models. Amphiphilic Trolox and PBN derivatives have been designed by adding to the parent compounds a perfluorinated chain in order to increase their hydrophobicity and a sugar group to ensure water solubility. In the present work we report their physical-chemical properties and their antioxidant properties. We first demonstrated that the three derivatives were able to form monolayers at the air/water interface. We next investigated the ability of each compound to interact with DLPC as well as their efficiency against AAPH induced oxidation of DLPC liposomes. By performing surface tension and antioxidant assays, we showed the location inside membranes is important and that the nature of the nature of the antioxidant is a key parameter in their efficiency against lipid oxidation.

Key words: lipid oxidation, antioxidant, amphiphilic nitrone, spin traps, model membranes, synergism

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are essential in living organisms as they are implicated in several biological processes like signaling pathways,[1] antimicrobial defense[2] and cell adhesion.[3] However, deregulation of physiological processes as well as the exposition to external factors such as smoke[4] may favor an overproduction of ROS that will create an oxidative stress context. Membrane lipids, especially polyunsaturated lipids (PUFAs), are degraded by ROS through a chemical process called lipid peroxidation.[5] Because of their ability to degrade biomolecules, ROS have been reported to be involved in the early stages of several diseases like Alzheimer disease,[6] diabetes,[7] cell death[8] and cancers.[9]

To control the amount of reactive species, living organisms use several antioxidant defense systems that can be either endogenous (enzymes…) or exogenous. Exogenous antioxidants are mainly natural and come from food (polyphenols, vitamins…), but to improve natural antioxidants properties, synthetic molecules have been developed.

In this regard, Trolox, a water soluble analog of α-tocopherol, has been used to prevent apoptosis[10] and ischemia.[11] Trolox is also used to evaluate the antioxidant activity of compounds. Indeed, the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay is a measurement of the strength of an antioxidant. TEAC allows the comparison of the antioxidant efficiency of food and beverages, as the evaluation of single molecules is difficult in those systems.[12,13]

Because of their enhanced reactivity against free radicals, spin trapping agents are often used against free radicals.[14] Among them, α-phenyl-*N*-*tert*-butylnitrone (PBN) is certainly the most popular. PBN was first used as a spin-trap for electron spin resonance (ESR) experiments, however, it has widely been used in biological models as an antioxidant.[15,16] Although PBN presented the advantages of being a non-toxic chemically stable antioxidant

with a half-life of six hours in animals that provides a good therapeutic window,[17] it presents a poor ability to remain inside cell membranes because of its pronounced hydrophilic properties. In an attempt to create nitrones with higher hydrophobicity and affinity for membranes, several molecules deriving from nitrones have been designed. For instance, Ayuso *et al.,*[18], as well as Choteau *et al.,*[19] reported the synthesis of PBN derivatives bearing a cholesterol moiety. In both cases, the authors demonstrated that compared to PBN, the derivatives presented an enhanced protection activity against stroke and retina light-induced damages, respectively.

New Trolox and PBN amphiphilic derivatives[20,21] have recently been designed. They comprise, on one hand, a perfluorinated chain to increase hydrophobicity without inducing a cytolytic effect[22] and on the other hand, a sugar group to maintain water solubility (Fig. 1). In the present work, we studied the physicochemical properties of these derivatives as well as their antioxidant properties by using biomimetic systems. Surface tension experiments showed that the derivatives have the ability to form monolayers at the air water interface contrary to non-modified compounds, confirming their enhanced lipophilicity. By performing Langmuir monolayer and antioxidant assays, we showed that the derivatives are more efficient than the non-modified compounds and that the nature of the active moiety is a key parameter in the antioxidant efficiency.

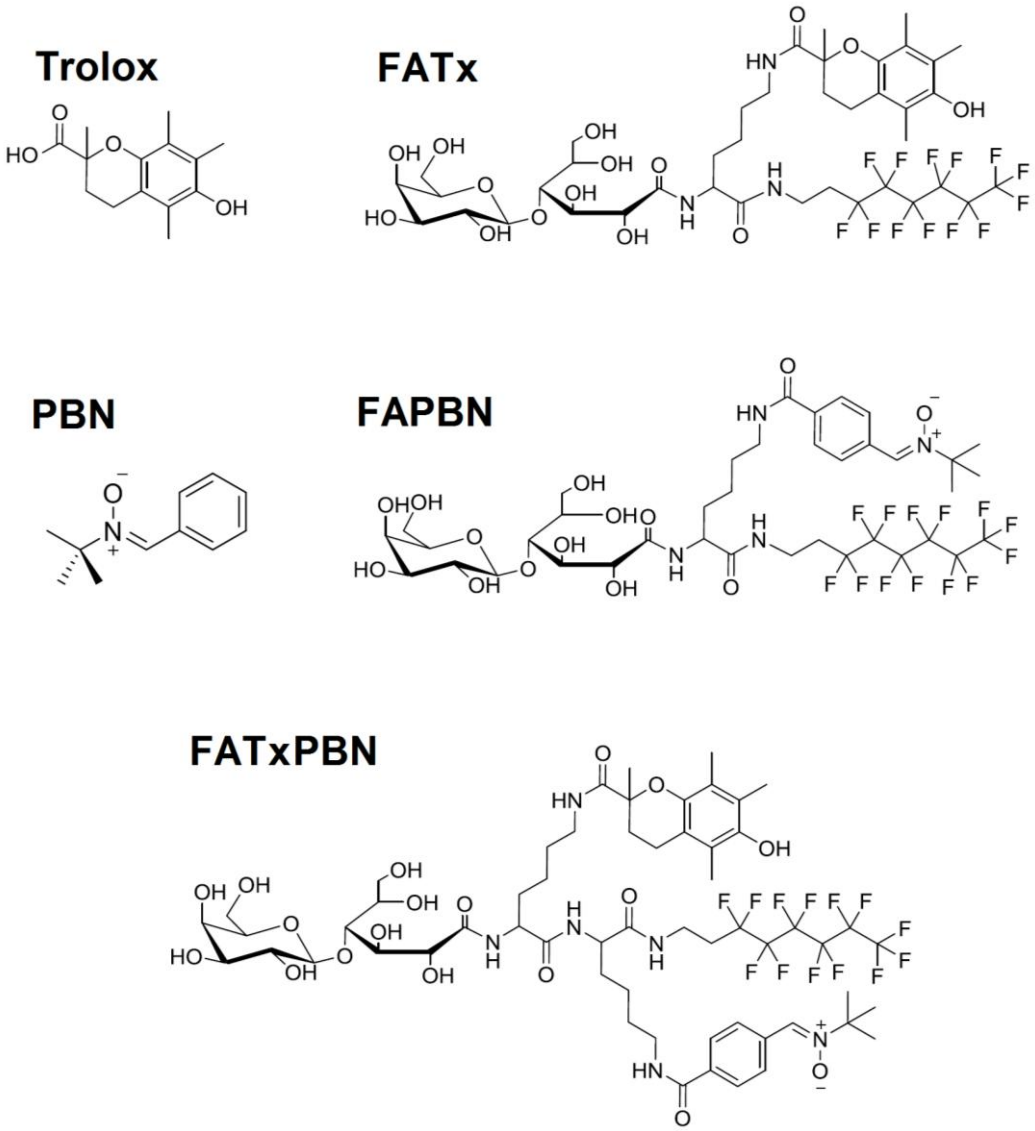


Fig. 1 Chemical structure of the molecules studied.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC), 1-palmitoyl-2-stearoyl-(5-DOXYL)-sn-glycero-3-phosphocholine (5-DOXYL PC) and 1-palmitoyl-2-steroyl-(10-DOXYL)-sn-glycero-3-phosphocholine (10-DOXYL PC) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), Trolox ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) and α-phenyl-*N*-*tert*-butylnitrone (PBN) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). FAPBN[20], FATx[20]and FATxPBN[21] were synthesized according to the procedure previously published.

The water used in all assays was purified using a Millipore filtering system (Bedford, MA), yielding ultrapure water (18.2MΩ×cm). Stock solutions of pure DLPC were prepared with chloroform for the preparation of liposomes or with hexane/ethanol 9:1 (v/v) for the monolayer studies. The antioxidants were dissolved in chloroform for liposomes studies and ethanol for the monolayers studies. Log*P* values were calculated with the software ACD/ChemSketch version 14.01. www.acdlabs.com

2.2. Surface tension experiments

All the experiments were performed at constant temperature (21.0±0.1°C). The film balance was built by Nima (Coventry, England) for adsorption experiments on a small Teflon dish. The dish (surface=19.6 cm²) was equipped with a Wilhelmy-type pressure measuring system. In these experiments, we used a subphase buffer of 62 mL continuously stirred with a magnetic stirrer spinning at 100 rpm. The buffer contained 10 mM of Hepes, 150 mM of NaCl and was adjusted to pH 7.4.

To prepare Gibbs monolayers, ethanolic solutions of antioxidants were injected in the subphase at two ranges of concentrations: from 1 to 40 µM for Trolox and PBN, and from 0.0625 to 10 µM for the fluorinated antioxidants. To study the adsorption of the fluorinated antioxidants to DLPC monolayers, DLPC was dissolved in hexane/ethanol 9:1 (v/v) and spread at the air–water interface to reach the desired surface pressure. As soon as the initial surface pressure was stabilized (~15 min), antioxidants solubilized in ethanol were injected into the subphase at a final concentration of 50 nM with an Hamilton syringe. Their adsorption at the air/lipid buffer interface was then followed by measuring the variation of surface pressure. A control experiment was also performed by injecting ethanol in the subphase, which produced no significant perturbation of the surface pressure.

2.3. Measurement of nitroxide quenching and evaluation of the depth inside the membrane

DLPC Liposomes containing only 20% (%mol) of fluorinated compound or 20% (%mol) of fluorinated compound plus 15% (%mol) of nitroxide labeled phospholipids (5-DOXYL PC or 10-DOXYL PC) were prepared with the procedure previously described.[23] Fluorescence intensities were measured for each sample with the following excitation and emission wavelengths (λ_{ex}:λ_{em}): 345:687 nm for FAPBN, 300:595 nm for FATx and 255:505 nm for FATxPBN. The distance of the antioxidants from the center of the bilayer was calculated by using the parallax equation:[24]

$$Z_{cf} = L_{c1} + (-ln\,(F_1/F_2)/\,\pi C - L_{21}^2)/2L_{21}\,(eq.1)$$

where Z_{cf} represents the distance of the compound from the center of the bilayer, L_{c1} the distance of the shallow quencher from the center of the membrane, F_1 the fluorescence intensity (F_5/F_0) in the presence of the shallow quencher (5-DOXYL PC), F_2 the fluorescence

intensity (F_{10}/F_0) in the presence of the deeper quencher (10-DOXYL PC), C the concentration of quencher in molecules/Å^2. To be more precise, C corresponds to the mole fraction of nitroxide-labeled phospholipids divided by the area per phospholipids (70 Å), *i.e.* 0.15/70 Å. At last, L_{21} corresponds to the distance between the shallow and deep quenchers. Fluorescence intensities of DLPC alone were verified and the values obtained were not significant.

2.4. Preparation of liposomes

DLPC alone or DLPC/antioxidant mixtures were dried under a stream of nitrogen and then kept under high vacuum for 2 hours to obtain a solvent-free film. The dry film was then dispersed in Hepes buffer to obtain multilamellar vesicles (MLVs). Small unilamellar vesicles (SUVs) were obtained by sonicating MLVs to clarity (3 cycles of 150 seconds) with a 500W titanium probe sonicator at 33% of the maximal power (Fisher Bioblock Scientific, France). To limit oxidation due to heat and light, sonication was performed in the dark and samples were kept in an ice bath. Then, the liposome suspension was filtered on 0.2 µm Acrodisc® (Pall Life Sciences, USA) to remove titanium particles. Liposomes size distribution was determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano-S, Malvern) and was unimodal.

2.5. Antioxidant efficiency of fluorinated derivatives

The antioxidant efficiency of the non-modified compounds as well as the derivatives was assessed by measuring the amount of conjugated dienes, which constitute the very first products of peroxidation for poly-unsaturated lipids.[5,25] Liposomes of DLPC alone or mixed with Fluorinated-antioxidants, Trolox or PBN at different concentrations were prepared in Hepes buffer. Lipid peroxidation was initiated by adding AAPH at a final concentration of 2

mM. The final concentration of DLPC for each assay was kept constant at 0.1 mg/mL. For the control assay, DLPC liposomes were tested alone. The samples were immediately incubated at 37°C. Conjugated dienes formation was measured with a Specord S300 UV–VIS spectrophotometer (Jena, Germany) at 234 nm. Results are expressed as percentages of peroxidation, calculated as follows:

$$Lipid\ oxidation\ (\%) = \frac{Absorbance_{sample}}{Absorbance\ max_{Control}} * 100\ (eq.2)$$

The curves were fitted by applying a dose-response model with variable slope with the software GraphPadPrism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

To further characterize the differences in the antioxidant efficiency of the compounds, we calculated the lag time of oxidation as follows:

$$lag\ time = time_{10/20\%}^{sample} - time_{10/20\%}^{control}\ (eq.3)$$

where $time_{10/20\%}$ is the time required to reach 10 or 20% of oxidation for the liposomes of DLPC/antioxidant 95:5 (mol/mol) (sample) and for the pure DLPC vesicles (control) respectively.

3. Results and discussion

3.1. Interfacial behavior of the antioxidants

3.1.1. Adsorption of the fluorinated derivatives at the air-buffer interface

To characterize the amphiphilicity of the antioxidants, we measured their ability to adsorb at the air-buffer interface. Different concentrations of each compound were injected in the subphase and the surface tension was recorded continuously to assess the formation of a Gibbs monolayer at the interface. Fig. 2 represents the surface activity of each compound.

The injection of 1, 5, 10, 20 and 30 µM of Trolox and PBN had only a poor effect on the surface pressure as the variations of surface pressure ($\Delta\pi$) recorded were comprised between 0 and 3 mN/m (Fig 2A, 2B). On the contrary, the fluorinated derivatives presented a high surface activity since the injection of 0.1 µM was enough to observe a non-negligible surface activity (Fig 2C, 2D, 2E). A maximal surface activity of ~ 40 mN/m was reached at only 1 µM for FATxPBN and FATx and at 3µM for FAPBN indicating that FATxPBN and FATx exhibit higher hydrophobicity compared to FAPBN. Higher concentrations (*i.e.* 5 and 10 µM) were also tested and $\Delta\pi$ values recorded remained close to 40 mN/m.

The log*P* values of the compounds were calculated and are summarized in Table 1. The three fluorinated compounds have log*P* values significantly higher their parent compounds. This indicates, as already observed, the strong contribution of a perfluorinated chain on the overall hydrophobicity of an amphiphilic molecules. Moreover the higher hydrophobicity of Trolox over PBN is clearly observed as Trolox exhibit a value of 3 while that of PBN is 1.3. This is also observed when comparing FATx and FAPBN with values of 3.8 and 2, respectively.

The same tendency is observed with the experimentally determined log k'_w values previously reported.[21] FATxPBN and FATx have log k'_w values ~ 5 times higher than Trolox when that of FAPBN is 3 times higher than PBN. These results indicate the amphiphilic derivatives are more hydrophobic than the non-modified compounds, in good agreement with the pronounced surface activity observed in the previous experiments. Taken together this shows that addition of the fluorinated chain significantly increase the hydrophobicity, and allows the formation of stable monolayers at the air-water interface.

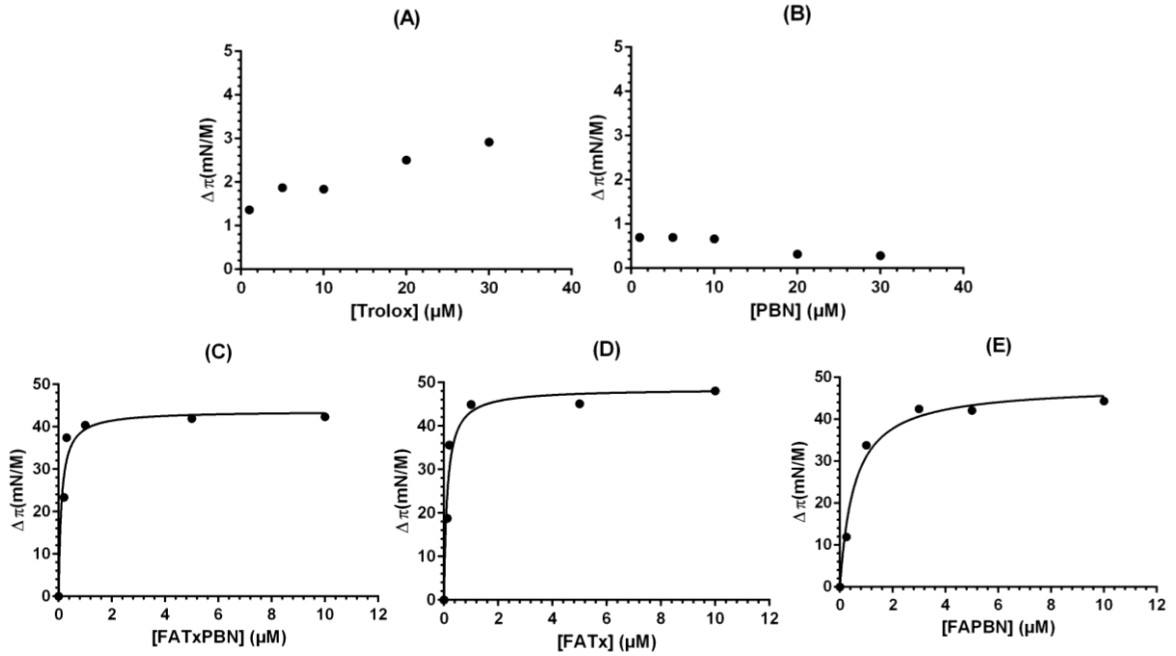


Fig. 2 Surface activities (Gibbs monolayers) of the compounds at the air/water interface. (A) Trolox, (B) PBN, (C) FATxPBN, (D) FATx and (E) FAPBN. Antioxidants were injected at different concentrations in the subphase and surface pressure was recorded after 5 min. The subphase buffer contained 10 mM of Hepes and 150 mM of NaCl. The pH was adjusted at 7.4. Data was fitted with a Langmuir equation with GraphPadPrism software.

Table 1 Log*P* values of the antioxidants.

	Trolox	PBN	FATxPBN	FATx	FAPBN
Log*P*	3.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3	4.2 ± 1.1	3.8 ± 1.0	2.0 ± 1.0

3.1.2. Interactions with an unsaturated phospholipid

To evaluate the ability of each compound to interact with DLPC, we performed adsorption at lipid monolayers assays. DLPC monolayers were prepared at different initial pressures and the compounds were injected in the subphase. The variation of pressure was recorded to evaluate the ability of the compounds to modify the surface activity of the monolayer. In order to avoid that the surface activity of the fluorinated compounds interacts with the measurements, they were injected at low concentration (0.05 μM) since at concentrations inferior to 0.1 μM they all presented a negligible surface activity (see Fig 2). Fig 3 represents the variation of pressure ($\Delta\pi$) over the initial surface pressure. As one can see, injection of

the non-modified compounds (Fig 3A, 3B) had a small effect on the surface pressure as $\Delta\pi$ remains under 3 mN/m, independently of the initial pressure. On the contrary, injection of fluorinated derivatives (Fig 3C, 3D, 3E) caused an immediate increase of the surface pressure and $\Delta\pi$ diminished when the initial pressure was increased. The linear regression led to the maximal insertion pressure (MIP), which designates the highest pressure that fluorinated derivatives can penetrate monolayers.[26] As reported in Table 2, FATxPBN, FATx and FAPBN possess MIPs of 51.5, 48.6 and 39.5 mN/m, respectively. Because all the MIPs are superior to 30-35 mN/m, which have been reported to be the average lateral pressure of biological membranes,[27] this suggests that fluorinated compounds may have the ability to penetrate bilayers at a physiological pressure. As fluorinated derivatives can insert in the membrane contrary to the parent antioxidants, we concluded that the addition of the fluorinated chain has increased their affinity for DLPC.

Calvez and co-workers[26] reported that in addition of the MIP, another parameter can be used to evaluate the affinity of the fluorinated compounds for DLPC. Indeed, the extrapolation from an initial surface pressure of 30 mN/m allowed us to determine the $\Delta\pi_{30mN/m}$ which reflects the quantity of fluorinated derivatives associated to the monolayer. As reported in Table 2, FATxPBN and FATx have $\Delta\pi_{30}$ values ~ 4 times higher than FAPBN (9.9 and 9.0 versus 2.3 mN/m). This result indicates that the amount of FATxPBN and FATx inserted in the membrane is much more important.

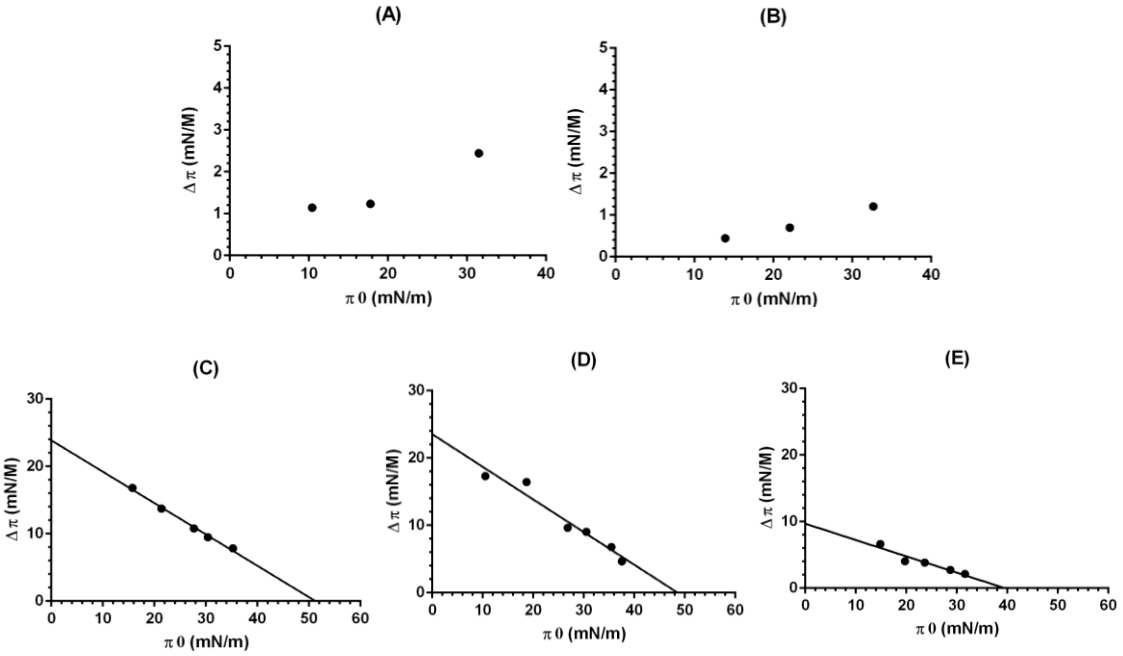


Fig. 3 Determination of the maximal insertion pressure (MIP) of fluorinated derivatives inside DLPC monolayers. (A) Trolox, (B) PBN, (C) FATxPBN, (D) FATx, (E) FAPBN. DLPC monolayers at different initial surface pressure were spread on a buffer containing 10 mM Hepes and 150 mM NaCl. The pH was adjusted at 7.4. All the compounds were injected under the monolayer at a final concentration of 50 nM.

Table 2 Summary of MIP and $\Delta\pi_{30mN/m}$ values of the fluorinated compounds.

	FATxPBN	FATx	FAPBN
MIP (mN/m)	51.5 ± 3.3	48.6 ± 5.3	39.5 ± 5.9
$\Delta\pi_{30}$ (mN/m)	9.9 ± 0.8	9.0 ± 1.5	2.3 ± 1.1

3.2. <u>The hydrophobic properties influence the insertion of the derivatives inside the membrane</u>

We demonstrated that the three fluorinated derivatives are able to interact with DLPC monolayers, however, differences of affinity were observed and were correlated to the overall hydrophobicity. To precisely evaluate the position of the derivatives inside the membrane, we used the parallax method.[24] DLPC liposomes containing the fluorinated compounds and a nitroxide-labeled lipid (DOXYL-5-PC or DOXYL-10-PC) were prepared and

we measured the fluorescence intensities from which the distance of each compound from the center of the membrane were evaluated. Distances of the nitroxide groups from the center of the membrane were 12,2 Å for 5-DOXYL PC and 6,1 Å for 10-DOXYL PC.[24] Z_{cf} values are reported in Table 3. As one can see, FATxPBN and FATx are embedded deeper inside the membrane comparing to FAPBN. Along with log*P*, we observe that the higher the hydrophobicity, the deeper the molecules are inserted with a good correlation (Supp 1). These results are in accordance with $\Delta\pi_{30mN/m}$ values, which suggest that FAPBN has less affinity for the membrane than the other compounds.

