



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des Procédés, des Produits et des Molécules

Par

Tanya SAHYOUN

Synthèse de double donneurs de monoxyde d'azote, évaluation de leur cytotoxicité et de leur activité pharmacologique

Soutenance publique le 17 octobre 2019 devant le jury constitué de :

Mme Marie-Agnès SARI	Professeur, Université Paris Descartes	Rapporteur
M. Samuel COUVE-BONNAIRE	Maître de Conférences, Université de Rouen	Rapporteur
Mme Sabine CHOPPIN	Maître de Conférences, Université de Strasbourg	Examineur
M. Pierre LEROY	Professeur émérite, Université de Lorraine	Examineur
Mme Axelle ARRAULT	Maître de Conférences, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse
M. Raphaël SCHNEIDER	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
Mme Caroline GAUCHER	Maître de Conférences, Université de Lorraine	Invitée
M. Naïm OUAINI	Professeur, Université Saint Esprit de Kaslik	Invité

A ma famille,

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM).

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse : Madame Marie-Agnès Sari, Monsieur Samuel Couve-Bonnaire, Madame Sabine Choppin et Monsieur Pierre Leroy.

Je tiens également à remercier Monsieur Alain Durand, directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli au sein du LCPM.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse Monsieur Raphaël Schneider pour avoir dirigé ma thèse et pour tous les conseils qui m'ont permis de bien avancer dans mon sujet de recherche. Je suis très reconnaissante d'avoir travaillé avec Raphaël et pour la confiance qui m'a confié durant ces années de thèse.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus chaleureux à Madame Axelle Arrault qui a co-dirigé cette thèse et qui m'a aidé énormément aussi bien au niveau professionnel qu'au niveau personnel. Axelle, je te remercie pour les petits cours dans ton bureau au démarrage de la thèse, pour tous les conseils ainsi que l'aide infinie durant les périodes difficiles de la recherche et surtout je te remercie d'être la personne avec qui je peux parler de tout en étant très loin de chez moi.

Je remercie également Monsieur Naim Ouaini, co-directeur de la thèse de l'USEK Liban, pour toute l'aide et la confiance qu'il m'a accordé.

Je présente mes remerciements à Madame Caroline Gaucher du laboratoire CITHEFOR pour la collaboration et les tests biologiques sur les molécules synthétisées. Je remercie également Monsieur Yi Zhou et Madame Isabelle Fries du CITHEFOR pour leurs aides durant les manipulations.

Je voudrais remercier Monsieur Olivier Fabre pour les analyses RMN et Madame Mathilde Achard pour les analyses de spectroscopie de masse et pour son aide en CLHP. Je voudrais remercier également tous les membres du LCPM pour tous les conseils qu'ils m'ont donnés durant les réunions du laboratoire ainsi que pour leur bonne humeur et la bonne

ambiance. Une petite pensée à tous les stagiaires, doctorants et post-doctorants que j'ai croisé au LCPM : Meriem, Géraldine, Tristan, Ali, Djallal, Albert, Amina, Mohammed.

Je remercie également Olga et Hong Ngoc (Cun) que j'ai croisé en tant que collègues au LCPM mais qui sont vite devenues des amies. Je vais commencer par remercier Olga de m'avoir accueillie au bureau à mon arrivée et de m'avoir introduit tout ce que je dois savoir au laboratoire. Olga, je te remercie aussi pour ton aide pour les analyses de mes échantillons, pour les conseils et pour m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin. Cun, I want to thank you for making me laugh in the office and for all of these moments that we shared together which I will forever appreciate. I want to thank you for your presence when I did not feel well and for all the delicious dishes you shared with me during the long period of writing. I'm glad I got you as an office and apartment neighbor! Finally, thank you Olga and Cun for the night outs, for the "ballet shows", and the little travels we did together!

J'adresse un grand merci à Valentin qui était mon plus grand support durant la rédaction de ce manuscrit. Valentin merci pour ta présence durant la période la plus compliquée de ma thèse, pour ta patience infinie, pour l'aide de la mise en page de mon manuscrit et bien sûr la correction de mes « petites » fautes de français. Je te remercie énormément pour ta simple présence dans ma vie qui m'a rendue plus forte pour dépasser ces périodes difficiles.

Je remercie également mes amies au Liban qui ne m'ont jamais laissé et qui me supportaient de loin. Cynthia, Soha et Mandy, j'apprécie énormément votre amitié et sachez que, sans vos encouragements et votre support, je ne pouvais pas arriver ici.

Enfin, j'adresse mes plus grands remerciements à ma famille qui m'a tout donné pour pouvoir acquérir ce travail. Papa, te remercier pour tout ce que tu as fait ne serait jamais suffisant. Tu es mon idole et tout ce que je fais est pour te rendre fier. Maman, c'est grâce à toi que je suis qui je suis aujourd'hui. Tes encouragements et ton amour m'ont poussé à me surpasser. Tony, tu étais la première personne qui m'a soutenu pour partir et obtenir mon diplôme de doctorat. Tu es resté toujours là à me parler chaque jour et me soutenir, et pour ça j'en serais à jamais reconnaissante. Je pense aussi à ma belle-sœur, Lama, et mon petit neveu, Charbel. Tia, ma petite sœur, merci pour tes petits appels de rigolade, de soutien et de petites discussions insignifiantes. Tu es mon petit rayon de soleil qui m'apporte la joie et la chaleur. Finalement, je remercie mon ange, ma grand-mère « Teta Daad », qui je suis sûre est en train de veiller sur moi. Teta, c'est grâce à tes petites prières que j'ai pu avancer dans ma vie.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
------------------------------------	-----------

INTRODUCTION GENERALE	17
------------------------------------	-----------

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction	27
1. Le monoxyde d'azote NO	27
2. Maladies cardiovasculaires et médicaments à base de NO	29
2.1. Les dérivés nitrés et apparentés commercialisés	31
2.1.1. Les dérivés nitrés.....	31
2.1.2. Les dérivés nitrés apparentés	31
2.2. Effets secondaires des dérivés nitrés et limitation d'utilisation	32
3. Les donneurs de NO en cours de développement.....	33
3.1. Les ions nitrite/nitrate	33
3.2. Les diazéniumdiolates.....	34
3.3. Les S-nitrosothiols	34
3.4. Les amidoximes.....	35
4. Etude des S-nitrosothiols.....	36
4.1. Les S-nitrosothiols endogènes	36
4.1.1. Le S-nitrosoglutathion	37
4.1.2. Autres RSNO endogènes	38
4.2. Les S-nitrosothiols exogènes (de synthèse).....	39
4.3. Synthèse des S-nitrosothiols.....	40
5. Une étude sur les amidoximes (Revue).....	41
Conclusion	41

Références de la partie	42
-------------------------------	----

Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors.....49

1. Introduction.....	49
2. Isomerism of amidoximes and oximes	50
3. Synthesis of oximes and amidoximes	52
3.1. Synthesis of amidoximes	52
3.2. Synthesis of oximes	55
4. Oxidation of amidoximes/oximes and NO release	55
4.1. Oxidation by chemicals and biomimetics.....	55
4.2. Biological pathways of amidoximes and oximes oxidation	57
4.3. In vivo and in vitro biological responses to NO release from amidoximes/oximes oxidation	59
5. Conclusions.....	63
References	63

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....69

Objectifs	71
-----------------	----

CHAPITRE I.....75

Introduction du chapitre	77
1. Méthodes de synthèse de produits possédant des fonctions thiol.....	78
1.1. Synthèse des thiols aliphatiques par les méthodes classiques	79
1.1.1. Synthèse des thiols à partir des halogénures.....	79
1.1.2. Synthèse des thiols à partir d'alcènes	82
1.1.3. Méthodes de synthèse de thiols à partir d'alcools.....	82
1.2. Méthodes de couplage avec une cystéine.....	83

2.	Plan général de synthèse des doubles donneurs hybrides	84
3.	Première stratégie : Substitution d'un halogénure par une fonction thiol.....	86
3.1.	Synthèse du produit intermédiaire 2a par addition d'une chaîne bromée	86
3.2.	Substitution par une fonction thiol.....	86
3.2.1.	Par utilisation du NaSH et de la thiourée.....	86
3.2.2.	Par utilisation du thioacétate de potassium.....	89
3.2.3.	Essais de réduction des disulfures	91
3.2.4.	Analyse des résultats obtenus	93
4.	Deuxième stratégie : Couplage à la cystéine possédant une fonction thiol libre	94
4.1.	Synthèse du produit 6a par incorporation d'une chaîne fonctionnalisée	94
4.2.	Synthèse de 7a par saponification de l'ester	94
4.3.	Couplage du chlorure d'acide à la cystéine	95
4.3.1.	Mise au point de la méthode du couplage à la cystéine	95
4.3.2.	Synthèse du chlorure d'acyle et couplage à la cystéine	97
4.3.3.	Couplage au carbodiimide	98
	Conclusion du chapitre.....	100
	Références du chapitre	102

CHAPITRE II..... 107

	Introduction du chapitre	109
1.	Plan général de synthèse des donneurs à base d'amidoximes	110
2.	Mise au point de la synthèse des mono-amidoximes aromatiques 9a, b.....	113
2.1.	Mise au point de la synthèse des amidoximes aromatiques par les méthodes classiques	113
2.2.	Mise au point de la méthode de synthèse des amidoximes 9a,b par micro-ondes	115
3.	Synthèse de la bis-amidoxime aromatique / aliphatique 12a et des mono-amidoximes analogues 12b,c.....	116

3.1.	Synthèse des produits intermédiaires 10a-c par incorporation des différentes chaînes lipophiles.....	116
3.2.	Synthèse des produits intermédiaires 11a,b par substitution des atomes de brome par la fonction nitrile	117
3.3.	Synthèse des amidoximes 12a-c	120
3.3.1.	Synthèse des amidoximes 12a-c par la méthode II	121
3.3.2.	Identification du produit secondaire de la molécule 12a : l'amide	122
3.3.3.	Optimisation de la méthode de synthèse des amidoximes 12a, b	124
4.	Etapes de synthèse des bis- et poly-amidoximes aromatiques 15a-c.....	126
4.1.	Synthèse des nitriles intermédiaires 13a,b et 14a par substitutions nucléophiles	127
4.1.1.	Synthèse des nitriles 13a,b.....	127
4.1.2.	Synthèse du produit intermédiaire 14a	131
4.2.	Synthèse des bis- et poly-amidoximes 15a-c	133
4.3.	Caractérisation des amidoximes 15a-c et analyse des résultats.....	134
4.3.1.	Hypothèse 1 : présence d'isomérisie.....	136
4.3.2.	Hypothèse 2 : présence des fonctions amides.....	137
4.3.3.	Mécanisme de la formation du produit secondaire : l'amide.....	140
	Conclusion du chapitre	144
	Références du chapitre	146

CHAPITRE III 149

	Introduction du chapitre	151
1.	Plan général des tests biologiques	152
2.	Solubilité des amidoximes dans le milieu physiologique	153
2.1.	Test de solubilité des amidoximes synthétisées	153
2.2.	Molécules retenues pour les tests biologiques.....	157
3.	Test de libération de NO en présence de microsomes de foie de rats.....	157

3.1.	Méthode de Griess	158
3.2.	Préparation des échantillons pour l'évaluation de la libération de NO en présence des microsomes	160
4.	Test de cytocompatibilité des amidoximes avec les cellules musculaires lisses humaines.....	163
4.1.	Principe du test MTT	163
4.2.	Préparation des échantillons pour la mesure de la cytocompatibilité	164
5.	Test de libération de NO sur les cellules humaines	166
5.1.	Méthode fluorescente de DAN	166
5.2.	Mesure de la cinétique de libération de NO à partir des amidoximes	169
5.3.	Mesure du pouvoir donneur des différents types d'amidoxime et comparaison des résultats	170
	Conclusion du chapitre	173
	Références du chapitre	175

PARTIE III : EXPERIMENTAL PART 177

General methods	179
Experimental procedures	187

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 211

LISTE DES TABLEAUX 217

LISTE DES FIGURES 219

Liste des abréviations

A

AVC	Accident Vasculaire Cérébral
ATR	Réflectance totale atténuée (Attenuated Total Reflectance)

B

BUC(NO) ₂	<i>S,S'</i> -dinitrosobuccilamine
----------------------	-----------------------------------

C

CCM (TLC)	Chromatographie sur Couche Mince (Thin Layer Chromatography)
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique (Cyclic Guanosine 3',5'-MonoPhosphate)
CITHEFOR	Cibles THérapeutiques, FORMulation et expertise préclinique du médicament
CLHP (HPLC)	Chromatographie Liquide de Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)
CYP450	Cytochromes P450

D

DAN	2,3-DiAminoNaphthalène
DEX	DEXométhasone
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry)
DMF	N,N-DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DTT	Dithiotréitol

E

eNOS NOS III)	Oxyde nitrique synthase endothéliale (Endothelial Nitric Oxide Synthase :
ESM	Erreur Standard à la Moyenne
EtOH	Ethanol

G

GC	Guanylate Cyclase
GMP	Guanosine MonoPhosphate
GSH	Glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GTP	Guanosine TriPhosphate

H

HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectroscopy)
HRP	Peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase)
HVSMC	Cellules musculaires lisses issues d'aorte thoracique humaine (Human Vascular Smooth Muscular Cells)

I

IBX	Acide 2-iodobenzoïque
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane (half maximal Inhibitory Concentration)
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible (Inducible Nitric Oxide Synthase : NOS II)
IOP	Tension oculaire (IntraOcular Pressure)
IR-TF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L

LCPM Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire

LRGP Laboratoire Réactions et Génie des Procédés

M

MeOH Méthanol

MCT Tellure de mercure-cadmium (Mercury Cadmium Telluride)

MTT MéthylThiazolTétrazolium

N

NADPH Dihydropyridine-adenine dinucleotide phosphate

NAT 2,3-Naphthotriazole

NED *N*-1(-naphtyl)éthylènediamine

nNOS Oxyde nitrique synthase neuronale (Neuronal Nitric Oxide Synthase : NOS I)

NO Monoxyde d'azote (Nitric Oxide)

NOHA *N*-Hydroxy-*L*-Arginine

NOS Oxyde nitrique synthase (Nitric Oxide Synthase)

O

OMS Organisation Mondiale de la Santé

P

PBS Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)

R

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

RSNO *S*-nitrosothiol

S

SNAC *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine

SNAP *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine

T

TEAB Bromure de tétraéthylammonium

TFA Acide trifluoroacétique

THF TétraHydroFurane

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Selon une étude réalisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2015, les maladies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité dans le monde. En effet, ces maladies sont responsables de 31% de décès dans le monde ce qui fait qu'elles sont plus mortelles que les cancers.¹ Les maladies cardio-vasculaires englobent un panel de maladies liées à un dysfonctionnement du cœur ou des vaisseaux sanguins qui l'alimentent et sont réparties en six types majeurs :

- Cardiopathie ischémique ou coronarienne (vaisseaux sanguins du muscle cardiaque),
- Cardiopathie congénitale (malformations de la structure du cœur présente à la naissance).
- Maladie cérébro-vasculaire (vaisseaux sanguins du cerveau),
- Maladie vasculaire périphérique (vaisseaux sanguins des jambes et bras),
- Thromboses veineuses et embolies pulmonaires (caillots sanguins obstruant les veines),
- Rhumatisme cardiaque (affection des articulations et valvules cardiaques par une infection bactérienne),

La présence chez des individus d'autres maladies comme le diabète et l'hypertension favorisent le risque d'évènements aigus comme les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (AVC).

Les dix principales causes de mortalité au monde selon l'OMS, présentant 54% des mortalités, sont affichées dans le diagramme ci-dessous (Figure I.1). Les cardiopathies ischémiques et les AVC sont répertoriés parmi ces 10 principales causes de mortalités mondiales et sont responsables de 27% des mortalités.²

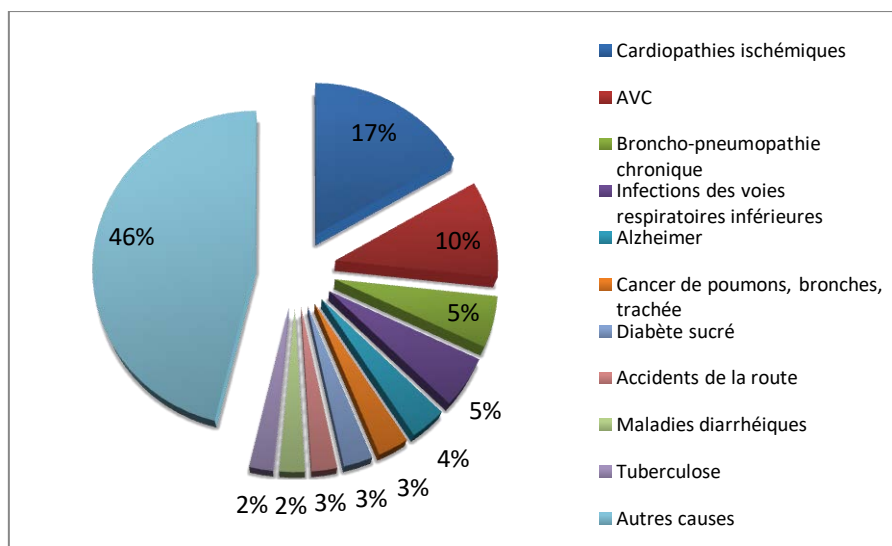


Figure I. 1. Causes de mortalités mondiales en 2016 selon l'OMS

Le traitement et la prévention de ces maladies est nécessaire pour réduire ces chiffres trop élevés. Plusieurs familles de médicaments existent déjà pour les traiter : les vasodilatateurs, les antihypertenseurs, les anti-ischémiques, les anti-thrombotiques, etc. En contrepartie de leur activité bénéfique, ces médicaments présentent toujours des effets indésirables ou des limitations d'utilisation.

L'un des agents, très connu pour ses propriétés vasodilatatrices et son rôle dans le système cardiaque, est le monoxyde d'azote (NO). Le NO est une molécule produite principalement par les cellules endothéliales à partir du groupement guanidine de la *L*-arginine et d'une molécule d'oxygène (O_2).³ Son inconvénient majeur est son temps de demi-vie très faible (de l'ordre de quelques millisecondes).⁴ Cette molécule est connue pour avoir des propriétés vasodilatatrices et est déjà utilisée pour traiter plusieurs maladies cardiovasculaires. Certaines maladies comme l'agrégation plaquettaire nécessitent des petites quantités de NO qui peuvent être administrées grâce à ce type de médicaments. Il existe deux types de vasodilatateurs à base de NO utilisés pour leurs applications thérapeutiques : ceux qui libèrent le NO spontanément comme le nitroprussiate de sodium et les nitrates organiques qui requièrent un procédé enzymatique afin de former le NO comme le dinitrate d'isosorbide.

La molécule d'arginine a montré un rôle dans le traitement des maladies cardiovasculaires en garantissant une production constante de monoxyde d'azote dans les vaisseaux sanguins. Pour cette raison, des travaux ont été réalisés pour concevoir et synthétiser de mimes de l'arginine en gardant les mêmes effets thérapeutiques mais avec une meilleure sélectivité et disponibilité orale.⁵ Au Laboratoire de Chimie Physique

Macromoléculaire (LCPM), notre équipe s'est intéressée particulièrement à la synthèse de nouveaux mimes de l'arginine à motif benzénique, pyridinique ou pyrazinique et à leur évaluation biologique préliminaire en tant que donneurs de NO. Nous nous sommes attachés à la synthèse de mimes de l'arginine avec pour objectif une évaluation biologique plus poussée afin de tester la capacité de chaque molécule à libérer du NO pour une utilisation ultérieure comme traitement contre les maladies cardiovasculaires.

Ce projet vise à synthétiser des molécules double ou même multi donneuses de NO, résultant de la condensation soit d'une amidoxime aromatique peptidomimétique de l'arginine et d'un S-nitrosothiol (RSNO), soit d'une amidoxime aromatique et une autre aliphatique, ou soit de deux ou plusieurs amidoximes aromatiques.

En effet, ces groupements fonctionnels sont connus pour leur potentialité à libérer du NO et ont la particularité d'être physiologiquement présents dans l'organisme :

- l'amidoxime correspond à un intermédiaire réactionnel formé au cours de la synthèse de NO suite à une hydroxylation de l'arginine par les NO synthase (NOS)
- le RSNO permet le stockage de NO dans le corps.

Les groupements RSNO sont connus pour leur demi-vie limitée *in vivo* (8 à 45 min) alors que les groupements fonctionnels amidoxime ont une demi-vie bien supérieure (environ 10 h). Ces types de double donneurs de NO ne sont pas décrits dans la littérature et aucune étude montrant la présence ou l'absence d'une cinétique différente de libération entre les amidoximes aromatiques, le RSNO et les amidoximes aliphatiques n'est répertoriée.

Ce projet de recherche s'inscrit dans une thématique pluridisciplinaire faisant intervenir trois laboratoires de l'Université de Lorraine à Nancy, France dont : le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Cibles THERapeutiques, FORMulation et expertise préclinique du médicament (CITHEFOR), et la faculté des sciences de l'université Saint-Esprit de Kaslik au Liban.

Le premier objectif était la synthèse de doubles donneurs « hybrides » à base d'amidoxime aromatique et RSNO. Les premiers résultats ont permis de réorienter le sujet vers la synthèse de mono-donneurs de NO aromatiques et aliphatiques ainsi que des doubles donneurs formés à partir des fonctions amidoximes. Enfin, par extrapolation, la synthèse de poly-donneurs à base d'amidoximes a également été envisagée lors de ce travail. Finalement, toutes les molécules synthétisées avec une pureté supérieure à 95% et solubles dans le milieu physiologique, ont été testées, sur les microsomes de foie de rats et sur les cellules humaines, afin de mesurer leur pouvoir donneur de NO.

Avant de présenter les résultats obtenus, le début de ce manuscrit est consacré à une étude bibliographique qui englobe les thématiques les plus importantes de ce travail. Tout d'abord, la molécule qui est au centre de tout ce travail, le NO, y est décrite en détaillant plus particulièrement son rôle dans l'organisme, les voies de production ainsi que ses propriétés. Il s'en suivra une description des différents types de maladies cardiovasculaires et des donneurs de NO actuellement sur le marché et susceptibles d'être prescrits dans le traitement de ces maladies en soulignant leurs limitations. De plus, de nouveaux types de donneurs de NO encore en cours de développement ou dans la phase clinique seront aussi détaillés.

Deux types de molécules seront alors plus particulièrement examinés :

- la famille de donneurs de NO en cours de développement, les *S*-nitrosothiols afin de mieux comprendre leur mode d'action, leur synthèse ainsi que les recherches d'ores et déjà effectuées sur ces produits.
- la famille de molécules dotées de fonction(s) amidoxime(s), un autre type de donneurs de NO en cours de développement : la synthèse, l'isomérisation, les voies chimiques et biologiques de libération de NO ainsi que les effets de libération *in vitro* et *in vivo* seront détaillés. Cette dernière partie sera présentée sous forme d'une revue rédigée en anglais.

Le premier chapitre de ce manuscrit concernera la description des essais de synthèse des molécules double donneuses « hybrides » possédant la fonction amidoxime et la fonction RSNO. Certains points sensibles, comme, entre autres, les problèmes récurrents observés lors de la synthèse des molécules de type RSNO causés par l'oxydation des fonctions thiols ainsi que les essais de réduction de ces ponts disulfures.

Le deuxième chapitre portera sur la mise au point de la synthèse des mono- ou bis-amidoximes aromatiques et / ou aliphatiques, en détaillant les étapes d'addition des chaînes lipophiles et des fonctions nitriles dans certains cas. La méthode décrite pour obtenir la bis-amidoxime en s'affranchissant totalement de la présence de produits secondaires qu'il a fallu identifier, a été appliquée et a permis de générer d'autres bis-amidoximes aromatiques et des poly-amidoximes.

Le troisième et dernier chapitre sera intégralement consacré aux tests biologiques réalisés au CITHEFOR. Les molécules pures et solubles dans les milieux physiologiques ont, en effet, été testées pour étudier leur capacité à libérer du NO grâce à deux tests différents ainsi que leur cytocompatibilité avec les cellules humaines.

Introduction générale

Les protocoles expérimentaux et les techniques de synthèse, de purification et de caractérisation ainsi que les techniques biologiques seront présentés dans la troisième partie de ce manuscrit.

La dernière partie présentera la conclusion générale où seront repris les principaux résultats de ces travaux ainsi que les perspectives.

Références de l'introduction

- (1) Maladies cardiovasculaires [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed Dec 3, 2019).
- (2) Les 10 principales causes de mortalité <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed Dec 3, 2019).
- (3) Lowenstein, C. J.; Dinerman, J. L.; Snyder, S. H. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Ann Intern Med* **1994**, *120*, 227–237.
- (4) Thomas, D. D.; Liu, X.; Kantrow, S. P.; Lancaster, J. R. The Biological Lifetime of Nitric Oxide: Implications for the Perivascular Dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (1), 355–360.
- (5) Keenan, R. M.; Miller, W. H.; Barton, L. S.; Bondinell, W. E.; Cousins, R. D.; Eppley, D. F.; Hwang, S.-M.; Kwon, C.; Lago, M. A.; Nguyen, T. T.; et al. Orally Bioavailable Nonpeptide Vitronectin Receptor Antagonists Containing 2-Aminopyridine Arginine Mimetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (13), 1801–1806.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Avant de débiter ce travail, il était très important de commencer par se focaliser sur la molécule cible, le NO : la compréhension de son rôle et particulièrement de son importance dans le système cardiovasculaire. Après avoir consacré du temps à définir les différentes maladies cardiovasculaires ainsi que les troubles cliniques associés, il a semblé intéressant de donner une liste non-exhaustive des principaux médicaments donneurs de NO existants et utilisés lors du traitement de certaines de ces maladies mais également de connaître les futurs « candidats / médicaments », c'est-à-dire les molécules à base de NO encore en cours de développement. Le premier type de donneurs de NO en cours de développement qui est l'un des objectifs de ce travail, les molécules de type *S*-nitrosothiols, seront présentées ensuite : leurs effets et les études déjà menées par d'autres équipes sur ce type de composés et enfin leur obtention par synthèse chimique. Enfin, dans une dernière partie, présentée sous forme de revue rédigée en anglais sera consacrée à un autre type de donneur de NO : les amidoximes, toutes les méthodes à l'heure actuelle décrites dans la littérature seront détaillées : la synthèse des fonctions oximes et amidoximes, leurs isomérisations et enfin leurs capacités à libérer le NO par des processus chimiques ou biologiques en terminant par les effets de ces composés *in vivo* et *in vitro*.

1. Le monoxyde d'azote NO

Avant la fin des années 80, le NO était considéré comme un gaz toxique et polluant provenant de la fumée des cigarettes et des voitures et qui ne pouvait pas avoir des effets positifs sur la santé.¹ Par contre, en 1987-88, des études ont montré que le NO était une molécule synthétisée par les cellules endothéliales des mammifères et qu'il contribuait à la relaxation des cellules musculaires lisses causée par l'endothélium.² Cette découverte sur le NO engendra un grand nombre de recherches dans les années qui suivirent pour envisager son utilisation pour un effet thérapeutique. Toutes ces recherches ont contribué à nommer le NO comme la molécule de l'année 1992 par le journal Science³ et ont permis la parution de 3000 articles scientifiques par an sur son rôle en biologie.