Table 3 Distance of the fluorinated derivatives from the center of the bilayer.

	FATxPBN	**FATx**	**FAPBN**
Z_{cf} (Å)	8.7 ± 0.1	9.2 ± 0.2	12.3 ± 1.0

3.3. <u>The fluorinated derivatives do not modify the membrane's structure</u>

To evaluate the impact of the insertion of the derivatives on the membrane's integrity, we performed calcein release experiments. DLPC liposomes containing calcein were prepared and the fluorinated antioxidants were added to the samples and fluorescence intensities were measured during 2 hours to evaluate the calcein leakage. In all cases, the addition of the antioxidant caused a weak leakage of the liposomes, but the percentages remain under 5% during the entire experiment (data not shown). The addition of Triton X100 after two hours caused a significant increase of the fluorescence intensity due to the release of the total amount of encapsulated calcein. Because the injection of these compounds did not significantly modify the calcein leakage, we concluded that their insertion has no significant effect on the structure of the membrane. Contrary to Frotscher and co-workers,[28]

who observed a solubilization of lipid bilayers during their incubation with fluorinated compounds, our assays did not reveal significant modification of the permeability of the membrane, indicating the fluorinated derivatives do not solubilize the membranes. This is certainly due to the fact that they tested concentrations much more important than ours (2 mM versus 5 µM).

3.4. Fluorinated derivatives and non-modified compounds inhibit lipid oxidation

Previous experiments allowed us to demonstrate that the non-modified compounds have less affinity for DLPC comparing to the fluorinated derivatives that penetrate DLPC monolayers. In order to evaluate the capacity of the compounds to decrease lipid oxidation, we measured the inhibition of the AAPH-induced oxidation of DLPC. Fig 4A represents the oxidation percentages over time in presence of FATxPBN. As one can see, oxidation percentages increase over time, regardless of the concentration of FATxPBN. In absence of FATxPBN, oxidation percentages increase until reaching a plateau at 60 minutes. Indeed, as conjugated dienes are primary products of lipid oxidation,[5,25] they constitute the major products at the beginning of the kinetics. However, after 80 minutes, lipid oxidation percentages begin to decrease as the oxidation continues beyond the conjugated dienes stage. In fact, conjugated dienes are progressively replaced by secondary peroxidation products that are not detected at 234 nm. With increasing concentrations of FATxPBN, we noticed a gradual diminution of the percentages, showing its dose-dependent antioxidant efficiency (Fig. 4A). The same tendency was observed with Trolox, FATx and FAPBN (data not shown).

To allow a better comparison of the antioxidant efficiencies, we reported oxidation percentages after 80 minutes (the time necessary to reach the plateau in absence of

antioxidant) over the antioxidant concentration (Fig 4B-F). For FATxPBN and FATx, molar ratios comprised between 1.25 and 2.5% seem to be enough to reach the maximal antioxidant efficiency. FAPBN seems to be less efficient as saturation was reached with ratios comprised between 20 and 30%. No significant antioxidant efficiency was observed for PBN, even at high concentrations (*i.e.* 30-40 µM). Half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}), defined as the concentration necessary to half-reduce the oxidation from the initial response (*i.e.* in absence of antioxidant), were determined and values are reported in Table 2. Trolox, FATxPBN, FATx and FAPBN present IC_{50} values of 4.0, 0.62, 0.93, and 29.5 µM, respectively.

The comparison between the non-modified compounds shows that Trolox is a much better antioxidant against peroxyl radicals than PBN since no IC_{50} was observed for PBN. This observation is in agreement with previous work, where we showed that Trolox was more efficient than PBN to neutralize ABTS radicals.[21] As for the fluorinated derivatives, they all possess lower IC_{50} than their parent compounds. Indeed, FATxPBN and FATx have IC_{50} ~ 5 times lower than Trolox (0.62 and 0.93 µM versus 4.0 µM) and FAPBN presented an IC_{50} of 29.5 µM while PBN has no IC_{50}.

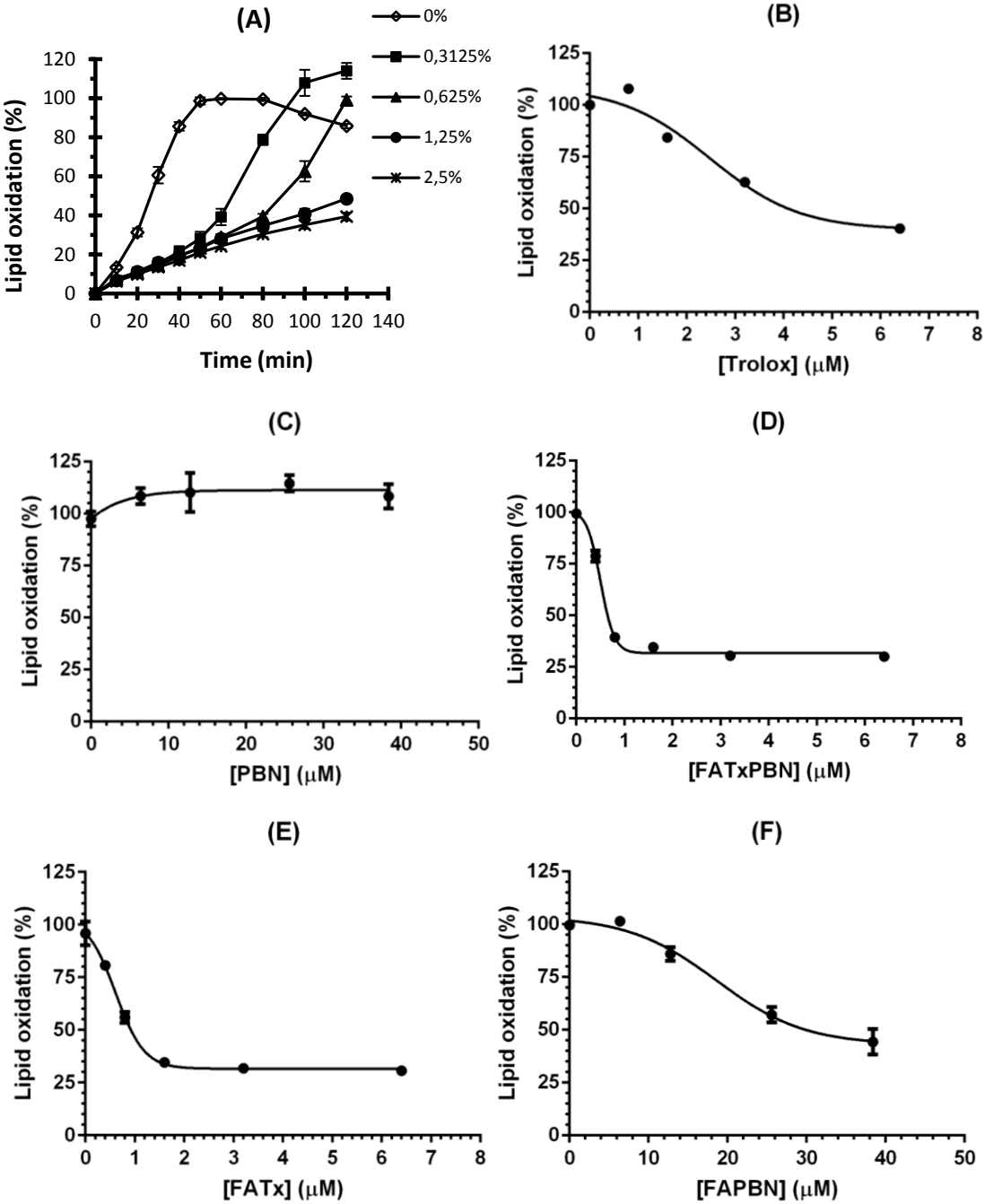


Fig. 4 Inhibition of the AAPH-induced oxidation of DLPC liposomes by FATxPBN and determination of the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of each compound. (A) Lipid oxidation percentages with increasing concentrations of FATxPBN. Determination of the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of Trolox (B), PBN (C), FATxPBN(D), FATx (E) and FAPBN (F). Liposomes were incubated under air atmosphere at 37°C during two hours. The final DLPC concentration was 0.1 mg/mL. The final AAPH concentration in liposome suspension was 2 mM. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

Table 4 IC_{50} (µM) values of the antioxidants.

	Trolox	PBN	FATxPBN	FATx	FAPBN
IC_{50} (µM)	4.0 ± 1.0	-	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	29.5 ± 2.9

To further discriminate between the antioxidant efficiencies of the two most efficient compounds (FATxPBN and FATx), we have determined the lag times which represent the time required to reach either 10 or 20% of lipid oxidation for DLPC liposomes containing the same amount of the different antioxidants, *i.e.* 5 mol% (Fig. 5). As one can see, except PBN and FAPBN at 20% oxidation (1.5±2.0 and 6.0±1.0 min, respectively), the lag times of fluorinated compounds are not significantly different compared to non-modified compounds. In the case of FATxPBN, the lag time was significantly higher at 10 and 20% oxidation than for all the compounds which suggest that this molecule is able to delay the oxidation process. In accordance with previous results, these data allowed us to conclude that the chemical modification (*i.e.* the addition of the perfluorinated chain) significantly improves the antioxidant efficiency of the parent compounds.

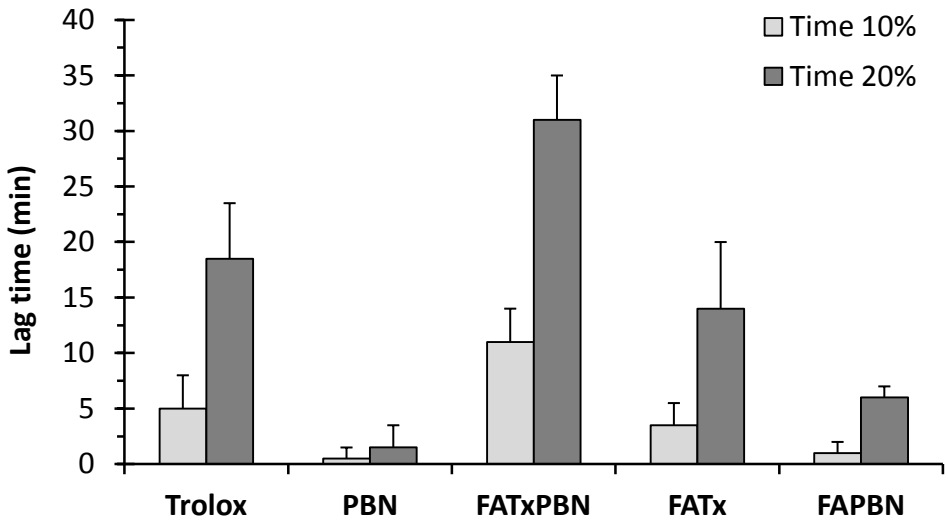


Fig. 5 Lag time necessary to reach 10 and 20% of oxidation. Liposomes containing 5 % molar ratios of each compound were prepared and the oxidation launched as previously described. Lag times were calculated with eq. 3. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

The antioxidants assays conducted in this work highlight that the three fluorinated derivatives are much more efficient than their parent compounds. However, significant discrepancies are observed between the derivatives as FATxPBN and FATx possess IC_{50} ~ 32 times higher than FAPBN. The differences observed between FAPBN and the two other fluorinated compounds can be explained by the fact that FATxPBN and FATx are more deeply inserted in the membrane than FAPBN very likely due to their enhanced hydrophobicity (Table 3). It has been reported that a location close to the phospholipids acyl chains favors a better inhibition of lipid oxidation which clearly supports our hypothesis.[29] Moreover, Azouzi and co-workers recently reported that serotonin has the ability to bind and protect DLPC enriched membranes from oxidation.[30] They suggested its frequent interactions with phospholipids acyl chains might inhibit the propagation step of lipid oxidation. However, while FATx and FAPBN have very similar chemical structures, the difference in their antioxidant potency suggests that other parameters are involved. The nature of the antioxidant moiety seems to play a crucial role. This is also supported by the fact that Trolox outcompete PBN and therefore the nature of the antioxidant appears to be the most important parameter for the antioxidant efficiency while the amphiphilicity, by ensuring a deeper localization within the membrane, improves the protection.

With an IC_{50} of 0.6 µM, FATxPBN has shown the highest antioxidant activity of all the compounds. Because its IC_{50} is smaller than the average of FATx and FAPBN, we suggest that the presence of Trolox and PBN on the same carrier creates a synergistic antioxidant effect.

Several researchers have reported on synergistic effects created by combining different antioxidants. For instance, it has been reported that the combination of β-carotene and α-tocopherol results in a better protection of rats liver microsomes from oxidative stress.[31] According to the authors, β-carotene, which has a poor antioxidant effect alone, may protect

α-tocopherol by forming a β-carotene peroxyl radical. Recently, Trolox have been mixed with caffeic acid phenethyl ester (CAPE) to create a synergistic antioxidant effect.[32] The authors attributed the enhanced protection of rats liver microsomes from radiation-induced oxidative stress to weak interactions (hydrogen bonds) between Trolox and CAPE. Trolox has also been combined to nitrones to create nitrone derivatives of Trolox.[40] Preliminary *in vitro* and *in vivo* experiments revealed they are more efficient than the parent compounds against lipid oxidation and ischemia.

Because FATxPBN and FATx have very close IC_{50} values (0.6 and 0.9 µM), synergism between Trolox and PBN may not seem obvious at first. Synergism between antioxidants can happen through different mechanisms like sacrificial oxidation,[33] regeneration or other mechanisms.[34] In the case of sacrificial oxidation, one antioxidant protects the other by free radical scavenging, when for regeneration, one antioxidant is oxidized to renew the second one. A famous example of regeneration is the interaction between vitamin E and vitamin C.[35]

In our case, the ability of FATxPBN to strongly delay lipid oxidation compared to other antioxidants (Fig. 5) suggest that FATxPBN combines the retarding effect of PBN[36] with the chain breaking activity of Trolox[37] to create a synergistic effect by retardation. At first, the PBN moiety seems to delay the oxidation during 60 minutes, as oxidation percentages of liposomes are the same, regardless of the concentration of FATxPBN (Fig. 4A). Then, the dose-dependent antioxidant efficiency observed may be attributed to the Trolox moiety, as FAPBN is slightly efficient against AAPH-induced oxidation (Fig 4F). The lag times previously determined are in accordance with this hypothesis, as the time to reach 20% of oxidation with FATxPBN is significantly higher than the other compounds.

Our group has previously reported the synthesis of PBNLP, a divalent antioxidant bearing a PBN and a lipoic acid moiety.[39] No synergistic antioxidant effect was observed as PBNLP

and its individual constituents showed a similar ability to protect red blood cells from AAPH-induced hemolysis. However, the combination of the two moieties on the same carrier strongly diminished the antagonist effect observed between the individual compounds. Other researchers attempted to combine different types of antioxidants to generate synergistic effects. For instance, lipoic acid have been combined to Trolox[41] as well as a nitric oxide synthase inhibitor[42] with the objective to obtain greater protective effects. Preliminary experiments on biological systems highlighted that the divalent antioxidants have better abilities to prevent neuronal damage caused by glutamate and oxidation of rat microsomal membrane lipids. Recently, Vavrilokova and co-workers, through enzymatic reactions, combined silybin to ascorbic acid, Trolox alcohol or tyrosol to obtain divalent antioxidants.[43] Among all the compounds, the derivative combining silybin to ascorbic acid showed the highest ability to protect rat microsomes from lipid oxidation. Thus, our results, in accordance with literature, suggest that the strategy of grafting two antioxidants on the same carrier to enhance the antioxidant efficiency deserves attention.

Conclusion

Amphiphilic fluorinated antioxidants that possess either a Trolox or a PBN moiety or both of them were studied as antioxidants in model membranes. The comparison with the parent compounds revealed that making them amphiphilic is beneficial in multiple aspects. The addition of the perfluorinated chain enhances the hydrophobicity, giving the antioxidants the ability to form monolayers at the air-water interface. Because the derivatives present higher hydrophobicity, they can penetrate DLPC membranes, which results in a pronounced antioxidant efficiency compared to the non-modified compounds. Interestingly, even if PBN is not efficient against AAPH-induced lipid oxidation, its combination with a Trolox moiety on a same carrier creates a synergistic effect that improves the global antioxidant efficiency of these molecules. Because of their enhanced hydrophobicity, these compounds may have various applications in cosmetics and food industry as preservatives.

Acknowledgements

L. Socrier was the recipient of a scholarship from the French “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”. Dr Marie Rosselin was the recipient of a fellowship from the “Provence Alpes Côte d’Azur” regional council. The Centre national de la recherche scientifique (CNRS), the Université de Technologie de Compiègne and the University of Avignon are gratefully acknowledged for providing facilities and financial support.

Contributions

G.D and S.M conceived this research. M.R synthesized the fluorinated derivatives. L.S and A-M.G performed the experiments with model membranes. L.S analyzed the data and wrote the article with the help of G.D and S.M.

References

(1) Apel, K.; Hirt, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55* (1), 373–399 DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.

(2) Forman, H. J.; Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *166* (12 Pt 2), S4-8 DOI: 10.1164/rccm.2206007.

(3) Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82* (1), 47–95 DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.

(4) Pincemail, J.; Meurisse, M.; Limet, R.; Defraigne, J. O. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaiss. Coeur, Poumons* **1999**, *4*, 2–5.

(5) Wheatley, R. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2000**, *19* (10), 617–628 DOI: 10.1016/S0165-9936(00)00010-8.

(6) Sultana, R.; Perluigi, M.; Butterfield, D. A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *62*, 157–169 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.027.

(7) Kojda, G. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **1999**, *43* (3), 562–571 DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00169-8.

(8) Circu, M. L.; Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48* (6), 749–762 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.

(9) Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* **2006**, *5* (1), 14 DOI: 10.1186/1477-3163-5-14.

(10) Forrest, V. J.; Kang, Y.-H.; McClain, D. E.; Robinson, D. H.; Ramakrishnan, N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16* (6), 675–684 DOI: 10.1016/0891-5849(94)90182-1.

(11) Sagach, V. F.; Scrosati, M.; Fielding, J.; Rossoni, G.; Galli, C.; Visioli, F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E. *Pharmacol. Res.* **2002**, *45* (6), 435–439 DOI: 10.1006/phrs.2002.0993.

(12) Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84* (4), 407–412 DOI: 10.1042/cs0840407.

(13) van den Berg, R.; Haenen, G. R. M. M.; van den Berg, H.; Bast, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* **1999**, *66* (4), 511–517 DOI: 10.1016/S0308-8146(99)00089-8.

(14) Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *200* (1), 1–16 DOI: 10.1016/0003-9861(80)90323-9.

(15) Floyd, R. A.; Hensley, K.; Forster, M. J.; Kelleher-Andersson, J. A.; Wood, P. L. Nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, *123* (8), 1021–1031 DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00385-2.

(16) Doblas, S.; Saunders, D.; Kshirsagar, P.; Pye, Q.; Oblander, J.; Gordon, B.; Kosanke, S.; Floyd, R. A.; Towner, R. A. Phenyl-tert-butylnitrone induces tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44* (1),

63–72 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.006.

(17) Floyd, R. A.; Neto, H. C. C. F.; Zimmerman, G. A.; Hensley, K.; Towner, R. A. Nitrone-based therapeutics for neurodegenerative diseases: Their use alone or in combination with lanthionines. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *62*, 145–156 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.033.

(18) Ayuso, M. I.; Chioua, M.; Martínez-Alonso, E.; Soriano, E.; Montaner, J.; Masjuán, J.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Marco-Contelles, J.; Alcázar, A. CholesteroNitrones for Stroke. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (16), 6704–6709 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00755.

(19) Choteau, F.; Durand, G.; Ranchon-Cole, I.; Cercy, C.; Pucci, B. Cholesterol-based α-phenyl-N-tert-butyl nitrone derivatives as antioxidants against light-induced retinal degeneration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7405–7409 DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.10.037.

(20) Ortial, S.; Durand, G.; Poeggeler, B.; Polidori, A.; Pappolla, M. A.; Böker, J.; Hardeland, R.; Pucci, B. Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers: A new class of protective agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (9), 2812–2820 DOI: 10.1021/jm060027e.

(21) Rosselin, M.; Meyer, G.; Guillet, P.; Cheviet, T.; Walther, G.; Meister, A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Durand, G. Divalent Amino-Acid-Based Amphiphilic Antioxidants: Synthesis, Self-Assembling Properties, and Biological Evaluation. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (3), 772–781 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00002.

(22) Der Mardirossian, C.; Krafft, M. P.; Gulik-Krzywicki, T.; Le Maire, M.; Lederer, F. Perfluoroalkylphosphocholines are poor protein-solubilizing surfactants, as tested with neutrophil plasma membranes. *Biochimie* **1998**, *80* (5–6), 531–541 DOI: 10.1016/S0300-9084(00)80018-8.

(23) Fadel, O.; El Kirat, K.; Morandat, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, *1808* (12), 2973–2980 DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.08.011.

(24) Kondo, M.; Mehiri, M.; Regen, S. L. Viewing membrane-bound molecular umbrellas by parallax analyses. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13771–13777 DOI: 10.1021/ja804929m.

(25) Schnitzer, E.; Pinchuk, I.; Lichtenberg, D. Peroxidation of liposomal lipids. *European Biophysics Journal*. 2007, pp 499–515.

(26) Calvez, P.; Bussières, S.; Éric Demers; Salesse, C. Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 718–733 DOI: 10.1016/j.biochi.2009.03.018.

(27) Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183–223 DOI: 10.1016/S0304-4157(96)00009-3.

(28) Frotscher, E.; Danielczak, B.; Vargas, C.; Meister, A.; Durand, G.; Keller, S. A Fluorinated Detergent for Membrane-Protein Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (17), 5069–5073 DOI: 10.1002/anie.201412359.

(29) Košinová, P.; Berka, K.; Wykes, M.; Otyepka, M.; Trouillas, P. Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes: Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (4), 1309–1318 DOI: 10.1021/jp208731g.

(30) Azouzi, S.; Santuz, H.; Morandat, S.; Pereira, C.; Côté, F.; Hermine, O.; El Kirat, K.; Colin, Y.; Le Van Kim, C.; Etchebest, C.; et al. Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. *Biophys. J.* **2017**, *112* (9), 1863–

1873 DOI: 10.1016/j.bpj.2017.03.037.

(31) Palozza, P.; Krinsky, N. I. Beta-Carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297* (1), 184–187 DOI: 10.1016/0003-9861(92)90658-J.

(32) Bai, H.; Liu, R.; Chen, H. L.; Zhang, W.; Wang, X.; Zhang, X. Di; Li, W. L.; Hai, C. X. Enhanced antioxidant effect of caffeic acid phenethyl ester and Trolox in combination against radiation induced-oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *207* (1), 7–15 DOI: 10.1016/j.cbi.2013.10.022.

(33) Neunert, G.; Górnaś, P.; Dwiecki, K.; Siger, A.; Polewski, K. Synergistic and antagonistic effects between alpha-tocopherol and phenolic acids in liposome system: spectroscopic study. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *241* (6), 749–757 DOI: 10.1007/s00217-015-2500-4.

(34) Becker, E. M.; Nissen, L. R.; Skibsted, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219* (6), 561–571 DOI: 10.1007/s00217-004-1012-4.

(35) Kamal-Eldin, A.; Appelqvist, L.-Å. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **1996**, *31* (7), 671–701 DOI: 10.1007/BF02522884.

(36) Barclay, L. R. C.; Vinqvist, M. R. Do spin traps also act as classical chain-breaking antioxidants? A quantitative kinetic study of phenyl tert-butylnitrone (PBN) in solution and in liposomes. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28* (7), 1079–1090 DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00197-0.

(37) Franzoni, F.; Colognato, R.; Galetta, F.; Laurenza, I.; Barsotti, M.; Di Stefano, R.; Bocchetti, R.; Regoli, F.; Carpi, A.; Balbarini, A.; et al. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione,

uric acid and trolox. *Biomed. Pharmacother.* **2006**, *60* (8), 453–457 DOI: 10.1016/j.biopha.2006.07.015.

(38) Niki, E. [3] Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxyl radicals. In *Journal of Agronomy and Crop Science*; 1990; Vol. 187, pp 100–108.

(39) Durand, G.; Polidori, A.; Salles, J. P.; Prost, M.; Durand, P.; Pucci, B. Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derived from PBN and lipoic acid. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (16), 2673–2676 DOI: 10.1016/S0960-894X(03)00545-6.

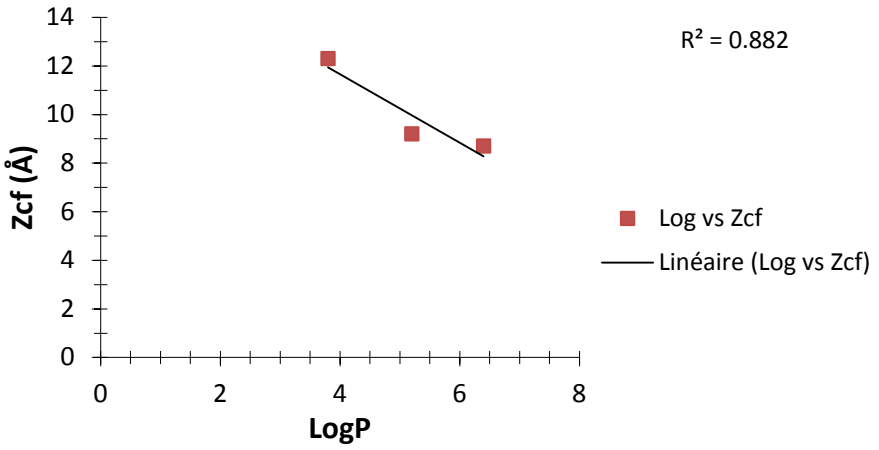
(40) Balogh, G. T.; Vukics, K.; Könczöl, Á.; Kis-Varga, Á.; Gere, A.; Fischer, J. Nitrone derivatives of trolox as neuroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (12), 3012–3015 DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.04.043.

(41) Koufaki, M.; Calogeropoulou, T.; Detsi, A.; Roditis, A.; Kourounakis, A. P.; Papazafiri, P.; Tsiakitzis, K.; Gaitanaki, C.; Beis, I.; Kourounakis, P. N. Novel potent inhibitors of lipid peroxidation with protective effects against reperfusion arrhythmias. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (24), 4300–4303 DOI: 10.1021/jm010962w.

(42) Harnett, J. J.; Auguet, M.; Viossat, I.; Dolo, C.; Bigg, D.; Chabrier, P. E. Novel lipoic acid analogues that inhibit nitric oxide synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (11), 1439–1442 DOI: Pii S0960-894x(02)00216-0\rDoi 10.1016/S0960-894x(02)00216-0.

(43) Vavříková, E.; Křen, V.; Jezova-Kalachova, L.; Biler, M.; Chantemargue, B.; Pyszková, M.; Riva, S.; Kuzma, M.; Valentová, K.; Ulrichová, J.; et al. Novel flavonolignan hybrid antioxidants: From enzymatic preparation to molecular rationalization. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 263–274 DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.051.

Appendix A. Supplementary data



Supp. 1 Correlation between the depth and the hydrophilicity of fluorinated compounds.

Conclusions du chapitre

Pour résumer, les résultats des expériences menées avec les dérivés fluorés ont montré que les dérivés sont plus hydrophobes que la PBN et que la chaîne perfluorée augmente la capacité d'insertion du Trolox et de la PBN dans les membranes.

En outre, bien que les dérivés soient plus efficaces que les molécules mères pour prévenir l'oxydation des lipides, la nature de l'antioxydant semble être le paramètre influençant le plus l'efficacité antioxydante. Enfin, la combinaison du Trolox et de la PBN sur un même motif augmente l'efficacité antioxydante et semble créer un effet de synergie.

Chapitre III. Les composés phénoliques

1. Introduction

Le lin *(Linum usitatissimum)* est particulièrement cultivé en France pour ses fibres et son huile riche en acides gras polyinsaturés. Néanmoins, cette plante est aussi connue comme étant celle qui possède la plus grande concentration de lignanes (McClements et Decker, 2000). Ces composés phénoliques, bien qu'ils soient connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé, sont peu étudiés. Ainsi, pour mieux comprendre leur fonctionnement et leurs interactions avec les lipides membranaires, l'équipe du professeur François Mesnard (Laboratoire de Biologie des plantes et Innovation) a purifié à partir du lin plusieurs molécules appartenant à cette classe de composés. Des acides hydroxycinnamiques ont également été purifiés. Dans ce chapitre, nous avons étudié leurs propriétés antioxydantes à l'aide de systèmes biomimétiques. De manière générale, les deux classes de composés se sont avérées efficaces pour protéger les lipides membranaires de l'oxydation et l'étude de leurs interactions avec les lipides membranaires a permis de montrer qu'elles présentent des modes d'action différents.

2. Article 3

Flax phenolic compounds: elucidation of their mechanisms of action

L. Socrier[a], A.Quéro[b], M.Verdu[a], Y. Song[a], R. Molinié[b], D. Mathiron[c], S.Pilard[c], F.Mesnard[b] and S. Morandat[a]*

[a]Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, CNRS, Laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire, centre de recherches Royallieu – CS 60 319 - 60 203 Compiègne cedex, France.

[b]EA3900 BioPI-UPJV - UFR de Pharmacie, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens cedex, France.

[c]Université Picardie Jules Vernes, Plateforme analytique. Rue Dallery - Passage du sourire d'Avril, 80039 Amiens Cedex, France.

*Corresponding author: Sandrine Morandat

E-mail address: sandrine.morandat@utc.fr. Tel: +33 3 44 23 44 18; Fax: +33 3 44 20 39 10

Article soumis pour publication.

Abstract

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are particularly sensitive to the damages due to reactive oxygen species (ROS) and lipid oxidation has been reported to be involved in the degradation of food as well as the early stages of several diseases. To prevent their deleterious effects, phenolic compounds are widely used as they are known for their ability to neutralize free radicals.

In the present work, we purified hydroxycinnamic acids and lignans from flaxseeds and studied their influence on lipid oxidation by using biomimetic lipid systems. We showed both classes of compounds are efficient to limit lipid oxidation and evidenced a relationship between the structure and the antioxidant efficiency. The characterization of their interactions with membranes lipids revealed that these compounds have different mechanisms of action and that the localization inside the hydrophobic core of the membrane remains an important parameter in the antioxidant efficiency.

Key words: phenolic compounds, antioxidant, lipid oxidation, model membranes

Phenolic compounds abbreviations:

coumaric acid glucoside (coumG), caffeic acid glucoside (cafG), ferulic acid glucoside (ferG), coumaric acid (coum), caffeic acid (caf), ferulic acid (fer), secoisolariciresinol diglucoside (SDG), secosisolariciresinol monoglucoside (SMG), secoisolariciresinol (seco), lariciresinol diglucoside (LDG), pinoresinol diglucoside (PDG), lariciresinol (larici), pinoresinol (pino), anhydro-secoisolariciresinol (anhydro).

1. Introduction

The deterioration of food supplies (Fernández, Pérez-Álvarez, & Fernández-López, 1997) as well as the appearance of diseases (Waris & Ahsan, 2006) is widely associated with an oxidative stress phenomenon, caused by an excess of reactive oxygen species (ROS). ROS are able to degrade all types of constituting biomolecules, *i.e.* proteins, lipids and DNA. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) remain one of the most important target of ROS (Avery, 2011). Because of the presence of several double bonds, PUFAs are particularly sensitive to the deleterious effects of reactive species. Thereby, any contact between reactive species and PUFAs triggers a chemical reaction called lipid peroxidation, which results in their degradation. Lipid peroxidation can be divided in three major steps (Wheatley, 2000).

In the initiation step, ROS abstract an allylic hydrogen atom from a methylene group of the lipids acyl chain to form an alkyl radical (L°) which is highly unstable. This radical undergoes a step of rearrangement of its double bonds to form an alkyl radical called conjugated diene. Then, this latter radical can react with molecular oxygen to form a peroxyl radical (LOO°). In the propagation step, peroxyl radicals amplify the reaction by abstracting other allylic hydrogens from adjacent polyunsaturated acyl chains. This creates a self-perpetrating chain reaction that allows the formation of new alkyl radicals. At last, in the termination step, peroxyl radicals can form less reactive products like cyclic peroxides and hydroperoxydes. These molecules can be further degraded in a wide range of compounds: aldehydes like 4-hydroxy-2-trans nonenal (4-HNE) and malonaldehyde (MDA), alcohols, epoxides, ether and hydrocarbons. The termination step can also take place when a free radical reacts with another one or splits to form stable products (Schaich, 2005).

Phenolic compounds are often used to prevent lipid peroxidation, as they are known for their ability to scavenge ROS (Di Meo *et al*., 2013). Phenolic compounds are secondary

metabolites that are produced by plants. From a chemical point of view, they are defined as compounds possessing at least one hydroxyl group attached to a benzene ring (Fadel, El Kirat, & Morandat, 2011). More than 8 000 phenolic compounds have been discovered. They can be divided into six main classes: flavonoïds, phenolic acids, stilbenes, coumarins, tannins and lignans (Fereidoon Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Flax *(Linum usitatissimum)* is a plant from the *Linaceae* family that presents several advantages as a functional food. Up to the 1990s, flax was mainly cultivated for the fibers contained in its stem to produce textile and paper (Goyal, Sharma, Upadhyay, Gill, & Sihag, 2014). However, in the last two decades, there's been a growing interest for the bioactive molecules of the seeds as they contain 30 to 40% of oil rich in ω-3 (Shim, Gui, Arnison, Wang, & Reaney, 2014), 20 to 25% of proteins and 20 to 28% of dietary fibers (Dixit, Kanakraj, & Rehman, 2012). The seeds also contain a significant amount of phenolic compounds with quantities ranging from 8 to 10 grams of phenolic acids and 6 to 29 grams of lignans per kg (Kasote, 2013).

Phenolic compounds present several applications in food industry. One of the main issues of industrials is to preserve the organoleptic properties of their products. The oxidation of PUFAs contained in food can lead to browning, loss of flavor, appearance of bad odors and rancidity (Fernández *et al*., 1997). Food rich in PUFAs – *e.g* oils, muscle food, fish – are particularly sensitive to the deterioration due to lipid oxidation (Perumalla & Hettiarachchy, 2011). Because of their antioxidant activity, phenolic compounds constitute valuable food preservatives. In this regard, green tea phenolic compounds have been used to extend the shelf life of pork sausages (Siripatrawan & Noipha, 2012) and to prevent the retrogradation of rice starch (Wu, Chen, Li, & Li, 2009). Lignans have been reported increase the stability of edible oils (Hemalatha & Ghafoorunissa, 2007) and milled flaxseeds, since they contain a

high amount of phenolic compounds, are used to improve the nutritional quality of bakery products (Goyal *et al*., 2014). Phenolic compounds can also be used in food as antimicrobials, thickeners, flavorings agents (Ayala-Zavala *et al*., 2011) or to maintain the color of red meats (Namal Senanayake, 2013).

In addition, although the subject remains controversial, several epidemiological studies suggests that the antioxidant properties of phenolic compounds are beneficial for health (Del Rio *et al*., 2013).

In this regard, the consumption of flaxseeds has been associated with a diminution the incidence rate of atherosclerosis (Rodriguez-Leyva *et al.*, 2013) and breast cancer (Thompson, Chen, Li, Strasser-Weippl, & Goss, 2005). These effects were attributed to the presence of phenolic compounds, since flax has been reported to be the plant that possesses the highest quantity of lignans (McClements & Decker, 2000).

According to literature, the antioxidant properties of phenolic compounds are due to the presence of structural elements like the catechol moiety and the hydroxyls groups, which are directly involved in the antiradical activity (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). However, the ability of phenolic compounds to interact with membranes remains an important parameter in their antioxidant efficiency. In this regard, Fadel and co-workers reported that 1% mol of rosmarinic acid spontaneously penetrate and fully protect membranes from oxidation (Fadel *et al*., 2011).

To better understand the mechanisms of action of flaxseeds phenolic compounds, we extracted hydroxycinnamic acids and lignans (Fig 1) from flaxseeds and studied their influence on lipid oxidation by using biomimetic lipid systems. Oxidative stress experiments allowed us to evaluate the phenolic compounds ability to protect 1,2-dilinoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DLPC) from oxidation. Most of the compounds showed the ability to

decrease lipid oxidation in a dose-dependent manner but lignans were generally more efficient than hydroxycinnamic acids. Surface tension experiments revealed structural parameters like the presence of sugar moieties hinders the interactions with the membrane and thanks to HPLC experiments, we were able to quantify the amount of phenolic compound associated to the membrane. In this study, we evidenced that the membrane localization is a prerequisite for potent antioxidant efficiency.

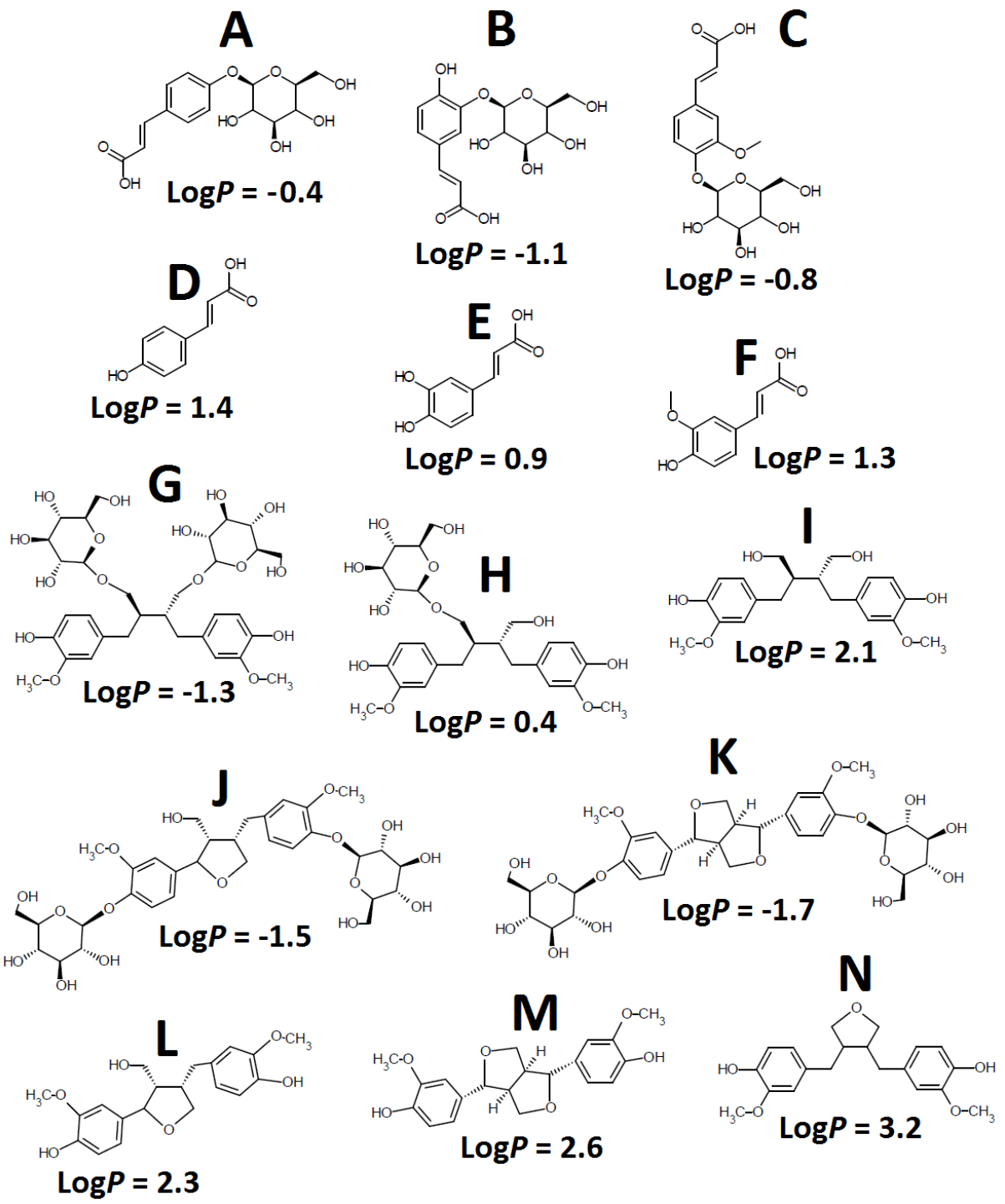


Fig. 1 Chemical structures of purified glucoside compounds. CoumG (A), cafG (B), ferG (C), coum (D), caf (E), fer (F), SDG (G), SMG (H), seco (I), LDG (J), PDG (K), larici (L), pino (M), anhydro (N).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC) and calcein were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), ferulic acid (fer), caffeic acid (caf), coumaric (coum), secoisolariciresinol (seco), pinoresinol (pino), lariciresinol (larici) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Phenolic compounds were dissolved in ethanol and kept at 4°C. The water used in all assays was purified by using a Millipore filtering system (Bedford, MA), yielding ultrapure water (18.2 MΩ×cm). Stock solutions of pure DLPC were prepared either with chloroform for the preparation of liposomes or with hexane/ethanol 9:1 (v/v) for the adsorption experiments.

2.2. Extraction and purification of phenolic compounds

Glucoside phenolic compounds (Supp 1) were extracted from flax (*Linum usitatissimum*) seeds. Ground seeds were extracted with 50% ethanol at 60°C during 3 h with 0.1 M of NaOH and neutralized with 0.1 M of acetic acid. Afterward, the compounds contained in the extract were separated on a Shimadzu LC-8A system equipped with an autosampler Shimadzu SIL-10AE as described in (Quéro *et al.*, 2016). SMG and anhydro were obtained from SDG hydrolysis as described by Li and co-workers (Li, Yuan, Xu, Wang, & Liu, 2008) and purified with the protocol mentioned above.

All purified compounds were characterized by NMR (Supp 2) and LC-MS (Supp 3) as described in (Quéro *et al.*, 2016). The purity was determined by NMR. For each compound, the H^1 signals attributed were weighted by all H^1 signals obtained. Thus, the calculated purity of each purified phenolic compound was greater than 95%. Log*P* and topographic surface

area (TPSA) values were calculated with Molinspiration cheminformatics software. www.molinspiration.com

2.3. Preparation of liposomes

DLPC was dried under a stream of nitrogen and then kept under high vacuum for 2 h to obtain a solvent-free film. The dry film was then dispersed in Hepes buffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4) to obtain multilamellar vesicles (MLVs). Small unilamellar vesicles (SUVs) were obtained by sonicating MLVs to clarity (3 cycles of 2 min 30 s) with a 500 W titanium probe sonicator at 33% of the maximal power (Fisher Bioblock Scientific, France). To limit oxidation due to heat and light, sonication was performed in the dark and samples were kept in an ice bath. Then, to remove titanium particles, liposome suspensions were filtered on 0.2 µm Acrodisc® (Pall Life Sciences, USA).

To prepare large unilamellar vesicles (LUVs), the MLVs suspension was extruded 19 times at room temperature through a 200 nm nuclepore polycarbonate membrane filter (Avestin Inc. Ottawa, Canada) with a syringe-type extruder (Avanti Polar lipids, Alabaster, AL, USA). The size distribution was determined by dynamic light scattering (Zetasizer Nano-S, Malvern) and was unimodal (data not shown).

2.4. Determination of antioxidant efficiency of phenolic compounds

The antioxidant efficiency of the phenolic compounds was assessed by measuring the amount of conjugated dienes, as they constitute the first products of peroxidation of poly-unsaturated lipids (Wheatley, 2000). DLPC liposomes were prepared in Hepes buffer at a final concentration of 0.1 mg/mL and incubated at room temperature with phenolic compounds during 10 minutes. AAPH was added to all samples at a final concentration of 2

mM to initiate lipid peroxidation. The samples were then incubated at 37°C during 1 hour. The appearance of conjugated dienes was measured with a Specord S300 UV–VIS spectrophotometer (Jena, Germany) at 234 nm. For the control assay, DLPC liposomes were tested without phenolic compounds.

For each sample, initial absorbencies (*i.e* a T=0) were subtracted from each measurement. Results are expressed as percentages of peroxidation calculated with the formula below:

$$Lipid\ oxidation\ (\%) = \frac{Absorbance_{sample}}{Absorbance\ max_{Control}} * 100\ (eq.1)$$

The curves were fitted with a dose-response model with variable slope with the software GraphPadPrism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

2.5. Adsorption at lipid experiments

All the experiments were performed at constant temperature (21 ± 0.1°C). The teflon dish, which has a surface of 19.6 cm^2, was equipped with a Wilhelmy-type pressure measuring system (Nima, Coventry, England). The subphase buffer (Hepes) of 62 mL was continuously stirred with a magnetic stirrer spinning at 100 rpm. Phospholipids were dissolved in hexane/ethanol 9:1 (v/v) and spread at the air–water interface to reach the desired surface pressure. As soon as the initial surface pressure was stabilized (~15 min), phenolic compounds dissolved in ethanol were injected into the subphase at a final concentration of 15 µM as described previously (Fadel *et al.*, 2011). Their adsorption at the air/lipid buffer interface was followed by measuring the variation of surface pressure. A

control experiment was also performed by injecting ethanol in the subphase, which produced no significant perturbation of the surface pressure.

2.6. Quantification of membrane interaction

DLPC SUVs were prepared at a concentration of 1 mg/mL as previously described and incubated with increasing concentrations of phenolic compounds. After 10 min of incubation, samples were centrifuged at 4°C at a rate of 200 000g during two hours to eliminate unbound lignans. Supernatant was removed and the liposomes pellet was dissolved in ethanol. Lipid concentration was determined with the method described by Stewart (Stewart, 1980).

The concentration of phenolic compounds was determined by HPLC (Agilent 1290 Infinity, CA, USA). Samples were eluted on a C18 column Hypercil Gold 150 x 4.6 mm 5 µm, reference 25005-154630 (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) with water and acetonitrile (7:3, v/v) for seco and pino, (6:4, v/v) for anhydro. Elution was performed at a flow rate of 0.7 mL per min and the compounds were detected by UV at 280 nm. The phenolic compound/lipid molar ratio was calculated and data were fitted with the following Langmuir equation with the software GraphPadPrism:

$$A = A_{max} * \frac{X}{K_d + X} (eq. 2)$$

A represents the phenolic compound/lipid molar ratios, X the concentration of phenolic compound and K_d the dissociation constant.

3. Results

3.1. Lignans and phenolic acids inhibit lipid oxidation

To study the ability of phenolic compounds to protect liposomes from oxidation, we performed oxidative stress experiments. Briefly, DLPC liposomes were incubated with increasing concentrations of phenolic compounds and the oxidation was launched as previously described.

Lignans showed a strong ability to protect DLPC liposomes from lipid oxidation. For instance, in presence of seco (Fig 2 A), the percentages increase with time independently of the concentration of seco tested. However, in absence of seco, the augmentation is more pronounced as the oxidation reaches 90% after 30 min. The addition of 2 µM reduces the percentages to 60%, however 6 µM of seco is sufficient to limit the percentages under 50 % after 30 min. With the most important concentrations (*i.e* 30 and 60 µM), the percentages stay below 40 % during the entire experiment. The same trend was observed with the other compounds, except that hydroxycinnamic acids presented a less pronounced antioxidant activity (data not shown).

To better compare the phenolic compounds antioxidant efficiency, we plotted the oxidation percentages after 30 min against the Log of phenolic compound concentrations to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}), which corresponds to the antioxidant concentration required to half-reduce oxidation percentages in absence of antioxidant. All lignans presented a tendency similar to seco (Fig 2B), that is to say, an important diminution of oxidation percentages at high concentrations (data not shown). Glucoside compounds presented high IC_{50} values, which indicate that those compounds have limited antioxidant efficiency. SDG, SMG, LDG and PDG present IC_{50} values of 52.5, 18.2, 41.7 and 43.7 µM, respectively.

On the contrary, aglycone lignans showed a significant efficiency, since all IC_{50} are inferior to 5 µM. Seco, anhydro, pino and larici have IC_{50} values of 4.5, 1.5, 2.7 and 2.5 µM, respectively. With all IC_{50}, the following ranking could be established regarding the antioxidant efficiency of lignans: anhydro>larici>pino>seco>SMG>LDG>PDG>SDG.

Concerning the hydroxycinnamic acids like coum (Fig 2C), we noticed a slight augmentation of oxidation percentages, no IC_{50} could be determined. The same tendency was observed with coumG. With the other compounds, we observed a slight diminution of the oxidation percentages but only fer and caf presented an IC_{50} value, of 24 and 1.1 µM respectively. Regarding the IC_{50} values of all hydroxycinnamic acids, the following ranking could be established: caf>fer>coum, cafG, ferG and coumG.