Le monoxyde d'azote est une molécule synthétisée par différentes cellules du corps à partir de la *L*-arginine en présence de l'oxyde nitrique synthase (NOS : Nitric Oxide

Synthase). La NOS existe sous trois isoformes identifiés dans le corps : la NOS I (nNOS : neuronal NOS) et la NOS III (eNOS : endothelial NOS) dont l'activité est régulée par du calcium-calmoduline intracellulaire. Elles sont responsables de la synthèse de petites quantités de NO qui jouent un rôle dans les systèmes nerveux central et périphérique (NOS I) ou dans le système cardiovasculaire (NOS III). La NOS II (iNOS : inducible NOS) produit du NO indépendamment du calcium et est présente généralement dans les cellules immunitaires après une stimulation par un pathogène. Ceci induit la libération en continu de grandes quantités de NO participant à la défense de l'hôte.^{1,4-6}

La majorité du NO formé dans le corps affectant le système cardiovasculaire provient normalement de l'action de l'eNOS des cellules endothéliales. L'action de cette enzyme est dépendante du taux de calcium intracellulaire : l'augmentation de ce taux dans la cellule, suite aux forces de cisaillement du sang sur la paroi vasculaire ou à l'activité des récepteurs endothéliaux (ex. récepteurs de l'acétylcholine et de la substance P), active la NOS. Cette dernière catalyse la synthèse du NO, à partir de la *L*-arginine, accompagnée de la *L*-citrulline. Le NO libéré est capable de passer ensuite aux cellules musculaires lisses adjacentes pour activer à son tour la guanylate cyclase (GC). Cette cascade est à l'origine de la production de cGMP à partir du GTP, second messenger et responsable de plusieurs fonctions cellulaires dont la relaxation du muscle lisse (Figure I.2).^{1,5-7}

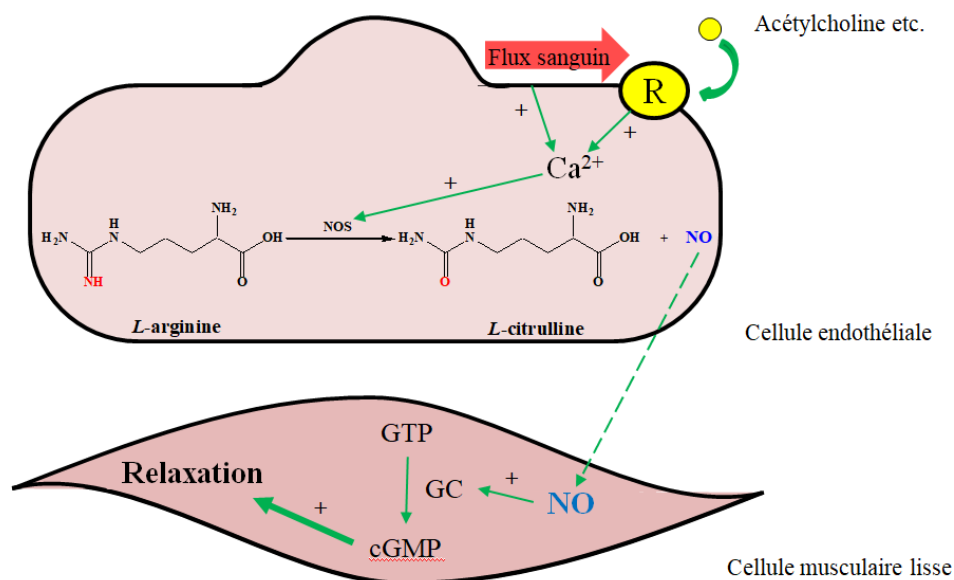


Figure I. 2. *Chemin d'activation de la production de NO dans l'endothélium et la relaxation des fibres musculaires lisses*

Le NO, comme montré sur la figure I.2., joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie vasculaire où il cause la relaxation des cellules musculaires lisses et induit ainsi la vasodilatation.⁶ De même, dans le système cardiovasculaire, cette molécule diminue l'agrégation plaquettaire et empêche aussi l'adhésion des leucocytes aux parois vasculaires.⁸ Le NO est un médiateur dans le système cardiovasculaire, mais aussi dans le système immunitaire et le système nerveux central et périphérique. Dans le système immunitaire, le monoxyde d'azote, libéré en grandes quantités à partir de la NOS II des macrophages, est capable d'éradiquer les bactéries, les parasites, les champignons, les virus en bloquant leur réplication et les cellules tumorales. Par contre, le NO n'est pas spécifique par son attaque immunitaire : il est capable d'attaquer les cellules de l'hôte lors de maladies auto-immunes.⁸⁻¹⁰ Dans le système nerveux, le NO est considéré comme un neurotransmetteur à la fois dans le central et le périphérique. Cette molécule joue un rôle dans la coordination des mouvements et dans le traitement de l'information olfactive dans le système nerveux central. De plus, dans le système nerveux périphérique, suite à un bol alimentaire, le NO peut engendrer une relaxation gastrique et une relaxation du sphincter anal, après une prise alimentaire. Enfin, le NO a aussi montré un rôle dans l'érection pénienne.^{8,11}

Néanmoins, un excès de NO dans le corps peut avoir des effets nocifs principalement dus à une activation de la NOS II suivie d'une libération excessive de NO. Différentes études ont montré qu'un excès de NO générerait une cytotoxicité menant à des inflammations ainsi que des hypotensions importantes.¹² De plus, le NO en grande quantité a été identifié comme génotoxique suite à l'observation d'anomalies au niveau des chromosomes de rats après exposition au NO.¹³ Le NO est capable de favoriser la présence de tumeurs cancéreuses vu qu'il est génotoxique et mutagène. Cette molécule a aussi différentes activités qui favorisent les cancers comme les effets anti-apoptotiques, la suppression de la prolifération des globules blancs et la favorisation des métastases. Au niveau du système nerveux, le NO à haute concentration a des effets neurotoxiques comme par exemple la démyélinisation de différentes parties du cerveau ou même un rôle dans les maladies neurodégénératives.¹¹

2. Maladies cardiovasculaires et médicaments à base de NO

Les maladies cardiovasculaires englobent toutes les maladies qui affectent le cœur ou les vaisseaux sanguins. Ce type de maladies est normalement associé avec une accumulation des dépôts d'acides gras sur la paroi interne des vaisseaux sanguins, connue sous le nom

d'athérosclérose, et une augmentation du risque de formation des caillots sanguins. Les risques de maladies cardiovasculaires (cardiopathies, AVC) sont augmentés par une absence d'activité physique, une alimentation non équilibrée riche en acides gras, le tabagisme et une consommation trop élevée d'alcool.^{14,15}

Les troubles cliniques de ces maladies cardiovasculaires se manifestent sous différentes formes parmi lesquelles on peut citer l'hypertension systémique et pulmonaire, l'hypotension, l'angine de poitrine, l'arythmie cardiaque, l'œdème, l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde. Des traitements pour ces différents troubles cardiovasculaires existent et appartiennent à différentes classes de médicament.^{16,17}

Les dérivés nitrés sont des médicaments capables de libérer du NO dans le corps ou former du NO dans les tissus et ils appartiennent à la classe des médicaments vasodilatateurs.^{18,19} Les vasodilatateurs ont la capacité d'engendrer une relaxation du muscle lisse des vaisseaux sanguins, cause de la dilatation de ces vaisseaux. L'effet direct de l'utilisation de ces vasodilatateurs est la baisse de la tension artérielle due à la diminution de la résistance systémique vasculaire. Les dérivés nitrés font partie intégrante de la famille des vasodilatateurs puisqu'ils miment l'action du NO endogène et permettent une dilatation des vaisseaux sanguins. Ils sont utilisés, le plus souvent, dans le cadre de traitement à court et long terme de l'angine de poitrine (angor), mais aussi pour d'autres maladies cardiovasculaires présentées dans la Figure I.3.¹⁸

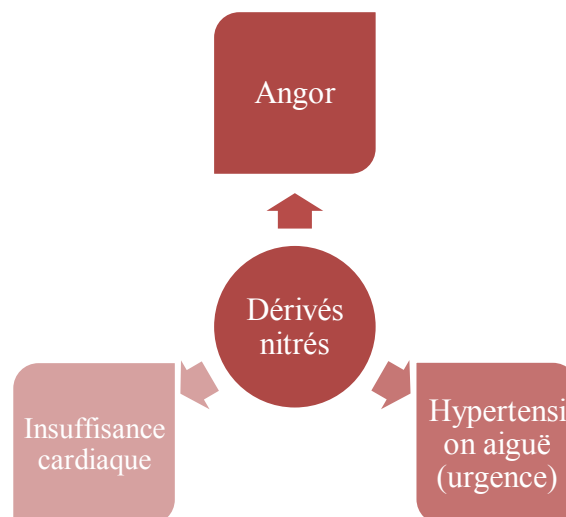


Figure I. 3. Utilisation des dérivés nitrés commercialisés

2.1. Les dérivés nitrés et apparentés commercialisés

Les dérivés nitrés sont des prodrogues du NO et ont déjà pour champ d'application le traitement des maladies cardiovasculaires présentées ci-dessus (Figure I.3). Deux grandes classes de dérivés nitrés existent : les dérivés nitrés, utilisant un processus enzymatique de libération du NO et les dérivés nitrés apparentés, capables de libérer le NO spontanément.^{6,18}

2.1.1. Les dérivés nitrés

La famille des dérivés nitrés ou les nitrates organiques comporte la nitroglycérine (Figure I.4), le dinitrate et mononitrate d'isosorbide. La nitroglycérine, aussi connue sous le nom de trinitrine, qui était à la base connue pour ses effets explosifs et son utilisation dans la dynamite, est l'un des plus anciens dérivés nitrés utilisé et le « chef de file » des nitrates organiques.⁶

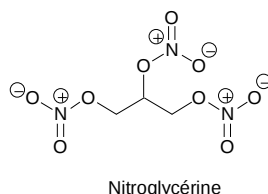


Figure I. 4. Structure du « chef de file » des nitrates organiques, la nitroglycérine

La nitroglycérine possède un temps d'action relativement court à cause de sa métabolisation rapide par le foie, ce qui nécessite une utilisation en voie transcutanée ou sublinguale. Elle reste majoritairement utilisée pour les crises d'angor et la prévention à court terme.^{20,21} Le dinitrate et mononitrate d'isosorbide ayant des durées d'action plus longues sont, au contraire, utilisés pour la prévention de l'angor à long terme.^{21,22}

2.1.2. Les dérivés nitrés apparentés

Appartenant à l'arsenal thérapeutique du cardiologue, le nitroprussiate de sodium, commercialisé en 1929 est la molécule la plus utilisée dans la deuxième famille des dérivés nitrés devant la molsidomine et le nicorandil. Le nitroprussiate de sodium (Figure I.5) libère le NO en interagissant avec les groupements thiol des protéines physiologiques. Ce médicament est efficace et utilisé pour traiter, entre autres, les crises d'hypertension et l'insuffisance cardiaque.²³

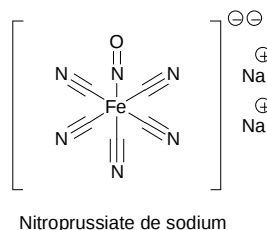
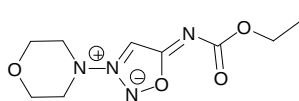
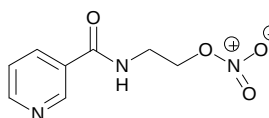


Figure I. 5. Structure du nitroprussiate de sodium

La molsidomine (Figure I.6), un autre dérivé apparenté, permet une libération spontanée de NO dans le corps après transformation en 3-morpholinosydnonimine. Cette molécule est utilisée pour le traitement de l'angor et a montré des effets similaires à ceux de la nitroglycérine mais avec un temps d'action prolongé. Par contre, son temps d'action plus lent, diminue son efficacité et ne permet pas son utilisation pour le traitement des crises d'angor.^{24,25} Le nicorandil (Figure I.6), quant à lui, se différencie des autres dérivés nitrés par son mécanisme d'action. En effet, ce composé est connu pour avoir un double mécanisme d'action où les deux permettent la relaxation des fibres musculaires. Le premier mécanisme est dû à la présence d'un radical nitré qui permet l'augmentation du taux de GMP comme dans les cas précédents. Le deuxième mécanisme, indépendant de la présence du radical nitré, se manifeste après activation des canaux potassiques membranaires par le nicorandil ce qui provoque une hyperpolarisation des membranes cellulaires vasculaires puis, par conséquence, un relâchement des muscles de la paroi vasculaire. Ce médicament, comme la majorité des dérivés nitrés, est utilisé le plus souvent contre l'angor.²⁶



Molsidomine



Nicorandil

Figure I. 6. Les structures de la molsidomine et du nicorandil

2.2. Effets secondaires des dérivés nitrés et limitation d'utilisation

Les dérivés nitrés présents sur le marché ont montré quelques effets secondaires qui peuvent limiter leurs utilisations. Ces molécules sont le plus souvent à l'origine de céphalées et d'une hypotension. Ils peuvent également causer des irritations cutanées ainsi que de la tachycardie.^{18,19}

Le phénomène qui limite le plus l'utilisation des dérivés nitrés est la présence d'un phénomène de tolérance suite à l'utilisation de plusieurs de ces médicaments et particulièrement de la nitroglycérine. Ceci est observé suite à la prise continue des dérivés nitrés et a pour conséquence de diminuer très rapidement les effets des dérivés nitrés. Afin de maintenir les effets des dérivés nitrés, il est nécessaire de garder des fenêtres thérapeutiques, c'est-à-dire de laisser le patient au moins 8 heures sans traitement par ces produits.^{6,18,19,27} Par contre, cet effet de tolérance n'est pas observé lors des traitements par la molsidomine ou le nicorandil.¹⁹

Le nitroprussiate de sodium présente une toxicité sévère par l'accumulation de cyanate due à la formation de cyanure suite à la libération de NO. Cette toxicité peut être contournée par l'utilisation d'antidotes du cyanure, comme le sulfanegen, 1 heure avant l'exposition au cyanure.^{18,23}

Le phénomène de tolérance (d'échappement) aux dérivés nitrés et la toxicité causée par le nitroprussiate de sodium, ont poussé les chercheurs à trouver des nouveaux donneurs de NO en essayant de minimiser les effets secondaires, la toxicité et en essayant d'élargir l'utilisation des donneurs de NO pour d'autres types de maladies cardiovasculaires.

3. Les donneurs de NO en cours de développement

Récemment, plusieurs chercheurs ont travaillé à trouver de nouvelles classes de donneurs de NO comme traitements pour les maladies cardiovasculaires en essayant de conserver les effets bénéfiques des dérivés nitrés déjà existants tout en essayant de réduire leurs effets secondaires. Aujourd'hui, quatre nouvelles classes principales de produits donneurs de NO sont en cours de développement.

3.1. Les ions nitrite/nitrate

Les ions nitrites et nitrates sont des produits de dégradation du NO et étaient considérés comme indicateurs de l'oxydation du NO. Par contre, comme le NO a un temps de demi-vie très court, des études ont prouvé qu'il pouvait être stocké dans le corps sous forme de nitrites, nitrates, S-nitrosothiols, etc.²⁸ Il a été décrit que les nitrites sont capables d'être réduits en NO dans certaines conditions pathologiques comme c'est le cas de l'ischémie.²⁹ Ceci est aussi possible dans le cas d'utilisation des ions nitrates: les nitrates sont capables d'être réduits en nitrites par les réductases des bactéries commensales présentes dans le tube digestif et les

nitrites seront réduits à leur tour en NO. Plusieurs essais cliniques réalisées sur le nitrite de sodium visent des maladies cardiovasculaires bien précises comme l'hypertension pulmonaire artérielle et l'arrêt cardiaque.²⁹ Même si la thérapie par les ions nitrite et nitrate semble une voie prometteuse, plusieurs doutes existent quant à la toxicité de l'administration en grandes quantités de ces ions qui peuvent se trouver transformés en nitrosamines, favorisant la croissance des tumeurs.^{6,28,29}

3.2. Les diazéniumdiolates

Les diazéniumdiolates, dérivés d'amidine et d'énamine libérant du monoxyde d'azote et aussi connus sous le nom de NONOates, portent un groupement caractéristique N(O-)N=O se liant par son atome azote à un atome de carbone ou d'azote le plus souvent, ou aussi à un atome d'oxygène ou de soufre. Cette structure peut être représentée sous forme d'un hybride de résonance des deux formes 1 minoritaire et 2 majoritaire (Figure I.7).³⁰

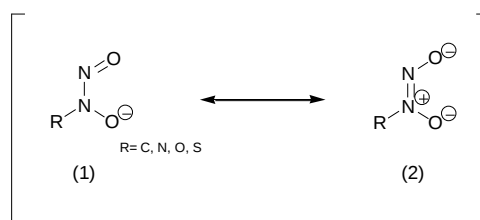


Figure I. 7. Formes mésomères des diazéniumdiolates

Ces composés présentent la capacité de libérer jusqu'à deux moles de NO par simple dissolution dans un milieu physiologique ou dans des milieux de culture cellulaire sans besoin d'une activation par réaction d'oxydoréduction.^{31,32} Par contre, comme les ions nitrite/nitrate, l'utilisation des diazéniumdiolates présente une toxicité due à la formation de nitrosamines. Les nitrosamines peuvent être présentes avant administration vu que leur formation est possible lors de la production de ces produits en présence de la lumière ou leur stockage.^{31,33}

3.3. Les S-nitrosothiols

Les S-nitrosothiols sont des produits de formule générale RSNO obtenus après nitrosation des fonctions thiol libres. Ils sont susceptibles d'être responsables du stockage, du transport, et de la livraison du NO *in vivo*.^{34,35} Les RSNO sont étudiés comme étant des donneurs endogène et exogène du NO qui peuvent être dégradés pour libérer le NO soit par voie enzymatique soit par voie non-enzymatique.^{34,36} Ces composés ont déjà montré des propriétés

très proches de celles des NO : ils sont responsables de la défense de l'hôte contre les corps étrangers, de l'immunosuppression, de la neurotransmission, et dans le système cardiovasculaire, ils sont impliqués dans la relaxation des fibres musculaires lisses et dans la limitation de l'agrégation plaquettaire. Les RSNO, même s'ils montrent des espoirs pour être utilisés contre différentes maladies, ne sont pas encore commercialisés en tant que donneurs de NO.³⁶ Par contre, ils ont déjà été administrés lors de quelques essais cliniques, comme le *S*-nitrosoglutathion qui est administré en quantités faibles en essais cliniques et a permis de démontrer une réduction de la coagulation sanguine durant les opérations coronaires.^{34,36}

Les RSNO, différemment des autres donneurs de NO, sont des produits endogènes et seront donc moins susceptibles de présenter des problèmes de toxicité.³² En plus, ils présentent des temps de demi-vie relativement longs qui se rapprochent de ceux des dérivés nitrés.⁶ Par contre, la vitesse de dégradation de ces composés semble parfois imprévisible à cause de la présence de cuivre (capable de les décomposer), d'enzymes et d'autres thiols engendrant une transnitrosation. Cette stabilité est influencée par la présence de la lumière, de la chaleur, des métaux (cuivre) et par les propriétés du groupe R.³⁶

3.4. Les amidoximes

Dans la littérature, une autre classe de produits est récemment étudiée pour ses propriétés donatrices de NO. Les amidoximes sont des composés possédant une fonction imine et une fonction hydroxyimine sur le même atome de carbone.³⁷ Ces composés ont déjà montré plusieurs utilisations suite à leur réduction mais également à leur oxydation qui libère du NO. La fonction amidoxime est présente dans le corps sous forme d'un produit intermédiaire (*N*-Hydroxy-*L*-Arginine ou NOHA) durant la synthèse du NO à partir de la *L*-arginine.³⁸ Comme dans le cas des RSNO, la présence de cette fonction dans le corps peut limiter ses risques de toxicité. Les amidoximes ont déjà montré des effets antithrombotiques et antihypertensifs *in vitro* et *in vivo* mais ne sont pas encore utilisés cliniquement comme donneurs de NO.^{39,40} En plus des effets positifs sur le système cardiovasculaire, les amidoximes ont montré un temps de demi-vie élevé qui peut atteindre les 10 heures environ.⁴¹

Les deux derniers groupes, les RSNO et les amidoximes, semblent être les plus prometteurs pour être développés en tant que donneurs de NO afin de traiter des maladies cardiovasculaires. Ils présentent potentiellement l'avantage non négligeable de ne pas engendrer de risques majeurs de toxicité *in vivo*. Ils ont déjà été décrits pour leur capacité de

libération de NO, leurs effets bénéfiques sur certaines maladies cardiovasculaires, et leurs temps de demi-vie suffisamment longs. Pour toutes ces raisons, la suite de cette étude bibliographique se concentrera sur les *S*-nitrosothiols et les amidoximes en répertoriant les différentes voies de synthèse de ces composés, leurs caractéristiques et l'état d'avancement des études menées jusqu'à présent.

4. Etude des *S*-nitrosothiols

Les *S*-nitrosothiols sont des molécules caractérisées par la présence d'une fonction thiol liée à une molécule de NO. Il existe des *S*-nitrosothiols endogènes, présents dans le corps, et formés par *S*-nitrosation de résidus d'acides aminés ou de protéines ayant la fonction thiol libre, comme le cas de la cystéine nitrosée en *S*-nitrosocystéine.^{36,42} Il existe également d'autres *S*-nitrosothiols endogènes qui portent normalement dans leurs structures un ou plusieurs résidus de cystéine ayant une ou plusieurs fonction(s) thiol.^{6,36}

Les *S*-nitrosothiols sont capables de se décomposer dans le corps afin de libérer du NO et de former le disulfure correspondant.⁴³ Cette dégradation est décrite en présence de traces d'ions cuivre, de vitamine C, de chaleur ou même de lumière ultraviolette.^{44,45} Le clivage et la libération de NO peut être enzymatique, en présence de γ -glutamyl transpeptidase, de glutathion peroxydase ou de xanthine oxydase.⁴⁵⁻⁴⁸ Les *S*-nitrosothiols peuvent aussi libérer du NO en participant au mécanisme de transnitrosation qui se produit dans le corps. La transnitrosation est le transfert du NO d'une fonction thiol d'une molécule vers une autre. Si cette transnitrosation se passe d'un *S*-nitrosothiol relativement stable comme le *S*-nitrosogluthation (GSNO) vers un autre moins stable comme la cystéine, il est possible d'observer une libération de NO.^{44,49}

Afin d'améliorer le temps de demi-vie des *S*-nitrosothiols endogènes et d'essayer de conserver leurs propriétés biologiques, des *S*-nitrosothiols exogènes ont été synthétisés en nitrosant une fonction thiol libre afin de donner la structure RSNO.

4.1. Les *S*-nitrosothiols endogènes

Les *S*-nitrosothiols endogènes sont suspectés d'être responsables du stockage du NO qui peut être utilisé ultérieurement si besoin. Les propriétés de ces produits semblent similaires à celles du NO *in vivo*, ce qui prouve leur rôle dans la défense immunitaire, la

neurotransmission, l'immunosuppression, la relaxation des fibres musculaires lisses ainsi que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.^{34,45}

Il existe plusieurs types de RSNO dans le corps et le plus important est le *S*-nitrosoglutathion.

4.1.1. Le *S*-nitrosoglutathion

Le *S*-nitrosoglutathion ou GSNO, chef de file des RSNO, est formé dans le corps par nitrosation du glutathion (GSH). Le GSH est le thiol le plus abondant dans le corps³⁴ et est formé à partir de la condensation de trois acides aminés : l'acide glutamique, la glycine et la cystéine portant la fonction thiol.^{43,49} (Figure I.8)

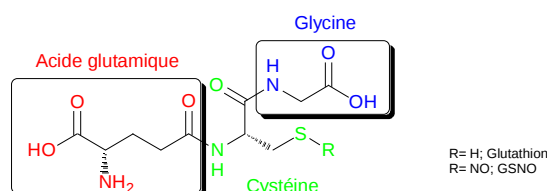


Figure I. 8. Structure du glutathion et de sa forme nitrosée le *S*-nitrosoglutathion

Le GSNO est considéré comme un réservoir important du NO dans le corps et est même capable de transporter le NO dans les cellules. C'est pour cela qu'il est considéré comme un véhicule de NO dans la cellule.⁵⁰ Plusieurs études ont montré que suite à l'incubation du GSNO avec des vaisseaux sanguins isolés, les cellules ont stocké NO libéré pendant 4 heures. Ce NO libéré a pu induire des effets vasorelaxants.⁵¹

Le GSNO est l'un des *S*-nitrosothiols endogènes les plus étudiés, pas seulement pour sa capacité à stocker et libérer du NO, mais aussi pour ses effets puissants dans le système cardiovasculaire. En effet, ce produit a déjà été administré lors de plusieurs essais cliniques afin de tester ses effets antiagrégants plaquettaires et vasodilatateurs. En fait, l'injection de GSNO dans l'artère brachiale d'individus masculins *ex vivo* et l'injection de GSNO intraveineuse systémique chez des individus féminins a causé une augmentation de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.^{44,52,53} En plus de son activité antiplaquettaire, le GSNO a montré une capacité à réduire l'apparition d'embolie chez l'Homme, observée suite à la détection de signaux emboliques asymptomatiques par echo-Doppler transcranien.⁵⁴

D'autre part, lors d'une étude de plus faible ampleur, du GSNO a été injecté par voie intraveineuse à des femmes enceintes présentant une pré-éclampsie sévère (hypertension

artérielle et présence de protéines dans l'urine) pathologie qui se présente parfois lors de certaines grossesses et qui affecte aussi bien la mère que le fœtus. Cette injection a permis simultanément une diminution de la tension maternelle et de l'agrégation plaquettaire.⁵⁵

Les études conduites sur le GSNO ont montré son implication et ses effets dans l'hypertension et les cardiopathies ischémiques, ce qui prouve son importance comme produit endogène ainsi que son utilisation en tant que *S*-nitrosothiols de synthèse exogène.⁴⁵

4.1.2. Autres RSNO endogènes

Il existe d'autres RSNO endogènes comme la *S*-nitrosocystéine, la *S*-nitrosohomocystéine et la *S*-nitrosoalbumine.⁴⁵ (Figure 1.9) Le NO est très souvent transporté dans le plasma par un type de *S*-nitrosoalbumine du sérum⁵⁶ et a montré des effets antiagrégants plaquettaires et vasorelaxants *ex vivo* sur des vaisseaux et plaquettes⁵⁷ mais également une capacité à diminuer la tension artérielle chez des rats.⁵⁸ De plus, la *S*-nitrosoalbumine est capable d'inhiber la prolifération de l'intima ainsi que l'agrégation plaquettaire suite à une angioplastie de l'artère fémorale des lapins.⁵⁹

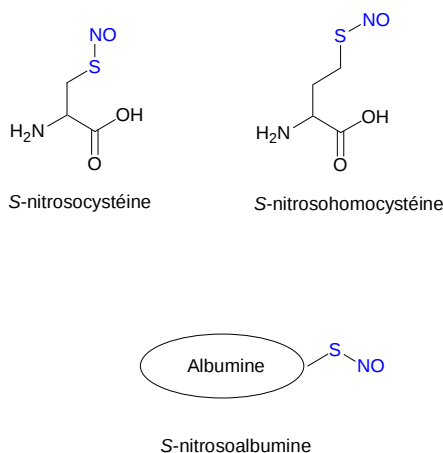


Figure I. 9. Types de *S*-nitrosothiols endogènes autre que le GSNO

Les *S*-nitrosothiols ayant un résidu de cystéine primaire comme la *S*-nitrosoalbumine sont plus stables que les *S*-nitrosothiols de faibles masses molaires.⁴³

4.2. Les *S*-nitrosothiols exogènes (de synthèse)

Les *S*-nitrosothiols synthétiques existants à ce jour sont des médicaments ayant des fonctions thiols qui ont été nitrosés afin de leur donner de nouveaux potentiels thérapeutiques liés à la libération de NO. Deux molécules principales ont été développées : la *S*-nitroso-*N*-acétylcystéine (SNAC) et la famille du *S*-nitroso-*N*-acétylpénicillamine (SNAP) incluant cette dernière et ses dérivés (Figure I.10). Une autre molécule hybride a même été synthétisée après combinaisons de deux *S*-nitrosothiols SNAC et SNAP sur la même molécule.