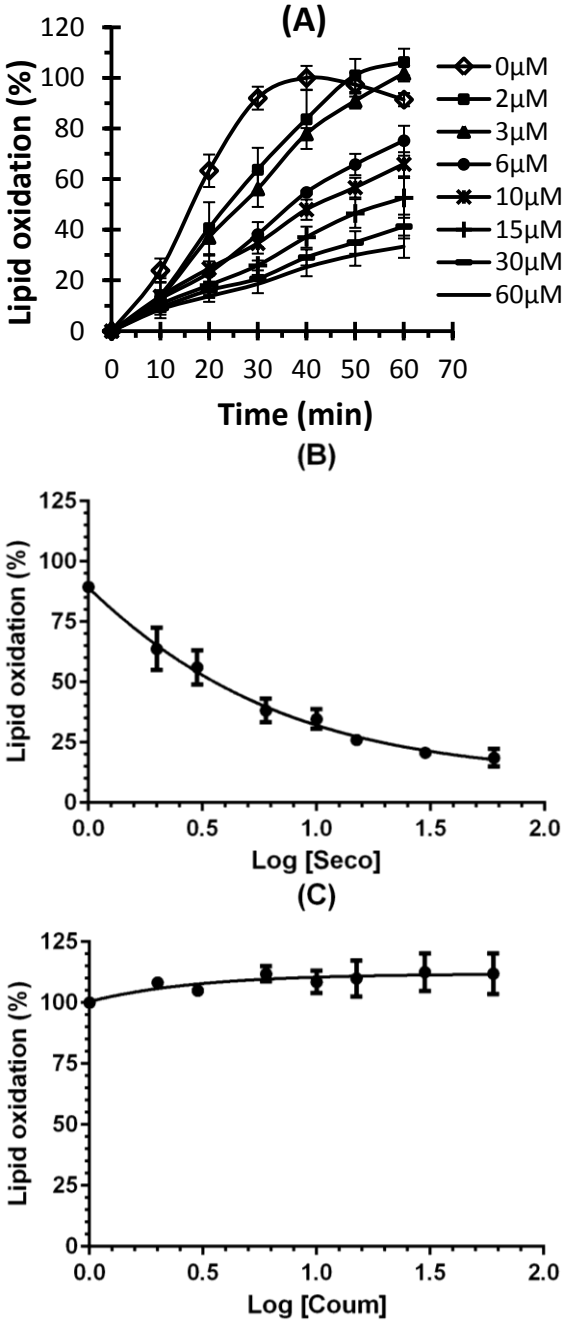


Fig. 2 Effect of seco and coum on the AAPH-induced oxidation of DLPC liposomes. Absorbencies measured at 234 nm with various concentrations of seco (A). Evolution of lipid oxidation percentages at 30 min in presence of seco (B) and coum (C). Liposomes were incubated at 37°C with increasing concentrations of phenolic compounds. The final DLPC and AAPH concentrations were 0.1 mg/mL and 2 mM, respectively. Initial absorbencies were 0.4±0.1 and were subtracted from each measurement to start the kinetics at zero. Oxidation percentages were calculated with eq.1 and reported over time. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

3.2. The sugar moieties hinders the interactions with membranes

Previous results clearly highlighted that glucoside compounds are much less efficient than aglycone compounds with both classes of antioxidants. As it has been reported that the presence of sugar moieties can influence the phenolic compounds properties (Heim *et al*., 2002), we determined Log*P* values to gain a view on their effect on phenolic compounds polarity. According to the values reported on Fig 1, glucoside compounds are much more hydrophilic than aglycone compounds. Because of their enhanced hydrophilicity, glucoside compounds may not interact as well as aglycones with membranes, which may result in an alteration of their antioxidant efficiency.

To evaluate the ability of each compound to interact with membranes, we performed surface tension experiments. We focused on the compounds that presented a potent antioxidant activity (*i.e* that have an IC_{50}). Thus, we tested all the lignans plus caf and fer. DLPC monolayers were prepared at different initial pressures and the phenolic compounds were injected in the subphase as described by Fadel and co-workers*.,* (Fadel *et al*., 2011).

Fig. 3 represents the variation of pressure ($\Delta\pi$) due to the interaction of caf, larici and seco over the initial surface pressure. As one can see, the injection of caf (Fig 3A) in the subphase had a slight effect on the surface pressure since $\Delta\pi$ reaches ≈ 2.8 mN/m on average, regardless the initial surface pressure. Fer and glucoside lignans presented similar profiles (data not shown). As $\Delta\pi$ values lower than 4 mN/m indicate that the compounds cannot penetrate or cross the membrane (Antonietti *et al*., 2017), we suggest that they interact with membranes by adsorbing onto phospholipids polar heads. On the contrary, the injection of aglycone lignans in the subphase caused a significant increase of the initial surface pressure. Larici (Fig 3B) presented a similar profile as hydroxycinnamic acids but the variations of surface pressure observed were more important ($\Delta\pi$ ≈ 4.5 mN/m on average).

The injection of seco (Fig 3C), anhydro and pino (data not shown) caused higher variations of the surface pressure ($\Delta\pi \approx 5.2$ mN/m on average). In addition, we observed a gradual diminution of $\Delta\pi$ when the initial pressure was increased, suggesting the interactions are less pronounced at high surface pressures. The intersection between the regression lines obtained with $\Delta\pi$ and the axis of abscissa corresponds to the maximal insertion pressure (MIP). Also called exclusion pressure, the MIP designates the pressure at which the compounds can no longer penetrate the monolayer (De Athayde Moncorvo Collado, Dupuy, Morero, & Minahk, 2016). As the regression line obtained with caf, fer, larici and glucoside lignans has a slope of zero, we were not able to determine a MIP for these compounds. On the contrary, seco, anhydro and pino presented MIPs of 56.7, 47.1 and 72.3 mN/m, respectively. Because these values are higher than the pressure of biological membranes – *i.e* 30-35 mN/m (Marsh, 1996) – this suggest that they can penetrate membranes at a physiological pressure.

Interestingly, despite a similar structure, larici did not present a MIP contrary to seco, anhydro and pino. This may be due to the presence of a free central hydroxyl moiety that may inhibit the penetration by forming hydrogen bonds with phospholipids polar heads. The other aglycone lignans do not present free central hydroxyl groups, except seco. However, the two central hydroxyl moieties may form an internal hydrogen bond which can explain its faculty to penetrate membranes contrary to larici. In addition, calcein release experiments, performed as described by Fadel and co-workers (Fadel *et al.*, 2011), showed the penetration of aglycone lignans has no consequence on the integrity of the membrane (Supp 4).

Besides, Calvez and co-workers reported another parameter, the $\Delta\pi_{30mN/m}$, could be determined to evaluate the ability of the compounds to interact with membranes (Calvez,

Bussières, Éric Demers, & Salesse, 2009). The $\Delta\pi_{30mN/m,}$ which is determined by extrapolation from an initial pressure of 30 mN/m, reflects the amount of compound inserted in the monolayer: the higher the $\Delta\pi_{30mN/m}$, the higher the quantity of compound associated to the monolayer. Seco, anhydro and pino presented $\Delta\pi_{30mN/m}$ of 5.7, 9.2 and 6.3 mN/m respectively. These values determined for seco and pino are ~ 40% lower than anhydro, suggesting that the amount of anhydro inserted in the membrane is higher than the other lignans. These results, in accordance with Log*P* values (Fig 1), suggest that anhydro can easily interact with membranes thanks to its pronounced hydrophobicity.

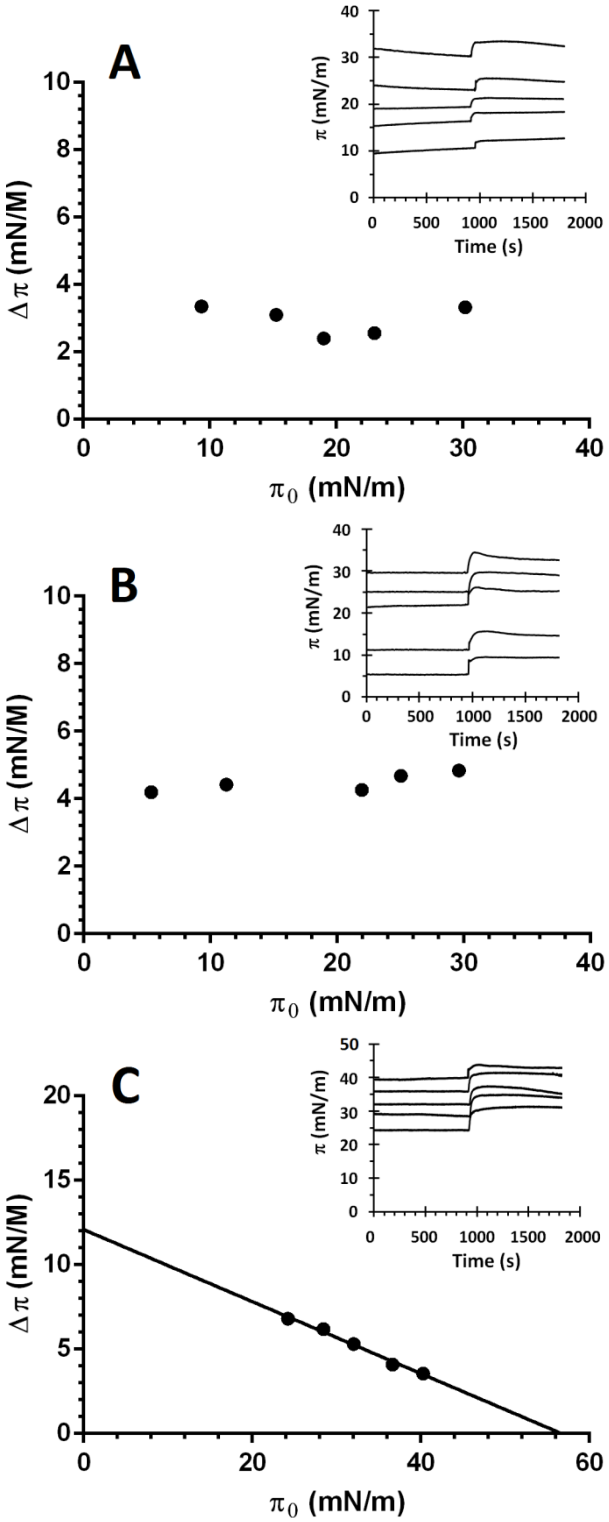


Fig. 3 Effect of the injection of phenolic compounds in the subphase of DLPC monolayers. Caf (A), larici (B) and seco (C). Upper right boxes: Kinetics of insertion of the phenolic compounds at different surface pressures. DLPC monolayers at different initial surface pressure were spread on a buffer containing 10 mM Hepes and 150 mM NaCl with a pH adjusted at 7.4. All the compounds were injected in the subphase at a final concentration of 15 µM.

3.3. Aglycone lignans have a pronounced affinity for membranes

Seco, anhydro and pino presented the ability to penetrate membranes but according to $\Delta\pi_{30mN/m}$, the amount associated to the membrane is different. To precisely quantify the amount of aglycone lignan associated to the membrane, we performed HPLC experiments. DLPC liposomes were incubated with various concentrations of lignans and the unbound lignans were eliminated by centrifugation. After the dissolution of the liposomes pellet in ethanol, the concentration of lipid and lignans were respectively determined with the Stewart assay and HPLC. The data were fitted to a Langmuir equation (eq. 2) to obtain the maximal lignan/lipid molar ratio (A_{max}) and the dissociation constant (K_d) (Supp 5). Seco, anhydro and pino presented a maximal association ratio of 13.5, 13.7 and 10.3 %mol, respectively. This indicates that the amount of lignan associated to the membranes is quite similar in all cases, in disagreement with $\Delta\pi_{30mN/m}$ values that suggested a higher amount of anhydro was inserted in the membrane. However, the $\Delta\pi_{30mN/m}$ is not accurate enough to predict the quantity of compounds associated to the membrane: it only gives a preview of the amount of compound associated to the membrane. In addition, seco, anhydro and pino presented K_d of 17, 11.5 and 16.1 µM, respectively, indicating that anhydro has the highest affinity for DLPC membranes.

3.4. The antioxidant efficiency of aglycone lignans mostly relies on the inner membrane fraction

As previously exposed, 10 to 13.5 %mol of aglycone lignan spontaneously penetrates the membrane, indicating that the major fraction of lignans remains outside the membrane. To determine which of the inner or outer membrane fraction is responsible of the antioxidant efficiency, we introduced different amounts of aglycone lignans in the dry DLPC films. By

adding Hepes buffer, we obtained DLPC liposomes containing controlled amounts of aglycone lignans. As we previously determined A_{max} values comprised between 10 and 13.5 %mol (Supp 5), we decided to work with molar ratios comprised between 0.2 and 25 %mol. Oxidation percentages of liposomes containing lignans were reported over lignans /DLPC molar ratios introduced in the membrane (Fig 4, open circles). As one can see, the percentages rapidly decrease when small ratios of lignans are added. For instance, a ratio of 4 %mol of seco inserted is enough to reduce the percentages down to ~ 40 % (Fig 4A). Similar tendencies were observed with anhydro and pino (Fig 4B, 4C), but the diminution of percentages is faster with anhydro.

Then, we used the data of Fig 4 to calculate the theoretical lignan/DLPC ratios for all the concentrations of lignans added to preformed liposomes (Fig 4, closed circles). The determination of the experimental and theoretical IC_{50} of each compound allowed us to better evaluate the contribution of each fraction (Fig 4). In the case of seco (Fig 4A), the experimental curve (IC_{50}=3.7 %mol) is shifted to the right comparing to the theoretical one (IC_{50}=2.9 %mol), showing that there is a contribution of the outer membrane fraction to the antioxidant efficiency. Pino presented a similar profile (Fig 4C), and the gap between the IC_{50} was nearly the same as seco, *i.e.* 0.8 %mol. On the contrary, anhydro's experimental (IC_{50}=0.6 %mol) and theoretical (IC_{50}=0.5 %mol) curves are nearly superimposed (Fig 4B). The weak difference between the IC_{50} suggest that the inner membrane fraction mostly contributes to the antioxidant efficiency.

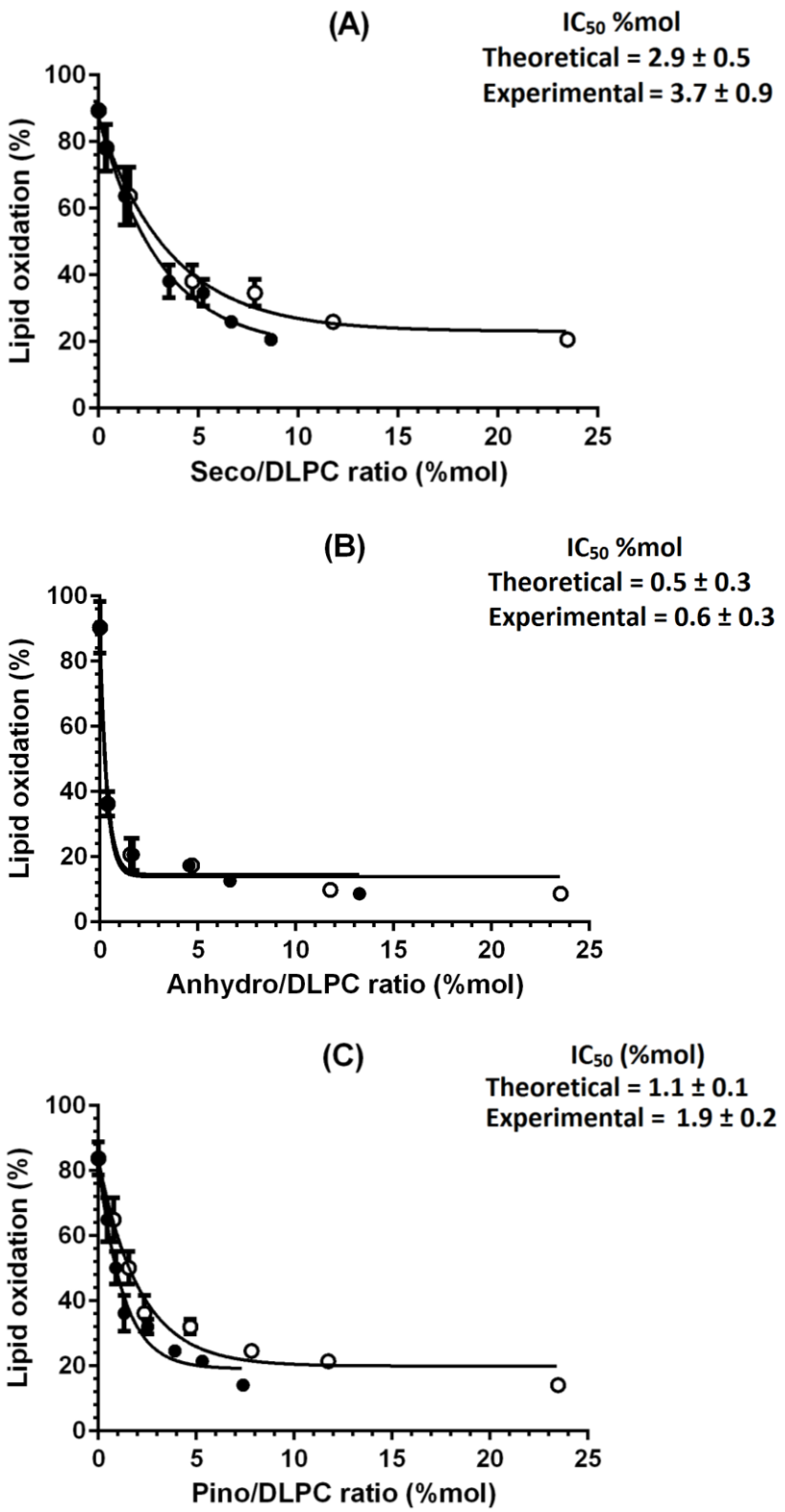


Fig. 4 Antioxidant activity of membrane inserted lignans against AAPH-induced oxidation. The black circles correspond to the theoretical molar ratios, the open circles to the experimental molar ratios. Seco (A), anhydro (B) and pino (C). Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.

In addition, to evaluate the contribution of the membrane fraction to the antioxidant efficiency, we calculated the inhibition percentages at the A_{max}. To do so, we used the data of Fig 4 and withdrawn the oxidation percentages at the A_{max} (low plateau) from the oxidation percentages in absence of lignan. The values obtained are summarized in Table 1. As one can see, the membrane fraction of aglycone lignans inhibits on average 70% of the oxidation. These results indicate that aglycone lignans are mainly membrane antioxidants; however, the contribution of the aqueous fraction to the antioxidant efficiency is non-negligible.

Table 1 Contribution of the membrane fraction of aglycone lignans against AAPH-induced oxidation.

	seco	anhydro	pino
A_{max} (%)	13.5 ± 1.7	13.7 ± 1.0	10.3 ± 0.7
K_d (µM)	17.0 ± 3.6	11.5 ± 1.2	16.1 ± 3.4
Oxidation percentage at A_{max}	23.0 ± 3.5	13.9 ± 4.0	19.9 ± 3.4
Oxidation percentage in absence of lignan	89.4 ± 1.0	90.4 ± 7.8	83.8 ± 5.1
Inhibition percentage A_{max} (%)	66.4 ± 2.5	76.5 ± 3.8	63.9 ± 1.7

4. Discussion

In order to evaluate the antioxidant efficiency of hydroxycinnamic acids and lignans, we performed oxidative stress experiments. We showed hydroxycinnamic acids and lignans are efficient to protect DLPC liposomes from oxidation. However, we noticed glucoside compounds are less efficient than aglycone compounds. These discrepancies can be attributed to their lower interactions with the membrane, as it has been reported that strong interactions of antioxidants with phospholipids acyl chains favors a better protection against lipid peroxidation (Azouzi *et al*., 2017).

The determination of Log*P* values provided useful information regarding the polarity of the compounds (Fig 1). According to Log*P* values, the ability of glucoside compounds to

interact with membranes lipids is lower than for aglycone compounds, as they are too hydrophilic. Surface tension results reinforced this hypothesis, as glucoside compounds showed no ability to penetrate DLPC monolayers. Despite higher Log*P* values, aglycone hydroxycinnamic acids presented the same behavior as glucoside compounds, contrary to aglycone lignans that strongly interacted with DLPC monolayers. However, the results obtained with glucoside compounds and aglycone hydroxycinnamic acids suggested the presence of weak interactions with phospholipids polar heads.

The topological polar surface area (TPSA) corresponds to the addition of the surfaces of all polar atoms. This parameter is often used to predict the ability of a compound to cross the blood brain barrier and the intestinal epithelium (Ertl, Rohde, & Selzer, 2000). The TPSA values of all the compounds are summarized in Table 2. As one can see, the values obtained with glucoside compounds are on average higher than 140 $Å^2$, which suggests a poor ability to penetrate membranes (Veber *et al*., 2002). Aglycone compounds presented lower TPSA (inferior to 100 $Å^2$), suggesting they can penetrate membranes. However, surface tension experiments highlighted aglycone hydroxycinnamic acids cannot cross the membrane contrary to aglycone lignans. Because these compounds presented on average Log*P* values twice as small as aglycone lignans, we attributed this to their weaker hydrophobic properties. In addition, we observed a good correlation between Log*P* and TPSA values (Supp 6) for both classes of compounds. As one can see, when the Log*P* diminishes, the TPSA increases. Other researchers have observed a correlation between these parameters (Hughes *et al.*, 2008); however the results we obtained with aglycone hydroxycinnamic acids suggest those parameters are not sufficient to predict the ability of a compound to cross the membrane.

Table 2 TPSA (Å^2) of phenolic compounds.

	caf	fer	coum	seco	pino	larici
Glucosides	156.9	145.9	136.7	SDG: 257.7 SMG: 178.5	235.7	246.7
Aglycones	77.8	66.8	57.5	seco: 99.4 anhydro: 68.2	77.4	88.4

In addition, the comparison between the IC_{50} and the Log*P* as well as the TPSA revealed a high correlation between the hydrophobic properties and the antioxidant efficiency of lignans (Supp 7A, 7B). A pronounced antioxidant efficient can be associated to a low TPSA and a high Log*P*. Thus, our results indicate that the presence of glucoside moieties inhibits the interactions of the compounds with the membrane. In agreement with our results, Londono-Londono *et al.,* recently compared the ability of hesperidin (glucoside) and hesperitin (aglycone) to interact with DMPC membranes (Londoño-Londoño, Lima, Jaramillo, & Creczynski-pasa, 2010). They reported that the ratio of association of hesperidin is five times lower than hesperitin and attributed this to the presence of a sugar moiety. Other researchers have reported that natural compounds bearing carbohydrate moieties are less efficient than aglycones. For instance, it was recently reported that the fermentation of litchi pericarp by *A. awamori* improves its DDPH radical scavenging activity and DNA protection effect (Lin *et al*., 2012). In another work, authors attributed this effect to the deglycosylation of rutin to kaempferol-3-glucoside and quercetin-3-glucoside (Lin *et al*., 2014). Our results, in accordance with the literature, show that the presence of membrane localization is a prerequisite to a potent antioxidant activity.

Despite its low affinity for membranes, caf showed a strong ability to lipid oxidation contrary to fer and coum (IC_{50} of 1.1 µM versus 24 µM for fer and no IC_{50} for coum). The analysis of the Log*P* values (0.9, 1.3 and 1.4 for caf, fer and coum) highlights that the

efficiency of these compounds diminishes when the hydrophobic properties increase. Kikuzaki and co-workers previously tested the antioxidant efficiency several phenolic acids in liposomes and came to the same conclusions as ours regarding the activity of caf, fer and coum (Kikuzaki, Hisamoto, Hirose, Akiyama, & Taniguchi, 2002). Interestingly, both observations are in accordance with the polar paradox theory that stipulates that polar antioxidants are more efficient in apolar medium (Fereidoon Shahidi & Zhong, 2011).

In addition, surface tension experiments show that caf does not penetrate the membrane and suggest it interacts with phospholipids polar heads. However, Kosinova and co-workers evaluated the position of caf and other phenolic acids in the membrane (Košinová, Berka, Wykes, Otyepka, & Trouillas, 2012). Molecular dynamic experiments revealed that caf slightly penetrates membranes and is located in the polar head groups of phospholipids, at a distance of 22 Å from the center of the bilayer. This can explain the antioxidant efficiency that we observed.

At last, regarding the results obtained with both classes of aglycone compounds, we propose that they intervene in different phases of lipid oxidation. According to surface tension experiments, hydroxycinnamic acids do not penetrate the hydrophobic core of the membrane and interact with phospholipids polar heads. As oxidative stress experiments highlighted a slight antioxidant efficiency, we propose that they scavenge ROS before they diffuse through the membrane and attack phospholipids acyl chains. As a result, hydroxycinnamic acids inhibit the initiation step of lipid oxidation. On the contrary, lignans penetrate the membrane up to the hydrophobic core, and interact directly with phospholipids polar heads. These interactions allow them to instantly neutralize newly formed alkyl radicals and inhibit the propagation step of lipid oxidation.

5. Conclusion

We have compared the antioxidant efficiency of two classes of phenolic compounds extracted from flaxseed. We highlighted a relation between the structure and the antioxidant efficiency as in both cases, the presence of sugar moieties inhibits the interaction with membranes, which results in lower antioxidant efficiency. However, other parameters like the affinity for membranes have to be taken into account to understand the differences observed for the aglycone compounds.

Because of their pronounced affinity for membranes, aglycone lignans are much more efficient than aglycone hydroxycinnamic acids, as their interactions with phospholipids acyl chains allow them to directly scavenge newly formed alkyl radicals. On the basis of our results and in agreement with literature, we can conclude that the location in the membrane is a prerequisite for potent antioxidant efficiency.