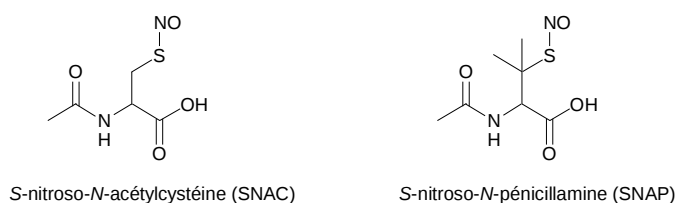


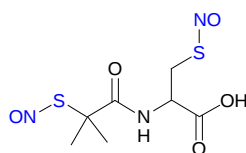
Figure I. 10. Structures de la SNAC et la SNAP

La SNAC est une molécule qui est formée par la nitrosation de la *N*-acétylcystéine, médicament déjà utilisé comme agent mucolytique (qui fluidifie le mucus).⁶⁰ Parmi les autres molécules RSNO étudiées, elle se différencie par sa stabilité et a en plus montré sa capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire et induire la vasorelaxation dans les anneaux de l'aorte thoracique avec ou sans endothélium.⁶¹ Dans des essais cliniques pour la cicatrisation des blessures, la SNAC appliquée sur la peau sous forme d'hydrogel a permis l'augmentation du flux sanguin.⁶²

Le deuxième RSNO synthétique, le SNAP, est formé par la nitrosation de la *N*-acétylpénicillamine, dérivé de la pénicillamine utilisée comme immunosuppresseur et chélateur de cuivre.⁶⁰ La SNAP, qui est la plus utilisée dans le cadre expérimental, a montré de puissants effets vasodilatateurs et antiagrégants plaquettaires. Par contre, cette molécule n'est pas très stable en présence de cuivre et a, de ce fait, poussé les chercheurs à tenter d'améliorer sa stabilité en synthétisant des dérivés.⁴⁵ Les premiers dérivés, qui augmentent aussi la lipophilie du SNAP, sont synthétisés par l'élongation de la chaîne acétyle⁶³ alors que les deuxièmes sont synthétisés par un couplage à la glucosamine⁶⁴, et les troisièmes par couplage à des acides aminés comme la leucine ou la proline.⁶⁵ La synthèse des dérivés du SNAP a permis l'amélioration de sa sensibilité au cuivre et donc de sa stabilité tout en conservant les effets biologiques du SNAP. Quelques dérivés ont même montré une

prolongation intéressante de l'effet vasodilatateur et donc une amélioration de l'effet vasodilatateur des SNAP.⁶³⁻⁶⁵

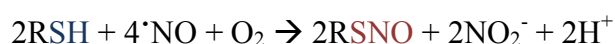
La molécule la plus récente, la *S,S'*-dinitrosobuccilamine (BUC(NO)₂), a été obtenue par couplage entre une SNAC et une SNAP, ce qui résulte en l'obtention de deux *S*-nitrosothiols sur la même molécule. Cette BUC(NO)₂ a montré une libération importante en NO plus élevée que celle de la SNAC et de la SNAP et même d'un mélange de ces deux molécules. En plus, la BUC(NO)₂ a des effets vasorelaxants plus efficaces que la SNAC et que le SNAP (Figure I.11).⁶⁶



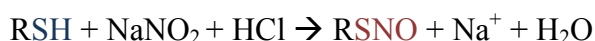
*Figure I. 11. Structure de la *S,S'*-dinitrosobuccilamine*

4.3. Synthèse des *S*-nitrosothiols

La synthèse des *S*-nitrosothiols se fait par nitrosation (ajout d'un NO) à une fonction thiol mère. Par contre, l'utilisation directe et seule du NO pour la nitrosation des fonctions thiol ne permet pas de générer des *S*-nitrosothiols sans la présence d'oxygène dans le milieu. En fait, **l'utilisation d'eau oxygénée en présence de NO** sur une fonction thiol, génère du trioxyde de diazote (N₂O₃), lui-même capable de nitroser les thiols.^{49,67}



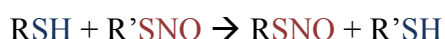
La méthode la plus utilisée et qui s'est montrée la plus efficace est la **réaction de la fonction thiol avec du nitrite acidifié**. Cette réaction se fait normalement avec un mélange équimolaire de nitrite de sodium (NaNO₂) et de thiol dans un milieu acide à basse température. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et de générer les produits avec un bon rendement.⁶⁸



La formation de *S*-nitrosothiols par l'utilisation du NaNO₂ en milieu acide peut être détectée par la coloration du milieu réactionnel par une couleur rouge orangée dans la plupart des cas sauf pour des exceptions comme la SNAP qui génère une coloration violette/verte.^{67,69}

Ce type de nitrosation peut aussi avoir lieu en utilisant directement de l'acide nitreux dans de l'eau, ou aussi par utilisation du *tert*-butyl nitrite dans des solvants organiques et le peroxyde d'azote.⁴³ Par contre, le nitrite de sodium reste le réactif le plus utilisé grâce à sa simplicité d'utilisation et des rendements élevés des produits obtenus.

La dernière méthode de nitrosation également utilisée est la **transnitrosation**. Cette méthode consiste en une réaction entre un *S*-nitrosothiol et la fonction thiol à nitroser. C'est un mécanisme qui se produit *in vivo* où le NO est transféré d'une cystéine à une autre.⁴⁹



5. Une étude sur les amidoximes (Revue)

Revue présentée à la fin de la partie I.

Conclusion

D'après cette étude bibliographique, il est bien évident que les maladies cardiovasculaires engendrent un risque très élevé de mortalité dans le monde. Pour cette raison, de nombreuses études sont réalisées chaque année afin d'élaborer de nouveaux médicaments à base de NO pour traiter certains troubles cliniques liés aux maladies cardiovasculaires.

Parmi les donneurs de NO en cours de développement, notre équipe s'est focalisée sur les *S*-nitrosothiols et les amidoximes qui ont montré des résultats prometteurs d'après la littérature. Ces deux fonctions ont été présentées afin de bien comprendre les différentes méthodes de synthèse envisageables ainsi que de faire le point, à ce jour, des avancements concernant les recherches sur leurs rôles en tant que donneurs de NO et leurs utilisations actuelles pour traiter certaines maladies cardiovasculaires. Cette étude a permis de pouvoir orienter les recherches décrites dans ce manuscrit.

Références de la partie

- (1) Anggard, E. Nitric Oxide: Mediator, Murderer, and Medicine. *Lancet* **1994**, 343, 1199–1206.
- (2) Knowles, R.; Moncada, S. Nitric Oxide as a Signal in Blood Vessels. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 399–402.
- (3) Pai-Dhungat, J. Nitric Oxide (NO): Molecule of the Year 1992. *J. Assoc. Physicians India* **2015**, 63, 93.
- (4) Guo, F. H.; De Raeve, H. R.; Rice, T. W.; Stuehr, D. J.; Thunnissen, F. B.; Erzurum, S. C. Continuous Nitric Oxide Synthesis by Inducible Nitric Oxide Synthase in Normal Human Airway Epithelium In Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92 (17), 7809–7813.
- (5) Schmetterer, L. Role of Nitric Oxide in the Control of Ocular Blood Flow. *Prog. Retin. Eye Res.* **2001**, 20 (6), 823–847.
- (6) Parent, M.; Dupuis, F.; Maincent, P.; Vigneron, C.; Leroy, P.; Boudier, A. Quel Avenir en Thérapeutique Cardiovasculaire pour le Monoxyde d’Azote et ses Dérivés ? *Ann. Pharm. Fr.* **2013**, 71 (2), 84–94.
- (7) Klabunde, R. Cardiovascular Physiology Concepts <https://cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011> (accessed Mar 6, 2019).
- (8) Lowenstein, C. J.; Dinerman, J. L.; Snyder, S. H. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Ann Intern Med* **1994**, 120, 227–237.
- (9) Bogdan, C. Nitric Oxide and the Immune Response. *Nat. Immunol.* **2001**, 2 (10), 907–916.
- (10) Coleman, J. W. Nitric Oxide in Immunity and Inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, 1 (8), 1397–1406.
- (11) Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. *The Neuroscientist* **1995**, 1 (1), 7–18.
- (12) Whittle, B. J. Nitric Oxide in Physiology and Pathology. *Histochem. J.* **1995**, 27, 727–737.
- (13) Liu, R. H.; Hotchkiss, J. H. Potential Genotoxicity of Chronically Elevated Nitric Oxide: A Review. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **1995**, 339 (2), 73–89.
- (14) Cardiovascular disease <https://www.nhs.uk/conditions/cardiovascular-disease/> (accessed Mar 6, 2019).
- (15) Cardiovascular diseases (CVDs) [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed Mar 6, 2019).

- (16) Tanaka, A.; Node, K. A Novel Cardioprotective Mechanism of Exogenous Nitric Oxide: Inhibition of Rho-Associated Kinase Activity. *Hypertens. Res.* **2015**, *38* (7), 461–462.
- (17) Klabunde, R. CV Pharmacology Concepts <https://www.cvpharmacology.com/> (accessed Mar 11, 2019).
- (18) Klabunde, R. CV Pharmacology | Nitrodilators <https://www.cvpharmacology.com/vasodilator/nitro> (accessed Mar 11, 2019).
- (19) Dérivés Nitrés et apparentés <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/derives-nitres-et-apparentes> (accessed Mar 11, 2019).
- (20) Hill, N. S.; Antman, E. M.; Green, L. H.; Alpert, J. S. Intravenous Nitroglycerin. *Chest* **1981**, *79* (1), 69–76.
- (21) Abrams, J. Nitroglycerin and Long-Acting Nitrates in Clinical Practice. *Am. J. Med.* **1983**, *74* (6), 85–94.
- (22) Thadani, U.; Lipicky, R. J. Short and Long-Acting Oral Nitrates for Stable Angina Pectoris. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1994**, *8*, 611–623.
- (23) Belani, K.; Hottinger, D.; Kozhimannil, T.; Prielipp, R.; Beebe, D. Sodium Nitroprusside in 2014: A Clinical Concepts Review. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2014**, *30* (4), 462–471.
- (24) Rosenkranz, B.; Winkelmann, B. R.; Parnham, M. J. Clinical Pharmacokinetics of Molsidomine. *Clin. Pharmacokinet.* **1996**, *30* (5), 372–384.
- (25) Disli, O. M.; Sarihan, E.; Colak, M. C.; Vardi, N.; Polat, A.; Yagmur, J.; Tamtekin, B.; Parlakpınar, H. Effects of Molsidomine against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Eur. Surg. Res.* **2013**, *51* (1–2), 79–90.
- (26) Taira, N. Nicorandil as a Hybrid Between Nitrates and Potassium Channel Activators. *Am. J. Cardiol.* **1989**, *63* (21), 18J–24J.
- (27) Thadani, U. Challenges with Nitrate Therapy and Nitrate Tolerance: Prevalence, Prevention, and Clinical Relevance. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2014**, *14* (4), 287–301.
- (28) Kevil, C. G.; Kolluru, G. K.; Pattillo, C. B.; Giordano, T. Inorganic Nitrite Therapy: Historical Perspective and Future Directions. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51* (3), 576–593.
- (29) Calvert, J. W.; Lefer, D. J. Clinical Translation of Nitrite Therapy for Cardiovascular Diseases. *Nitric Oxide* **2010**, *22* (2), 91–97.

- (30) Hrabie, J. A.; Keefer, L. K. Chemistry of the Nitric Oxide-Releasing Diazeniumdiolate (“Nitrosohydroxylamine”) Functional Group and Its Oxygen-Substituted Derivatives. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (4), 1135–1154.
- (31) Keefer, L. K. Fifty Years of Diazeniumdiolate Research. From Laboratory Curiosity to Broad-Spectrum Biomedical Advances. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (11), 1147–1155.
- (32) Webb, D. J.; Megson, I. L. Nitric Oxide Donor Drugs: Current Status and Future Trends. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11* (5), 587–601.
- (33) Maragos, C. M.; Morley, D.; Wink, D. A.; Dunams, T. M.; Saavedra, J. E.; Hoffman, A.; Bove, A. A.; Isaac, L.; Hrabie, J. A.; Keefer, L. K. Complexes of NO with Nucleophiles as Agents for the Controlled Biological Release of Nitric Oxide. Vasorelaxant Effects. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (11), 3242–3247.
- (34) Morakinyo, M. K. S-Nitrosothiols: Formation, Decomposition, Reactivity and Possible Physiological Effects. Dissertations and theses, Portland State University, Portland, 2000.
- (35) Munro, A. P.; Williams, D. L. H. Synthesis and Kinetics of Decomposition of Some Novel S-Nitrosothiols. *Can J Chem* **1999**, *77*, 550–556.
- (36) Richardson, G.; Benjamin, N. Potential Therapeutic Uses for S-Nitrosothiols. *Clin. Sci.* **2002**, *102*, 99–105.
- (37) Fylaktakidou, K.; Hadjipavlou-Litina, D.; Litinas, K.; Varella, E.; Nicolaides, D. Recent Developments in the Chemistry and in the Biological Applications of Amidoximes. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14* (10), 1001–1047.
- (38) Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their C=N(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, *37* (49), 17179–17191.
- (39) Rehse, K.; Brehme, F. New NO Donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 26 Amidoximes and Their Prodrugs. *Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem.* **1998**, *331* (12), 375–379.
- (40) Rehse, K.; Bade, S.; Harsdorf, A.; Clement, B. New NO-Donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 17. Arylazoamidoximes and 3-Arylazo-1,2,4-Oxadiazol-5-Ones. *Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem.* **1997**, *330* (12), 392–398.
- (41) Weller, T.; Alig, L.; Beresini, M.; Blackburn, B.; Bunting, S.; Hadváry, P.; Hürzeler Müller, M.; Knopp, D.; Levet-Trafit, B.; Lipari, M. T.; et al. Orally Active Fibrinogen

- Receptor Antagonists. 2. Amidoximes as Prodrugs of Amidines. *J. Med. Chem.* **1996**, 39 (16), 3139–3147.
- (42) Gould, N.; Doulias, P.-T.; Tenopoulou, M.; Raju, K.; Ischiropoulos, H. Regulation of Protein Function and Signaling by Reversible Cysteine S-Nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288 (37), 26473–26479.
- (43) Williams, D. L. H. The Chemistry of S-Nitrosothiols. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32 (10), 869–876.
- (44) Al-Sa'Doni, H.; Ferro, A. S-Nitrosothiols: A Class of Nitric Oxide-Donor Drugs. *Clin. Sci.* **2000**, 98, 507–520.
- (45) Al-Sa'Doni, H. H.; Ferro, A. S-Nitrosothiols as Nitric Oxide-Donors: Chemistry, Biology and Possible Future Therapeutic Applications. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11 (20), 2679–2690.
- (46) Hogg, N.; Singh, R. J.; Konorev, E.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. S-Nitrosoglutathione as a Substrate for γ -Glutamyl Transpeptidase. *Biochem. J.* **1997**, 323 (2), 477–481.
- (47) Freedman, J. E.; Frei, B.; Welch, G. N.; Loscalzo, J. Glutathione Peroxidase Potentiates the Inhibition of Platelet Function by S-Nitrosothiols. *J. Clin. Invest.* **1995**, 96 (1), 394–400.
- (48) Trujillo, M.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Freeman, B. A.; Radi, R. Xanthine Oxidase-Mediated Decomposition of S-Nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (14), 7828–7834.
- (49) Broniowska, K. A.; Diers, A. R.; Hogg, N. S-Nitrosoglutathione. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2013**, 1830 (5), 3173–3182.
- (50) Corpas, F. J.; Alché, J. D.; Barroso, J. B. Current Overview of S-Nitrosoglutathione (GSNO) in Higher Plants. *Front. Plant Sci.* **2013**, 4.
- (51) Alencar, J. L. S-Nitrosating Nitric Oxide Donors Induce Long-Lasting Inhibition of Contraction in Isolated Arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 307 (1), 152–159.
- (52) de Belder, A. J. d.; MacAllister, R.; Radomski, M. W.; Moncada, S.; Vallance, P. J. T. Effects of S-Nitroso-Glutathione in the Human Forearm Circulation: Evidence for Selective Inhibition of Platelet Activation. *Cardiovasc. Res.* **1994**, 28 (5), 691–694.
- (53) Ramsay, B.; Radomski, M.; Belder, A.; Martin, J.; Lopez-Jaramillo, P. Systemic Effects of S-Nitroso-Glutathione in the Human Following Intravenous Infusion. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1995**, 40 (1), 101–102.

- (54) Molloy, J.; Martin, J. F.; Baskerville, P. A.; Fraser, S. C. A.; Markus, H. S. S-Nitrosoglutathione Reduces the Rate of Embolization in Humans. *Circulation* **1998**, *98* (14), 1372–1375.
- (55) Lees, C.; Langford, E.; Brown, A.; de Belder, A.; Pickles, A.; Martin, J.; Campbell, S. The Effects of S-Nitrosoglutathione on Platelet Activation, Hypertension, and Uterine and Fetal Doppler in Severe Preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **1996**, *88*, 14–19.
- (56) Stamler, J. S.; Jaraki, O.; Osborne, J.; Simon, D. I.; Keaney, J.; Vita, J.; Singel, D.; Valeri, C. R.; Loscalzo, J. Nitric Oxide Circulates in Mammalian Plasma Primarily as an S-Nitroso Adduct of Serum Albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (16), 7674–7677.
- (57) Minamiyama, Y.; Takemura, S.; Inoue, M. Albumin Is an Important Vascular Tonus Regulator as a Reservoir of Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225* (1), 112–115.
- (58) Orie, N. N.; Vallance, P.; Jones, D. P.; Moore, K. P. S-Nitroso-Albumin Carries a Thiol-Labile Pool of Nitric Oxide, Which Causes Venodilation in The Rat. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2005**, *289* (2), H916–H923.
- (59) Marks, D. S.; Vita, J. A.; Folts, J. D.; Keaney, J. F.; Welch, G. N.; Loscalzo, J. Inhibition of Neointimal Proliferation in Rabbits after Vascular Injury by a Single Treatment with a Protein Adduct of Nitric Oxide. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96* (6), 2630–2638.
- (60) Dahboul, F. Evaluations Physico-Chimique, Biochimique et Pharmacologique de S-Nitrosothiols: Rôle Des Enzymes Membranaires Dans La Libération de l'oxyde Nitrique. Thèse, Université de Lorraine, 2013.
- (61) Tullett, J. M.; Rees, D. D.; Shuker, D. E. G.; Gescher, A. Lack of Correlation Between the Observed Stability and Pharmacological Properties of S-Nitroso Derivatives of Glutathione and Cysteine-Related Peptides. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 1239–1247.
- (62) Seabra, A. B.; Fitzpatrick, A.; Paul, J.; De Oliveira, M. G.; Weller, R. Topically Applied S-Nitrosothiol-Containing Hydrogels as Experimental and Pharmacological Nitric Oxide Donors in Human Skin. *Br. J. Dermatol.* **2004**, *151* (5), 977–983.
- (63) Megson, I. L.; Morton, S.; Greig, I. R.; Mazzei, F. A.; Field, R. A.; Butler, A. R.; Caron, G.; Gasco, A.; Fruttero, R.; Webb, D. J. N-Substituted Analogues of S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine: Chemical Stability and Prolonged Nitric Oxide Mediated Vasodilatation in Isolated Rat Femoral Arteries. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126* (3), 639–648.

- (64) Megson, I. L.; Greig, I. R.; Gray, G. A.; Webb, D. J.; Butler, A. R. Prolonged Effect of a Novel S-Nitrosated Glyco-Amino Acid in Endothelium-Denuded Rat Femoral Arteries: Potential as a Slow Release Nitric Oxide Donor Drug. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 1617–1624.
- (65) Gaucher, C.; Boudier, A.; Dahboul, F.; Parent, M.; Leroy, P. S-Nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-Nitrosothiols. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19* (3), 458–472.
- (66) Dahboul, F.; Perrin-Sarrado, C.; Boudier, A.; Lartaud, I.; Schneider, R.; Leroy, P. S,S'-Dinitrosobucillamine, a New Nitric Oxide Donor, Induces a Better Vasorelaxation than Other S-Nitrosothiols. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *730*, 171–179.
- (67) Hogg, N. Biological Chemistry and Clinical Potential of S-Nitrosothiols. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28* (10), 1478–1486.
- (68) Hart, T. W. Some Observations Concerning the S-Nitroso and S-Phenylsulphonyl Derivatives of L-Cysteine and Glutathione. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (16), 2013–2016.
- (69) Field, L.; Dilts, R. V.; Ravichandran, R.; Lenhert, P. G.; Carnahan, G. E. An Unusually Stable Thionitrite from N-Acetyl-D,L-Penicillamine; X-Ray Crystal and Molecular Structure of 2-(Acetylamino)-2-Carboxy-1,1-Dimethylethyl Thionitrite. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, No. 6, 249–250.

Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors

Tanya Sahyoun ¹, Axelle Arrault ^{1,*} and Raphaël Schneider ^{2,*}

¹ Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, Université de Lorraine, CNRS, LCPM, F-54000 Nancy, France; tanya.sahyoun@univ-lorraine.fr; axelle.arrault@univ-lorraine.fr

² Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France; raphael.schneider@univ-lorraine.fr

* Correspondence: Tel.: +33-372743689 (A.A.); +33-372743790 (R.S.)

Received: 20 June 2019; Accepted: 2 July 2019; Published: 5 July 2019

Abstract: Nitric oxide (NO) is naturally synthesized in the human body and presents many beneficial biological effects; in particular on the cardiovascular system. Recently; many researchers tried to develop external sources to increase the NO level in the body; for example by using amidoximes and oximes which can be oxidized in vivo and release NO. In this review; the classical methods and most recent advances for the synthesis of both amidoximes and oximes are presented first. The isomers of amidoximes and oximes and their stabilities will also be described; (Z)-amidoximes and (Z)-oximes being usually the most energetically favorable isomers. This manuscript details also the biomimetic and biological pathways involved in the oxidation of amidoximes and oximes. The key role played by cytochrome P450 or other dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent reductase pathways is demonstrated. Finally, amidoximes and oximes exhibit important effects on the relaxation of both aortic and tracheal rings alongside with other effects as the decrease of the arterial pressure and of the thrombi formation

Keywords: Amidoxime; oxime; synthesis; isomerism; nitric oxide; oxidation.

1. Introduction

In recent years, oximes and amidoximes (oximes in which one of the substituents is an amino group) (Figure 1) have gained high interest. These compounds are usually easy to synthesize and were studied in many different fields such as coordination [1] or materials chemistry [2,3] but also for their numerous biological activities. Moreover, the amidoxime function is often used as bioisoster of a carboxylic acid, and there are some successful examples of drug candidates exhibiting cardiogenic or antiarthritic properties containing the amidoxime moiety.

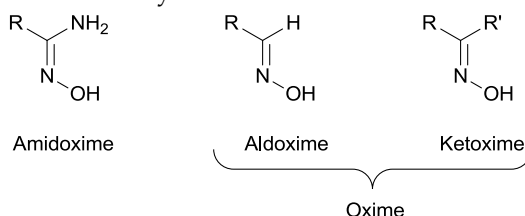


Figure 1. Structures of amidoximes and oximes.

Oximes and amidoximes have also gained high interest regarding their ability to release nitric oxide (NO). The oxidation of these compounds can be catalyzed by various hemoproteins like cytochrome P450

(CYP450) or horseradish peroxidase (HRP) [4]. The first step of arginine oxidation has been extensively studied since the intermediate product, N-hydroxy-L-arginine (NOHA) exhibiting an amidoxime function, is oxidized by NO-synthase (NOS) and other enzymes like CYP450 into NO (Figure 2) [5]. NO is involved in many physiological processes such as neurotransmission, blood pressure regulation, or immunomodulation. Thus, it is important to have external sources of NO specially when NOS presents an abnormal activity as it is the case for patients having diseases like diabetes or hypertension [6,7]. For this reason, exogenous compounds able to be oxidized by different pathways that do not involve NOS are of high interest.

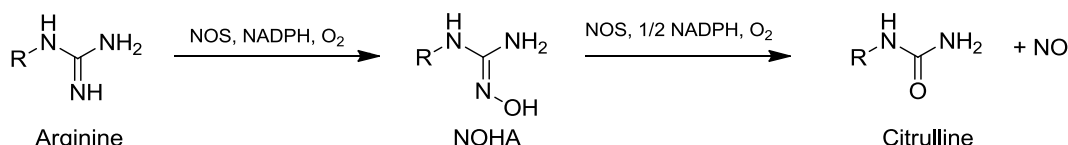


Figure 2. In vivo NO synthesis from arginine.

Microsomal oxidation of amidoximes generates the corresponding amides and/or nitriles. It has been demonstrated that these oxidative cleavages of C=N bonds to the corresponding C=O bonds result in a transfer of one oxygen atom (dependent on CYP450) from O₂ to the substrate, with simultaneous release of NO [8].

In 1986, a patent was deposited for a series of compounds containing an amidoxime function possessing cardiotoxic activities and allowing an increase in the heart muscle force [9]. In 1989, a second patent proved that many compounds bearing amidoxime functions can reduce heart failures by increasing the contractile force of the heart muscle [10]. These studies were followed by the work of Shahid et al. who demonstrated that once the cardiotoxic agent depicted in Figure 3 injected in isolated cardiac and vascular tissues, positive chronotropic and inotropic effects were observed [11].

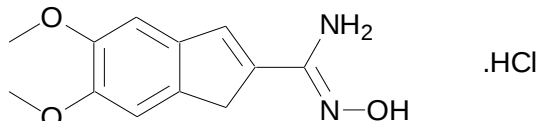


Figure 3. Structure of N-hydroxy-5,6-dimethoxy-1H-indene-2-carboximidamide.HCl.

The oxidations of oximes and amidoximes were studied in vitro using either chemical reagents like 2-iodobenzoic acid (IBX) or IBX associated to tetraethylammonium bromide (TEAB) [12] or biological ones like microsomes of rats containing CYP450 [5]. Amidoximes are also known to be reduced in vivo into amidines exhibiting important anti-microbial activities against many pathogens such as pneumocystis and protozoan [13,14].

In this review, we focus on the oxidation methods of both amidoximes and oximes developed over the last twenty years, topic that has never been described to date. The first part is devoted to the structure and isomerism of these compounds, which is an important subject only scarcely presented in the literature. Next, the major methods developed for the synthesis of amidoximes and oximes will be reported. Finally, the last part will describe the in vitro oxidation steps of amidoximes and oximes via chemical as well as biological processes. The oxidation mechanisms will also be presented in order to describe the exact pathways of NO release. Finally, the last part will focus on the in vivo oxidations of amidoximes and oximes in rats and rabbits alongside with their effects like the release of NO, the blood pressure regulation and the vasodilatation.

2. Isomerism of amidoximes and oximes

Amidoximes and oximes have poorly been studied in the literature regarding their isomerism. However, this topic is of high interest for the determination of their structure. These two compounds can exhibit two types of isomers, (i) geometrical diastereoisomers Z or E, and (ii) constitutional isomers

(tautomers). Better knowledge of the relative stability of the tautomeric forms of amidoximes would permit to elucidate some aspects of their pharmacological activity, of their reactivity and of their ability to coordinate with metal centers.

Some studies were devoted to amidoximes in order to clarify their structure. Four main amidoxime tautomers plus their geometrical isomers (Z/E) were studied, namely amidoxime, iminohydroxylamine, aminonitrone and nitroso-amine (Figure 4) [15,16]. In 1964, the presence of a zwitterionic form for amidoximes was demonstrated. This zwitterion or aminonitrone was identified via FT-IR by the presence of a medium to strong band at 1690 cm^{-1} associated to the amidoxime $\text{C}=\text{N}$ stretching at 1656 cm^{-1} . The main aminonitrone and amidoxime IR bands are summarized in Table 1 [17].

Table 1. Infrared bands in solid and liquid phases of amidoximes.

	Functions	Stretching solid phase (cm^{-1})	Stretching liquid phase ^a (cm^{-1})
Amidoxime form	OH	-	3620
	NH ₂	3400 and 3500 (sh)	
	NH ₂ scissor	1575-1620	
	Associated OH and NH ₂	2500 and 3300 (br)	
	C=N	1650-1670 (vs)	
Aminonitrone form	C=N ⁺ (H)	1690 (m-s)	-

^a liquid phase stretching is performed in chloroform; sh: sharp, br: broad, vs: very sharp, m: medium, s: strong.

Recent theoretical and experimental studies show that the most stable and dominant form is the Z-amidoxime [15,16,18]. This isomer is more stable than the iminohydroxylamine, the aminonitrone and the nitroso-amine, the latter being the less stable [18]. However, according to the most recent published work on that topic [16], three amidoximes isomers may coexist due to their close relative energies: the Z-amidoxime as the most stable form in both protic and aprotic solvents with the Z-aminonitrone and the E-amino oxime as the minor forms. These theoretical studies were conducted on two compounds, benzamidoxime and acetamidoxime. Z-aminonitrone and E-amidoxime are the most energetically stable after the dominant form Z-amidoxime: for acetamidoxime, the relative energies of these two tautomers are of 3.0 kcal/mol and 3.5 kcal/mol, respectively, while for benzamidoxime they are of 4.5 kcal/mol and 5.4 kcal/mol, respectively. The other tautomers, E-aminonitrone and all iminohydroxylamine isomers are less energetically favorable since their relative energies were higher than 8.5 kcal/mol in the case of acetoxime and of 9.8 kcal/mol for benzamidoxime. The nitroso-amine is always the less energetically stable isomer ($\Delta G \approx 30\text{ kcal/mol}$). The other tautomers show stabilities in between the tautomers mentioned above, the iminohydroxylamine exhibiting an intermediate stability with $\Delta G \approx 10\text{--}13\text{ kcal/mol}$ (Figure 4). [16,18].

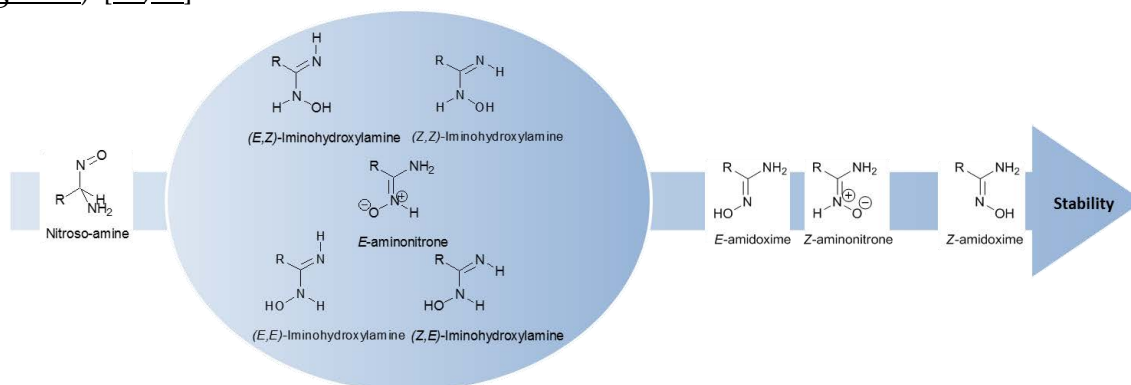


Figure 4. Summary of the stability of amidoxime isomers.

Oximes tautomers were also studied and three main tautomeric forms were identified, the oxime, the nitron and the nitroso compound (Figure 5) [19,20]. Depending on the structure, other cyclic tautomers may also exist [19]. These various isomers may present different biological activities [20] but no data can be found in the literature. The first identified isomerization was the oxime–nitron [21]. Even if both nitron and nitroso tautomers were identified to be less stable than the oxime form [22], the nitron form exhibits a higher reactivity than the oxime, especially in cycloaddition reactions and nucleophilic addition to unsaturated electrophiles [16,23]. The presence of an electron donating group on the oxime moiety allows to decrease the energy gap between the oxime and the nitron form and stabilizes this latter, which facilitates addition reactions [16]. However, the oxime form is more reactive than the nitron at high pH [24].



Figure 5. Tautomers of oximes.

The oxime–nitron tautomerism is the mostly studied in the literature and its mechanism was investigated. Recently, Lopez et al. demonstrated by theoretical calculations that this isomerization occurs via a bimolecular mechanism involving two oximes or two nitrons [23]. Previous studies suggested that the oxime–nitron tautomerism likely originated from a thermal 1,2-hydrogen shift and a solvation effect [25–28].

Oximes can also exist as stereoisomers (Z/E forms). Numerous studies showed that the (Z)-oxime is the most stable configuration. This was proven by differential scanning calorimetry (DSC) studies in which heating and melting of the E-oxime afforded the Z-oxime. The oxime in its (E) configuration may be present with the Z-oxime but it represents the minor specie [20,25].

3. Synthesis of oximes and amidoximes

According to the literature, amidoximes and oximes are compounds easily synthesized in high yields. Amidoximes are usually prepared from the corresponding nitriles and hydroxylamine while oximes are generated from the aldehydes/ketones and hydroxylamine.

3.1. Synthesis of amidoximes

Amidoximes are compounds possessing an amino and a hydroxymino function on the same carbon (Figure 1) [7]. The first synthesized amidoxime is formamidoxime obtained in 1873 by Lossen and Schigerdecker [29,30] but the first chemical structure of amidoximes only appeared in 1884 with Tiemann's work [30,31]. Many synthesis methods of amidoximes were explored but the most commonly used nowadays is the nucleophilic attack of hydroxylamine on a nitrile (vide infra). Table 2, Table 3 and Table 4 summarize all the processes developed for amidoximes synthesis and reactions are classified by the type of additives used [7,30]. The methods described in Table 3 and Table 4 are scarcely used nowadays because they require more sophisticated procedures.

Table 2 shows that amidoximes can be prepared from hydroxylamine and nitrile, thioamide, amidine hydrochloride, hydrazide imide, iminoether, imidoylbenzotriazole, and pyrazine derivatives. The attack of hydroxylamine on nitriles is the mostly used method since Tiemann showed that mixing a nitrile with hydroxylamine hydrochloride and sodium carbonate in an alcohol produces the corresponding amidoxime after several hours of heating at 60–80 °C [31]. Via this method, amidoximes are generally prepared in high yield, up to 98% (entry 1) [32]. Synthetic methods described in entries 2 and 3 are more scarcely used since the starting compounds are prepared from nitriles [30]. In some cases, better results are obtained using thioamides than the nitriles [33]. The reaction of hydroxylamine with

thioamides [30,33,34], amidines, hydrazide imides [30] or iminoethers [35], even if rarely used, usually affords the targeted amidoximes in yields varying from 60% to 100% (entries 2–4).

Table 2. Amidoxime syntheses using hydroxylamine.

Entry	Hydroxylamine action on	Reaction
1	nitrile	$\text{R}-\text{C}\equiv\text{N} \xrightarrow{\text{NH}_2\text{OH}} \text{R}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}-\text{OH}$ R = Alkyl, Ar
2	thioamide	$\text{R}-\text{C}(=\text{S})\text{NH}_2 \xrightarrow{\text{NH}_2\text{OH}} \text{R}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}-\text{OH} + \text{H}_2\text{S}$ R = C₆H₄F, C₆H₄Cl, C₆H₄Br, C₆H₄Me, pyridyl
3	amidine hydrochloride or hydrazide imide	$\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH} \cdot \text{HCl} \xrightarrow{\text{NH}_2\text{OH}} \text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}-\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$
4	iminoether	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH=CH}_2)\text{C}(\text{NH})=\text{OEt} \xrightarrow{\text{NH}_2\text{OH}} \text{C}_6\text{H}_4(\text{CH=CH}_2)\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}-\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
5	Imidoylbenzo-triazole	$\text{Benzotriazole-N}(\text{R})=\text{C}(\text{R}_1) \xrightarrow{\text{NHR}_2\text{OR}_3} \text{R}_3\text{O}-\text{N}(\text{R}_2)=\text{C}(\text{R}_1)\text{R}$ R = <i>p</i>-Tol, R₁ = Bn R = <i>p</i>-Tol, R₁ = Me R = <i>i</i>-Bu, R₁ = Ph R = 4-MeOPh, R₁ = <i>p</i>-Tol R = Ph, R₁ = Ph R = <i>i</i>-Bu, R₁ = Me R = 2-Pyridyl, R₁ = Ph R = <i>p</i>-Tol, R₁ = 2-Furyl R₂ = H, R₃ = H R₂ = H, R₃ = Bn R₂ = H, R₃ = Me R₂ = Me, R₃ = H R₂ = H, R₃ = H R₂ = H, R₃ = Me R₂ = H, R₃ = Bn R₂ = Me, R₃ = H
6	Open chain pyrazine derivatives and/or pyrrolopyrazine	$\text{Pyrazine derivative} + \text{Pyrrolopyrazine} \xrightarrow{\text{NH}_2\text{OH}} \text{Amidoxime}$ R = CH₃, Bn

The use of the nitriles and hydroxylamine allows usually to obtain the expected amidoximes in good yields in a reaction time varying from of 1 to 48 h depending on the substrates. It is the leading method to prepare amidoximes using readily available nitriles as starting substrates [36,37,38]. Hydroxylamine hydrochloride is associated to bases like triethylamine or sodium carbonate (2 to 6 equivalents) that allow the in situ generation of hydroxylamine. The addition of hydroxylamine can be conducted at room temperature but is usually performed in refluxing ethanol or methanol to decrease the reaction time [36,37]. Aromatic amidoximes are obtained in higher yields than aliphatic ones. Nevertheless, it is still possible to improve the yield by adding an excess of hydroxylamine.

The use of an aqueous solution of hydroxylamine has also been reported. In this case, a base is not required and the reaction time is generally shorter than when using hydroxylamine hydrochloride [38,39]. This method has been demonstrated to be of interest for the efficient preparation of amidoximes starting from aliphatic nitriles.

Recently, Ranjbar-Karimi et al. synthesized a series of amidoximes using hydroxylamine and nitriles via a solvent free method under ultrasonic irradiation. The reaction proceeds in short time and allows the production of amidoximes in high yields (70–85%) [40].

Finally, the ring-opening of heterocycles using hydroxylamine was also demonstrated to be of interest for the preparation of amidoximes. One of the most recent methods was developed by Katritzky et al. by using imidoylbenzotriazoles and hydroxylamine as starting reagents under microwave irradiation (Table 2, entry 5). This method allows the fast preparation of amidoximes (reaction time of 5–15 min) and in good yields (65–81%) [41]. Hydroxylamine was also used for the synthesis of pyrazine-based amidoximes from open chain pyrazine derivatives or their pyrrolopyrazine tautomers. The reaction was demonstrated to occur either via the attack of hydroxylamine on the nitrile or the pyrrolidine ring. These reactions gave amidoximes in yields ranging from 63–93% after 18 h (Table 2, entry 6) [42,43].

The second synthetic process allowing the preparation of amidoximes involves the reaction of ammonia or amines with oximinoethers, hydroxamic acids or nitric oxides (Table 3) [7,30]. The first example described in the literature is the reaction of ammonia with ethyl benzhydroxamic acid for 8 h at 175 °C (Table 3, entry 1) [44]. This method is scarcely used but is of interest when using primary or secondary amines [30]. The use of 2 equivalents of amine relative to the hydroxamic acid causes a fast dehydrohalogenation followed by a nucleophilic attack of the amine on the intermediate nitrile oxide (Table 3, entry 2) [30].

Table 3. Reaction of ammonia and amines with oximinoethers and hydroxamic acid chlorides.

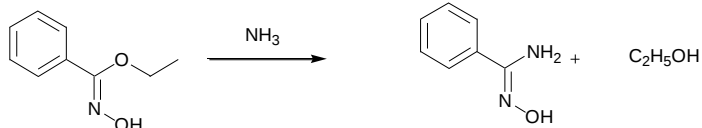
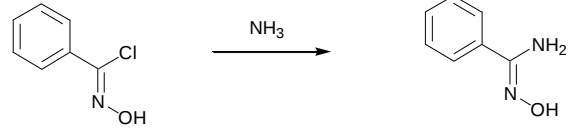
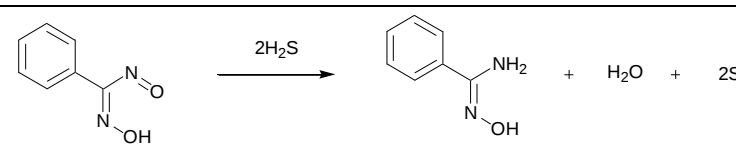
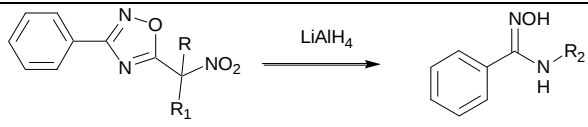
Entry	Ammonia and amine action on	Reaction
1	oximinoether	 <chem>CCOC(=NO)c1ccccc1.N>>NC(=NO)c1ccccc1.CCO</chem>
2	hydroxamic acid chlorides	 <chem>ClC(=NO)c1ccccc1.N>>NC(=NO)c1ccccc1</chem>

Table 4. Miscellaneous reactions allowing the preparation of amidoximes.

Entry	Method	Reaction
1	Reduction of nitrosolic acids and related compounds	 <chem>O=[N]c1ccccc1.O=S=S>>NC(=NO)c1ccccc1.O.S</chem>
2	Ring opening of nitrogen-containing heterocycles	 <chem>CC(=O)OCCc1ccccc1n2c(c1)nc(c2)O[N+](=O)[O-]>>NC(=NO)c1ccccc1</chem> $R = \text{COOEt}, R_1 = \text{Cl}$ $R = \text{COOEt}, R_1 = \text{NO}_2$ $R = \text{NO}_2, R_1 = \text{NO}_2$ $R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ $R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ $R_2 = \text{Me}$

Some examples of reactions rarely described in the literature but allowing the preparation of amidoximes are described in Table 4. The reduction of benzonitrosolic acid with hydrogen sulfide was reported in 1906 by Wieland and Bauer (entry 1) [45].

Some reducing agents are able to open nitrogen containing heterocycles like 1,2,4-oxadiazoles, Δ' -1,2,4-oxadiazoles, 1-alkoxyadenines and 1,2,5-oxadiazoles [Z,30]. The reaction of lithium aluminum hydride (LiAlH_4) with Δ' -1,2,4-oxadiazoles allows the break of the C-O bond to give N-substituted amidoximes in 70% to 72% yield (entry 2) [46].

Finally, 1,2,4-oxadiazoles can also be transformed into amidoximes (yield of 75–85%) by reaction with aqueous NaOH [47]. Amidoximes were obtained in lower yields (35–63%) after passing 1-alkoxyadenine derivatives through Amberlite IRA 402 column and heating the eluate at 30–40°C for 7–48 h [48].

3.2. Synthesis of oximes

An oxime is a compound belonging to imines family ($\text{RR}'\text{C} = \text{NOH}$). If R is an alkyl or an aryl group, R' may be a hydrogen atom (aldoxime) or an alkyl/aryl group (ketoxime) (Figure 1). These compounds are usually synthesized by the addition of hydroxylamine on an aldehyde or a ketone [25,49,50]. The preparation of oximes is extensively described in the literature. Some improvements were described to enhance the yields and decrease the by-products formation. In 1999, Hajipour et al. reported the oximation of aldehydes and ketones using hydroxylamine hydrochloride under microwave irradiation in solvent free conditions. The process was demonstrated to be of higher efficiency for the synthesis of aldoximes using hydroxylamine hydrochloride and silica gel (yields higher than 76% and reaction time of 4 min) [51]. A similar solvent free method was reported in 2002 using hydroxylamine hydrochloride and zinc oxide giving yield of 80–98% and reaction time varying between 5 and 15 min at 140–170°C [52].

Recently, Li et al. reported an efficient synthesis of oximes under sonication (yields ranging 51 to 99% and short reaction times). The reaction is conducted in ethanol in the presence of anhydrous sodium sulfate [53].

Oximes can also be synthesized by the oxidation of aliphatic amines using m-CPBA. This reaction gave very high yields (>90%) in 20 min and at room temperature [54].

4. Oxidation of amidoximes/oximes and NO release

During many years, NO was considered to present no beneficial biological effects and to be even toxic due to its presence in polluted environments [55]. In the 1980s, it was observed that a molecule released from the endothelium is responsible of the vasodilators effects and it was later identified as NO. Since, numerous studies on NO showed many biological benefits including its important role in vasodilation and blood pressure reduction [56]. For this reason, amidoximes and oximes were studied for their capacity of NO release.

4.1. Oxidation by chemicals and biomimetics

Since the NO production in the human body originates from the oxidation of l-arginine by NOS, this oxidation route and the factors affecting the oxidation were investigated. In 1998, Koikov et al. studied the oxidation of three series of compounds including oximes and amidoximes at a concentration of 2×10^{-4} M with $\text{K}_3\text{Fe}[(\text{CN})_6]$ at pH 12 [57]. Under these conditions, oximes were not able of releasing NO and this phenomenon was explained by the acceptor or donor properties of the substituents (hydroxyphenyl and pyridine rings) and by the acidity of the oxime functions. However, many tested amidoximes showed the capacity to release NO in the presence of $\text{K}_3\text{Fe}[(\text{CN})_6]$ and methyl and phenyl amidoximes released 25% and 10% of NO, respectively. It was observed that replacing the phenyl ring by a pyridine ring allows to increase twice the amount of released NO and that the amidoximes exhibit quite a similar potential of NO release than methylamidoxime. The structures of these amidoximes are shown in Figure 6. The most important release was observed for the pyridine-2,6-diamidoxime for which the amount of released NO reached up to 40%. Benzonitrile was also identified as the major product present after the oxidation of benzamidoxime.

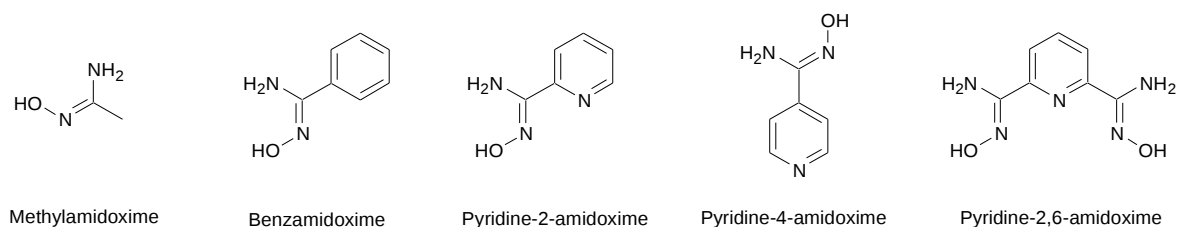


Figure 6. Amidoximes releasing NO in the presence of $K_3Fe[(CN)_6]$.

To better understand the products formed during the oxidation of amidoximes, Vadon-Le Goff et al. reported the use of various oxidants and biomimetic systems to study the reaction products as well as the causes and factors affecting the outcome of the reaction [4]. The authors evaluated the potential of NO release of 4-chlorobenzamidoxime in the presence of different oxidants. Amides or nitriles were identified as the main products but the presence of a dimeric product in the mixture was also detected (Figure 7).

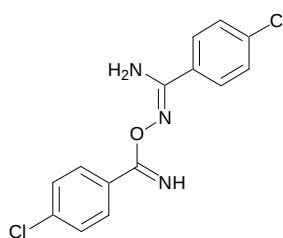


Figure 7. Dimeric product obtained from 4-chlorobenzamidoxime.

It was demonstrated that with oxidants like $Pb(OAc)_4$ and Ag_2CO_3 , amidoximes are selectively oxidized into nitriles, while amides were selectively formed using oxidants capable of transferring one oxygen atom like H_2O_2 , $t-BuOOH$ or $m-CPBA$. Using $m-CPBA$, 4-chlorobenzamidoxime was oxidized into a mixture of dimeric products and amide, the latter being the major component. This oxidant, as well as $t-BuOOH$, associated with catalytic amounts of iron-porphyrin generates preferentially the nitrile in less than 1 h (ca. 80% of the amidoxime oxidized) (Table 5, lines 1–3). This likely originates from the formation of highly reactive iron-oxo species which oxidize the amidoxime into the nitrile. This result is in accordance with those described in the literature related to the oxidation of amidoximes by hemoproteins. Horseradish peroxidase, able of generating iron-oxo species in the presence of H_2O_2 , oxidizes amidoximes to nitriles and a dimeric product. On the other hand, the oxidation by CYP450 generates exclusively the amide product instead of the nitrile. This was explained by the presence of the superoxide $O_2^{\bullet-}$ radical anion or of a protein-metal- O_2 complex instead of the presence of the iron-oxo intermediates (see Section 4.2 for the oxidation by CYP450).

Table 5. Summary of the major oxidation products after amidoxime reaction with different chemical and biomimetic oxidants.

Entry		Major oxidation products	
		Amide	Nitrile
1	Monoelectronic oxidants		√
2	O_2 atom donors	√	
3	O_2 atom donors + iron-porphyrin catalyst		√
4	Photooxygenation of amidoximates	√	
5	IBX	√	
6	IBX/TEAB		√

√ Major product formed.

Amidoximes and oximes can also be oxidized via the amidoximate/oximate anions in the presence of singlet oxygen [58]. The authors demonstrate that amidoximes and oximes are inert to $^1\text{O}_2$ but once converted to amidoximates and under photooxygenation, amidoximes can be oxidized into the corresponding amides along with nitriles as minor products (Table 5, entry 4). The use of $^1\text{O}_2$ is similar to the oxidation of N-hydroxyguanidines by the NOS and clarifies the biological oxidation routes (Figure 8, red part).

To better understand the oxidation process of amidoximes, oxidants like 2-iodobenzoic acid (IBX) and the IBX/tetraethylammonium bromide (TEAB) combination were also used [12]. The authors demonstrate that IBX can selectively oxidize benzamidoxime (Figure 8, blue part) into amide (best yield of 83% using an amidoxime:IBX ratio of 1:1 and only 10% of the nitrile). This method was extended to various amidoximes and similar results were obtained. Nevertheless, the use of an amidoxime:IBX:TEAB molar ratio of 1:2:2 gave 90% of the nitrile and only 5% of the amide. By using this ratio with a series of amidoximes, similar results were obtained by the authors (Table 5, entries 5 and 6).

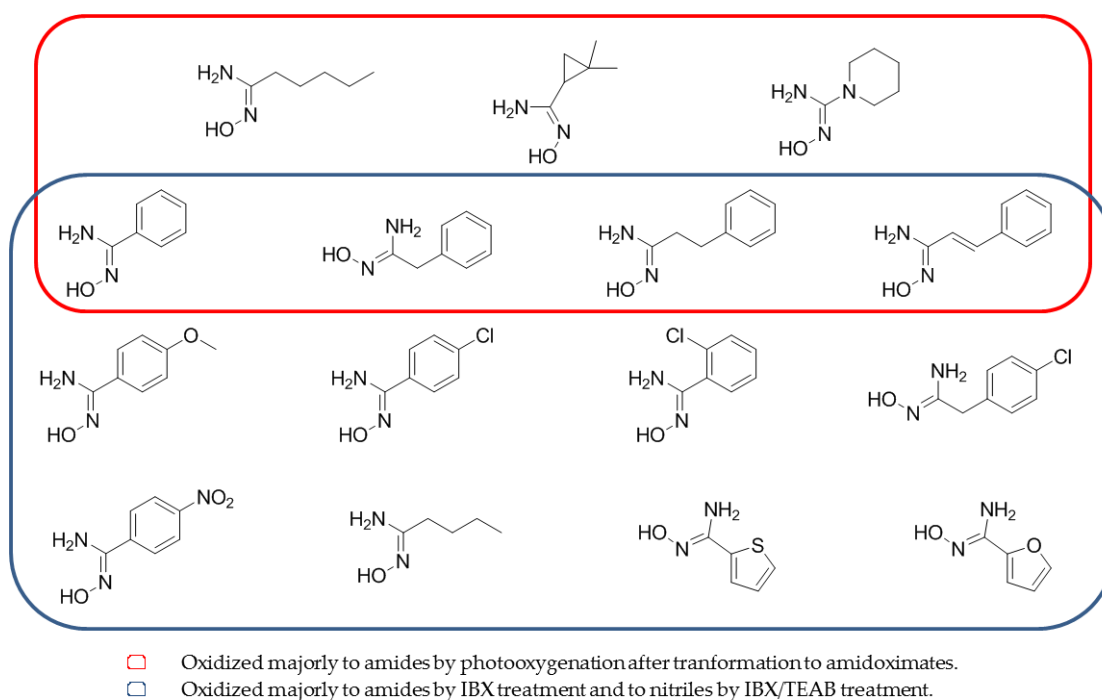


Figure 8. Structures of amidoximes able to be oxidized after photooxygenation or by treatment 2-iodobenzoic acid or IBX/tetraethylammonium bromide.

4.2. Biological pathways of amidoximes and oximes oxidation

As it is well known, NO is synthesized *in vivo* by the NOS enzymes. In recent years, many scientists got interested in finding new ways to oxidize amidoximes and oximes in order to increase the NO concentration in the organism. A few studies demonstrated that C=N-OH moieties present in compounds like amidoximes and oximes can be oxidized by CYP450 enzymes [59,60]. In 1998, a study showed the key role of CYP450 in the oxidation of amidoximes, oximes and N-hydroxyguanidines along with their oxidation products [5]. In the presence of rat liver microsomes, NADPH and O_2 , amidoximes and oximes can be oxidized and release NO and NO-related aerobic products like NO_2^- and NO_3^- . The presence of both NADPH and O_2 and of the active microsomes was demonstrated to be essential for the oxidation, indicating that this reaction is enzymatic. Moreover, the authors demonstrated that the CYP450 present in the microsomes are responsible for this reaction by using either the CYP450 inhibitor Miconazole which caused the inhibition by ca. 80–90% of the reaction or Dexomethasone (DEX), a CYP450 inducer, treated

microsomes. The oxidation of various amidoximes and oximes generates both NO_2^- and NO_3^- , especially in the presence of DEX-treated microsomes which boosts the oxidation. This release was always accompanied by the formation of amides and nitriles in the case of amidoximes and of ketones and nitroalkanes in the case of ketoximes.