Contributions

S.M and F.M conceived this research. A.Q purified the phenolic compounds. D.M, R.M and S.P realized the structural elucidation. L.S performed the experiments on model membranes with the help of M.V and Y.S. L.S analyzed the data and wrote the article. A.Q, R.M, F.M and S.M formatted the manuscript.

Acknowledgements

L. Socrier was the recipient of a scholarship from the French “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche”. Dr A. Quéro was the recipient of a fellowship from “Haut de France” regional council. The Centre national de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de Technologie de Compiègne are gratefully acknowledged for providing facilities.

References

1. Antonietti, V., Boudesocque, S., Dupont, L., Farvacques, N., Cézard, C., Da Nascimento, S., … Sonnet, P. (2017). Synthesis, iron(III) complexation properties, molecular dynamics simulations and P. aeruginosa siderophore-like activity of two pyoverdine analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *17*(8/1), 185–196. http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.010

2. Avery, S. V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, *434*(2), 201–210. http://doi.org/10.1042/BJ20101695

3. Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., … González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, *44*(7), 1866–1874. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021

4. Azouzi, S., Santuz, H., Morandat, S., Pereira, C., Côté, F., Hermine, O., … Amireault, P. (2017). Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. *Biophysical Journal*, *112*(9), 1863–1873. http://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.037

5. Calvez, P., Bussières, S., Éric Demers, & Salesse, C. (2009). Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, *91*(6), 718–733. http://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.018

6. De Athayde Moncorvo Collado, A., Dupuy, F. G., Morero, R. D., & Minahk, C. (2016). Cholesterol induces surface localization of polyphenols in model membranes thus enhancing vesicle stability against lysozyme, but reduces protection of distant double bonds from reactive-oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1858*(7), 1479–1487. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.04.002

7. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., &

Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(14), 1818–1892. http://doi.org/10.1089/ars.2012.4581

8. Di Meo, F., Lemaur, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., Olivier, Y., & Trouillas, P. (2013). Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, *117*(10), 2082–2092. http://doi.org/10.1021/jp3116319

9. Dixit, S., Kanakraj, S., & Rehman, A. (2012). Linseed oil as a potential resource for bio-diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(7), 4415–4421. http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.042

10. Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P. (2000). Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(20), 3714–3717. http://doi.org/10.1021/jm000942e

11. Fadel, O., El Kirat, K., & Morandat, S. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1808*(12), 2973–2980. http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.011

12. Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, *59*(3), 345–353. http://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00114-8

13. Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., & Sihag, M. (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(9), 1633–1653. http://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9

14. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants:

Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572–584. http://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5

15. Hemalatha, S., & Ghafoorunissa. (2007). Sesame lignans enhance the thermal stability of edible vegetable oils. *Food Chemistry*, *105*(3), 1076–1085. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.023

16. Hughes, J. D., Blagg, J., Price, D. A., Bailey, S., DeCrescenzo, G. A., Devraj, R. V., … Zhang, Y. (2008). Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *18*(17), 4872–4875. http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.071

17. Kasote, D. M. (2013). Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *International Food Research Journal*, *20*(1), 27–34.

18. Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., & Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 2161–2168. http://doi.org/10.1021/jf011348w

19. Košinová, P., Berka, K., Wykes, M., Otyepka, M., & Trouillas, P. (2012). Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes: Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition. *The Journal of Physical Chemistry B*, *116*(4), 1309–1318. http://doi.org/10.1021/jp208731g

20. Li, X., Yuan, J. P., Xu, S. P., Wang, J. H., & Liu, X. (2008). Separation and determination of secoisolariciresinol diglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1185*(2), 223–232. http://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.066

21. Lin, S., Yang, B., Chen, F., Jiang, G., Li, Q., Duan, X., & Jiang, Y. (2012). Enhanced DPPH radical scavenging activity and DNA protection effect of litchi pericarp extract by Aspergillus

awamori bioconversion. *Chemistry Central Journal*, *6*(1), 108. http://doi.org/10.1186/1752-153X-6-108

22. Lin, S., Zhu, Q., Wen, L., Yang, B., Jiang, G., Gao, H., … Jiang, Y. (2014). Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with Aspergillus awamori. *Food Chemistry*, *145*, 220–227. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.048

23. Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. D., Jaramillo, C., & Creczynski-pasa, T. (2010). Hesperidin and hesperetin membrane interaction: Understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *499*(1–2), 6–16. http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.023

24. Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, *1286*(3), 183–223. http://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3

25. McClements, D., & Decker, E. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, *65*(8), 1270–1282. http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x

26. Namal Senanayake, S. P. J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1529–1541. http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011

27. Perumalla, A. V. S., & Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, *44*(4), 827–839. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.022

28. Quéro, A., Molinié, R., Mathiron, D., Thiombiano, B., Fontaine, J.-X., Brancourt, D., …

Mesnard, F. (2016). Metabolite profiling of developing Camelina sativa seeds. *Metabolomics*, *12*(12), 186. http://doi.org/10.1007/s11306-016-1135-1

29. Rodriguez-Leyva, D., Weighell, W., Edel, A. L., Lavallee, R., Dibrov, E., Pinneker, R., … Pierce, G. N. (2013). Potent antihypertensive action of dietary flaxseed in hypertensive patients. *Hypertension*, *62*(6), 1081–1089. http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02094

30. Schaich, K. M. (2005). Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Vol. 1, pp. 269–356). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. http://doi.org/10.1002/047167849X.bio067

31. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897. http://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018

32. Shahidi, F., & Zhong, Y. (2011). Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3499–3504. http://doi.org/10.1021/jf104750m

33. Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2014). Flaxseed (Linum usitatissimum L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *38*(1), 5–20. http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.011

34. Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 102–108. http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011

35. Stewart, J. C. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, *104*(1), 10–4. http://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9

36. Thompson, L. U., Chen, J. M., Li, T., Strasser-Weippl, K., & Goss, P. E. (2005). Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(10), 3828–35. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2326

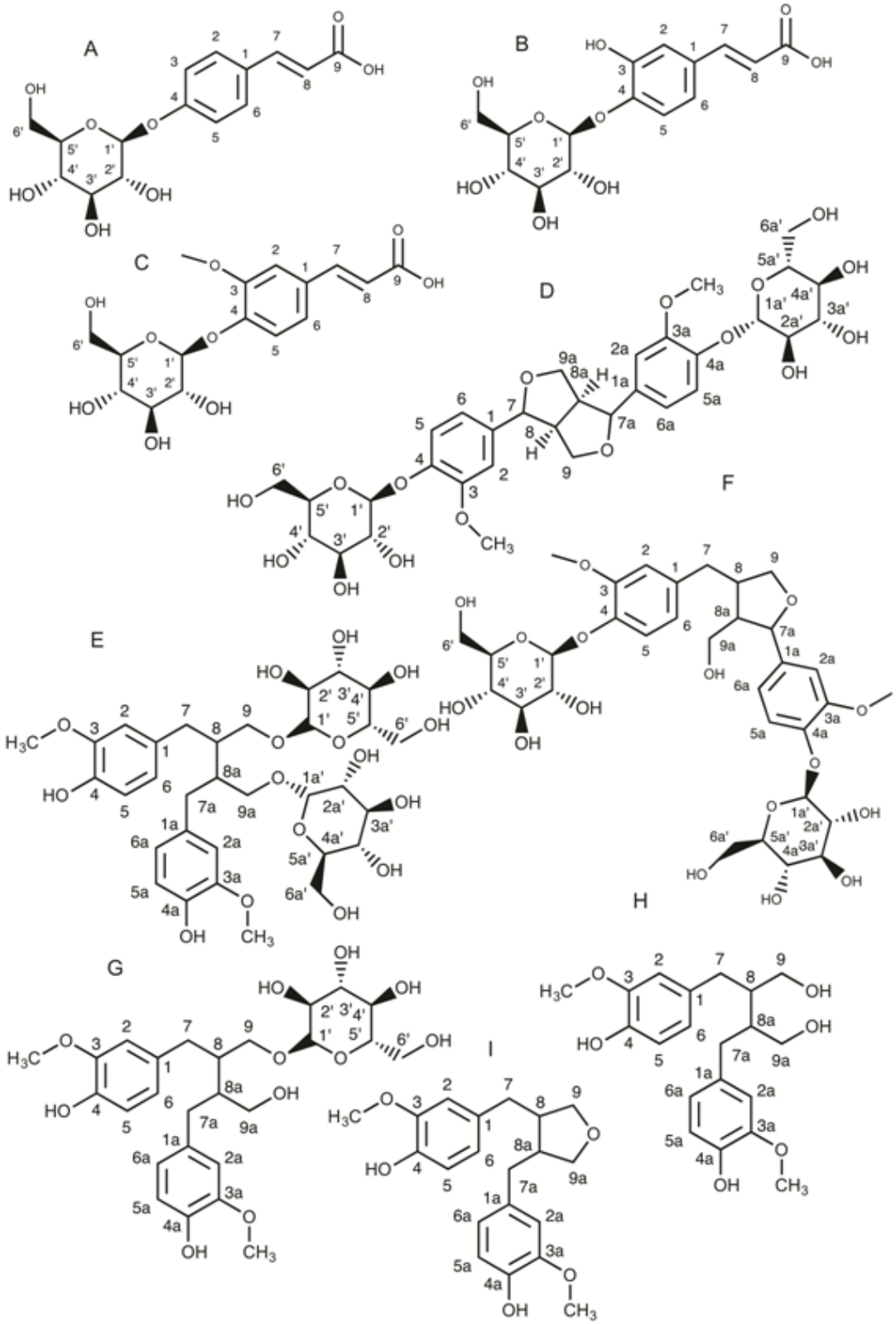
37. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(12), 2615–2623. http://doi.org/10.1021/jm020017n

38. Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, *5*(1), 14. http://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14

39. Wheatley, R. (2000). Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *19*(10), 617–628. http://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00010-8

40. Wu, Y., Chen, Z., Li, X., & Li, M. (2009). Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. *Food Research International*, *42*(2), 221–225. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.11.001

Appendix A. Supplementary data



Supp. 1 Chemical structures of purified glucoside compounds. CoumG (A), cafG (B), ferG (C), PDG (D), SDG (E), LDG (F), SMG (G), seco (H), anhydro (I).

Supp. 2 LC-MS Characterization of purified compounds. The structures of compounds A-I are represented in Supp 1. (The table is displayed on pages 176-177).

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Elemental composition	m/z (experimental)	Error (mDa)
A	325		$C_{15}H_{17}O_8$	325.0927	-0.2
		163	$C_9H_7O_3$	163.0401	0
		119	C_8H_7O	119.0502	-0.1
B	341		$C_{15}H_{17}O_9$	341.0878	-0.1
		179	$C_9H_7O_4$	179.0351	0.1
		135	$C_8H_7O_2$	135.0452	0
C	355		$C_{16}H_{19}O_9$	355.1039	0.5
		193	$C_{10}H_9O_4$	193.0508	0.2
		178	$C_9H_6O_4$	178.0274	0.2
		149	$C_9H_9O_2$	149.0610	0.2
		134	$C_8H_6O_2$	134.0375	0.2
D	681		$C_{32}H_{41}O_{16}$	681.2409	0.8
		519	$C_{26}H_{31}O_{11}$	519.1881	0.9
		357	$C_{20}H_{21}O_6$	357.1349	0.6
E	685		$C_{32}H_{45}O_{16}$	685.2714	0.1
		523	$C_{26}H_{35}O_{11}$	523.2186	0.1
		361	$C_{20}H_{25}O_6$	361.1654	-0.3
		343	$C_{20}H_{23}O_5$	343.1556	0.5
F	683		$C_{32}H_{41}O_{16}$	683.2550	-0.6
		521	$C_{26}H_{33}O_{11}$	521.2026	-0.2
		359	$C_{20}H_{23}O_6$	359.1492	-0.8
		344	$C_{19}H_{20}O_6$	344.1271	0.6
G	523		$C_{26}H_{34}O_{11}$	523.2188	0.3
		361	$C_{20}H_{25}O_6$	361.1655	-0.2
		346	$C_{19}H_{22}O_6$	346.1418	-0.4
		343	$C_{20}H_{23}O_5$	343.1557	0.7
		165	$C_9H_9O_3$	165.0559	0.1
H	361		$C_{20}H_{25}O_6$	361.1663	0.6
		315	$C_{18}H_{19}O_5$	315.1241	0.3
		179	$C_{10}H_{11}O_3$	179.0712	-0.2
		165	$C_9H_9O_3$	165.0555	-0.2
		161	$C_{10}H_9O_2$	161.0606	-0.2
		147	$C_9H_7O_2$	147.0449	-0.2
		129	C_9H_5O	129.0343	-0.3
		121	$C_7H_5O_2$	121.0292	-0.3
		109	$C_6H_5O_2$	109.0292	-0.3
		93	C_6H_5O	93.0343	-0.3

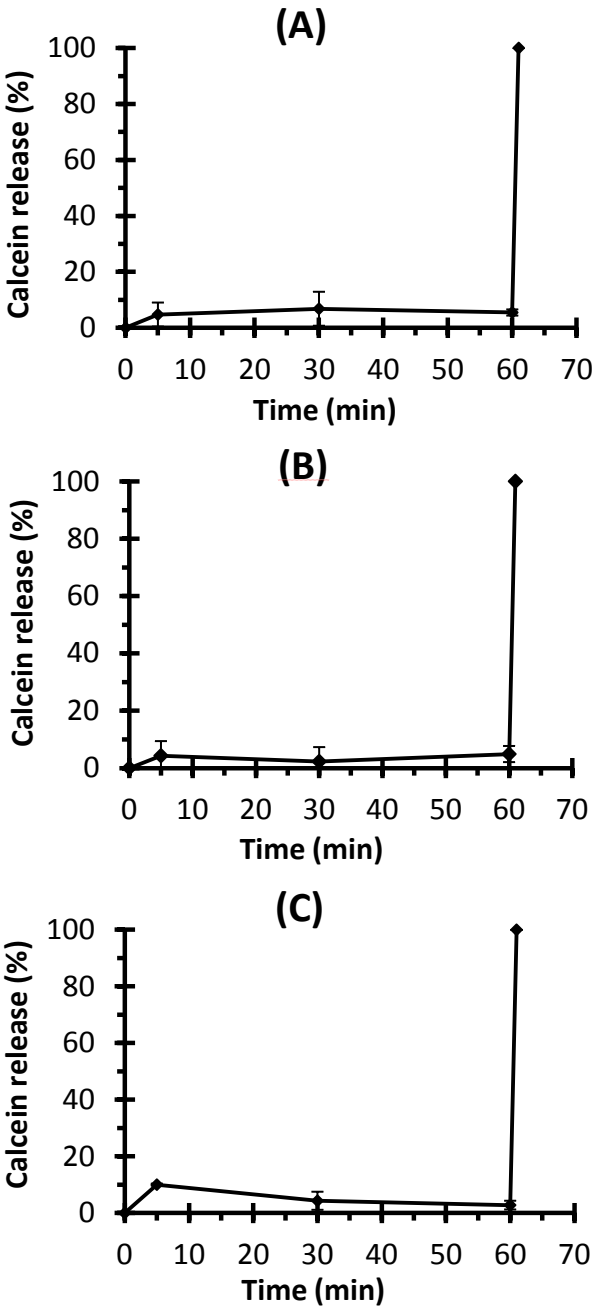
I	343		$C_{20}H_{23}O_5$	343.1559	0.8
		328	$C_{19}H_{20}O_5$	328.1322	0.6
		313	$C_{18}H_{17}O_5$	313.1085	0.4
		299	$C_{18}H_{19}O_4$	299.1293	0.4
		203	$C_{12}H_{11}O_3$	203.0713	0
		191	$C_{11}H_{11}O_3$	191.0712	-0.1
		161	$C_{10}H_9O_2$	161.0607	-0.1
		123	$C_7H_7O_2$	123.0448	-0.4
		121	$C_7H_5O_2$	121.0293	-0.2
		109	$C_6H_5O_2$	109.0293	-0.2
		93	C_6H_5O	93.0344	-0.1

Supp. 3 NMR characterization of purified compounds. The structures of compounds A-I are represented in Supp 1. (The table is displayed on pages 178-180).

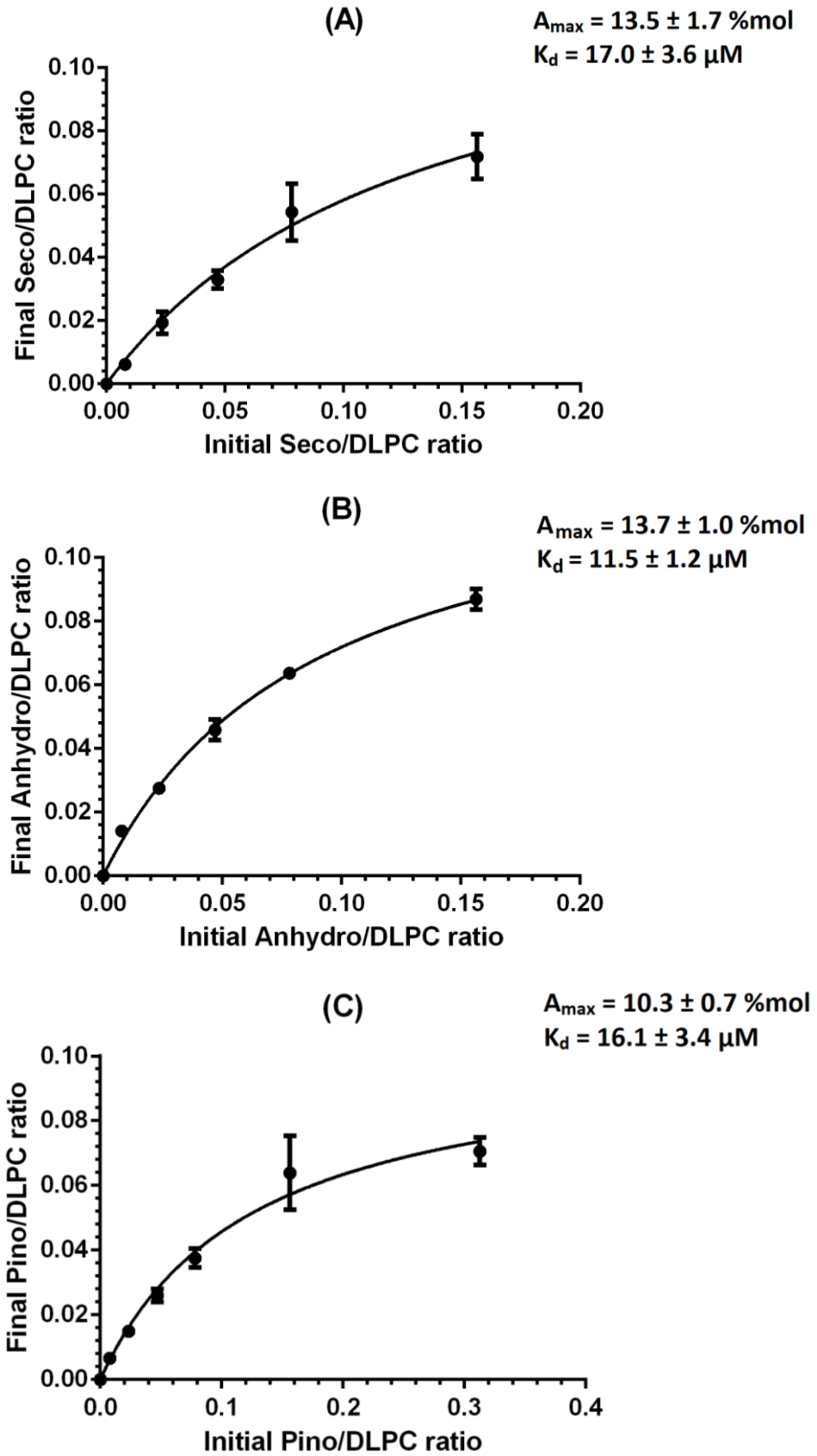
Compound	A		B		C	
Position	δH (ppm) J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm) J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm) J (Hz)	δC (ppm)
1		133.1		134.1		133.3
2	7.57, 1H, d (8.7)	132.5	7.14, 1H, d (2.1)	117.8	7.27, 1H, d (1.7)	114.2
3	7.13, 1H, d (8.7)	119.6		149.4		152
3-O-CH3					3.91, 3H, s	58.9
4		161.3		149.2		150
5	7.13, 1H, d (8.7)	119.6	7.15, 1H, d (8.5)	119.6	7.16, 1H, d (8.5)	118.9
6	7.57, 1H, d (8.7)	132.5	7.07, 1H, dd (2.1, 8.5)	124.2	7.19, 1H, dd (1.7, 8.5)	124.7
7	7.44, 1H, d (15.9)	144.7	7.34, 1H, d (15.9)	143.9	7.40, 1H, d (15.9)	144.3
8	6.40, 1H, d (15.9)	124.1	6.39, 1H, d (15.9)	125.6	6.42, 1H, d (15.9)	125.2
9		176.6		177.5		177.1
1'	5.06, 1H, d (7.5)	103.3	5.00, 1H, d (7.3)	104.5	5.05, 1H, d (7.4)	103.7
2'	3.52, 1H, m	76.4	3.63, 1H, m	76.3	3.58, 1H, m	76.2
3'	3.57, 1H, m	79.7	3.62, 1H, m	78.8	3.57, 1H, m	79.0
4'	3.46, 1H, m	72.9	3.54, 1H, m	72.7	3.49, 1H, m	72.6
5'	3.55, 1H, m	79.3	3.58, 1H, m	79.6	3.54, 1H, m	79.5
6'	3.90, 1H, dd (2.3, 12.4)	63.9	3.93, 1H, dd (2.1, 12.7)	63.8	3.89, 1H, dd (2.1, 12.4)	63.9
	3.74, 1H, dd (5.4, 12.4)		3.80, 1H, dd (5.0, 12.7)		3.74, 1H, dd (5.3, 12.4)	
1a						
2a						
3a						
3a-O-CH3						
4a						
5a						
6a						
7a						
8a						
9a						
1a'						
2a'						
3a'						
4a'						
5a'						
6a'						

Compound	D		E		F	
Position	**δH (ppm) J (Hz)**	**δC (ppm)**	**δH (ppm) J (Hz)**	**δC (ppm)**	**δH (ppm) J (Hz)**	**δC (ppm)**
1		135.5		136.0		140.7
2	7.06, 1H, d (1.9)	113.6	6.54, 1H, d (2.0)	115.2	6.73, 1H, d (1.7)	116.1
3		148.9		150.5		150.5
3-O-CH3	3.89, 3H, s	58.9	3.70, 3H, s	58.2	3.78, 3H, s	58.7
4		145.6		146.2		146.7
5	7.16, 1H, d (8.4)	119.3	6.72, 1H, d (8.0)	117.5	6.82, 1H, d (8.0)	117.9
6	6.98, 1H, dd (1.9, 8.4)	122.0	6.59, 1H, dd (2.0, 8.0)	124.6	6.69, 1H, dd (1.7, 8.0)	125.3
7	4.82, 1H, ND	88.8	2.80, 1H, dd (5.3, 14.0)	37.2	3.85, 2H, m	49.7
			2.52, 1H, dd (10.0, 14.0)			
8	3.19, 1H, m	56.5	2.04, 1H, m	42.4	1.95, 1H, m	47.1
9	4.27, 1H, dd (6.7, 9.3)	74.5	4.10, 1H, dd (4.5, 10.4)	73.5	4.14, 1H, m	75.6
	3.91, 1H, dd (3.5, 9.3)		3.54, 1H, dd (8.0, 10.4)		3.61, 1H, m	
1'	5.00, 1H, d (7.4)	104.1	4.37, 1H, d (8.0)	106.2	4.39, 1H, d (7.9)	106.2
2'	3.57, 1H, m	76.3	3.25, 1H, m	76.4	3.28, 1H, m	76.5
3'	3.57, 1H, m	78.9	3.44, 1H, m	79.1	3.45, 1H, m	79.1
4'	3.47, 1H, m	72.6	3.40, 1H, m	72.5	3.38, 1H, m	72.5
5'	3.51, 1H, m	79.6	3.31, 1H, m	78.9	3.21, 1H, m	79.0
6'	3.88, 1H, dd (2.0, 12.3)	63.9	3.81, 1H, dd (2.2, 12.3)	63.8	3.89, 1H, dd (2.1, 12.3)	63.6
	3.74, 1H, dd (5.2, 12.3)		3.73, 1H, dd (5.3, 12.3)		3.71, 1H, dd (5.1, 12.3)	
1a		135.5		136.0		131.7
2a	7.06, 1H, d (1.9)	113.6	6.54, 1H, d (2.0)	115.2	6.77, 1H, s	114.7
3a		148.9		150.5		149.0
3a-O-CH3	3.89, 3H, s	58.9	3.70, 3H, s	58.2	3.82, 3H, s	58.7
4a		145.6		146.2		135.6
5a	7.16, 1H, d (8.4)	119.3	6.72, 1H, d (8.0)	117.5	6.21, 1H, d (1.6)	119.0
6a	6.98, 1H, dd (1.9, 8.4)	122.0	6.59, 1H, dd (2.0, 8.0)	124.6	ND	ND
7a	4.82, 1H, ND	88.8	2.80, 1H, dd (5.3, 14.0)	37.2	3.85, 1H, d (10.3)	49.6
			2.52, 1H, dd (10.0, 14.0)			
8a	3.19, 1H, m	56.5	2.04, 1H, m	42.4	2.20, 1H, m	39.6
9a	4.27, 1H, dd (6.7, 9.3)	74.5	4.10, 1H, dd (4.5, 10.4)	73.5	2.93, 1H, dd (4.4, 15.8)	35.3
	3.91, 1H, dd (3.5, 9.3)		3.54, 1H, dd (8.0, 10.4)		2.80, 1H, dd (10.3, 15.8)	
1a'	5.00, 1H, d (7.4)	104.1	4.37, 1H, d (8.0)	106.2	4.17, 1H, d (7.9)	105.6
2a'	3.57, 1H, m	76.3	3.25, 1H, m	76.4	3.24, 1H, m	76.3
3a'	3.57, 1H, m	78.9	3.44, 1H, m	79.1	3.38, 1H, m	79.1
4a'	3.47, 1H, m	72.6	3.40, 1H, m	72.5	3.37, 1H, m	72.5
5a'	3.51, 1H, m	79.6	3.31, 1H, m	78.9	3.21, 1H, m	79.0
6a'	3.88, 1H, dd (2.0, 12.3)	63.9	3.81, 1H, dd (2.2, 12.3)	63.8	3.77, 1H, m	72.2
	3.74, 1H, dd (5.2, 12.3)		3.73, 1H, dd (5.3, 12.3)		3.63, 1H, m	

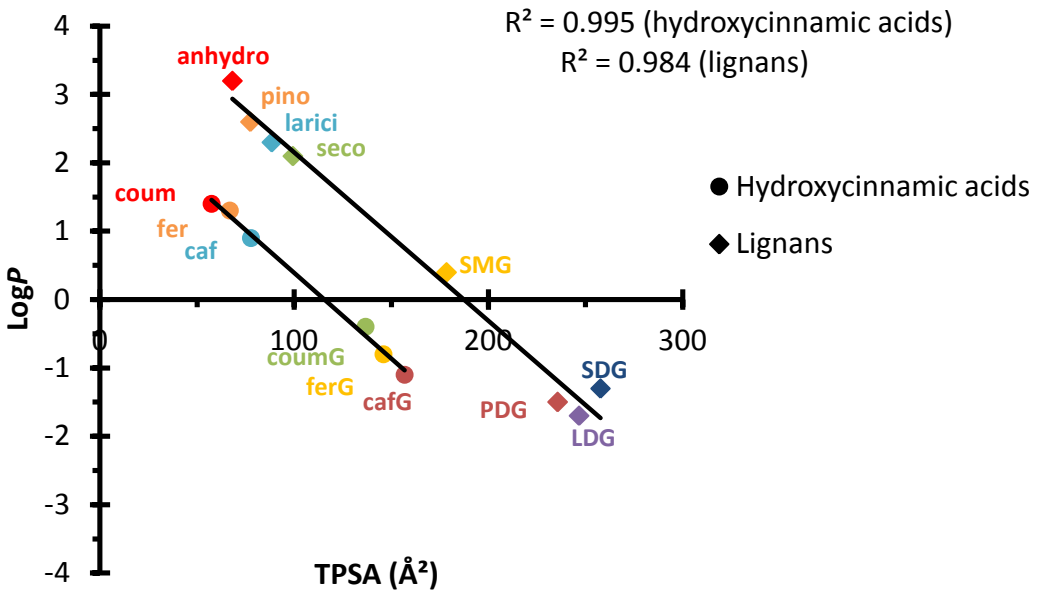
Compound	G		H		I	
Position	**δH (ppm) J (Hz)**	**δC (ppm)**	**δH (ppm) J (Hz)**	**δC (ppm)**	**δH (ppm) J (Hz)**	**δC (ppm)**
1		136.3		131.9		132.4
2	6.54, 1H, d (1.8)	115.6	6.58, 1H, d (1.9)	111.2	6.50, 1H, d (1.7)	111.2
3		150.5		143.4		143.9
3-O-CH3	3.70, 3H, s	58.5	3.82, 3H, s	55.9	3.83, 3H, s	55.8
4		146.4		145.9		146.8
5	6.72, 1H, d (3.3)	117.7	6.80, 1H, d (7.9)	113.9	6.80, 1H, d (8.0)	114.2
6	6.57, 1H, dd (1.8, 3.4)	124.8	6.63, 1H, dd (1.9, 7.9)	121.5	6.58, 1H, dd (1.7, 8.0)	121.3
7	2.75, 1H, dd (5.8, 13.8)	37.6	2.75, 1H, dd (8.0, 13.5)	35.8	2.58, 1H, dd (6.7, 13.8)	39.4
	2.50, 1H, m		2.65, 1H, dd (6.5, 13.5)		2.52, 1H, dd (7.8, 13.8)	
8	2.02, 1H, m	42.7	1.86, 1H, m	43.8	2.16, 1H, m	44.4
9	3.53, 1H, m	73.5	3.56, 1H, dd (4.4, 11.2)	60.8	3.53, 1H, dd (5.8, 8,7)	73.3
	4.05, 1H, dd (4.9, 10.4)		3.81, 1H, dd (2.1, 11.2)		3.91, 1H, dd (6.7, 8,7)	
1'	4.31, 1H, d (7.9)	106.2				
2'	3.28, 1H, m	76.5				
3'	3.43, 1H, m	79.3				
4'	3.38, 1H, m	72.5				
5'	3.28, 1H, m	79.2				
6'	3.83, 1H, dd (2.3, 12.2)	63.9				
	3.74, 1H, dd (5.2, 12.2)					
1a		136.3		131.9		132.4
2a	6.53, 1H, d (1.8)	115.6	6.58, 1H, d (1.9)	111.2	6.50, 1H, d (1.9)	111.2
3a		150.5		143.4		143.9
3a-O-CH3	3.71, 3H, s	58.5	3.82, 3H, s	55.9	3.83, 3H, s	55.8
4a		146.4		145.9		146.8
5a	6.71, 1H, d (3.3)	117.7	6.80, 1H, d (7.9)	113.9	6.80, 1H, d (8.0)	114.2
6a	6.56, 1H, dd (1.8, 3.4)	124.8	6.63, 1H, dd (1.9, 7.9)	121.5	6.58, 1H, dd (1.9, 8.0)	121.3
7a	2.65, 1H, dd (5.8, 13.8)	37.3	2.75, 1H, dd (8.0, 13.5)	35.8	2.58, 1H, dd (6.7, 13.8)	39.4
	2.50, 1H, m		2.65, 1H, dd (6.5, 13.5)		2.52, 1H, dd (7.8, 13.8)	
8a	1.85, 1H, m	44.9	1.86, 1H, m	43.8	2.16, 1H, m	44.4
9a	3.53, 1H, m	64.3	3.56, 1H, dd (4.4, 11.2)	60.8	3.53, 1H, dd (5.8, 8,7)	73.3
	3.70, 1H, dd (4.9, 10.4)		3.81, 1H, dd (2.1, 11.2)		3.91, 1H, dd (6.7, 8,7)	
1a'						
2a'						
3a'						
4a'						
5a'						
6a'						



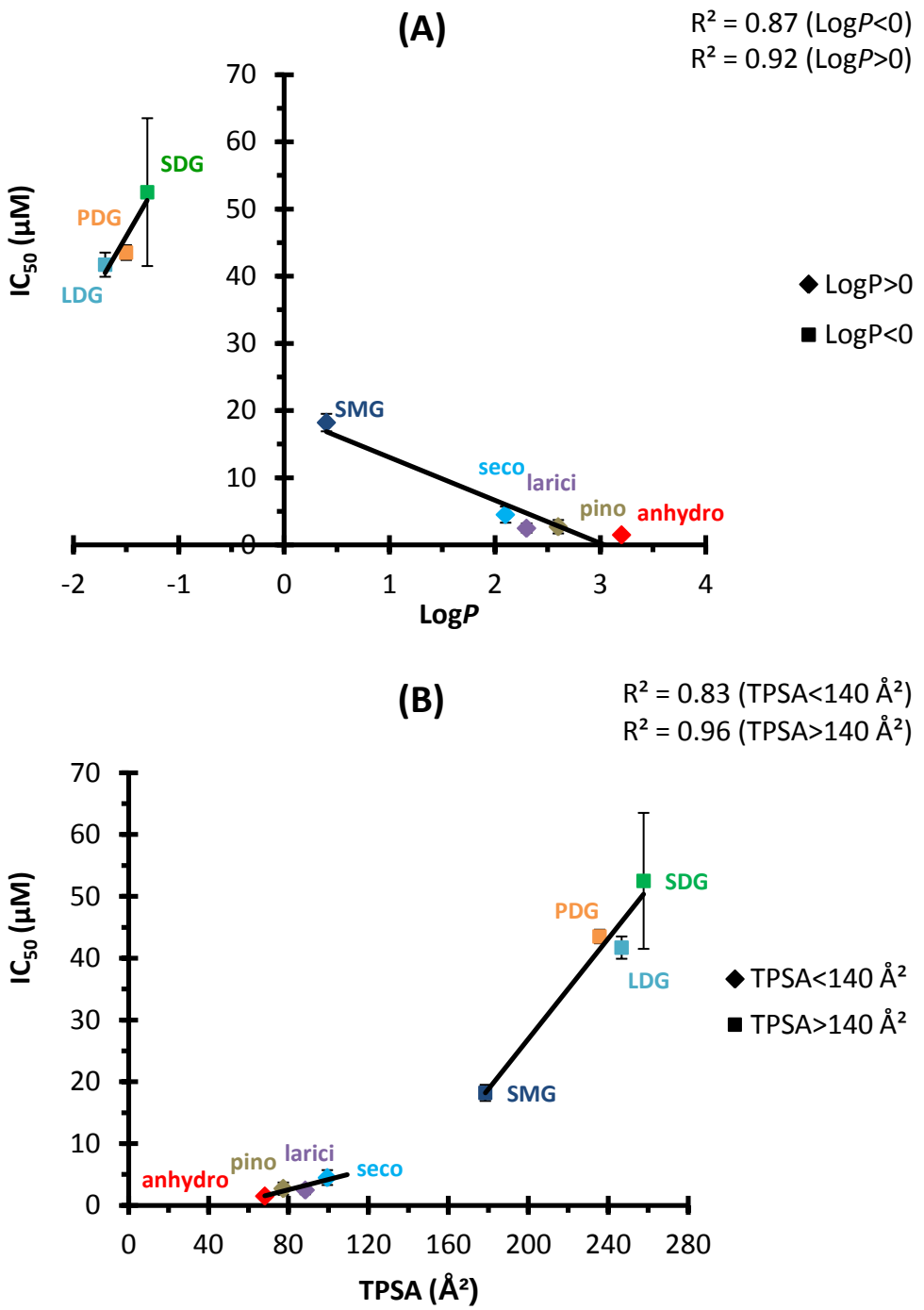
Supp. 4 Determination of calcein leakage due to the insertion of lignans inside the membrane. Seco (A), anhydro (B) and pino (C). Calcein containing liposomes were prepared and the fluorescence measured after preparation. Lignans were added after 5 minutes. Leakage percentages were calculated immediately after the addition of phenolic compounds, then at 30 and 60 minutes after addition. After 60 minutes, Triton X100 was added to release the total amount of encapsulated calcein. Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.



Supp. 5 Quantification of aglycone lignans inserted in DLPC liposomes. Seco (A), anhydro (B) and pino (C). Results are presented as the mean ± standard deviation of at least three experiments.



Supp. 6 Correlation between Log*P* and TPSA values of phenolic compounds. A color code was used to facilitate the identification of the compounds.



Supp. 7 Correlation between the IC_{50} and: (A) the Log*P*, (B) the TPSA of lignans. Because negative Log*P* are associated with hydrophilic properties (Kikuzaki, Hisamoto, Hirose, Akiyama, & Taniguchi, 2002), two populations were considered: the compounds with a negative Log*P* and the compounds with a positive one. For the TPSA, compounds were also divided in two populations, as it has been reported that compounds with a TPSA higher than 140 Å² cannot penetrate membranes (Veber *et al.*, 2002). A color code was used to facilitate the identification of the compounds. Because only two compounds presented an IC_{50}, the curves could not be drawn for hydroxycinnamic acids.

Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons montré que les lignanes sont globalement de meilleurs antioxydants que les acides hydroxycinnamiques prévenir l'oxydation des lipides. Les deux classes de composés présentent une relation structure-fonction puisque les composés glucosides sont moins efficaces que les aglycones. Enfin, les lignanes aglycones qui sont les seuls à pouvoir s'insérer dans la membrane, sont les composés phénoliques les plus efficaces. Leur fraction membranaire inhibe 70% de l'oxydation.

Discussion

Discussion

Chapitre I. Interactions des dérivés PBN avec les lipides membranaires

Bien que la PBN soit reconnue comme un antioxydant efficace biologique pour piéger les radicaux libres en milieu biologique, de fortes concentrations sont nécessaires pour obtenir un effet antioxydant significatif (Floyd *et al.*, 2008; Patrick, 2014). Les lipides étant l'une des cibles principale des EROs (Catalá, 2012), il a été suggéré que sa faible capacité à cibler les membranes pouvait être à l'origine de ce problème, ce qui a motivé la synthèse de dérivés PBN plus hydrophobes.

Dans les deux premiers chapitres de la partie résultats, nous avons étudié l'interaction de nitrones dérivées du cholestérol (cholestéryl-PBNs) et de nitrones fluorées avec les lipides à l'aide de monocouches de Langmuir et de liposomes. Dans un premier temps, les expériences de tensiométrie de surface ont montré que le chol-PBN, le L-PBN-chol et le chol-PBN-L, le FATx, le FAPBN et le FATxPBN sont capables de former des monocouches à la surface de l'eau. Ces molécules étant amphiphiles, elles possèdent des propriétés hydrophobes supérieures à celles de la PBN, ce qui devrait leur permettre de mieux cibler les membranes.

Bien qu'il ait été suggéré qu'elle agit comme un antioxydant retardateur (Barclay et Vinqvist, 2000), le mode d'action de la PBN n'a pas encore été élucidé à ce jour. Pour étudier la capacité des dérivés à protéger les lipides membranaires de l'oxydation et mieux comprendre le mode de fonctionnement de la PBN, nous avons réalisé des expériences de stress oxydant pour évaluer la capacité de ces composés à protéger les liposomes de DLPC de l'oxydation.

Les résultats obtenus par diffusion de la lumière et spectroscopie d'absorption ont souligné la capacité de tous les dérivés à protéger les liposomes de l'oxydation. Néanmoins, des différences d'efficacité en lien avec leur mécanisme d'action ont été observées.

Les cholestéryl-PBNs se sont avérés bien plus efficaces pour lutter contre l'oxydation induite par la réaction de Fenton que par l'AAPH. La capacité du groupement PBN à oxyder les ions Fe^{2+} en Fe^{3+} (Tero-Kubota *et al.*, 1982) pourrait expliquer ces différences. En oxydant les ions Fe^{2+}, le groupement PBN limite la dismutation du peroxyde d'hydrogène et donc la formation de radicaux hydroxyles au voisinage de la membrane (Cf. figure 1A). Ceci se traduit par une inhibition de l'étape d'initiation de la peroxydation lipidique.

En revanche, pour ce qui est des radicaux AAPH, le groupement PBN ne semble pas empêcher ces derniers de diffuser à travers la membrane et d'attaquer les AGPI, vu que l'on observe une augmentation importante des pourcentages d'oxydation même en présence des cholestéryl-PBNs. Néanmoins, comme on observe une réduction des pourcentages par rapport au témoin, on peut penser que ces molécules neutralisent la formation de radicaux peroxyles au sein de la membrane, inhibant ainsi l'étape de propagation de la peroxydation lipidique.

En outre, bien que les deux isomères de structure aient une efficacité antioxydante similaire face aux radicaux hydroxyles, des différences d'efficacité ont été observées face aux radicaux AAPH. En effet, après deux heures d'incubation, les pourcentages d'oxydation augmentent jusqu'à 70 % avec le L-PBN-chol alors qu'ils atteignent 85 % avec le chol-PBN-L (Article 1, figure 5A). Ceci pourrait s'expliquer par une différence de réactivité du groupement nitrone. En effet, il a été reporté que les analogues structuraux du dérivé LPBNH15 présentent des différences d'efficacité pour réduire l'ABTS (Durand *et al.*, 2010).

Pour expliquer cet effet, les auteurs ont suggéré que la position des substituants affecte la réactivité de la PBN. Dans notre cas, ceci pourrait s'expliquer par la position du groupement nitrone vis-à-vis des chaînes acyles des phospholipides. Dans le cas du chol-PBN-L, le groupement nitrone se trouve du côté de la lactobionamide, au niveau des têtes polaires des phospholipides. Pour ce qui est du L-PBN-chol, le groupement nitrone se trouve du côté du cholestérol, un peu plus au contact des chaînes acyles des phospholipides (Cf. figure 1). Ainsi, en étant plus proche des chaînes acyles des phospholipides, le groupement nitrone est plus à même de neutraliser les radicaux peroxyles au sein de la membrane.

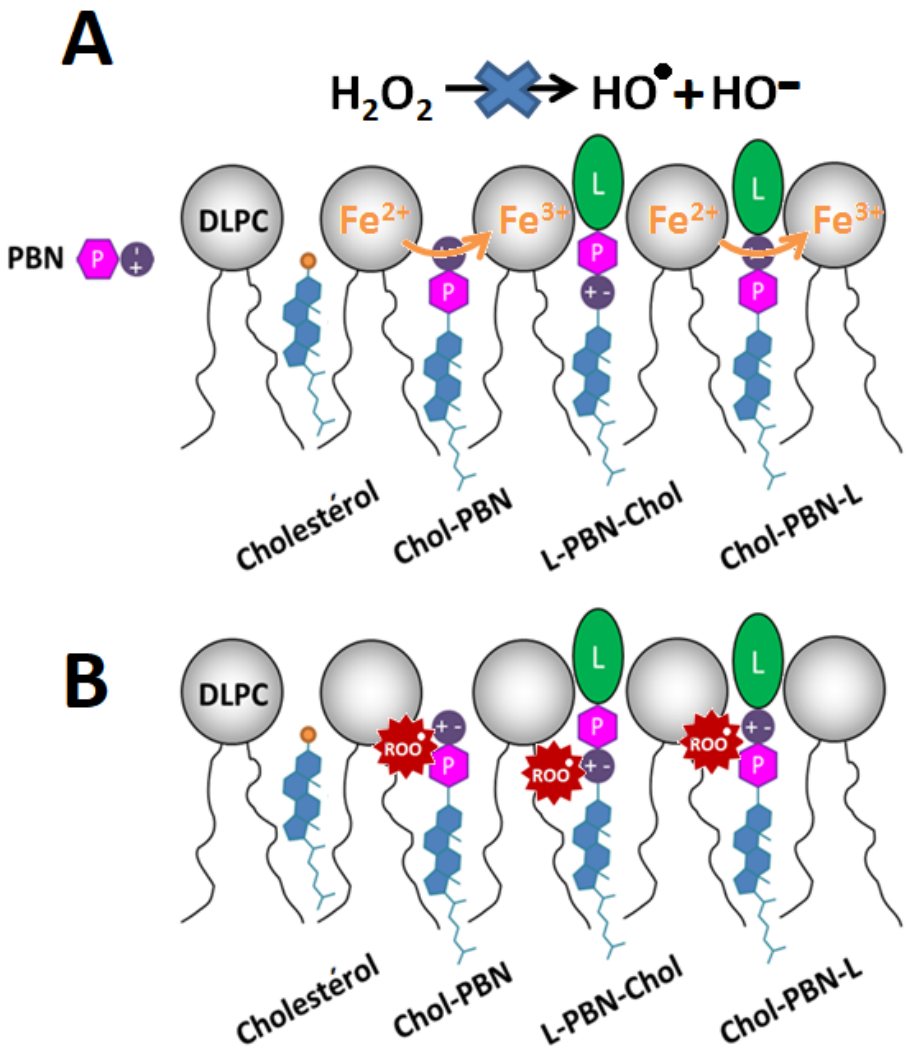


Figure 1. Représentation schématique de l'inhibition de l'oxydation des lipides par les cholestéryls-PBN au sein d'une membrane de DLPC. Cas des radicaux hydroxyles (A), cas des radicaux peroxyles (B).

Pour ce qui est des dérivés fluorés, les résultats indiquent un enfouissement assez important, puisqu'ils se trouvent à moins de 15 Å du centre de la membrane, sachant que l'épaisseur moyenne d'une bicouche lipidique est comprise entre 60 et 70 Å (Lewis et Engelman, 1983). Cette proximité avec les chaînes acyles, permet une capture plus facile des radicaux peroxyles formés à la suite de l'attaque des radicaux AAPH, ce qui limite la phase de propagation de la peroxydation lipidique (Cf. figure 2).

L'étude des propriétés antioxydantes a permis de mettre en évidence l'efficacité antioxydante marquée du FATx et du FATxPBN par rapport au FAPBN (IC_{50} respectives de 0,6 et 0,9 µM contre 29,4 µM pour le FAPBN). La position moins enfouie du FAPBN par rapport aux deux autres composés (Z_{cf}=12.8 Å contre 9.2 et 8.7 Å pour le FATx et le FATxPBN) explique en partie ces différences d'efficacité puisqu'il a été montré que l'interaction directe avec les phospholipides membranaires favorise une meilleure efficacité antioxydante (Azouzi *et al.*, 2017; Košinová *et al.*, 2012). Néanmoins, les différences d'efficacité observées avec les molécules mères, suggère que la nature de l'antioxydant reste le paramètre le plus important.

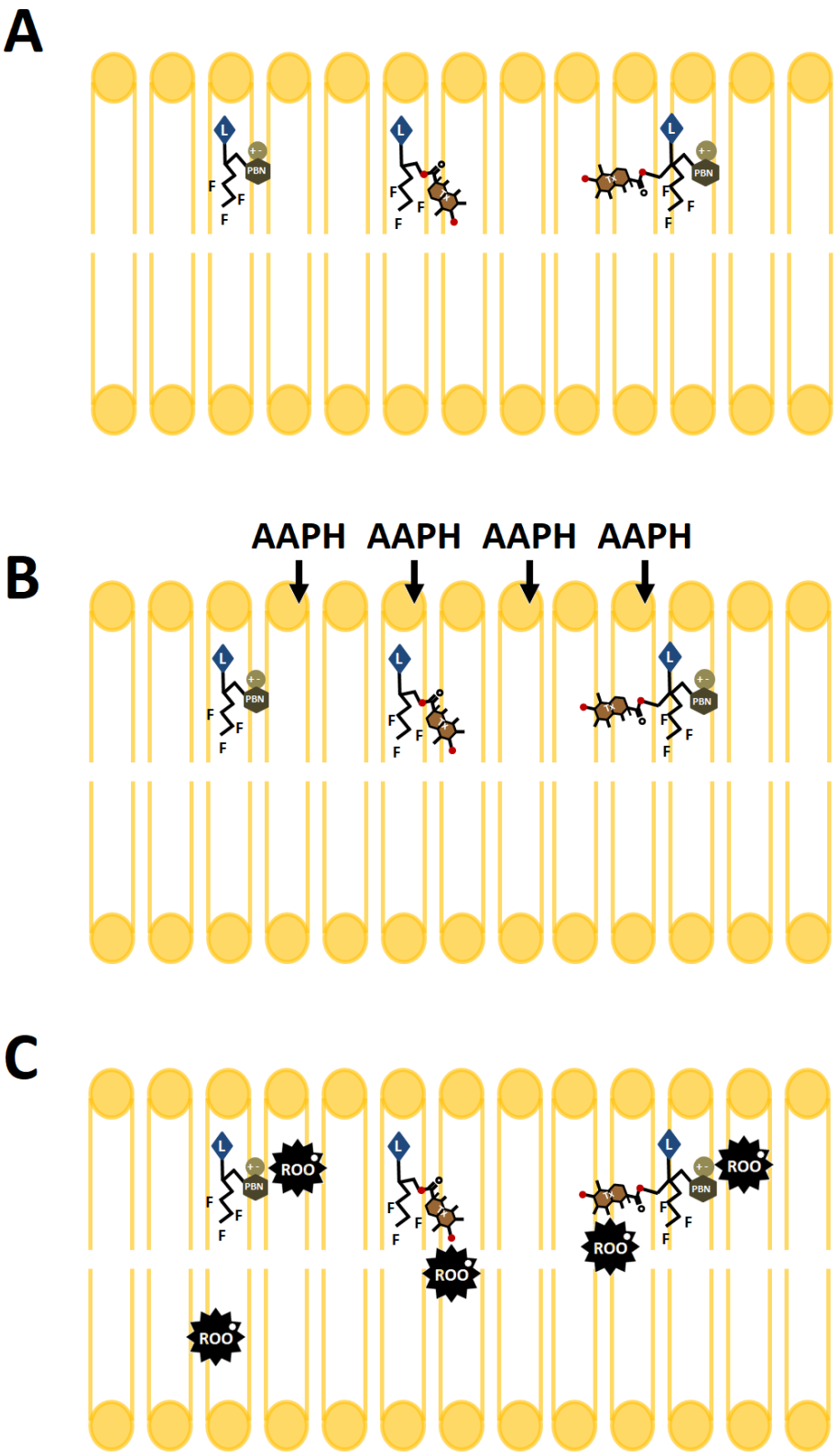


Figure 2. Représentation schématique de l'effet protecteur des dérivés fluorés contre la peroxydation lipidique. Position des dérivés au sein de la membrane (A), diffusion des radicaux AAPH (B) et capture des radicaux peroxyles (C).