In 2004, another study used CYP450 to test the oxidation of the oximes. Hence, Mäntylä et al. incubated buparvaquone-oxime and its derivatives with NADPH and either untreated rat liver microsomes or treated ones with various CYP450 inducers. These buparvaquone's prodrugs were studied for their ability to be oxidized and releasing the corresponding buparvaquone alongside NO which was quantified via the NO_2^- species produced [61]. All of the oximes were able to be oxidized in the presence of CYP450 and release buparvaquone bearing a $\text{C}=\text{O}$ function effective against leishmaniasis. The presence of NO was also believed to have a role against this disease. The solubility of the oximes prodrugs was further improved by the synthesis of their corresponding phosphate prodrugs. These latter were able to release the corresponding oximes-buparvaquone [62].

Recently, we evaluated the capacity of mono- and bis-amidoximes to release NO by a CYP450-mediated oxidation (Figure 9) [38]. Amidoximes were also incubated with NADPH and untreated microsomes. Only aromatic mono-amidoximes showed an important NO release while the aliphatic mono-amidoxime and the bis-amidoxime bearing both an aromatic and aliphatic amidoxime released only small NO quantities. The inadequate size or shape of the latter compounds and/or the lower reactivity of the aliphatic amidoximes compared to aromatic ones hinders their metabolism by rat liver microsomes. It was of interest to determine if these amidoximes are able to release NO once incubated with human cells not originating from the liver. For that purpose, these compounds were first demonstrated to be cytocompatible with human vascular smooth muscle cells (HVSMC) and were later incubated with these cells for 1 h to evaluate their ability to release NO. This test showed that all of the amidoximes are able to release NO and to increase the NO storage through nitrosothiol (RSNO) formation inside the cells. It is worth mentioning that the bis-amidoxime exhibited a high potential for the generation of RSNO, very close to that of the aromatic mono-amidoximes, but at a twice lower concentration.

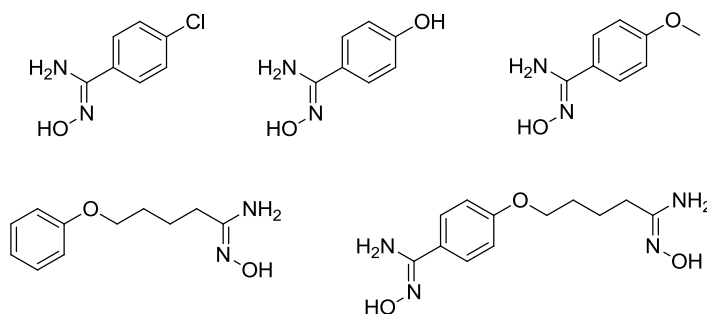


Figure 9. Structures of tested mono- and bis-amidoximes for NO release on rat liver microsomes and human vascular smooth muscle cells.

Other reports focused on finding the capacity of the NOS in oxidizing amidoximes and oximes. Acetoxime can be oxidized by CYP450 and NADPH in the presence of metal complexes into NO_2^- and reactive NO species [63]. However, this study clearly proved that acetoxime cannot be oxidized by the NOS II enzyme and cannot even inhibit its activity, which suggests a low affinity between NOS and this ketoxime. This demonstrates that the oxidation pathway of acetoxime in the cells involves only CYP450. In another study, four amidoximes were incubated with NOS I and II and NADPH and the NO formation was monitored by the Griess assay in order to study the amidoximes recognition by NOS [64]. All the amidoximes were inactive in the presence of NOS and did not show any NO release. Moreover, they are also very bad inhibitors of NOS I and II. The corresponding N-hydroxyguanidines analogs showed high affinity, indicating that the NOS better recognizes molecules bearing the $-\text{NH}-\text{C}(\text{R})=\text{NH}$ moiety than

C=NOH. The latest study related to that topic was conducted in 2002 [65], and a series of N-hydroxyguanidines, amidoximes, ketoximes and aldoximes were tested for their NO release capacity in the presence of recombinant NOS II. The presence of an unmodified N-hydroxyguanidine function is mandatory for the oxidation by the NOS. Thus, none of the amidoximes and oximes could be oxidized by this enzyme.

As shown by these studies, CYP450 seems to be responsible of the oxidation of both amidoximes and oximes while NOS does not appear to have a role in these oxidations. As mentioned above, the oxidations by CYP450 afforded as major products amides in the case of amidoximes and ketones in the case of oximes alongside with the release of NO, nitrites and nitrates [63–65]. The mechanism of amidoximes and oximes oxidation by CYP450 that generates amides/ketones is explained by the formation of the superoxide radical anion ($O_2^{\bullet-}$) which is a dissociation product of the CYP450-Fe(II)- O_2 complex, this latter was shown to be easily transformed to CYP420-Fe(II)- O_2 during the oxidation [60,63–65]. The formation, even in small amounts, of a nitrile and nitroalkane mixture originates from the presence of an iron-oxo complex as it is the case for the biomimetic reactions generating nitriles. Many CYP450 isoforms have been identified as responsible of the oxidations of these products like CYP4501A₁, CYP4502B₁, and CYP4502E₁ [5,63].

These results demonstrate that NOS are not optimal for the evaluation of the NO release from amidoximes. It is preferable to use the CYP450 pathway that shows good results with both amidoxime and oxime functions.

4.3. *In vivo and in vitro biological responses to NO release from amidoximes/oximes oxidation*

Along with the discovery of the capacity of amidoximes and oximes to release NO in the presence of biological extracts and cells, many scientists started to test these products on biological tissues. Indeed, the in vivo generation of NO has gained a lot of attention among others due its capacity of vasodilatation and thus reducing platelet aggregation and thrombosis formation.

The first major works that appeared on that topic were published by Rehse et al. in 1997 and 1998 [66,67]. Seven aryl azoamidoximes and their effects on thrombosis inhibition, blood pressure and inhibition of platelet aggregation were investigated [66]. Five of the seven amidoximes inhibited the formation of thrombus in mesenteric rat vessels and even two of these amidoximes inhibited the thrombus formation by more than 20% (Figure 10). The remaining two amidoximes bearing a methoxy or a fluoro group on the para position did not show any significant effect on the thrombus formation in both arterioles and venules. The inactive 4-methoxyphenylazo-methanamidoxime had also no significant action in lowering the blood pressure during 2, 4, 6, and 24 h. The highly active 4-chlorophenylazo-methanamidoxime decreased the blood pressure for 24 h with a maximum efficiency of $16\% \pm 10\%$ at 6 h. It is noteworthy that both amidoximes were able to release NO in the presence of DEX-treated rat liver microsomes and NADPH, but only the second amidoxime was used by the cells in order to lower blood pressure and reduce thrombi formation. The last test conducted with these amidoximes was the platelet aggregation. All of the studied amidoximes exhibited low or poor activity after calculating their IC_{50} following the Born test. This means that these amidoximes are not able of being oxidized in these conditions.

In another series of experiments, 17 compounds containing different aliphatic, aromatic, and bis-amidoximes were tested [67]. The results were in accordance with the previous study since the majority of the amidoximes showed a poor effect or even a lack of activity towards the inhibition of platelet aggregation which proves once more that the platelet rich plasma is not convenient for amidoximes oxidation. The most effective amidoxime was the aromatic one bearing a chlorine atom on the para position and an ethene group between the phenyl and the amidoxime function. The presence of this ethene group raised the efficiency for the platelet aggregation inhibition. Bis-amidoximes displayed a good activity for the inhibition of thrombus formation in arterioles and venules and the bis-amidoxime bearing an ethene group exhibited the highest percentage of thrombus inhibition. All other amidoximes

also show some activity and it was noticed that adding a group on the para position may increase the thrombi formation inhibition, the key parameter being the lipophilicity rather than the electronic variations. The amidoximes exhibiting the highest activity in reducing the thrombus formation were also tested for decreasing the blood pressure but their activity was weak (the highest effect was observed for the bis-amidoxime with a blood pressure lowering of only 5%) (Figure 10).

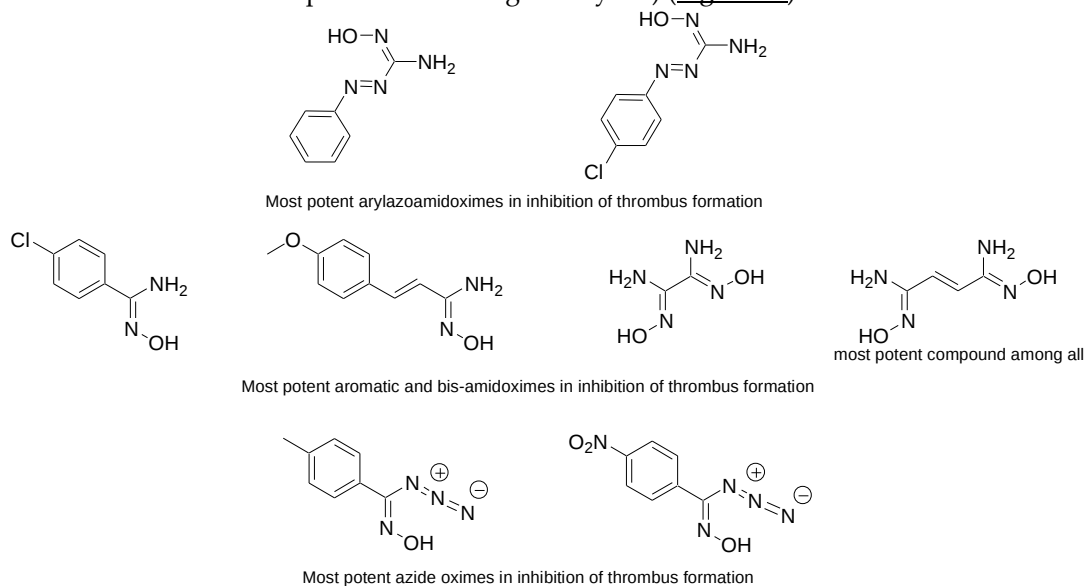


Figure 10. Most potent amidoximes and oximes in the inhibition of thrombus formation according to the studies of Rehse et al.

These studies were not limited to amidoximes but also to azide oximes. These compounds showed better antiplatelet effect than the azide amidoximes and the amidoximes since the majority of the studied azide oximes exhibited a capacity to inhibit platelet aggregation with the oxime bearing the nitrophenyl function having an IC_{50} of 2 $\mu\text{mol/L}$ in the Born test [68]. Similarly to amidoximes, the electronic variance and the lipophilicity had no major role in changing the efficiency of the oximes, however strong electron withdrawing groups like a nitro function seem to increase the oxime activity. All of the oximes showed also 10–20% efficiency in thrombus formation inhibition and two of them exhibited values higher than 20%. Additionally, azide oximes allowed a decrease of the blood pressure that may reach 10–15%. This parameter is not connected to the thrombus formation inhibition since the compound exhibiting the highest antithrombotic activity did not have the highest capacity of blood pressure lowering. Overall, the azide oximes showed to be more effective than the azide amidoximes and other studied amidoximes (Figure 10).

In another study and in order to evaluate the relaxation capacity of amidoximes, Jia et al. used formamidoxime in the presence of a tracheal ring previously contracted by carbachol, a cholinomimetic drug. They observed a relaxation effect on the tracheal ring after the incubation along with an accumulation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) level after incubation with the tracheal smooth muscle cells [69]. The relation between the production of cGMP and the relaxation of the ring was proved by using a cGMP inhibitor on both the tracheal rings and the smooth muscle cells. This inhibitor prevented the relaxation of the rings and the formation of the cGMP in both cultures. After the detection of NO in the incubation media of the tracheal smooth muscle cells with formamidoxime, the authors proposed that after the amidoxime oxidation, the released NO activates the formation of the cGMP which induces the relaxation of the tracheal ring. As previously, a NOS inhibitor was used with the cultured cells and the tracheal rings but it did not inhibit the production of cGMP or the relaxation of the rings. On

the contrary, the cGMP production and the ring relaxation were both inhibited after the use of a CYP450 inhibitor, 7-ethoxyresorufin. Similarly, the cGMP production was inhibited after the use of Miconazole on the cell cultures. These results provided evidence that the pathway of the amidoxime oxidation in the tracheal smooth muscle cells and tracheal ring is through CYP450 and not NOS, and more specifically by CYP4501A₁ being a strong substrate of the 7-ethoxyresorufin.

This study using formamidoxime got a lot of attention and other researches were conducted to see if this compound, along with other amidoximes and oximes, exhibited the same effects in the rat aorta. Vetrovsky et al. tested a series of amidoximes and one oxime in the presence of endothelium-denuded rat aorta (Figure 11) [70]. All of the compounds caused an endothelium-independent relaxation higher than the NOHA with 4-chlorobenzamidoxime being the most active. It should also be noted that formamidoxime (Table 6, entry 1, in vitro studies) caused an important rat aorta relaxation close to that of the 4-chlorobenzamidoxime. The authors demonstrate that the presence of electron donating or withdrawing groups has a limited influence on the aorta relaxation since benzamidoxime, 4-methoxybenzamidoxime, and 4-*n*-(hexyloxy)benzamidoxime were slightly less potent than 4-chlorobenzamidoxime and 4-nitrobenzamidoxime. Additionally, the lipophilicity increase in 4-*n*-(hexyloxy)benzamidoxime compared to 4-methoxybenzamidoxime did not play a key role on the relaxation effect. Finally, the use of an oxime instead of an amidoxime function caused a decrease in the relaxation capacity.

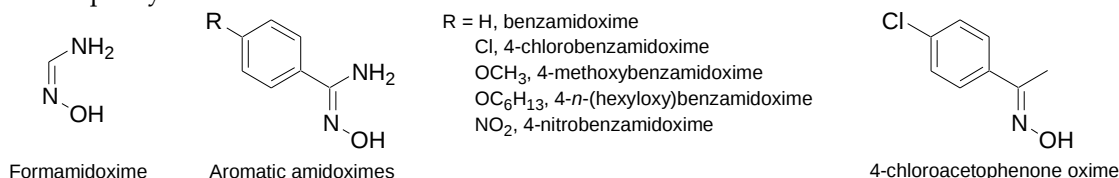


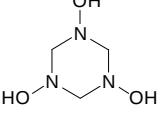
Figure 11. Some of the studied amidoximes and oximes for their activity in rat aorta relaxation.

Using the same tests but focusing on oximes like acetaldoxime, acetoxime and formaldoxime (Table 6, entries 2–4, in vitro studies), it was shown that all of these oximes are more potent to induce relaxation in rat aorta than hydroxyguanidine, formaldoxime being the most potent [71]. Similar to amidoximes, the lipophilicity increase from acetaldoxime to acetoxime does not significantly affect the induced relaxation. For the previously studied amidoximes and oximes, cGMP and NO were involved in the aorta relaxation since the addition of the guanylate cyclase inhibitor and NO-scavengers completely inhibited the relaxation. The use of NOS inhibitors and CYP450 inhibitors like proadifen did not alter the relaxation effect, indicating that other oxidation pathways are involved with these amidoximes and oximes. However, the use of the 7-ethoxyresorufin inhibited the relaxation of the aorta rings in the presence of 4-chlorobenzamidoxime and oximes but the authors suggested that this is not due to an inhibition of the CYP4501A₁ but to an inhibition of a different NADPH-dependent reductase pathway. In a following study [6], the aliphatic oximes and formamidoxime (Table 6) were tested in vivo to evaluate the blood pressure decrease in conscious chronically cannulated rats in which the endogenous NO synthesis was blocked. In the precedent in vitro studies, the three tested oximes and the formamidoxime caused an aorta relaxation, contrariwise, in vivo only formamidoxime and formaldoxime were capable of lowering the blood pressure, with the amidoxime being the most active. This result was different from the in vitro experiments where the formaldoxime was the most potent. The inhibition of the guanylate cyclase in vivo caused the inhibition of the blood pressure reduction when using formaldoxime, which indicates that NO is responsible for the whole effect while with formamidoxime NO is responsible for one third of the effect, suggesting that with the amidoxime not the whole blood pressure decrease is caused by the NO release. Finally, hydrophilic substances were found to be more active in vivo than in vitro.

More recently, other studies evaluated the potency of some oximes to induce a vasorelaxation in superior mesenteric arteries isolated from rats. It was demonstrated that E-cinnamaldehyde oxime was the most potent and able of causing a NOS and endothelium-independent vasorelaxation. The NO release

and relaxation activity of this compound were only partially inhibited by 7-ethoxyresorufin, a CYP450A₁ specific inhibitor, but not by other CYP450 nonspecific inhibitor, which shows also that the oxime oxidation is catalysed by a NADPH-dependent reductase pathway in the superior mesenteric arteries just like the studies in rat aortic rings. The relaxation pathway is also caused by the activation of cGMP with a key role played by a type of K⁺ channel and the reduction of the Ca²⁺ influx [72]. The role of the K⁺ channels was demonstrated in another study published in 2014 after the incubation of an oxime with rat aortic rings in the presence of different channel blockers [73]. The relaxation was observed when the enzyme and the aortic rings were incubated without the channel blockers. Furthermore, when administered to conscious rats, the oxime caused the reduction of blood pressure. The aorta and superior mesenteric artery rings relaxations were similar in the presence and in the absence of the endothelium after the incubation with the oxime, indicating that NOS were not responsible of the oxidation. The relaxation, as for the previously studied compounds, is achieved by the release of NO and the activation of the cGMP pathway alongside the activation of the K⁺ channels.

Table 6. Comparison of some studied amidoximes and oximes for their aorta relaxation and pressure decrease abilities.

Molecule	<i>In vitro</i> rat aorta relaxation	<i>In vivo</i> blood pressure decrease
 Formamidoxime	+++	+++
 Acetaldoxime	++	×
 Acetoxime	++	×
 Formaldoxime	++++	++

++++ highly active; +++ active; ++ weakly active; × inactive.

In addition, amidoximes can also be used for their capacity of lowering the intraocular pressure (IOP) in rabbits due to the NO release followed by the formation of cGMP [74,75]. In 2006, Oresmaa et al. tested various imidazole amidoximes for their IOP-lowering abilities. Two of them (Figure 12) were able to produce NO and increase the cGMP formation when incubated with porcine iris-ciliary bodies but only the methyl form was able to reduce the IOP when administered intravitreally in rabbits. The esterification of the active amidoximes caused the loss of their biological activity.

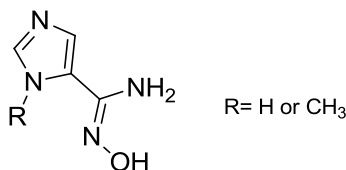


Figure 12. Imidazole amidoximes able to increase cGMP formation.

All of these studies demonstrate that when amidoximes or oximes are incubated with cultured cells such as tracheal smooth muscle cells [69] or with biological tissues such as aortic/tracheal rings [69,70], the generation of NO followed by the relaxation of the tissues is observed. This relaxation was proved to

be caused by an increase in the cGMP accumulation after the activation of the guanylate cyclase by the released NO. Moreover, even in biological tissues, the NOS pathway does not seem to play a role in the oxidation of these products [69–71]. However, in some biological tissues like aortic rings and superior mesenteric arteries, CYP450 did not seem to play a role in the oxidation but it was suggested to be another NADPH-dependent reductase pathway [70–72]. Independently from the enzyme involved in the oxidation of amidoximes and oximes, it is now well established that the related NO release causes an activation of the guanylate cyclase with an accumulation of cGMP. This is followed by an activation of the BK_{Ca} channels which causes an efflux of the potassium ions and thus a decrease in the calcium channels activity [72,73]. This pathway causes a relaxation in the targeted tissue along the detected effects such as blood pressure decrease.

5. Conclusions

Amidoximes and oximes are compounds that are easy to synthesize and that present many benefits especially in biological pathways. In this review, we focused on their NO donor abilities. Many oximes and amidoximes can be oxidized by the CYP450 route rather than the NOS pathway which is of high interest when the patient's NOS is not functional. Additionally, these compounds showed in vitro and in vivo abilities to cause the relaxation of aortas, to inhibit platelet aggregation and to decrease the hypertension. For all these reasons, amidoximes and oximes are of high potential for future use against many cardiovascular diseases.

Author Contributions: writing—original draft preparation, T.S.; writing—review and editing, A.A; writing—review and editing, R.S.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bolotin, D. S.; Bokach, N. A.; Kukushkin, V. Y. Coordination Chemistry and Metal-Involving Reactions of Amidoximes: Relevance to the Chemistry of Oximes and Oxime Ligands. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *313*, 62–93.
2. Tamada, M.; Seko, N.; Yoshii, F. Application of Radiation-Graft Material for Metal Adsorbent and Crosslinked Natural Polymer for Healthcare Product. *Radiat. Phys. Chem.* **2004**, *71*, 221–225.
3. Seko, N.; Tamada, M.; Yoshii, F. Current Status of Adsorbent for Metal Ions with Radiation Grafting and Crosslinking Techniques. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **2005**, *236*, 21–29.
4. Vadon-Le Goff, S.; Boucher, J.-L.; Mansuy, D. Oxidation of Arylamidoximes by Various Chemical and Biomimetic Systems: Comparison with Their Oxidations by Hemeproteins. *Comptes Rendus Acad. Sci. - Ser. IIC - Chem.* **2000**, *3*, 785–792.
5. Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their C=N(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17179–17191.
6. Jaroš, F.; Straka, T.; Dobešová, Z.; Pintérová, M.; Chalupský, K.; Kuneš, J.; Entlicher, G.; Zicha, J. Vasorelaxant Activity of Some Oxime Derivatives. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *575*, 122–126.
7. Fylaktakidou, K.C.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Litinas, K.E.; Varella, E.A.; Nicolaides, D.N. Recent Developments in the Chemistry and in the Biological Applications of Amidoximes. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 1001–1047.
8. Mansuy, D.; Boucher, J.-L.; Clement, B. On the Mechanism of Nitric Oxide Formation upon Oxidative Cleavage of C=N(OH) Bonds by NO-Synthases and Cytochromes P450. *Biochimie* **1995**, *77*, 661–667.
9. Logan, R.T.; Redpath J.; Roy, R.G. Indene and Naphthalene Derivatives. E.P. 0,199,393, 29 October 1986.
10. Huang, C.-T. ; Pelosi, S.S. Jr.; Bayless, A.V. N-Hydroxy-5-Phenyl-2-Furancarboximidamides Useful as Cardiotonic Agents. U.S. Patent 4,882,354, 21 November 1989.

11. Shahid, M.; Martorana, M. G.; Cottney, J. E.; Marshall, R. J. Pharmacological and Biochemical Effects of the Cardiotonic Agent Org10325 in Isolated Cardiac and Vascular Tissue Preparations. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *100*, 735–742.
12. Desmukh, S.S.; Huddar, S.N.; Bhalerao, D.S.; Akamanchi, K.G. Oxidation of Amidoximes with IBX and IBX/TEAB. *Arkivoc* **2010**, *ii*, 118–126.
13. Hall, J. E.; Kerrigan, J. E.; Ramachandran, K.; Bender, B. C.; Stanko, J. P.; Jones, S. K.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R. Anti-Pneumocystis Activities of Aromatic Diamidoxime Prodrugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 666–674.
14. Clement, B.; Bürenheide, A.; Rieckert, W.; Schwarz, J. Diacetyldiamidoximeester of Pentamidine, a Prodrug for Treatment of Protozoal Diseases: Synthesis, in Vitro and in Vivo Biotransformation. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1260–1267.
15. Tavakol, H.; Arshadi, S. Theoretical Investigation of Tautomerism in N-Hydroxy Amidines. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 807–816.
16. Novikov, A. S.; Bolotin, D. S. Tautomerism of Amidoximes and Other Oxime Species. *J. Phys. Org. Chem.* **2018**, *31*, e3772.
17. Bell, C. L.; Nambury, C. N. V.; Bauer, L. The Structure of Amidoximes. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2873–2877.
18. Głębocka, A.; Raczynska, E. D.; Chylewska, A.; Makowski, M. Experimental (FT-IR) and Theoretical (DFT) Studies on Prototropy and H-Bond Formation for Pyrazine-2-Amidoxime: FT-IR and DFT Studies on Pyrazine-2-Amidoxime. *J. Phys. Org. Chem.* **2016**, *29*, 326–335.
19. Blatt, A. H. The Tautomerism of Oximes. *J. Org. Chem.* **1938**, *03*, 91–98.
20. Bohle, D. S.; Chua, Z.; Perepichka, I.; Rosadiuk, K. E/Z Oxime Isomerism in PhC(NOHCN). *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 4223–4229.
21. Vijfhuizen, P. C.; Terlouw, J. K. On the Loss of CH₃[·] from O-Methylbenzaloxime. Evidence for an Ortho Assisted Oxime→nitron Isomerization. *Org. Mass Spectrom.* **1977**, *12*, 63–64.
22. Long, J. A.; Harris, N. J.; Lammertsma, K. Formaldehyde Oxime ⇌ Nitrosomethane Tautomerism. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6762–6767.
23. Roca-López, D.; Darù, A.; Tejero, T.; Merino, P. Revisiting Oxime–Nitron Tautomerism. Evidence of Nitron Tautomer Participation in Oxime Nucleophilic Addition Reactions. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 22161–22173.
24. Dignam, K. J.; Hegarty, A. F. Reactivity of 1,3-Dipoles in Aqueous Solution. Part 4.1 Kinetics and Mechanism of Isomerisation of Amidoximes in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1979**, 1437–1443.
25. Belmar, J.; Quezada, J.; Jiménez, C. A.; Díaz-Gallifa, P.; Pasán, J.; Ruiz-Pérez, C. Synthesis, Crystal Structures and Tautomerism in Novel Oximes Based on Hydroxyalkylpyrazolones. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 2002–2010.
26. Noguchi, M.; Okada, H.; Tanaka, M.; Matsumoto, S.; Kakehi, A.; Yamamoto, H. Mechanistic Considerations on the Oxime–Nitron Isomerization and Intramolecular Cycloaddition Reaction of 3-(Alk-2-Enylamino)Propionaldehyde Oximes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 917–925.
27. Heaney, F.; Bourke, S.; Cunningham, D.; McArdle, P. Steric Control of Reactivity: Formation of Oximes, Benzodiazepinone N-Oxides and Isoxazoloquinolinones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 547–559.
28. Gotoh, M.; Mizui, T.; Sun, B.; Hirayama, K.; Noguchi, M. Intramolecular 1,3-Dipolar Cycloaddition at the Periphery of Heterocyclic Systems. Part 1. Facile Oxime–Nitron Isomerisation at the Periphery of Pyran and 1-Benzopyran. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1995**, 1857–1862.
29. Lossen, W.; Schifferdecker, P. Isuretine, a Base Isomeric with Urea. *Ann Chem Pharm* **1973**, *dxvi*, 295–320.
30. Nicolaides, D.N.; Varella, E.A. The Chemistry of Amidoximes. In *The Chemistry of acid derivatives*; Patai, S., Ed.; *The Chemistry of functional groups*; Wiley: Chichester ; New York, **1992**; Vol. 2, 875–927.
31. Tiemann, T. Effect of Hydroxylamine on Nitriles. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 126–129.
32. Kosary, J.; Kasztreiner, E.; Andrási, F. Synthesis of Pyridylthiazoles as Antisecretory Agents. *Pharm.* **1989**, *44*, 191–193.
33. Warburton, W. K. The Reaction of Benzoyldicyandiamide [PhCO-NH-C(NH₂):N-CN] with Hydroxylamine Hydrochloride to Give Oxadiazoles. *J. Chem. Soc. C* **1966**, 1522–1524.
34. Bjorklund, M. D.; Coburn, M. D. 3,3-Dinitrobutyl-1,2,4-Oxadiazoles (1). *J. Heterocycl. Chem.* **1980**, *17*, 819–821.