Par ailleurs, la comparaison des IC_{50} suggère la présence d'un effet de synergie dans le cas du FATxPBN. En effet, l'IC_{50} de ce dernier est bien inférieure à la moyenne de celles du FAPBN et du FATx. Néanmoins, du fait que le FATx possède une IC_{50} proche de celle du FATxPBN (0,6 contre 0,9 µM), l'effet de synergie peut ne pas paraître évident au premier abord. Néanmoins, la capacité du FATxPBN à fortement retarder l'oxydation (Article 2, figures 4A et 5) suggère que cette molécule exerce un mécanisme de synergie par effet retardateur en combinant à la fois l'effet retardateur de la PBN (Barclay et Vinqvist, 2000) et l'effet briseur de réaction radicalaire en chaîne du Trolox (Franzoni *et al.*, 2006). D'après les valeurs de Z_{cf}, le FAPBN est moins enfoui que le FATx, ce qui laisse penser que le motif FAPBN présent sur le FATxPBN est le premier à capter les radicaux AAPH qui diffuserait à travers la membrane. Ceci pourrait expliquer l'effet retardateur observé pendant 60 minutes, indépendamment de la concentration en FATxPBN (Article 2, figure 4A). Néanmoins, en l'absence de données expérimentales sur le degré de liberté du « linker » lysine, cette hypothèse est à relativiser.

Chapitre II. Interactions des composés phénoliques avec les membranes

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence la capacité des acides hydroxycinnamiques et lignanes à protéger les liposomes de DLPC de l'oxydation mais avons constaté des différences significatives entre les composés glucosides et les aglycones. Puisque l'interaction avec les chaînes acyles est essentielle pour obtenir un effet antioxydant prononcé (Azouzi *et al.*, 2017; Socrier *et al.*, 2017), nous avons étudié la capacité de ces composés à pénétrer des membranes à l'aide de monocouches de Langmuir.

Les résultats des expériences de tensiométrie de surface, l'analyse des Log*P* et des TPSA ont mis en évidence de faibles interactions entre les composés glucosides et la membrane, que nous avons attribuées à leur caractère polaire prononcé, en accord avec la littérature (Heim *et al.*, 2002; Londoño-Londoño *et al.*, 2010). En ce qui concerne les composés aglycones, les acides hydroxycinnamiques présentent un comportement similaire aux composés glucosides contrairement aux lignanes aglycones qui sont capables de pénétrer les membranes.

De manière générale, nous avons observé une bonne corrélation entre la capacité des composés phénoliques à interagir avec la membrane et leur efficacité antioxydante puisque les lignanes aglycones se sont révélés plus efficaces que tous les autres composés.

L'ensemble des résultats obtenus avec les composés phénoliques nous a permis de proposer deux modes d'action pour lutter contre la peroxydation lipidique (Cf. figure 1). Comme indiqué par les résultats de tensiométrie de surface, les acides hydroxycinnamiques ne sont pas capables de pénétrer les membranes. Néanmoins, comme les résultats indiquent la présence d'interactions avec les monocouches, on peut penser que ces composés s'associent avec la membrane au niveau des têtes polaires sans pénétrer jusqu'au cœur hydrophobe (Cf. figure 1B). Le contact avec les chaînes acyles étant limité, ces composés ne

peuvent qu'intervenir sur la phase d'initiation de la peroxydation lipidique, en neutralisant les EROs avant qu'elles ne pénètrent dans la membrane (Cf. figure 1D). Les résultats obtenus par Bonarska-Kujawa et ses collaborateurs appuient cette hypothèse. Ces derniers ont montré que les composés phénoliques extraits des myrtilles s'accumulent au niveau des têtes polaires des phospholipides des membranes de globules rouges. Ainsi, les composés phénoliques formeraient une barrière qui limiterait la diffusion des radicaux dans la membrane, protégeant ainsi ces dernières de l'oxydation (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2014).

Contrairement aux acides hydroxycinnamiques, les lignanes sont capables de pénétrer spontanément dans la membrane pour se retrouver au contact des chaînes acyles des phospholipides (Cf. figure 1B). Par conséquent, lorsque les EROs attaquent les AGPI, les lignanes peuvent neutraliser directement les radicaux peroxyles formés limitant ainsi l'étape de propagation de la peroxydation lipidique (Cf. figure 1D). D'après Gutiérrez et ses collaborateurs, cet effet pourrait être dû à une augmentation de la fluidité membranaire (Gutiérrez *et al.*, 2003). En effet, ces derniers ont montré que les composés phénoliques extraits d'agrumes et du romarin sont capables d'augmenter la fluidité des membranes des cellules bovines, ce qui aurait pour effet de favoriser les interactions entre les composés phénoliques et les radicaux peroxyles.

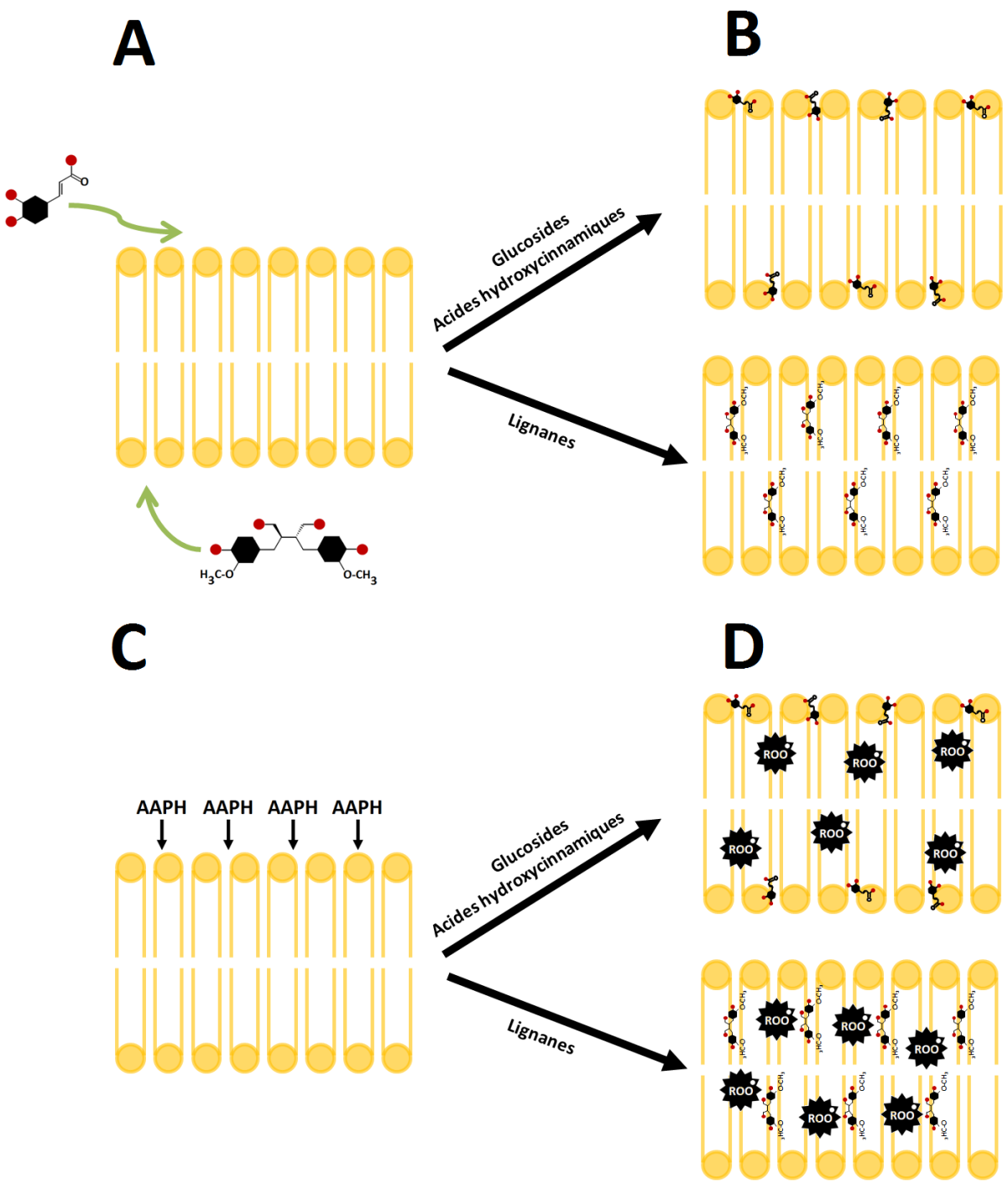


Figure 1. Représentation schématique du mode d'action proposé pour les composés phénoliques testés : cas de l'acide caféique et du sécoisolaricirésinol. Interaction des composés avec une membrane de DLPC (A), position des composés dans la membrane (B), attaque des radicaux AAPH (C), capture des radicaux peroxyles par les composés phénoliques (D).

Perspectives

Perspectives

Les expériences de tensiométrie de surface menées avec les lignanes aglycones suggèrent que le laricirésinol est incapable de pénétrer les membranes alors même qu'il présente une structure et une activité antioxydante proche de celle des autres lignanes aglycones. Néanmoins, de fortes interactions avec les monocouches ont été observées ($\Delta\pi_{30mN/m}$ moyen de 4 mN/m). Comme il a été reporté que la modification de la planéité d'un composé peut altérer sa capacité à interagir avec une monocouche (Nelson *et al.,* 1990), il serait intéressant de faire des expériences de modélisation moléculaire pour comparer la structure 3D des lignanes aglycones et visualiser leurs interactions avec la membrane.

En outre, nous avons mené notre étude avec les composés phénoliques sous forme native. Or, comme ils sont rapidement métabolisés par la flore intestinale une fois consommés, la biodisponibilité des molécules natives est faible (les concentrations plasmatiques sont de l'ordre du µmol/L). Puisque certains auteurs (Cardona *et al.*, 2013) attribuent les bienfaits des composés phénoliques à l'action de leurs métabolites et que ces derniers sont peu étudiés, il pourrait être intéressant d'étudier *in vitro* leurs interactions avec les membranes afin de compléter nos travaux.

Par ailleurs, l'approche que nous avons utilisée pour caractériser nos antioxydants présente certaines limites. En effet, même s'ils sont faciles à préparer et que l'on peut facilement faire varier les conditions expérimentales, les systèmes membranaires biomimétiques que nous avons utilisés présentent le désavantage de simplifier au maximum les membranes. En effet, avec ces modèles membranaires, il n'est possible d'utiliser que quatre lipides au maximum (Eeman et Deleu, 2010) alors même que les cellules en comptent plus de 1000 (van Meer *et al.*, 2008).

En outre, ces systèmes ne prennent pas en compte la présence des protéines qui pourraient avoir une influence sur les interactions que nous avons observées *in vitro*.

Ainsi, pour compléter ces travaux et approfondir les résultats, il pourrait être intéressant d'évaluer les interactions des antioxydants chimiques et naturels avec des cellules. L'utilisation de monocouches de cellules Caco-2 pourrait permettre d'étudier la perméabilité cellulaire des composés et ainsi prédire leur biodisponibilité *in vivo*.

De plus, pour ce qui est des propriétés antioxydantes, des tests préliminaires pourraient être réalisés *in vitro* avec des cellules. Pour ce faire, on pourrait incuber ces dernières avec les composés et un indicateur sensible à l'oxydation. L'exposition des cellules à un stress oxydant entraînera la dégradation de l'indicateur en un composé fluorescent. Si les composés testés sont efficaces, le signal de fluorescence sera faible.

Ensuite, on pourrait passer sur un organisme entier en inoculant les composés à des rats puis en les exposants à un agent pro-oxydant. Le suivi par spectrométrie de masse de l'apparition des isoprostanes F_2 et F_4, bio-marqueurs de l'oxydation des lipides, permettra ainsi d'évaluer la capacité des composés à protéger *in vivo* les membranes de l'oxydation.

En outre, puisque le FATxPBN présente un effet de synergie, on pourrait tester des mélanges de composés phénoliques pour voir si on peut obtenir un effet de synergie avec ces derniers. Aussi, puisque nous avons montré que les acides hydroxycinnamiques et les lignanes agissent sur l'oxydation des lipides à des niveaux différents, il pourrait être intéressant de les greffer sur une même molécule pour obtenir un effet de synergie en bloquant à la fois la phase d'initiation et la phase de propagation de la peroxydation lipidique.

Une des perspectives à long terme serait de valoriser nos antioxydants dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique ou encore pharmacologique. En effet, au cours des différentes étapes de leur fabrication, les produits industriels sont exposés à plusieurs facteurs (dioxygène, température, radiations lumineuses) pouvant entraîner l'oxydation des AGPI qu'ils contiennent. L'incorporation de nos antioxydants pourrait permettre de limiter au maximum la détérioration des AGPI et ainsi préserver les qualités des produits.

Les antioxydants chimiques sont utilisés comme conservateurs dans l'industrie agroalimentaire depuis plus de 50 ans (Saad *et al.*, 2007). Cependant, leur utilisation a récemment diminué car des études récentes ont mis en évidence l'implication des conservateurs traditionnels (BHA et BHT) dans l'apparition de diverses maladies, ce qui a conduit ainsi à l'adoption d'une directive par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture limitant leur quantité à 200 mg/kg. Ainsi, la piste à privilégier pour valoriser nos antioxydants synthétiques semble être l'industrie cosmétique, d'autant plus qu'il n'existe pas de règlementation en vigueur spécifique (Fernandez *et al.*, 2012).

En ce qui concerne les acides hydroxycinnamiques et les lignanes, ils pourraient être aussi utilisés dans l'industrie cosmétique mais une valorisation agroalimentaire semble plus pertinente car le marché des antioxydants dans l'industrie agroalimentaire (500 milliards de dollars en 2010) croit d'environ 5% chaque année (Shahidi et Ambigaipalan, 2015) et que l'on observe une demande croissante des consommateurs de produits naturels.

Communications scientifiques

Communications scientifiques

❖ Articles

– **Socrier L.**, Rosselin M., Choteau F., Durand G. et Morandat S. *Cholesterol-nitrone congugates as protective agents against lipid oxidation : A model membrane study*. Accepté, sous presse, Journal : BBA – Biomembranes. DOI : 10.1016/j.bbamem.2017.09.026.

– **Socrier L.**, Rosselin M., Gomez Giraldo A. M., Durand G. et Morandat S. *Nitrone-Trolox conjugate as a protective agent against lipid oxidation : Towards synergistic antioxidant effects*. Article soumis pour publication.

– **Socrier L.**, Quéro A., Verdu M., Song Y., Molinié R., Mathiron D., Pilard S., Mesnard F. et Morandat S. *Flax phenolic compounds: elucidation of their mechanisms of action.* Article soumis pour publication.

❖ Congrès

– **Socrier Larissa**, Quéro Anthony, Verdu Margaux, Song Yiming, Molinié Roland, Mathiron David, Pilard Serge, Mesnard François et Morandat Sandrine. *Flax phenolic compounds: elucidation of their mechanisms of action*.

19th IUPAB and 11th EBSA Congress. Edimbourg, Juillet 2017. Poster.

– **Socrier Larissa**, Quéro Anthony, Verdu Margaux, Song Yiming, Molinié Roland, Mathiron David, Pilard Serge, Mesnard François et Morandat Sandrine. *Flax phenolic compounds: elucidation of their mode of action*.

11th World Congress on polyphenols applications. Vienne, Juin 2017. Communication orale.

– **Socrier Larissa**, Rosselin Marie, Choteau Fanny, Durand Grégory et Morandat Sandrine. *New PBN derivatives as protective agents against lipid oxidation: a model membrane study*.

25th French biophysical society Congress. Obernai, Décembre 2016. Poster.

– **Socrier Larissa**, Rosselin Marie, Choteau Fanny, Durand Grégory et Morandat Sandrine. *New PBN derivatives to protect membranes from oxidation*.

1st International symposium on lipid oxidation and antioxidants. Porto, Juin 2016. Communication orale.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Acıkgoz, C., Onay, O., Kockar, O.M., 2004. Fast pyrolysis of linseed: product yields and compositions. J. Anal. Appl. Pyrolysis 71, 417–429.

Akin, D.E., Dodd, R.B., Foulk, J.A., 2005. Pilot plant for processing flax fiber. Ind. Crops Prod. 21, 369–378.

Alu'datt, M.H., Rababah, T., Alhamad, M.N., Al-Mahasneh, M.A., Almajwal, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Johargy, A., Alli, I., 2017. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. Food Chem. 218, 99–106.

Alu'datt, M.H., Rababah, T., Ereifej, K., Alli, I., 2013. Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. Food Chem. 139, 93–99.

Ambike, A., Rosilio, V., Stella, B., Lepeêtre-Mouelhi, S., Couvreur, P., 2011. Interaction of self-assembled squalenoyl gemcitabine nanoparticles with phospholipid-cholesterol monolayers mimicking a biomembrane. Langmuir 27, 4891–4899.

ANDJELKOVIC, M., VANCAMP, J., DEMEULENAER, B., DEPAEMELAERE, G., SOCACIU, C., VERLOO, M., VERHE, R., 2006. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. Food Chem. 98, 23–31.

Antonietti, V., Boudesocque, S., Dupont, L., Farvacques, N., Cézard, C., Da Nascimento, S., Raimbert, J.-F., Socrier, L., Robin, T.-J., Morandat, S., El Kirat, K., Mullié, C., Sonnet, P., 2017. Synthesis, iron(III) complexation properties, molecular dynamics simulations and P. aeruginosa siderophore-like activity of two pyoverdine analogs. Eur. J. Med. Chem. 17, 185–196.

Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant.

Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1569, 1–9.

Arshad, N., 2013. Spin trapping radicals from lipid oxidation in liposomes in the presence of flavonoids 1–10.

Arts, I.C.W., Hollman, P.C.H., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies 1 – 4. Am. J. Clin. Nutr. 81, 317S–25S.

Asanuma, T., Yasui, H., Inanami, O., Waki, K., Takahashi, M., Iizuka, D., Uemura, T., Durand, G., Polidori, A., Kon, Y., Pucci, B., Kuwabara, M., 2007. A new amphiphilic derivative, N-{[4-(Lactobionamido)methyl] benzylidene}-1,2-dimethyl-2-(octylsulfanyl) ethylamine N-oxide, has a protective effect against copper-induced fulminant hepatitis in long-Evans cinnamon rats at an extremely low concentration co. Chem. Biodivers. 4, 2253–2267.

Azouzi, S., Kirat, K.E., Morandat, S., 2010. The potent antimalarial drug cyclosporin a preferentially Destabilizes Sphingomyelin-Rich Membranes. Langmuir 26, 1960–1965.

Azouzi, S., Santuz, H., Morandat, S., Pereira, C., Côté, F., Hermine, O., El Kirat, K., Colin, Y., Le Van Kim, C., Etchebest, C., Amireault, P., 2017. Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. Biophys. J. 112, 1863–1873.

Babior, B.M., 1997. Superoxide: a two-edged sword. Brazilian J. Med. Biol. Res. 30, 141–155.

Baeuerle, P.A., Henkel, T., 1994. Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System. Annu. Rev. Immunol. 12, 141–179.

Bagatolli, L.A., 2006. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1758, 1541–1556.

Barclay, L.R.C., Vinqvist, M.R., 2000. Do spin traps also act as classical chain-breaking antioxidants? A quantitative kinetic study of phenyl tert-butylnitrone (PBN) in solution and in liposomes. Free Radic. Biol. Med. 28, 1079–1090.

Boisselier, É., Demers, É., Cantin, L., Salesse, C., 2017. How to gather useful and valuable

information from protein binding measurements using Langmuir lipid monolayers. Adv. Colloid Interface Sci. 243, 60–76.

Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Cyboran, S., Żyłka, R., Oszmiański, J., Kleszczyńska, H., 2014. Biophysical Mechanism of the Protective Effect of Blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L. var. kamtschatica Sevast.) Polyphenols Extracts Against Lipid Peroxidation of Erythrocyte and Lipid Membranes. J. Membr. Biol. 247, 611–625.

Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M., 2013. Glutathione peroxidases. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1830, 3289–3303.

Brown, D. a, Rose, J.K., 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 68, 533–544.

Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C.A., 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu2+ ions: implications for their antioxidant properties. Biochem. J. 330 Pt 3, 1173–8.

Cadenas, S., Barja, G., 1999. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO3. Free Radic. Biol. Med. 26, 1531–1537.

Cai, Y., Mei Sun, Jie Xing, Luo, Q., Corke, H., 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Sci. 78, 2872–2888.

Calder, P.C., 2014. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116, 1280–1300.

Calliste, C.A., Kozlowski, D., Duroux, J.L., Champavier, Y., Chulia, A.J., Trouillas, P., 2010. A new antioxidant from wild nutmeg. Food Chem. 118, 489–496.

Calvez, P., Bussières, S., Éric Demers, Salesse, C., 2009. Parameters modulating the maximum

insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. Biochimie 91, 718–733.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radic. Biol. Med. 22, 749–760.

Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., Queipo-Ortuño, M.I., 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. J. Nutr. Biochem. 24, 1415–1422.

Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem. Toxicol. 51, 15–25.

Catalá, A., 2012. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “fluid Mosaic Model” to the “lipid Whisker Model.” Biochimie 94, 101–109.

Chachaty, C., 1977. Spectrométrie par résonance paramagnétique électronique par. Transition 33, 885–885.

Chatterjee, S.N., Agarwal, S., 1988. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. Free Radic. Biol. Med. 4, 51–72.

Chen, K.L., Bothun, G.D., 2014. Nanoparticles Meet Cell Membranes: Probing Nonspecific Interactions using Model Membranes. Environ. Sci. Technol. 48, 873–880.

Cheniour, M., Brewer, J., Bagatolli, L., Marcillat, O., Granjon, T., 2017. Evidence of proteolipid domain formation in an inner mitochondrial membrane mimicking model. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1861, 969–976.

Chlebda, E., Magdalan, J., Merwid-Ląd, A., Trocha, M., Kopacz, M., Kuźniar, A., Nowak, D., Szeląg, A., 2010. Influence of water-soluble flavonoids, quercetin-5’-sulfonic acid sodium salt and morin-5’-sulfonic acid sodium salt, on antioxidant parameters in the subacute cadmium intoxication mouse model. Exp. Toxicol. Pathol. 62, 105–108.

Choteau, F., Durand, G., Ranchon-Cole, I., Cercy, C., Pucci, B., 2010. Cholesterol-based α-phenyl-N-tert-butyl nitrone derivatives as antioxidants against light-induced retinal degeneration. Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 7405–9.

Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radic. Biol. Med. 48, 749–762.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D. Vanden, 1998. Structure−Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. J. Nat. Prod. 61, 71–76.

Cracowski, J.-L., 2004. Les isoprostanes : un rôle physiopathologique potentiel en pathologie vasculaire. La Rev. Médecine Interne 25, 459–463.

Crane, F.L., 2001. Biochemical Functions of Coenzyme Q 10. J. Am. Coll. Nutr. 20, 591–598.

Cunnane, S.C., Hamadeh, M.J., Liede, A.C., Thompson, L.U., Wolever, T.M., Jenkins, D.J., 1995. Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. Am. J. Clin. Nutr. 61, 62–8.

Czemplik, M., et. al, 2011. Flax engineering for biomedical application. Biomed. Eng. Trends, Res. Technol. 407–434.

Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J.N., 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. Free Radic. Biol. Med. 62, 170–185.

Davies, J.., 1962. Mass transfer across interfaces. Interfacial Phenom. 39, 301.

De Athayde Moncorvo Collado, A., Dupuy, F.G., Morero, R.D., Minahk, C., 2016. Cholesterol induces surface localization of polyphenols in model membranes thus enhancing vesicle stability against lysozyme, but reduces protection of distant double bonds from reactive-oxygen species. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1858, 1479–1487.

De La Haba, C., Palacio, J.R., Martínez, P., Morros, A., 2013. Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1828, 357–364.

Defraigne, J.O., Pincemail, J., 2009. STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS : mythes et réalités. Rev Med Liège 63, 10–19.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. Antioxid. Redox Signal. 18, 1818–1892.