35. Cashman, J. R.; Kalisiak, J. Blood Brain Barrier-Penetrating Oximes for Cholinesterases Reactivation. U.S. Patent 9,751,831, 5 September 2017.
36. Yahya, A. M. Synthesis of Some Heterocyclic Compounds from Amidoxime and Imidate. *Raf. J. Sci.* **2008**, *19*, 59–68.
37. Ovdichuk, O.; Hordiyenko, O.; Medviediev, V.; Shishkin, O.; Arrault, A. Efficient Synthesis of Nicotinic Acid Based Pseudopeptides Bearing an Amidoxime Function. *Synthesis* **2015**, *47*, 2285–2293.
38. Sahyoun, T.; Gaucher, C.; Zhou, Y.; Ouaini, N.; Schneider, R.; Arrault, A. Synthesis of Novel Mono and Bis Nitric Oxide Donors with High Cytocompatibility and Release Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3329.
39. Lee, W.M. Copper cmp Polishing Pad Cleaning Composition Comprising of Amidoxime Compounds. U.S. Patent 0,137,191, 28 May 2009.
40. Ranjbar-Karimi, R.; Davodian, T.; Mehrabi, H. Survey Reactivity of Some Substituted Quinazolinones with Pentafluoro(Chloro)Pyridine. *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55*, 475–480.
41. Katritzky, A. R.; Khashab, N. M.; Kirichenko, N.; Singh, A. Microwave-Assisted Preparations of Amidrazones and Amidoximes. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9051–9056.
42. Ovdichuk, O. V.; Hordiyenko, O. V.; Arrault, A. Synthesis and Conformational Study of Novel Pyrazine-Based Pseudopeptides Bearing Amidoxime, Amidoxime Ester and 1,2,4-Oxadiazole Units. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 3427–3435.
43. Ovdichuk, O.; Hordiyenko, O.; Fotou, E.; Gaucher, C.; Arrault, A.; Averlant-Petit, M.-C. Conformational Studies of New Pseudotripeptide with Pyrazine Amidoxime Motif and Simplified Analogs Using IR, NMR Spectroscopy, and Molecular Dynamic Simulations. *Struct. Chem.* **2016**, *28*, 813–822.
44. Lossen, W. Structural Formulae of Hydroxylamine and Its Derivatives. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1889**, *252*, 170–240.
45. Wieland, H.; Bauer, H. Benzenylnitrosolic Acid. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 1480–1488.
46. Tyrkov, A. G.; Usova, A. N. Reduction of Substituted 5-(Nitromethyl)-3-Phenyl-1,2,4-Oxadiazoles. *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40*, 286–287.
47. Bakó, E. M.; Horváth, K.; Pálosi, E.; Korbonits, D. Formation of α -(Acylamino)Butyramide Oximes from 5-Substituted 3-(1-Aminopropyl)-1,2,4-Oxadiazoles: An Astonishing Hydrolytic Transformation. *Chem. Ber.* **1988**, *121*, 723–726.
48. Fujii, T.; Saito, T.; Kumazawa, Y. Purines. XL. Preparation of 9-(ω -Carboxyalkyl)-3-Methyladenines. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1990**, *38*, 1392–1395.
49. Kuruba, B. K.; Vasanthkumar, S. An Efficient Protocol for the Synthesis of Six-Membered N, O-Heterocycles via a 1,3-Dipolar (3+3) Cycloaddition between Nitrile Oxide and α -Diazo Esters. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 3860–3865.
50. Kool, E. T.; Crisalli, P.; Chan, K. M. Fast Alpha Nucleophiles: Structures That Undergo Rapid Hydrazone/Oxime Formation at Neutral pH. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1454–1457.
51. Hajipour, A. R.; Mallakpour, S. E.; Imanzadeh, G. A Rapid and Convenient Synthesis of Oximes in Dry Media under Microwave Irradiation. *J. Chem. Res.* **1999**, 228–229.
52. Sharghi, H.; Hosseini, M. Solvent-Free and One-Step Beckmann Rearrangement of Ketones and Aldehydes by Zinc Oxide. *Synthesis* **2002**, 1057–1060.
53. Li, J.-T.; Li, X.-L.; Li, T.-S. Synthesis of Oximes under Ultrasound Irradiation. *Ultrasound. Sonochem.* **2006**, *13*, 200–202.
54. Patil, V. V.; Gayakwad, E. M.; Shankarling, G. S. m-CPBA Mediated Metal Free, Rapid Oxidation of Aliphatic Amines to Oximes. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 781–786.
55. Anggard, E. Nitric Oxide: Mediator, Murderer, and Medicine. *Lancet* **1994**, *343*, 1199–1206.
56. Knowles, R.G.; Moncada, S. Nitric Oxide as a Signal in Blood Vessels. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 399–402.
57. Koikov, L. N.; Alexeeva, N. V.; Lisitza, E. A.; Krichevsky, E. S.; Grigoryev, N. B.; Danilov, A. V.; Severina, I. S.; Pyatakova, N. V.; Granik, V. G. Oximes, Amidoximes and Hydroxamic Acids as Nitric Oxide Donors. *Mendeleev Commun.* **1998**, *8*, 165–168.
58. Öcal, N.; Erden, I. Oxidative Cleavage of the C=N Bond during Singlet Oxygenations of Amidoximates. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4765–4767.

59. Boucher, J.-L.; Genet, A.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Henry, Y.; Mansuy, D. Cytochrome P450 Catalyzes the Oxidation of N ω -Hydroxy-L- Arginine by NADPH and O₂ to Nitric Oxide and Citrulline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 880–886.
60. Andronik-Lion, V.; Boucher, J.-L.; Delaforge, M.; Henry, Y.; Mansuy, D. Formation of Nitric Oxide by Cytochrome P450-Catalyzed Oxidation of Aromatic Amidoximes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *185*, 452–458.
61. Mäntylä, A.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Juvonen, R.; Kendrick, H.; Garnier, T.; Croft, S. L.; Järvinen, T. Synthesis and Antileishmanial Activity of Novel Buparvaquone Oxime Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3497–3502.
62. Mäntylä, A.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Keski-Rahkonen, P.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T. Design, Synthesis and in Vitro Evaluation of Novel Water-Soluble Prodrugs of Buparvaquone. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 151–158.
63. Caro, A. A.; Cederbaum, A. I.; Stoyanovsky, D. A. Oxidation of the Ketoxime Acetoxime to Nitric Oxide by Oxygen Radical-Generating Systems. *Nitric Oxide* **2001**, *5*, 413–424.
64. Moali, C.; Brollo, M.; Custot, J.; Sari, M.-A.; Boucher, J.-L.; Stuehr, D. J.; Mansuy, D. Recognition of α -Amino Acids Bearing Various C=NOH Functions by Nitric Oxide Synthase and Arginase Involves Very Different Structural Determinants. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8208–8218.
65. Renodon-Cornière, A.; Dijols, S.; Perollier, C.; Lefevre-Groboillot, D.; Boucher, J.-L.; Attias, R.; Sari, M.-A.; Stuehr, D.; Mansuy, D. N-Aryl N'-Hydroxyguanidines, a New Class of NO-Donors after Selective Oxidation by Nitric Oxide Synthases: Structure–activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 944–954.
66. Rehse, K.; Bade, S.; Harsdorf, A.; Clement, B. New NO-Donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 17. Arylazoamidoximes and 3-Arylazo-1,2,4-Oxadiazol-5-Ones. *Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem.* **1997**, *330*, 392–398.
67. Rehse, K.; Brehme, F. New NO Donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 26 Amidoximes and Their Prodrugs. *Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem.* **1998**, *331*, 375–379.
68. Rehse, K.; Brehme, F. New NO Donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 27 Azide Oximes and 1-Hydroxytetrazoles. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2000**, *333*, 157–161.
69. Jia, Y.; Zacour, M.; Tolloczko, B.; Martin, J. G. Nitric Oxide Synthesis by Tracheal Smooth Muscle Cells by a Nitric Oxide Synthase-Independent Pathway. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, L895–L901.
70. Vetrovsky, P.; Boucher, J.-L.; Schott, C.; Beranova, P.; Chalupsky, K.; Callizot, N.; Muller, B.; Entlicher, G.; Mansuy, D.; Stoclet, J.-C. Involvement of NO in the Endothelium-Independent Relaxing Effects of N ω -Hydroxy-L-Arginine and Other Compounds Bearing a C=NOH Function in the Rat Aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 823–830.
71. Chalupsky, K.; Lobysheva, I.; Nepveu, F.; Gadea, I.; Beranova, P.; Entlicher, G.; Stoclet, J.-C.; Muller, B. Relaxant Effect of Oxime Derivatives in Isolated Rat Aorta: Role of Nitric Oxide (NO) Formation in Smooth Muscle. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1203–1214.
72. Veras, R. C.; Rodrigues, K. G.; Alustau, M. do C.; Araújo, I. G. A.; de Barros, A. L. B.; Alves, R. J.; Nakao, L. S.; Braga, V. A.; Silva, D. F.; de Medeiros, I. A. Participation of Nitric Oxide Pathway in the Relaxation Response Induced by E-Cinnamaldehyde Oxime in Superior Mesenteric Artery Isolated from Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2013**, *62*, 58–66.
73. Dantas, B.P.V.; Ribeiro, T.P.; Assis, V.L.; Furtado, F.F.; Assis, K.S.; Alves, J.S.; Silva, T.M.S.; Camara, C.A.; França-Silva, M.S.; Veras, R.C.; et al. Vasorelaxation Induced by a New Naphthoquinone-Oxime Is Mediated by NO-SGC-CGMP Pathway. *Molecules* **2014**, *19*, 9773–9785.
74. Oresmaa, L.; Kotikoski, H.; Haukka, M.; Oksala, O.; Pohjala, E.; Vapaatalo, H.; Moilanen, E.; Vainiotalo, P.; Aulaskari, P. Synthesis, Ocular Effects, and Nitric Oxide Donation of Imidazole Amidoximes. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1073–1079.

75. Oresmaa, L.; Kotikoski, H.; Haukka, M.; Oksala, O.; Pohjala, E.; Vapaatalo, H.; Vainiotalo, P.; Aulaskari, P. Synthesis and Ocular Effects of Imidazole Nitrolic Acid and Amidoxime Esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2144–2147.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Partie II

Résultats et discussions

Objectifs

Ce travail de thèse vise à concevoir et à développer de nouvelles molécules doubles donneuses de NO dans l'intention de les évaluer pour une utilisation potentielle dans le traitement contre les maladies cardiovasculaires.

Dans un premier temps, la synthèse des doubles donneurs hybrides de NO a été envisagée par synthèse de molécules comportant à la fois une fonction *S*-nitrosothiol ainsi qu'une fonction amidoxime. Théoriquement, la présence de ces deux fonctions doit permettre d'assurer la libération de NO en deux temps en considérant la demi-vie des *S*-nitrosothiols *in vivo* qui est comprise entre 7 et 60 minutes^{1,2} permettant une libération rapide, et celle des amidoximes qui est d'environ 10 heures, permettant une libération prolongée.³

Les recherches se sont alors dirigées vers la synthèse d'un autre type de donneurs et se base sur la présence de groupements amidoximes uniquement. Différents modèles de molécules ont été ciblés :

- Mono-donneuses de NO possédant **une fonction amidoxime aliphatique ou aromatique** ; après avoir mis au point une méthode de synthèse efficace et rapide de ces deux types de fonctions amidoxime, l'évaluation de leur capacité à libérer NO, la cinétique et le taux de libération servira de base pour l'étude des molécules plus complexes.
- double donneuses possédant **une fonction amidoxime aromatique et une fonction amidoxime aliphatique** ; l'innovation apportée à ce type de molécules réside dans la combinaison de deux types de groupements fonctionnels identiques, permettant éventuellement une libération prolongée, en deux temps, de NO. De plus, la synthèse et, de ce fait, la bipotentialité de ces molécules n'ont jamais été décrites dans la littérature.
- double donneuses possédant **deux fonctions amidoxime aromatiques** sur deux cycles différents ; il est intéressant d'envisager la comparaison de la capacité de libération de NO de ce nouveau type de molécules avec les bis-amidoximes aromatique(s) / aliphatique(s) afin d'optimiser et obtenir un modèle de molécules donneuses de NO plus efficaces. Ce type de molécules n'a auparavant jamais été testé pour sa capacité à libérer du NO.

Partie II : Résultats et discussions

- multi donneuses possédant **deux fonctions amidoxime ou plus** sur le même cycle ou sur différents cycles ; ces composés donneurs sont synthétisés dans l'objectif de tester, cette fois, la capacité de libération maximale des amidoximes et de les comparer avec les composés mono et double donneurs. Actuellement, ce type d'amidoximes n'est pas décrit dans la littérature.

Par la suite, une fois les différentes molécules décrites ci-dessus synthétisées, l'objectif était d'étudier leurs propriétés grâce à certains tests biologiques. Les essais réalisés ont permis de quantifier la capacité des différentes molécules à réellement libérer du NO lorsqu'elles sont en contact avec des extraits de foie de rats ou des cellules humaines. Pour cela, quatre types de tests biologiques ont été réalisés afin d'évaluer et mesurer le pouvoir donneur des produits synthétisés (Figure II.1).

- Etude de la solubilité des molécules dans le tampon phosphate salin (PBS) ; chaque molécule doit impérativement être soluble dans le tampon PBS ou dans une solution de concentration maximale de 0,1% de DMSO dans ce même tampon qui est utilisé dans toutes les étapes suivantes. Ce premier test sélectionnera ainsi les molécules capables d'être analysées ultérieurement.
- Etude de la libération de NO sur les microsomes de rats (extraits de foie) ; les microsomes contenant des cytochromes P450 seront capables, selon la structure de la molécule, de l'oxyder en libérant le NO. Ce test permet d'avoir une première indication sur la capacité des fonctions synthétisées à être oxydées.
- Etude de la cytocompatibilité ; ce test important permet de s'assurer que les molécules étudiées sont compatibles avec les cellules humaines. Une fois que les molécules seront révélées être non toxiques, elles pourront être mises en contact avec les cellules humaines pour les tests.
- L'étude de la libération de NO sur les cellules humaines ; ce dernier test très ciblé permet de voir si ces dernières sont aussi capables d'oxyder les fonctions amidoximes. En effet, il est nécessaire et important de sélectionner les molécules qui pourront être engagées pour des études plus poussées afin de prouver ou non leur effet donneur de NO sur les humains.

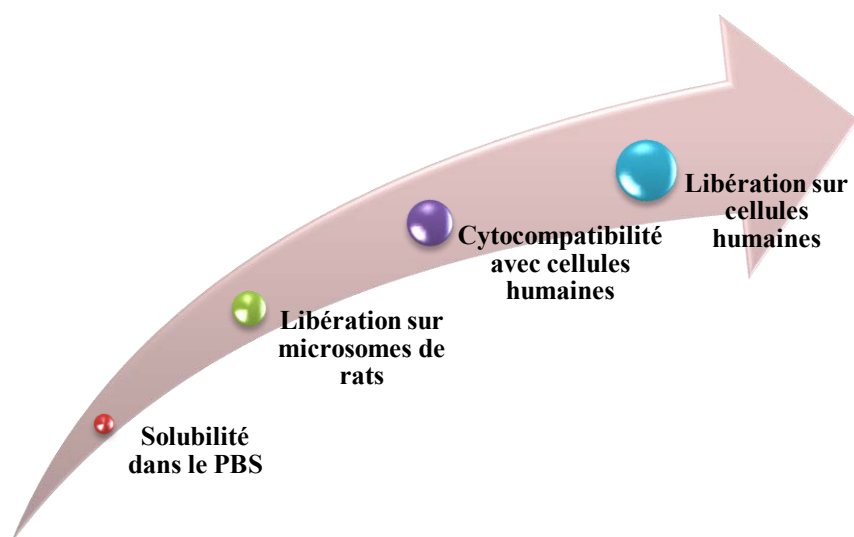


Figure II. 1. Etapes d'étude biologique des produits synthétisés

Chapitre I

Synthèse des doubles donneurs hybrides : S-nitrosothiols et amidoximes

Introduction du chapitre

Ce chapitre présente les différents essais de synthèse de molécules hybrides double donneuses de NO, porteuses conjointement d'une fonction *S*-nitrosothiol et d'une fonction amidoxime. Ces molécules offriraient la potentialité d'une libération en deux temps de NO *via* une cinétique dépendante du groupement fonctionnel donneur : elles seraient capables de libérer NO de façon prolongée en s'appuyant sur la bipotentialité apportée par les deux fonctions, libérant NO selon deux mécanismes enzymatiques distincts :

- amidoxime libérant NO par coupure oxydante catalysée ou non par les cytochromes P450 (CYP)^{4,5}
- *S*-nitrosothiol (RSNO) libérant NO spontanément ou par catalyse enzymatique *via* des rédoxines.^{6,7}

Ce travail nécessite d'obtenir, sur la même molécule, une fonction thiol libre, à nitroser ultérieurement, ainsi qu'une fonction amidoxime, tout en s'affranchissant de l'oxydation spontanée et parfois inévitable des thiols durant les étapes de synthèse. Dans la littérature, ce type de molécule n'est pas décrit mais des travaux, menés précédemment au LCPM, avaient pour but de générer également des doubles donneurs hybrides qui résultent du couplage d'une cystéine avec une amidoxime (Figure II.2). La première étape de ce travail était la protection de la fonction thiol de la cystéine par un groupement trityle afin d'éviter son oxydation lors des étapes suivantes de couplage, cyclisation et synthèse de l'amidoxime. Une fois l'amidoxime synthétisée, la fonction thiol est déprotégée à l'aide du triéthylsilane et d'acide trifluoroacétique. Par contre, dû aux difficultés de déprotection et de purification des thiols durant la dernière étape, la nitrosation n'avait pas pu être réalisée.⁸ Suite à ces résultats, il a semblé nécessaire, dans la suite de ce travail, d'empêcher l'oxydation des thiols en s'affranchissant des étapes de protection et de déprotection des fonctions thiol.

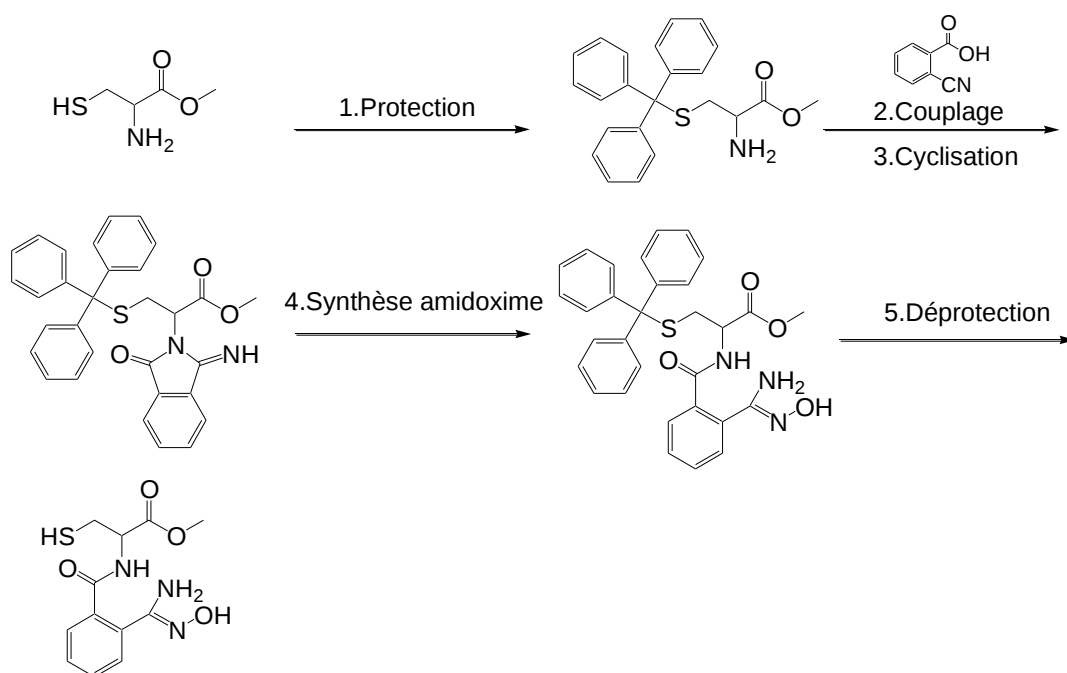


Figure II. 2. Travaux précédents au LCPM des étapes de synthèse d'un double donneur hybride de NO par protection et déprotection du thiol

En effet, les composés *S*-nitrosothiols visés dans ce travail de thèse sont différents de ceux détaillés dans la littérature : ce ne sont ni des protéines ni des analogues de la cystéine mais des petites molécules organiques aromatiques (portant également la fonction amidoxime).

Ce chapitre présente les différentes étapes des deux stratégies qui ont été envisagées pour la synthèse de ces molécules hybrides ainsi que les difficultés survenues au cours de ces travaux. Une étude bibliographique préliminaire concernant l'obtention des fonctions thiol semble indispensable en guise de préambule afin de présenter clairement les stratégies de synthèse qui ont été ultérieurement choisies dans ce chapitre.

1. Méthodes de synthèse de produits possédant des fonctions thiol

Dans la littérature, plusieurs méthodes existent pour la synthèse de molécules comportant une fonction thiol. Ces méthodes sont différentes si la fonction thiol recherchée est aliphatique ou aromatique. L'objectif initial de ce travail de thèse étant la synthèse de fonctions thiol aliphatiques, il est judicieux de concentrer l'étude bibliographique sur ce type de molécules.⁹

Généralement, une fonction thiol aliphatique est obtenue à partir de composés de la famille des alcènes, d'halogénures ou encore d'alcools en présence de réactifs soufrés.

Il est également possible d'obtenir une molécule dotée d'une fonction thiol libre après réaction de couplage avec un acide aminé ayant une fonction thiol (comme la cystéine). Les composés *S*-nitrosothiols exogènes efficaces contre les maladies cardiovasculaires sont justement synthétisés à partir de cystéines.

1.1. Synthèse des thiols aliphatiques par les méthodes classiques

Cette partie permettra de passer en revue diverses méthodes de synthèse de thiols aliphatiques. Les méthodes les plus courantes utilisent généralement des halogénures ou des alcènes comme produit de départ. Néanmoins, même si cela est moins fréquemment décrit, les thiols peuvent être obtenus également à partir d'alcools.⁹

Pour cela, la méthode la plus simple et la plus économique reste l'addition du sulfure d'hydrogène (H₂S) sur l'un de ces trois composés.¹⁰⁻¹² Sa toxicité¹³ non négligeable et la formation en quantité significative d'un produit secondaire de type sulfure lors de la réaction, restreint fortement son utilisation.⁹

D'autres méthodes, plus longues à mettre en œuvre, car nécessitant le passage par un produit intermédiaire, ont été développées et sont actuellement de plus en plus utilisées pour la formation des thiols à partir des halogénoalcane, alcènes ou alcools. Malgré un temps de synthèse plus important, ces méthodes permettent d'atteindre l'objectif avec de meilleurs rendements et de diminuer fortement les risques d'apparition de produits secondaires.

1.1.1. Synthèse des thiols à partir des halogénures

- **Par addition des réactifs à base de thiols :** Le réactif le plus utilisé pour ce type de réactions est l'hydrogénosulfure de sodium (NaSH) qui possède un caractère nucléophile marqué. (Figure II.3)

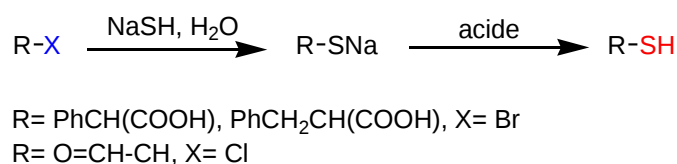


Figure II. 3. Synthèse des thiols à partir des halogénures et de NaSH

Cette synthèse est décrite, dans la majorité des cas, à partir de bromures ou de chlorures et réalisée dans l'eau comme solvant. Cette réaction peut être menée à température ambiante ou précédée par un mélange des réactifs à froid. La présence d'un acide dans la deuxième étape de cette réaction permet la protonation afin de former la fonction thiol. Cette réaction peut être réalisée en moins de 24 heures et les rendements sont acceptables (jusqu'à 68%).¹⁴⁻¹⁶

Une autre manière d'utiliser l'hydrogénosulfure de sodium est de mélanger ce dernier avec une résine échangeuse d'ions pour la synthèse de composés à fonction thiol. Cette méthode a été développée afin de tenter de diminuer la formation de produits secondaires comme le disulfure et le sulfure et donc d'améliorer le rendement. Cette méthode est basée sur l'échange du chlorure présent sur la résine avec la fonction thiolate de NaSH. Cet échange forme un précipité blanc de NaCl qui sera séparé de la nouvelle résine formée portant la fonction thiolate.¹⁷ (Figure II.4)

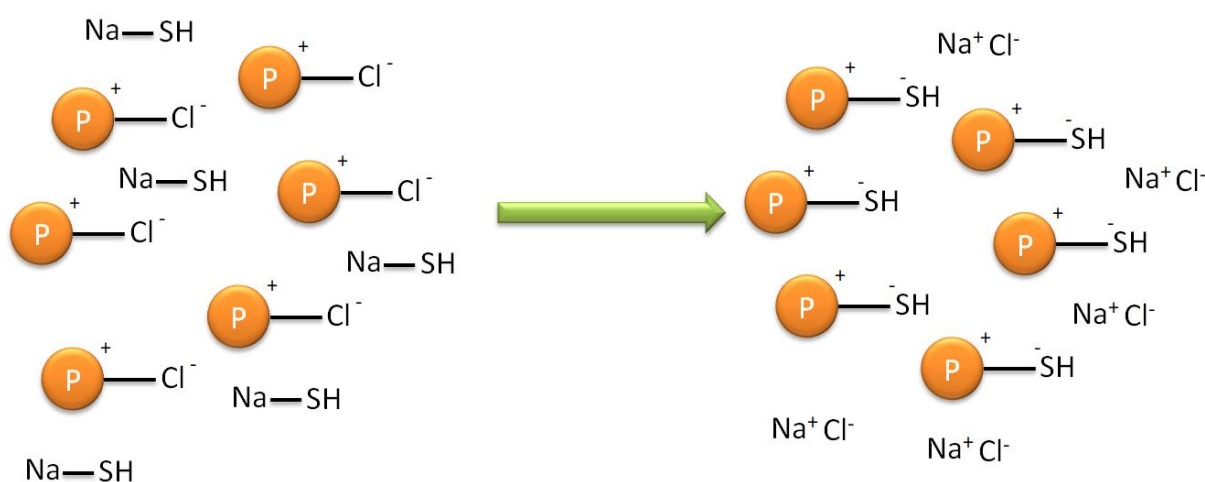


Figure II. 4. Méthode de préparation d'une résine échangeuse de thiol rapporté par Bandgar et al.¹⁷

Une fois cette étape terminée, la résine est mise à réagir avec un halogénure d'alkyle permettant la substitution de l'halogène par la fonction thiol de la résine. (Figure II.5)

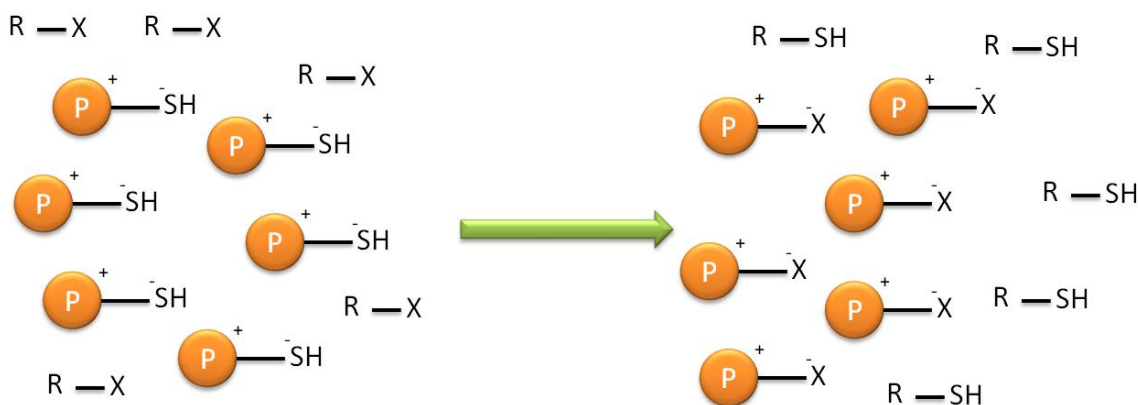


Figure II. 5. Substitution des halogénures à partir de la résine échangeuse de thiol rapporté par Bandgar et al. ¹⁷

Une autre méthode se base sur l'emploi de la même résine échangeuse d'ions directement en présence de NaSH et de la molécule halogénée en s'affranchissant de la préparation préalable de la résine. ¹⁸

- **Substitution par utilisation de la thiourée :** L'utilisation de la thiourée peut également s'avérer une méthode intéressante pour permettre la substitution d'un atome d'halogène par une fonction thiol. La première étape, réalisée dans l'éthanol à reflux avec un temps de réaction allant jusqu'à 6 heures, permet de générer un produit intermédiaire de substitution qui nécessite, lors d'une seconde étape, l'ajout d'une base, le plus couramment NaOH, pour libérer le groupement thiol. Le rendement de cette réaction peut atteindre 60%. ¹⁹⁻²² (Figure II.6)

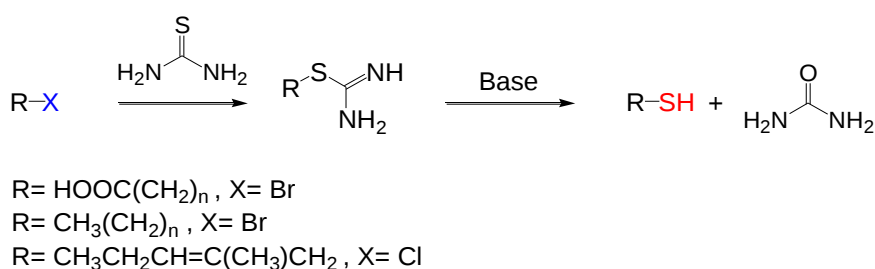


Figure II. 6. Substitution des halogénures par la thiourée

- **Substitution par utilisation des acides thiocarboxyliques R'COSH:** Il est également possible d'effectuer ce type de réaction par utilisation du thioacétate de potassium, réaction couramment décrite dans la littérature. Après ajout de thioacétate sur un dérivé halogéné, l'intermédiaire stable thioester est, dans la majorité des cas, hydrolysé en milieu basique afin d'obtenir le thiol. (Figure II.7) Cette réaction peut se

dérouler dans différents solvants comme le THF, le méthanol, l'acétone ou encore le chloroforme et aussi bien à température ambiante qu'à chaud. Les rendements de la réaction qui peut, malgré les deux étapes, être réalisée en moins de 24 heures sont excellents (formation du thioester, 98% et hydrolyse 96%) .^{23,24}

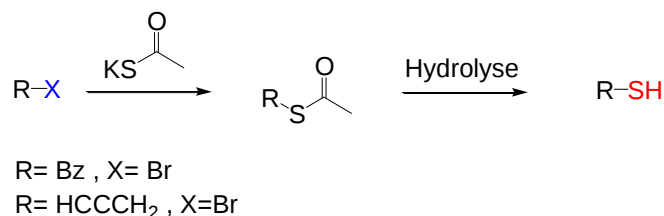


Figure II. 7. Substitution des halogénures en présence du thioacétate de potassium

Pour finir, d'autres dérivés soufrés comme les thiocyanates, les thiosulfates, le sel de Bunte, les di- et trithiocarbonates⁹ peuvent permettre ce type de réaction.

1.1.2. Synthèse des thiols à partir d'alcènes

D'après la littérature récente, la synthèse des thiols à partir d'alcènes aliphatiques se fait principalement en utilisant H₂S. D'autres méthodes sont également décrites, comme par exemple l'utilisation de l'acide thioacétique en se basant sur l'ouvrage de S. Patai, mais, de nos jours, moins utilisées sur les alcènes aliphatiques. Ceci est dû au succès de l'emploi de H₂S qui conduit à de bons rendements avec un temps de réaction court. De ce fait, H₂S est toujours le chef de file de cette synthèse.⁹

1.1.3. Méthodes de synthèse de thiols à partir d'alcools

Dans la littérature, peu de publications décrivent la synthèse d'un thiol à partir de l'alcool correspondant. Comme décrit précédemment pour les alcènes, le réactif le plus utilisé est H₂S, même s'il existe quelques autres méthodes.

Il a été montré que l'utilisation du pentasulfure de diphosphore en présence d'un alcool pouvait générer le thiol correspondant après hydrolyse acide du produit intermédiaire. Ces réactions sont assez efficaces puisque les rendements atteignent parfois plus de 70%, lorsque les disulfures obtenus peuvent être réduits.⁹

Dans le même registre, la triphénylphosphine peut également être utilisée en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) afin de former des halogénures primaires. Ce produit en présence d'une résine à base de thiol (préparée comme dans la partie 1.1.1. de ce chapitre),

peut permettre d'obtenir les composés souhaités en seulement 10 à 30 minutes et à température ambiante avec des rendements allant jusqu'à 94%.²⁵

1.2. Méthodes de couplage avec une cystéine

La cystéine, présente dans certaines structures protéiques du corps humain, est un acide α -aminé naturel comportant une fonction thiol sur sa chaîne latérale. Cette fonction présente l'avantage de pouvoir être nitrosée lorsque la cystéine est seule ou couplée avec d'autres acides aminés, comme par exemple dans le cas du glutathion.²⁶ Néanmoins, l'oxydation des fonctions thiols de la cystéine qui produit des disulfures (formation de cystine) reste parfois difficile à contrôler (Figure II.8). La cystine joue néanmoins un rôle important afin d'assurer la stabilité de certaines protéines.^{27,28}

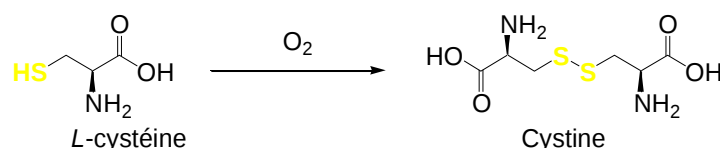


Figure II. 8. Oxydation de la L-cystéine en cystine

Par ailleurs, la cystéine peut être engagée dans une réaction de couplage *via* son extrémité N-terminale avec une fonction acide carboxylique. Deux méthodes d'activation sont principalement décrites afin de laisser la fonction thiol libre :

- **Couplage direct de la cystéine à un chlorure d'acyle :** La réaction entre une amine primaire ou secondaire et un chlorure d'acide permet aisément la préparation des amides *via* la formation d'une liaison peptidique. La méthode la plus ancienne est celle de Schotten-Baumann, réalisée en présence d'ions hydroxyde OH⁻ permettant de neutraliser l'acide formé.^{29,30} D'autres méthodes utilisent des bases telles que la triéthylamine ou la pyridine. Cette méthode présente un avantage majeur : le passage par les chlorures d'acides permet le couplage à la cystéine par sa fonction amine, sans la nécessité de protéger préalablement la fonction thiol. Un exemple de cette réaction est présenté dans la Figure II.9 où le produit est obtenu avec 76% de rendement après chauffage à reflux en présence de soude diluée.³¹

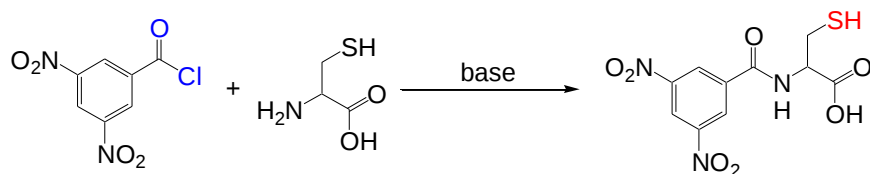


Figure II. 9. Couplage de la cystéine au chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle rapporté par Sharma et al.

- **Couplage de la cystéine à un chlorure d'acyle activé par le benzotriazole :** Une autre méthode, en deux étapes, développée par Katritzky *et al.* permet également ce type de couplage. Après formation puis activation du chlorure d'acide par le benzotriazole, le produit intermédiaire, le *N*-acylbenzotriazole, est mis à réagir avec la cystéine, ce qui permet de former la liaison peptidique et de générer la *N*-acylcystéine. (Figure II.10) Dans ce cas, la réaction s'effectue à température ambiante dans de l'acétonitrile pendant 2 heures avec des rendements entre 51 et 86%.³²

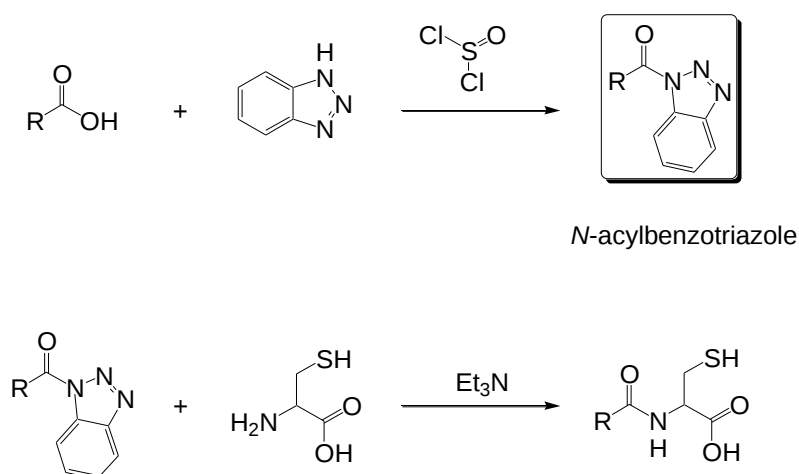


Figure II. 10. Couplage de la cystéine au chlorure d'acyle activé par le benzotriazole rapporté par Katritzky et al.

2. Plan général de synthèse des doubles donneurs hybrides

L'élaboration de ce type de molécules hybrides nécessite de répondre à plusieurs critères :

- la présence d'un groupement nitrile pouvant être transformé en fonction amidoxime,
- la présence d'une fonction thiol libre, non oxydée, pouvant être nitrosée afin de former la fonction RSNO.

La fonction amidoxime sera placée sur le noyau aromatique en position *para* d'un atome d'oxygène portant une chaîne carbonée substituée par une fonction thiol. Ce modèle est basé

sur la littérature : les fonctions amidoximes aromatiques en position *para* d'un groupement inductif attracteur (–I) et mésomère donneur d'électrons (+M) sont parmi les meilleurs donneurs de NO. L'ajout de la chaîne carbonée sert à augmenter la lipophilie de la molécule car l'augmentation de cette dernière facilite le passage passif des molécules à travers les membranes cellulaires.^{33,34}

Pour cela, après examen de la littérature, deux stratégies principales de synthèse ont été retenues pour introduire la fonction thiol libre :

- 1) sur un halogénure d'alkyle, par substitution nucléophile par une fonction thiol ;
- 2) par couplage de la molécule préalablement activée avec une cystéine portant une fonction thiol libre.

La transformation du groupement cyano en amidoxime pourra être envisagée avant ou après l'étape d'insertion du thiol. Ces étapes seront réalisées au LCPM.

Finalement, la nitrosation des fonctions thiol sera réalisée à CITHEFOR (Figure II.11).

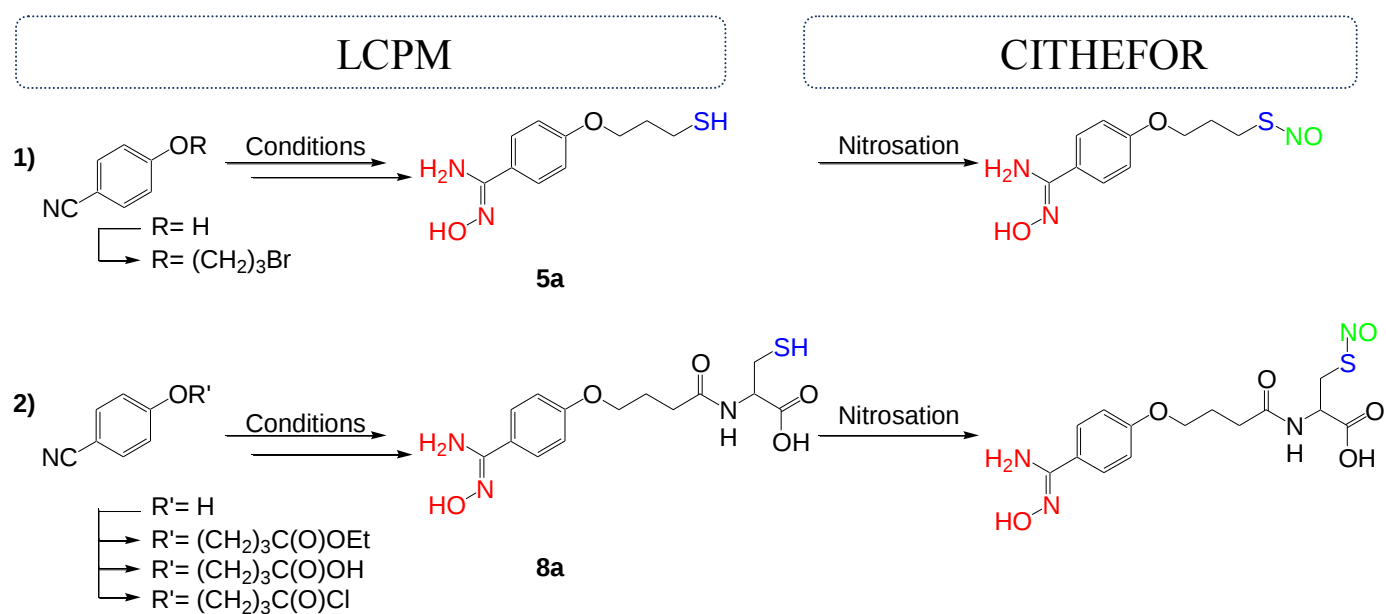
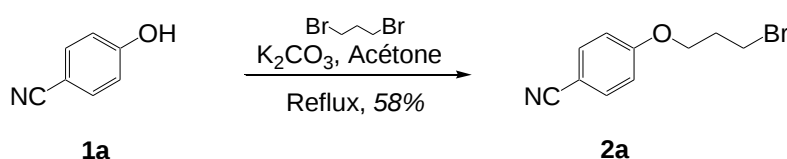


Figure II. 11. Stratégie de synthèse des donneurs hybrides de NO par ajout d'un thiol nitrosé et d'une amidoxime

3. Première stratégie : Substitution d'un halogénure par une fonction thiol

La première molécule cible **5a** porte une fonction amidoxime aromatique et une fonction thiol libre aliphatique, à nitroser lors d'une dernière étape. Pour sa synthèse, il sera nécessaire d'envisager la substitution d'un atome de brome par la fonction thiol et la transformation du nitrile en amidoxime,

3.1. Synthèse du produit intermédiaire **2a** par addition d'une chaîne bromée



*Figure II. 12. Synthèse de la molécule intermédiaire **2a** portant une chaîne bromée*

La réaction d'ancrage de la chaîne lipophile bromée est réalisée sur le 4-hydroxybenzonitrile dans de l'acétone en présence de carbonate de potassium suivie par l'addition du 1,3-dibromopropane porté à reflux. Cette réaction d'*O*-alkylation conduit au produit **2a** avec un rendement de 58% (Figure II.12). Il est néanmoins préférable d'utiliser un large excès de dérivé dibromé (5 équivalents) afin de minimiser l'attaque du phénate sur le produit de monoalkylation.

3.2. Substitution par une fonction thiol

3.2.1. Par utilisation du NaSH et de la thiourée

Afin d'obtenir le double donneur hybride à partir de la molécule **2a**, deux voies de synthèse ont été planifiées.

La première voie de synthèse nécessite la substitution nucléophile de l'atome de brome par la fonction thiol avant la transformation de la fonction nitrile en amidoxime. Les méthodes classiques, à savoir l'utilisation d'hydrogénosulfure de sodium dans de l'eau ou la thiourée dans l'éthanol à reflux, n'ont pas permis de générer le produit **3a** souhaité (Figure II.13).

La seconde voie, nécessitant au préalable la synthèse de l'amidoxime avant d'effectuer la substitution de l'atome de brome par la fonction thiol ne fut également pas fructueuse. En effet, l'amidoxime **4a** a bien été isolée après traitement du composé **2a** avec du chlorhydrate d'hydroxylamine en présence de triéthylamine dans le méthanol à reflux mais, dans le meilleur des cas et malgré de très nombreux essais, avec un rendement extrêmement faible puisque inférieur à 10%. Par conséquent, cette voie de synthèse a été abandonnée (Figure II.13).

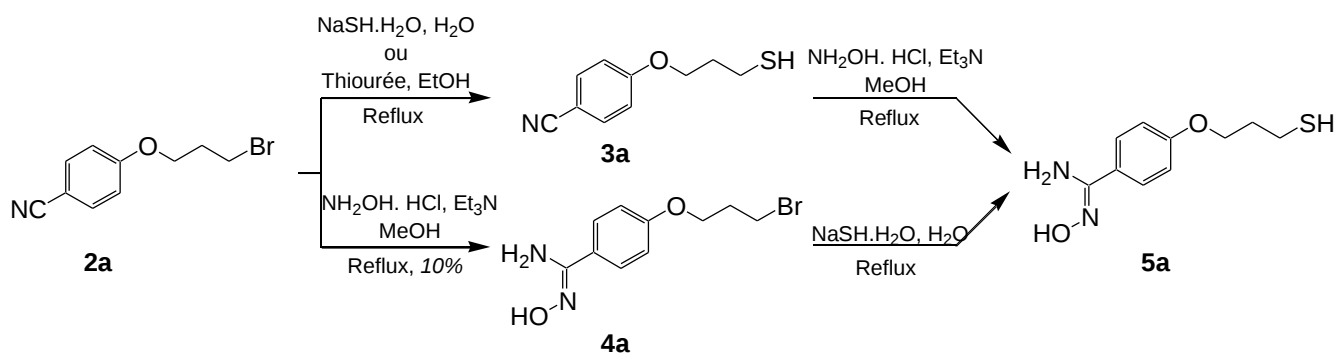


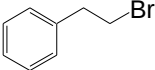
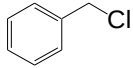
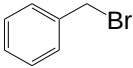
Figure II. 13. Premiers essais de substitution nucléophile des halogénures par des fonctions thiols et synthèse des amidoximes

Il a été donc nécessaire de se focaliser sur la mise au point de l'obtention de la fonction thiol par substitution nucléophile (**2a** $\rightarrow$ **3a**). Tous les essais ont été réalisés avec des molécules à chaînes alkyles, commerciales mais beaucoup moins onéreuses que notre produit de départ **2a**. Les différents essais sont présentés dans le Tableau II.1.

Les différentes méthodes présentées dans la littérature ont été testées afin d'essayer d'obtenir la fonction thiol libre (Tableau II.1). A partir du bromure de benzyle (entrée 9) ou encore du (2-bromoéthyl)benzène, l'hydrogénosulfure de sodium est l'un des premiers réactifs utilisés, dans l'eau ou dans l'éthanol, à -5°C , en présence ou non de chlorhydrate de la triéthylamine (entrées 1, 2 et 3). La réaction est ensuite menée à température ambiante pendant 12 à 24 heures puis 2 à 3 heures chauffée à reflux. NaSH a aussi été mélangé à de l'Amberlite IRA-400, à température ambiante avec ou sans base¹⁸ avant d'être mis en contact avec le (2-bromoéthyl)benzène (entrées 4 et 5) ou avec le chlorure de benzyle (entrée 7). L'Amberlite IRA-400 traitée par NaSH avant son mélange avec le chlorure de benzyle (description paragraphe 1.1.1.) a été également employée (entrée 8).¹⁷ Pour finir, la dernière tentative a été réalisée par ajout de thiourée sur le (2-bromoéthyl)benzène (entrée 6) dans de l'éthanol à reflux puis traitement par une solution de soude, préparée dans de l'éthanol, afin d'obtenir le produit final souhaité. Il est important de noter que toutes ces réactions ont été

menées sous flux d'azote, après plusieurs essais, et après dégazage des solvants afin d'essayer de diminuer le risque d'oxydation des fonctions thiols. (Tableau II.1)

Tableau II. 1. Mise au point d'une méthode de substitution des halogénures par les fonctions thiol

<i>Entrée</i>	<i>Molécule</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Solvant</i>	<i>Température</i>	<i>Thiol + Disulfure</i>
1	 I	NaSH.H ₂ O	H ₂ O	-5°C, reflux	-
2		NaSH.H ₂ O	EtOH	-5°C, reflux	-
3		NaSH.H ₂ O, Et ₃ N.HCl	H ₂ O	-5°C, reflux	50%
4		Amberlite, NaSH.H ₂ O	MeOH	t.a.	10%
5		Amberlite, NaSH.H ₂ O, Et ₃ N.HCl	MeOH	t.a.	20-30%
6	 II	Thiourée, NaOH	EtOH	Reflux	10%
7		Amberlite, NaSH.H ₂ O	CH ₃ CN	t.a.	10%
8	 III	Amberlite traitée	CH ₃ CN	t.a.	-
9		NaSH.H ₂ O	H ₂ O	-5°C, reflux	-

Toutes ces méthodes ont conduit à l'obtention d'un produit identifié comme étant le disulfure (Figure II.14) et caractérisé ainsi par RMN (absence du signal correspondant au déplacement chimique du proton du thiol libre, attendu dans la zone située entre 1 et 2 ppm).³⁵ Malgré toutes les précautions prises, l'oxydation de la fonction thiol n'a pu être évitée et a conduit au disulfure. Dans certains cas, le thiol libre recherché est présent avec le disulfure mais d'après les analyses RMN réalisées et dans le meilleur des cas, avec un taux maximal de 50%. Malheureusement, dans la majorité des cas, le disulfure a été obtenu seul ou avec une très faible proportion du thiol libre.

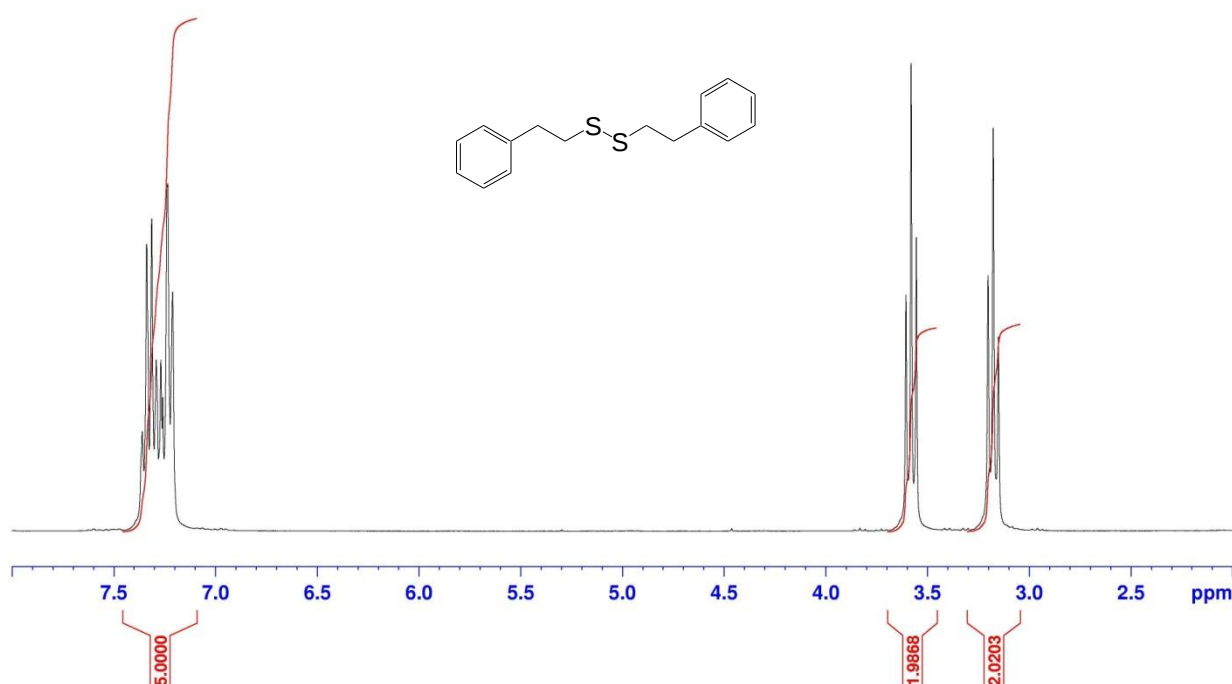


Figure II. 14. Spectre RMN ^1H des disulfures dans CDCl_3

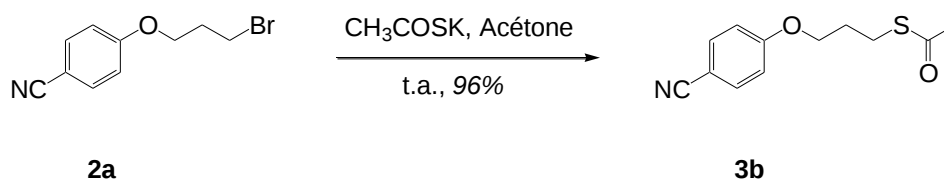
Bien évidemment, l'obtention de ces disulfures empêche toute tentative de nitrosation, requérant la présence d'une fonction thiol libre. De plus, la séparation des deux produits par colonne chromatographique sur gel de silice s'est avérée totalement inefficace en raison de l'oxydation quasiment instantanée des thiols libres existants dans le mélange. Pour cela, une méthode alternative a dû être envisagée afin de tenter de contourner le problème.