Der Mardirossian, C., Krafft, M.P., Gulik-Krzywicki, T., Le Maire, M., Lederer, F., 1998. Perfluoroalkylphosphocholines are poor protein-solubilizing surfactants, as tested with neutrophil plasma membranes. Biochimie 80, 531–541.

Di Majo, D., La Guardia, M., Leto, G., Crescimanno, M., Flandina, C., Giammanco, M., 2014. Flavonols and flavan-3-ols as modulators of xanthine oxidase and manganese superoxide dismutase activity. Int. J. Food Sci. Nutr. 65, 886–92.

Diederichsen, A., 2007. Ex situ collections of cultivated flax (Linum usitatissimum L.) and other species of the genus Linum L. Genet. Resour. Crop Evol. 54, 661–678.

Dixit, S., Kanakraj, S., Rehman, A., 2012. Linseed oil as a potential resource for bio-diesel: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 16, 4415–4421.

Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol. Rev. 82, 47–95.

Durand, G., Poeggeler, B., Böker, J., Raynal, S., Polidori, A., Pappolla, M.A., Hardeland, R., Pucci, B., 2007. Fine-Tuning the Amphiphilicity: A Crucial Parameter in the Design of Potent α-Phenyl- N - tert -butylnitrone Analogues. J. Med. Chem. 50, 3976–3979.

Durand, G., Poeggeler, B., Ortial, S., Polidori, A., Villamena, F.A., Böker, J., Hardeland, R.,

Pappolla, M.A., Pucci, B., 2010. Amphiphilic amide nitrones: A new class of protective agents acting as modifiers of mitochondrial metabolism. J. Med. Chem. 53, 4849–4861.

Durand, G., Polidori, A., Salles, J.P., Prost, M., Durand, P., Pucci, B., 2003. Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derived from PBN and lipoic acid. Bioorganic Med. Chem. Lett. 13, 2673–2676.

Dynarowicz-Łątka, P., Kita, K., 1999. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. Adv. Colloid Interface Sci. 79, 1–17.

Eeman, M., Deleu, M., 2010. From biological membranes to biomimetic model membranes. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14, 719–736.

Eklund, P.C., Långvik, O.K., Wärnå, J.P., Salmi, T.O., Willför, S.M., Sjöholm, R.E., 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. Org. Biomol. Chem. 3, 3336.

Engelman, D.M., 2005. Membranes are more mosaic than fluid. Nature 438, 578–580.

Fadel, O., El Kirat, K., Morandat, S., 2011. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1808, 2973–2980.

Faye, N., Gammoudi, I., Moroté, F., 2013. Phase Behavior and Structure Properties of Supported Lipid Monolayers and Bilayers in Interaction with Silica Nanoparticles. World Acad. Sci. Eng. Technol. 78, 1594–1601.

Ferger, B., 2000. The Protective Effects of PBN Against MPTP Toxicity Are Independent of Hydroxyl Radical Trapping. Pharmacol. Biochem. Behav. 65, 425–431.

Fernandez, X., Merck, F., Kerdudo, A., 2012. Conservateurs pour cosmétiques - Antioxydants et anti-UV. Tech. l'Ingénieur 33, 1–19.

Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M.,

1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. FEBS Lett. 416, 123–129.

Fevig, T.L., Bowen, S.M., Janowick, D.A., Jones, B.K., Munson, H.R., Ohlweiler, D.F., Thomas, C.E., 1996. Design, synthesis, and in vitro evaluation of cyclic nitrones as free radical traps for the treatment of stroke. J. Med. Chem. 39, 4988–4996.

Finkelstein, E., Rosen, G.M., Rauckman, E.J., 1980. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. Arch. Biochem. Biophys. 200, 1–16.

Floyd, R.A., Kopke, R.D., Choi, C.H., Foster, S.B., Doblas, S., Towner, R.A., 2008. Nitrones as therapeutics. Free Radic. Biol. Med. 45, 1361–1374.

Flynn, J., Amiri, A., Ulven, C., 2016. Hybridized carbon and flax fiber composites for tailored performance. Mater. Des. 102, 21–29.

Forrest, V.J., Kang, Y.-H., McClain, D.E., Robinson, D.H., Ramakrishnan, N., 1994. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. Free Radic. Biol. Med. 16, 675–684.

Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N., 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2’-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 4533–4537.

Francois-Moutal, L., Marcillat, O., Granjon, T., 2014. Structural comparison of highly similar nucleoside-diphosphate kinases: Molecular explanation of distinct membrane-binding behavior. Biochimie 105, 110–118.

Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A., Balbarini, A., Migliore, L., Santoro, G., 2006. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. Biomed. Pharmacother. 60, 453–457.

Fucassi, F., Heikal, A., Mikhalovska, L.I., Standen, G., Allan, I.U., Mikhalovsky, S. V., Cragg, P.J.,

2014. Metal chelation by a plant lignan, secoisolariciresinol diglucoside. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 80, 345–351.

Furlan, A.L., Jobin, M.L., Pianet, I., Dufourc, E.J., Géan, J., 2015. Flavanol/lipid interaction: A novel molecular perspective in the description of wine astringency & bitterness and antioxidant action. Tetrahedron 71, 3143–3147.

Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l ' oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Actual. Chim. 91–96.

Goñi, F.M., 2014. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1838, 1467–1476.

Gonser, E., Hermeling, H., Kilgus, R., Kupke, R., Moll, A., Ring, W., Hermeling, H., 1999. From Fibre To Fashion, in Clothing Technology 6th Edition.

Goodrich, F.C., 1957. Proceedings of the Second International Congress of Surface Activity. Schulman, J. H. Butterworths Press, London.

Grauby-Heywang, C., Turlet, J.-M., 2008. Study of the interaction of β-cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy. J. Colloid Interface Sci. 322, 73–78.

Gülçin, I., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sci. 78, 803–811.

Gutiérrez, L.-F., Hamoudi, S., Belkacemi, K., 2012. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. Int. Dairy J. 26, 103–111.

Gutiérrez, M.E., García, A.F., Africa de Madariaga, M., Sagrista, M.L., Casadó, F.J., Mora, M., 2003. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. Life Sci. 72, 2337–60.

Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. Biochem. Soc. Trans. 35, 1147–50.

Hano, C., Martin, I., Fliniaux, O., Legrand, B., Gutierrez, L., Arroo, R.R.J., Mesnard, F., Lamblin, F., Lainé, E., 2006. Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (Linum usitatissimum) seeds. Planta 224, 1291–1301.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. 13, 572–584.

Heimburg, T., 2000. A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. Biophys. J. 78, 1154–1165.

Heinonen, I.M., Meyer, A.S., Frankel, E.N., 1998. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. J. Agric. Food Chem. 46, 4107–4112.

Heo, H.J., Lee, C.Y., 2004. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. J. Agric. Food Chem. 52, 7514–7.

Höhn, A., König, J., Grune, T., 2013. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. J. Proteomics 92, 132–159.

Janzen, E.G., West, M.S., Kotake, Y., DuBose, C.M., 1996. Biological spin trapping methodology. III. Octanol-water partition coefficients of spin-trapping compounds. J. Biochem. Biophys. Methods 32, 183–190.

Kaganer, V., Möhwald, H., Dutta, P., 1999. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. Rev. Mod. Phys. 71, 779–819.

Karamac, M., Koleva, L., Kancheva, V.D., Amarowicz, R., 2017. The structure-antioxidant activity relationship of ferulates. Molecules 22, 15–19.

Kasote, D.M., 2013. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. Int. Food Res. J. 20, 27–34.

Kaviarasan, K., Kalaiarasi, P., Pugalendi, V., 2008. Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from Spermacoce hispida in hyperlipidemic rats. J. Appl. Biomed. 6, 165–176.

Khokhar, S., Owusu Apenten, R.K., 2003. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. Food Chem. 81, 133–140.

Kissa, E., 1994. Fluorinated Surfactants: Synthesis, Properties, Applications, Surfactant science series. New York, NY.

Kopacz, M., Kuzniar, A., 2003. Complexes of cadmium(II), mercury(II) and lead(II) with quercetin-5 ’-sulfonic acid (QSA). Pol. J. Chem. 77.

Košinová, P., Berka, K., Wykes, M., Otyepka, M., Trouillas, P., 2012. Positioning of Antioxidant Quercetin and Its Metabolites in Lipid Bilayer Membranes: Implication for Their Lipid-Peroxidation Inhibition. J. Phys. Chem. B 116, 1309–1318.

Kotake, Y., 1999. Pharmacologic Properties of Phenyl N-tert -Butylnitrone. Antioxid. Redox Signal. 1, 481–499.

Kotake, Y., Sang, H., Miyajima, T., Wallis, G.L., 1998. Inhibition of NF-κB, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butylnitrone (PBN). Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1448, 77–84.

Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 711, 193–201.

Labalette, F., Landé, N., Wagner, D., Roux-Duparque, M., Saillet, E., 2011. La filière lin olèagineux française: Panorama et perspectives. OCL - Ol. Corps Gras Lipides 18, 113–122.

Lahmani, M., Houdy, P., 2015. Les nanosciences Tome 3, 688.

Lee, M.R., Lin, C.Y., Li, Z.G., Tsai, T.F., 2006. Simultaneous analysis of antioxidants and

preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1120, 244–251.

Lewis, B.A., Engelman, D.M., 1983. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. J. Mol. Biol. 166, 211–217.

Li, Z., Malla, S., Shin, B., Li, J.M., 2014. Battle against RNA oxidation: Molecular mechanisms for reducing oxidized RNA to protect cells. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 5, 335–346.

Londoño-Londoño, J., Lima, V.R.D., Jaramillo, C., Creczynski-pasa, T., 2010. Hesperidin and hesperetin membrane interaction: Understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. Arch. Biochem. Biophys. 499, 6–16.

Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R., 2004. Les liposomes: Description, fabrication et applications. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 8, 163–176.

Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. Biochim. Biophys. Acta 1830, 3143–53.

Luceri, C., Caderni, G., Sanna, A., Dolara, P., 2002. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cycloxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. J. Nutr. 132, 1376–9.

Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem. Biol. Interact. 224, 164–175.

Luzzati, V., Tardieu, A., 1974. Lipid Phases: Structure and Structural Transitions. Annu. Rev. Phys. Chem. 25, 79–94.

Maeda, H., Dudareva, N., 2012. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 63, 73–105.

Maget-Dana, R., 1999. The monolayer technique: A potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with

lipid membranes, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79, 727–47.

Marsh, D., 1996. Lateral pressure in membranes. Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. 1286, 183–223.

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem. 32, 595–603.

McClements, D., Decker, E., 2000. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. J. Food Sci. 65, 1270–1282.

Melis, J.P.M., van Steeg, H., Luijten, M., 2013. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. Antioxid. Redox Signal. 18, 2409–2419.

Moghaddam, B., Ali, M.H., Wilkhu, J., Kirby, D.J., Mohammed, A.R., Zheng, Q., Perrie, Y., 2011. The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations. Int. J. Pharm. 417, 235–244.

Moran, J.F., Klucas, R. V., Grayer, R.J., Abian, J., Becana, M., 1997. Complexes of Iron with Phenolic Compounds from Soybean Nodules and Other Legume Tissues: Prooxidant and Antioxidant Properties. Free Radic. Biol. Med. 22, 861–870.

Morandat, S., Durand, G., Polidori, A., Desigaux, L., Bortolato, M., Roux, B., Pucci, B., 2003. PBN derived amphiphilic spin-traps. I/synthesis and study of their miscibility with polyunsaturated phospholipids. Langmuir 19, 9699–9705.

Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? Cell 115, 377–88.

Na, H.K., Surh, Y.J., 2008. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. Food Chem. Toxicol. 46, 1271–1278.

Neindre, B.L.E., 2014. Spectrométrie de masse - Principe Tensions superficielles et interfaciales et appareillage par : Techniques de l'ingénieur.

Nelson, A., Auffret, N., Borlakoglu, J., 1990. Interaction of hydrophobic organic compounds with mercury adsorbed dioleoylphosphatidylcholine monolayers. BBA - Biomembr. 1021, 205–216.

Nenadis, N., Zhang, H.-Y., Tsimidou, M.Z., 2003. Structure−Antioxidant Activity Relationship of Ferulic Acid Derivatives: Effect of Carbon Side Chain Characteristic Groups. J. Agric. Food Chem. 51, 1874–1879.

Nerdal, W., Nilsen, T.R.S., Steinkopf, S., 2015. CoenzymeQ10 localizations in model membranes. A Langmuir monolayer study. Biophys. Chem. 207, 74–81.

Niu, S.L., Mitchell, D.C., Lim, S.Y., Wen, Z.M., Kim, H.Y., Salem, N., Litman, B.J., 2004. Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. J. Biol. Chem. 279, 31098–31104.

Noguchi-Shinohara, M., Yuki, S., Dohmoto, C., Ikeda, Y., Samuraki, M., Iwasa, K., Yokogawa, M., Asai, K., Komai, K., Nakamura, H., Yamada, M., 2014. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline. PLoS One 9.

Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. Free Radic. Biol. Med. 31, 1287–1312.

Novelli, G.P., Angiolini, P., Livi, P., Paternostro, E., 1989. Resuscitation, 18 (1989) 195-205 18, 195–205.

Novelli, G.P., Angiolini, P., Tani, R., Consales, G., Bordi, L., 1986. Phenyl-T-Butyl-Nitrone is Active Against Traumatic Shock in Rats. Free Radic. Res. Commun. 1, 321–327.

Nowotarska, S.W., Nowotarski, K.J., Friedman, M., Situ, C., 2014. Effect of structure on the interactions between five natural antimicrobial compounds and phospholipids of bacterial cell membrane on model monolayers. Molecules 19, 7497–7515.

Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J.P., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Prog. Lipid Res. 41, 66–97.

Ortial, S., Durand, G., Poeggeler, B., Polidori, A., Pappolla, M.A., Böker, J., Hardeland, R., Pucci, B., 2006. Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers: A new class of protective agents. J. Med. Chem. 49, 2812–2820.

Ortial, S., Morandat, S., Bortolato, M., Roux, B., Polidori, A., Pucci, B., Durand, G., 2014. PBN derived amphiphilic spin-traps. II/Study of their antioxidant properties in biomimetic membranes. Colloids Surfaces B Biointerfaces 113, 384–393.

Ouari, O., Polidori, A., Pucci, B., Tordo, P., Chalier, F., 1999. Synthesis of a glycolipidic amphiphilic nitrone as a new spin trap. J. Org. Chem. 64, 3554–3556.

Paiva-Martins, F., Gordon, M.H., Gameiro, P., 2003. Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. Chem. Phys. Lipids 124, 23–36.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid. Med. Cell. Longev. 2, 270–8.

Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M., Gratton, E., 1991. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. Biophys. J. 60, 179–189.

Patrick, B., 2014. La Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique. EDP Sciences.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian J. Clin. Biochem. 30, 11–26.

Pietta, P.-G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035–1042.

Pingret, D., Durand, G., Fabiano-Tixier, A.-S., Rockenbauer, A., Ginies, C., Chemat, F., 2012. Degradation of Edible Oil during Food Processing by Ultrasound: Electron Paramagnetic Resonance, Physicochemical, and Sensory Appreciation. J. Agric. Food Chem. 60, 7761–7768.

Poeggeler, B., Durand, G., Polidori, A., Pappolla, M.A., Vega-Naredo, I., Coto-Montes, A., Boker, J., Hardeland, R., Pucci, B., 2005. Mitochondrial medicine: neuroprotection and life extension by the new amphiphilic nitrone LPBNAH1 acting as a highly potent antioxidant agent. J. Neurochem. 95, 962–973.

Pogrebniak, H., Matthews, W., Mitchell, J., Russo, A., Samuni, A., Pass, H., 1991. Spin trap protection from tumor necrosis factor cytotoxicity. J. Surg. Res. 50, 469–474.

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia 82, 513–523.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 50, 586–621.

Ranchon, I., Chen, S., Alvarez, K., Anderson, R.E., 2001. Systemic Administration of Phenyl- N - tert -Butylnitrone Protects the Retina from Light Damage. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 1375–1379.

Rao, D., Fechter, L.D., 2000. Protective Effects of Phenyl-N-tert-butylnitrone on the Potentiation of Noise-Induced Hearing Loss by Carbon Monoxide. Toxicol. Appl. Pharmacol. 167, 125–131.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20, 933–956.

Robbins, R.J., 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. J. Agric. Food Chem. 51, 2866–2887.

Rodriguez-Leyva, D., Weighell, W., Edel, A.L., Lavallee, R., Dibrov, E., Pinneker, R., Maddaford, T.G., Ramjiawan, B., Aliani, M., Guzman, R., Pierce, G.N., 2013. Potent antihypertensive action of dietary flaxseed in hypertensive patients. Hypertension 62, 1081–1089.

Rose, R.C., Bode, A.M., 1993. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. FASEB J. 7, 1135–42.

Rosen, H., Orman, J., Rakita, R.M., Michel, B.R., VanDevanter, D.R., 1990. Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in myeloperoxidase-treated Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 10048–52.

Rosselin, M., Meyer, G., Guillet, P., Cheviet, T., Walther, G., Meister, A., Hadjipavlou-Litina, D., Durand, G., 2016. Divalent Amino-Acid-Based Amphiphilic Antioxidants: Synthesis, Self-Assembling Properties, and Biological Evaluation. Bioconjug. Chem. 27, 772–781.

Rothfield, L., 1971. BIOLOGICAL MEMBRANES: AN OVERVIEW AT THE MOLECULAR LEVEL, in: Structure and Function of Biological Membranes. Elsevier, pp. 3–9.

Russo, G.L., Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Iannitti, R., Palumbo, R., 2014. Quercetin: A Pleiotropic Kinase Inhibitor Against Cancer, in: The Practitioner. pp. 185–205.

Saad, B., Sing, Y.Y., Nawi, M.A., Hashim, N., Mohamed Ali, A.S., Saleh, M.I., Sulaiman, S.F., Talib, K.M., Ahmad, K., 2007. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. Food Chem. 105, 389–394.

Sagach, V.F., Scrosati, M., Fielding, J., Rossoni, G., Galli, C., Visioli, F., 2002. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and

ex vivo. A comparison with vitamin E. Pharmacol. Res. 45, 435–439.

Salgo, M.G., Pryor, W. a, 1996. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. Arch. Biochem. Biophys. 333, 482–488.

Sang, H., Wallis, G.L., Stewart, C.A., Kotake, Y., 1999. Expression of Cytokines and Activation of Transcription Factors in Lipopolysaccharide-Administered Rats and Their Inhibition by PhenylN-tert-Butylnitrone (PBN). Arch. Biochem. Biophys. 363, 341–348.

Sanhueza, J., Nieto, S., Valenzuela, A., 2000. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 77, 933–936.

Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine. J. Med. Food 3, 121–125.

Schaich, K.M., 2005. Lipid Oxidation: Theoretical Aspects, in: Shahidi, F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 269–356.

Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Curr. Biol. 24, R453–R462.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. J. Funct. Foods 18, 820–897.

Shahidi, F., Naczk, M., 2006. Phenolics in food and nutraceuticals, New York.

Shahidi, F., Naczk, M., 1996. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, in: Food Chemistry. Lancaster, pp. 481–482.

Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., Reaney, M.J.T., 2014. Flaxseed (Linum usitatissimum L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. Trends Food Sci. Technol. 38, 5–20.

Sies, H., 1991. Oxidative stress: From basic research to clinical application. Am. J. Med. 91, S31–S38.

Silva, P., Bonifácio, B., Ramos, M., Negri, K., Maria Bauab, T., Chorilli, M., 2013. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. Int. J. Nanomedicine 9, 1.

Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5, 415–8.

Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387, 569–72.

Simons, K., Van Meer, G., 1988. Lipid sorting in epithelial cells. Biochemistry 27, 6197–6202.

Singer, S.J.J., Nicolson, G.L.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science (80-.). 175, 720–731.

Socrier, L., Rosselin, M., Choteau, F., Durand, G., Morandat, S., 2017. Cholesterol-nitrone conjugates as protective agents against lipid oxidation: A model membrane study. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.

Stefaniu, C., Brezesinski, G., Möhwald, H., 2014. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. Adv. Colloid Interface Sci. 208, 197–213.

Stelmach, E., Pohl, P., Szymczycha-Madeja, A., 2015. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. Food Chem. 182, 302–308.

Talbot, J.C., Dautant, A., Polidori, A., Pucci, B., Cohen-Bouhacina, T., Maali, A., Salin, B., Brèthes, D., Velours, J., Giraud, M.F., 2009. Hydrogenated and fluorinated surfactants derived from Tris(hydroxymethyl)- acrylamidomethane allow the purification of a highly active yeast F1-F0 ATP-synthase with an enhanced stability. J. Bioenerg. Biomembr. 41, 349–360.

Tero-Kubota, S., Ikegami, Y., Kurokawa, T., Sasaki, R., Sugioka, K., Nakano, M., 1982. Generation of free radicals and initiation of radical reactions in nitrones - Fe2+ - phosphate buffer systems. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 1025–31.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 279, L1005 LP-L1028.

Thompson, L.U., Chen, J.M., Li, T., Strasser-Weippl, K., Goss, P.E., 2005. Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer. Clin. Cancer Res. 11, 3828–35.

Tian, M., Liu, Y., Sun, Y., Zhang, R., Feng, R., Zhang, G., Guo, L., Li, X., Yu, X., Sun, J.Z., He, X., 2017. A single fluorescent probe enables clearly discriminating and simultaneously imaging liquid-ordered and liquid-disordered microdomains in plasma membrane of living cells. Biomaterials 120, 46–56.

Tomita, H., Kotake, Y., Anderson, R.E., 2005. Mechanism of protection from light-induced retinal degeneration by the synthetic antioxidant phenyl-N-tert-butylnitrone. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 46, 427–434.

Trouillas, P., Marsal, P., Svobodová, A., Vostálová, J., Gažák, R., Hrbáč, J., Sedmera, P., Křen, V., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., Walterová, D., 2008. Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study. J. Phys. Chem. A 112, 1054–1063.

van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H., Bast, A., 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem. 66, 511–517.

van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 112–124.

van Zeist, W., Bakker-Heeres, J.A.H., 1975. Evidence for linseed cultivation before 6000 bc. J. Archaeol. Sci. 2, 215–219.

Velasco, J., Andersen, M.L., Skibsted, L.H., 2005. Electron Spin Resonance Spin Trapping for

Analysis of Lipid Oxidation in Oils: Inhibiting Effect of the Spin Trap α-Phenyl- N - tert-butylnitrone on Lipid Oxidation. J. Agric. Food Chem. 53, 1328–1336.

Vennat, B., Bos, M.A., Pourrat, A., Bastide, P., 1994. Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. Biol. Pharm. Bull. 17, 1613–5.

Vessal, M., Hemmati, M., Vasei, M., 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 135, 357–364.

Vest, R., Wallis, R., Jensen, L.B., Haws, A.C., Callister, J., Brimhall, B., Judd, A.M., Bell, J.D., 2006. Use of steady-state laurdan fluorescence to detect changes in liquid ordered phases in human erythrocyte membranes. J. Membr. Biol. 211, 15–25.

Wang, H., Wang, J., Qiu, C., Ye, Y., Guo, X., Chen, G., Li, T., Wang, Y., Fu, X., Liu, R.H., 2017. Comparison of phytochemical profiles and health benefits in fiber and oil flaxseeds (Linum usitatissimum L.). Food Chem. 214, 227–233.

Waris, G., Ahsan, H., 2006. Reactive oxygen species role in the development of cancer and various chronic conditions. J. Carcinog. 5, 14.

Waters, W.A., Wickham-Jones, C., 1951. The retardation of benzaldehyde autoxidation by p-cresol. J. Chem. Soc. 812.

Weaver, L.M., Herrmann, K.M., 1997. Dynamics of the shikimate pathway in plants. Trends Plant Sci. 2, 346–351.

Weintraub, P.M., Tiernan, P.L., 1974. Steroidal Nitrones. J. Org. Chem. 39, 1061–1065.

Wheatley, R., 2000. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. TrAC Trends Anal. Chem. 19, 617–628.

Yamamoto, K., Kamiya, A., Ando, J., 2014. Shear Stress Rapidly Alters the Physical Properties of Vascular Endothelial Cell Membranes by Decreasing Their Lipid Order and Increasing

Their Fluidity, in: Macromolecules. pp. 19–22.

Zaja-Milatovic, S., Gupta, R.C., Aschner, M., Montine, T.J., Milatovic, D., 2008. Pharmacologic suppression of oxidative damage and dendritic degeneration following kainic acid-induced excitotoxicity in mouse cerebrum. Neurotoxicology 29, 621–627.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. J. Exp. Med. 182, 367–77.

Zhou, X., Cooper, K.L., Sun, X., Liu, K.J., Hudson, L.G., 2015. Selective sensitization of zinc finger protein oxidation by reactive oxygen species through arsenic binding. J. Biol. Chem. 290, 18361–18369.

Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., Best, T.M., 2015. Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. Acta Physiol. 214, 329–348.