3.2.2. Par utilisation du thioacétate de potassium

Une méthode utilisant le thioacétate de potassium et couramment décrite depuis quelques années pour la synthèse de thiols, a été testée sur la molécule **2a**. Cette synthèse peut s'effectuer en trois étapes : premièrement, la synthèse d'un produit intermédiaire ayant une fonction acétate ; deuxièmement, la formation de la fonction amidoxime et finalement la déprotection de la fonction thiol. Les deux dernières étapes peuvent être permutées.

3.2.2.1. Première étape de synthèse du thioacétate

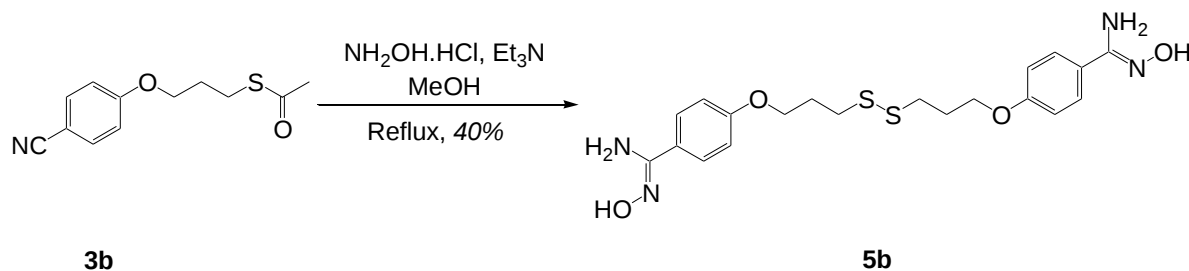
La réaction de substitution de l'atome de brome par une fonction thioacétate a été réalisée dans l'acétone et a abouti, après 1 heure d'agitation à température ambiante, à 96% de rendement du produit souhaité **3b** (Figure II.15). Cette fonction acétate permet une protection temporaire de la fonction thiol.



*Figure II. 15. Synthèse du produit intermédiaire thioacétate **3b***

3.2.2.2. Etapes de déprotection du thiol et de transformation du nitrile en amidoxime

- Dans un premier temps, la déprotection du produit **3b** a été envisagée et réalisée par réaction avec l'acide trifluoroacétique dans une solution à reflux dioxane/eau (35%/65%) pendant 5 heures.³⁶ Comme précédemment, les essais ont seulement conduit à une faible quantité de thiol réduit, 10% maximum de produit souhaité, en mélange avec le disulfure.
- La stratégie inverse a alors été tentée, c'est-à-dire en effectuant la synthèse de l'amidoxime avant la déprotection du thiol. La présence de l'hydroxylamine dans le mélange réactionnel a bien permis de générer la fonction amidoxime. Cependant, l'hydroxylamine (4 équivalents) a déprotégé la fonction thiol qui s'est oxydée en disulfure (Figure II.16).



*Figure II. 16. Synthèse de l'amidoxime et déprotection du thiol par l'hydroxylamine donnant la molécule **5b***

La réaction du chlorhydrate de l'hydroxylamine avec **3b** en présence de triéthylamine dans du méthanol à reflux n'est pas sélective puisqu'en plus de former l'amidoxime, la fonction thiols a été déprotégée et s'est spontanément oxydée. Durant cette réaction, et surtout après purification sur colonne de silice, aucune fonction thiol libre n'a été détectée et cela même en modulant le nombre d'équivalents utilisé, la base ou le temps de contact.

Après avoir essayé différentes méthodes pour obtenir une fonction thiol réduite, il était intéressant de tenter de réduire les ponts disulfures des différentes molécules obtenues.

3.2.3. Essais de réduction des disulfures

Les difficultés rencontrées lors des essais d'obtention de la fonction thiol sont survenues à différentes étapes : la substitution des halogénures par les thiols qui a donné quasi uniquement des disulfures à la place des thiols ainsi que les essais de purification de ces derniers par colonne chromatographique. En effet, les faibles quantités de thiols libres présentes dans les mélanges se sont oxydées presque instantanément sur la colonne.

Pour cette raison, les produits oxydés obtenus ont été engagés dans des réactions de réduction afin d'obtenir la fonction thiol libre (Figure II.17).

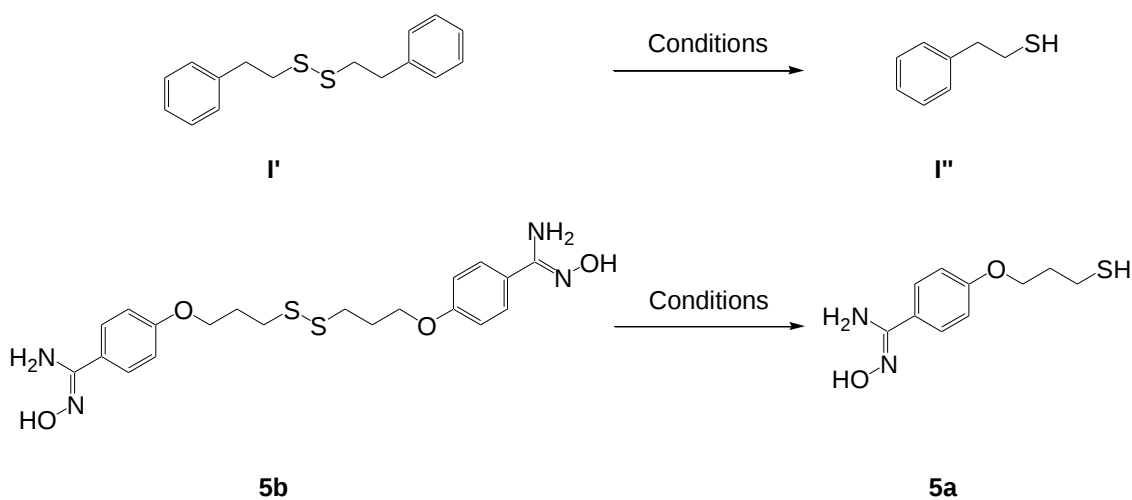


Figure II. 17. Essais de réduction des disulfures obtenus

Les conditions utilisées pour tenter la réduction des ponts disulfure sont présentées dans le Tableau II.2.

Tableau II. 2. Conditions de réduction des premiers ponts disulfures

Entrée	Molécule	Réactifs	Solvant	Température
1	I'	P(n-Bu) ₃ ^{37,38}	THF, gouttes H ₂ O	t.a.
2		Zn ³⁹	AcOH	50°C
3		LiAlH ₄ ⁴⁰	Et ₂ O	Reflux
4		N ₂ H ₄ ⁴¹	CH ₂ Cl ₂	t.a.
5		N ₂ H ₄ ⁴¹	THF, MeOH	Reflux
6	5b	DTT	MeOH	t.a.
7		NaBH ₄ ⁴²	MeOH	0°C

Après examen de la littérature, différents réactifs ont été utilisés pour tenter la réduction des disulfures, comme la tributylphosphine, le zinc, l'aluminohydrure de lithium ainsi que l'hydrazine, avec des conditions propres à chaque réactif. Cependant, aucune méthode n'a pu générer exclusivement des fonctions thiols libres : la majorité des mélanges obtenus étaient toujours composés de thiols oxydés en disulfures, malgré différentes précautions prises comme l'utilisation de façon ininterrompue d'un flux d'azote.

D'autres essais de réduction ont été réalisés sur la molécule **5b** issue de la déprotection du thioacétate.

Le dithiothréitol ou DTT est le réactif le plus utilisé pour la réduction des ponts disulfure. Ce fort agent réducteur contient deux fonctions thiols libres et est, par conséquent, capable de réduire les ponts disulfures en s'oxydant lui-même par création d'un pont disulfure intramoléculaire thermodynamiquement plus favorable et conduisant à la formation d'un cycle à 6 atomes.⁴³ Cependant, l'utilisation du DTT n'a pas permis de réduire les ponts disulfures ciblés (entrée 6). De même, le traitement par le réducteur NaBH₄ utilisé dans du méthanol à froid n'a pas permis de générer un thiol libre (entrée 7). Dans les deux cas, le disulfure est récupéré à la fin de la réaction.

3.2.4. Analyse des résultats obtenus

Les résultats obtenus montrent les nombreuses difficultés rencontrées pour obtenir et isoler la molécule cible sous sa forme réduite. Comme vu précédemment, toutes les méthodes testées ont généré majoritairement des composés de type disulfure. De plus, la purification du mélange obtenu, fonctions thiol libres / oxydées, s'est avérée totalement inefficace et ceci à cause de l'oxydation très rapide de ces fonctions sur la silice. Pire, cette oxydation spontanée génère, en sortie de la colonne, quasiment exclusivement les produits oxydés.

Ceci est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature puisque des thiols de faible masse moléculaire, semblables à celles de cette étude, s'oxydent très facilement suite à un simple contact avec de l'air en présence de bases comme la triéthylamine, la diéthylamine, la pyridine, etc... Les fonctions thiol de ces molécules sont oxydées avec des taux compris entre 80 et 99% en moins de 24 heures.^{44,45} Ces résultats témoignent que l'oxydation de ces molécules se produit très facilement et sans doute inévitablement.

Néanmoins, la molécule **5b** obtenue (Figure II.15) peut présenter un intérêt pour trois raisons majeures :

- Lors de sa synthèse, il a été montré la possibilité de déprotéger la fonction thiol et de former l'amidoxime en une seule étape par utilisation du chlorhydrate d'hydroxylamine en présence de la triéthylamine. Cette propriété pourra être valorisée pour d'autres synthèses.
- Les ponts disulfures peuvent être réduits *in vivo* par une famille d'enzymes appelés les thiorédoxines.⁴⁶ De plus, la nitrosation est aussi un mécanisme qui peut s'effectuer directement dans le corps. Pour ces deux raisons, l'utilisation de cette molécule sous sa forme oxydée pourrait s'avérer intéressante car elle pourrait être réduite et nitrosée dans les cellules. Ceci permettrait de générer *in vivo* les doubles donneurs hybrides nitrosothiol / amidoxime.
- Cette molécule, non réduite, est aussi intéressante puisque la présence du pont disulfure a généré un double donneur de NO symétrique, grâce à la présence de deux fonctions amidoximes aromatiques. Il sera intéressant de tester la capacité de libération de NO de ces deux fonctions, et de la comparer avec celle d'une amidoxime simple. Théoriquement, celle-ci devrait être deux fois plus élevée en raison de la présence de deux fonctions amidoximes, ce qui est intéressant à long terme afin d'administrer aux patients des quantités plus faibles de principe actif en conservant les mêmes effets thérapeutiques.

4. Deuxième stratégie : Couplage à la cystéine possédant une fonction thiol libre

La deuxième stratégie, présentée dans la Figure II.11, consiste à coupler la cystéine à une molécule ayant une fonction nitrile aromatique comme précurseur d'amidoxime afin d'obtenir la molécule **8a**. La cystéine est un acide aminé contenant une fonction thiol libre qui pourra être ultérieurement nitrosée afin de générer un *S*-nitrosothiol.

4.1. Synthèse du produit **6a** par incorporation d'une chaîne fonctionnalisée

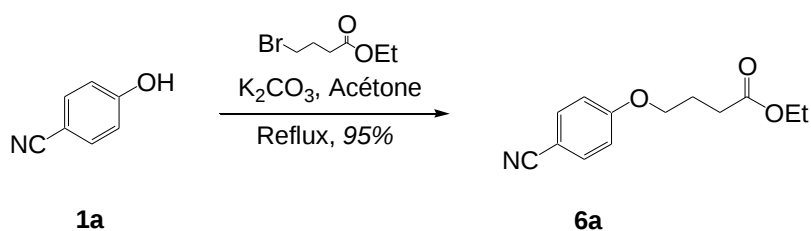


Figure II. 18. Incorporation de la chaîne lipophile fonctionnalisée par O-alkylation du 4-hydroxybenzonitrile

Le produit **6a** à chaîne lipophile fonctionnalisée (Figure II.18) est synthétisé par réaction de substitution nucléophile à partir du 4-hydroxybenzonitrile et du 4-bromobutyrate d'éthyle en présence de carbonate de potassium. Le produit a été obtenu avec un rendement de 95%.

La présence de la chaîne carbonée augmente la lipophilie de la molécule, ce qui facilite le passage transmembranaire des molécules par diffusion passive. De plus, la présence de la fonction ester sur la chaîne permettra la saponification de celle-ci afin de pouvoir, ultérieurement, incorporer la cystéine *via* un couplage.

4.2. Synthèse de **7a** par saponification de l'ester

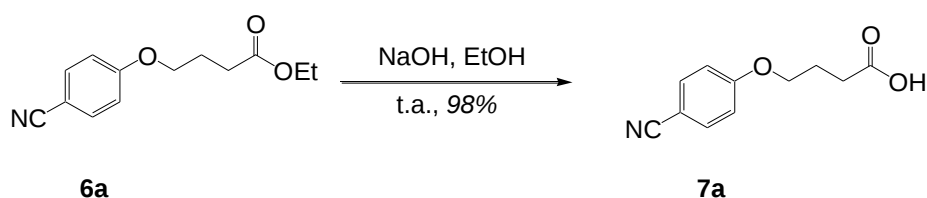


Figure II. 19. La saponification de la fonction ester générant **7a**

La saponification de l'ester **6a** est réalisée classiquement par réaction, à température ambiante dans l'éthanol, avec de la soude (Figure II.19). Après une étape d'hydrolyse du carboxylate formé, l'acide carboxylique **7a** est obtenu à un rendement de 98%.

La fonction acide carboxylique peut être transformée facilement en fonction chlorure d'acyle.⁴⁷⁻⁴⁹ Cette méthode permet d'activer l'acide carboxylique, ce qui favorisera son couplage ultérieur à l'extrémité *N*-terminale de la cystéine.

4.3. Couplage du chlorure d'acide à la cystéine

4.3.1. Mise au point de la méthode du couplage à la cystéine

Deux méthodes de couplage de l'acide carboxylique **6a** avec la cystéine ont été prévues : le couplage avec le chlorure d'acide et le couplage après activation du chlorure d'acide. Pour la mise au point de ces méthodes et pour des raisons économiques, des chlorures d'acide simples, commerciaux et disponibles au laboratoire ont été utilisés.

4.3.1.1. Couplage sans activation du chlorure d'acide

Les chlorures d'acide sont de bons réactifs de couplage. C'est ce couplage à la cystéine (libre de préférence) par une *N*-acylation qui a été étudié. (Figure II.20)

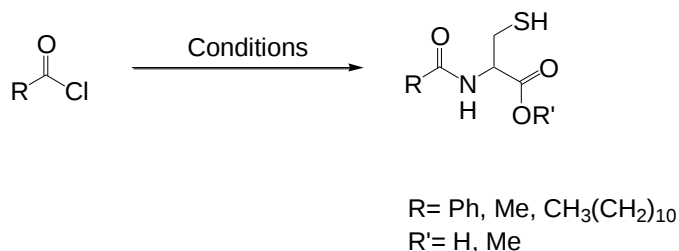


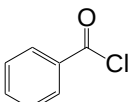
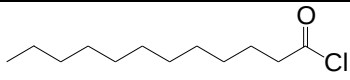
Figure II. 20. Mise au point de la méthode du couplage des chlorures d'acide avec la cystéine

Les différentes conditions utilisées pour la mise au point de cette méthode sont regroupées dans le Tableau II.3.

La première molécule, le chlorure de benzoyle, est engagée dans une réaction avec la cystéine libre (entrées 1, 2 et 3) ou sous forme d'ester méthylique (entrée 4). Ces réactions ont été menées en présence ou en l'absence de base (triéthylamine ou pyridine) et dans différents solvants. Tous les produits obtenus lors de ces essais sont majoritairement composés des produits de *N*- et de *S*-acylation. Après analyses RMN, le produit *N*-acylé est présent dans le mélange avec un taux maximum de 10%. Ce résultat a été obtenu en utilisant la triéthylamine comme base sur la cystéine libre (entrée 3). L'utilisation d'un chlorure d'acyle aliphatique,

comme le chlorure d'acétyle, avec la cystéine en présence de pyridine dans du dichlorométhane (entrée 5) a permis d'isoler seulement 10% de produit *N*-acylé en mélange avec les produit *N*- et *S*-acylés. Cependant, dans les mêmes conditions, mais cette fois sur un chlorure d'acyle à plus longue chaîne, comme le chlorure de lauroyle (entrée 6), 30% du produit *N*-acylé ont été formés. Les chlorures d'acyle ont été ensuite engagés directement, sans aucune purification.

Tableau II. 3. Conditions de la mise au point du couplage des chlorures d'acyle aux cystéines

Entrée	Molécule	Réactifs	Solvant	Température	Thiol
1	 IV	H-Cys(H)-OH, py	CH ₃ Cl ou CH ₂ Cl ₂	0°C, t.a.	-
2		H-Cys(H)-OH	H ₂ O, CH ₃ CN	t.a.	-
3		H-Cys(H)-OH, Et ₃ N	H ₂ O, CH ₃ CN	t.a.	10%
4		H-Cys(H)-OMe, py	CH ₃ Cl	0°C, t.a.	-
5	 V	H-Cys(H)-OH, py	CH ₂ Cl ₂	0°C, t.a.	10%
6	 VI	H-Cys(H)-OH, py	CH ₂ Cl ₂	0°C, t.a.	30%

En se basant sur les résultats obtenus précédemment, les dernières conditions ont donc été retenues afin de reproduire le couplage sur la cystéine libre sur la molécule étudiée.

4.3.1.2. Couplage après activation du chlorure d'acyle

En amont du couplage à la cystéine, cette méthode repose sur l'activation du chlorure d'acyle par le benzotriazole. Cette étape est réalisée par mélange du chlorure de benzoyle, utilisé uniquement pour la mise au point, avec du THF à température ambiante pendant 24 heures. Le produit ainsi obtenu est purifié et aussitôt solubilisé dans une solution

acétonitrile/eau avec la cystéine et la triéthylamine à température ambiante durant 24 heures (Figure II.21).³²

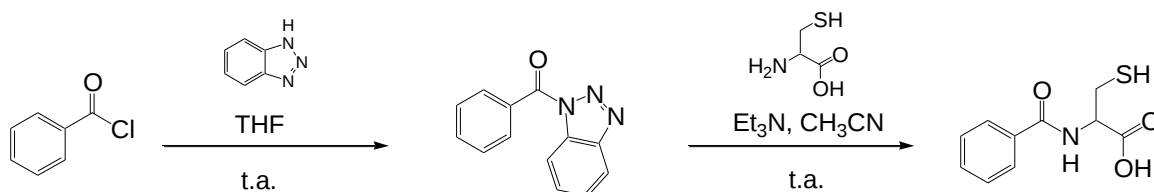


Figure II. 21. Activation du chlorure de benzoyle avec le benzotriazole avant couplage avec la cystéine

Cette méthode n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité mais plutôt, d'après les analyses CCM et RMN réalisées, un mélange de plusieurs produits difficiles à identifier.

Ces résultats montrent que la méthode utilisant la pyridine et ne nécessitant pas d'activation préalable du chlorure d'acyle (Tableau II.3, entrée 6) reste la meilleure méthode à tester sur la molécule **7a**.

4.3.2. Synthèse du chlorure d'acyle et couplage à la cystéine

La première étape, la synthèse du chlorure d'acyle, est réalisée à partir de l'acide **7a** en présence du chlorure de thionyle dans du dichlorométhane à reflux. Le chlorure est, sans plus attendre, additionné à la cystéine libre en présence de pyridine dans le même solvant à 0°C puis à température ambiante pendant la nuit (Figure II.22).

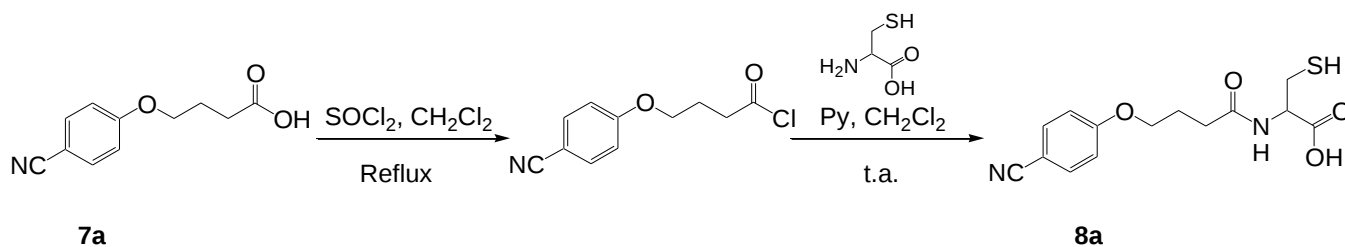


Figure II. 22. Synthèse du chlorure d'acyle et couplage à la cystéine

Cette synthèse n'a pas permis d'aboutir au produit souhaité malgré qu'elle ait montrée de bons résultats sur les chlorures d'acyle commerciaux présentés ci-dessus mais majoritairement la récupération des produits de départ. Ceci signifie que cette réaction n'a pas eu lieu en utilisant la molécule cible **7a**. Ce résultat peut être dû à deux raisons distinctes :

- le chlorure d'acide correspondant à la molécule **7a** n'est pas capable de réagir avec la cystéine sous les conditions utilisées

- la synthèse du chlorure d'acide n'est pas réussie ce qui a empêché le couplage avec la cystéine.

4.3.3. Couplage au carbodiimide

Les carbodiimides sont des agents de couplage très employés en synthèse peptidique. La 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide, EDC (appelée aussi WSC pour water soluble carbodiimide) dont l'urée formée est soluble dans l'eau et peut être éliminée par lavage. Ces composés sont couramment utilisés avec l'hydroxybenzotriazole, HOBT, dont la présence permet de s'affranchir de certaines réactions parasites.

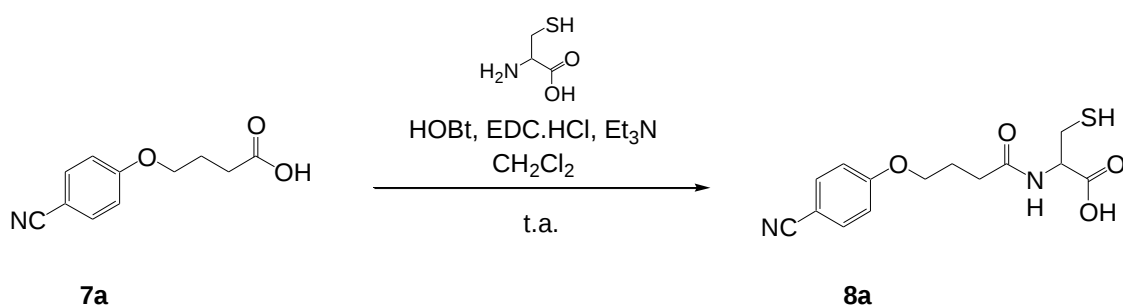


Figure II. 23. Couplage de l'acide **7a** avec la cystéine en présence de l'EDC et HOBT

Classiquement, l'acide carboxylique **7a** a été mis en présence de la cystéine, de HOBT, de l'EDC.HCl et de triéthylamine dans du dichlorométhane à 0°C pendant 15 minutes puis à température ambiante durant la nuit (Figure II.23). Après traitement puis purification par chromatographie sur gel de silice, les produits de *N*- et de *S*-acylation ont été obtenus (Figure II.24).

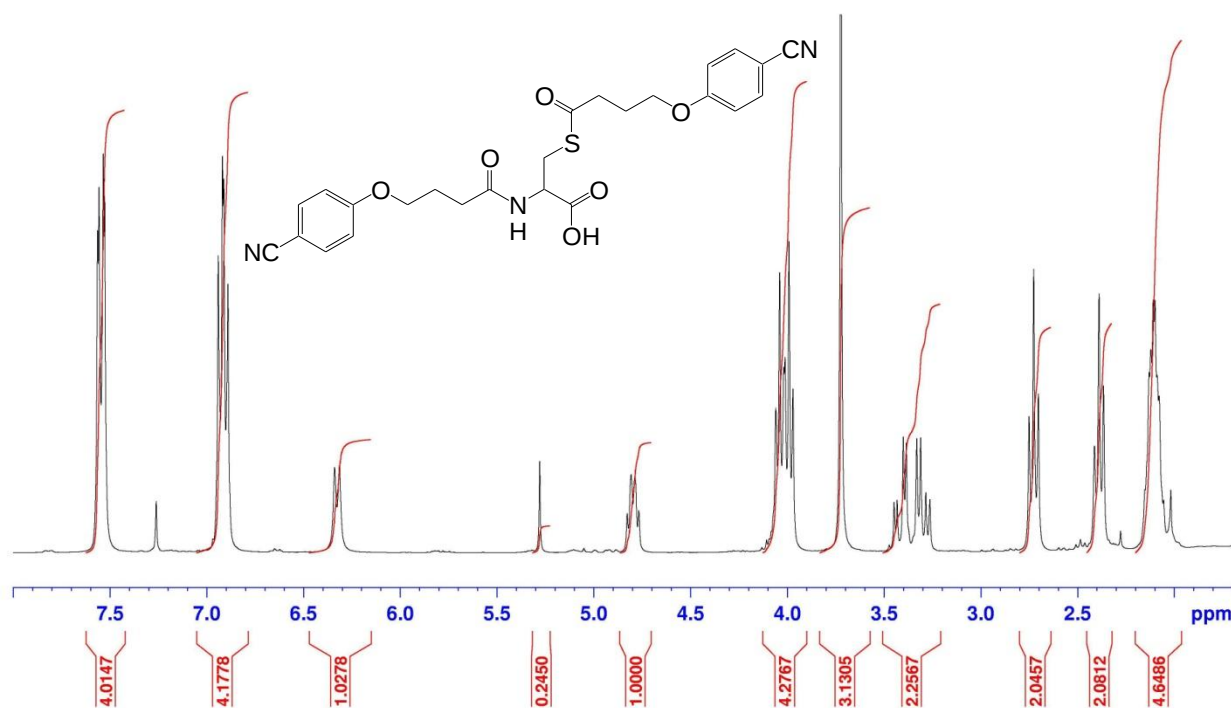


Figure II. 24. Spectre RMN ^1H des produits de N- et de S-acylation dans CDCl_3

Toutes les méthodes de couplage testées dans ce travail n'ont pas permis d'aboutir au produit souhaité avec des rendements acceptables. Le produit majoritairement obtenu présente à la fois un groupement acyle sur l'atome d'azote et sur l'atome de soufre. Ce produit ne pourra pas être utilisé pour les études prévues ultérieurement, la nitrosation est inenvisageable car la fonction thiol n'est pas libre.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre a été dédié à la synthèse de composés double donneurs hybrides de NO. Ces doubles donneurs ont la particularité de devoir porter, sur la même molécule, une fonction amidoxime ainsi qu'une fonction *S*-nitrosothiol. L'innovation apportée à ces molécules réside dans la combinaison de ces groupements fonctionnels différents, tous deux permettant une libération prolongée et en deux temps de NO.

Deux voies de synthèse de ces molécules ont été initialement prévues afin de trouver les conditions idéales pour obtenir ce type de donneurs.

L'introduction de la fonction thiol a été envisagée :

- soit par substitution directe d'un atome d'halogène à partir d'un halogénure d'alkyle,
- soit par couplage avec la cystéine libre à partir d'un composé portant une fonction acide carboxylique.

Des précautions ont été prises (réactions sous flux d'azote, dégazage des solvants) de façon à éliminer toute trace potentielle d'oxygène, et éviter l'oxydation non désirée de la fonction thiol de la cystéine au cours du procédé de couplage ou de substitution.

Lors de la mise au point de ces deux stratégies, il a fallu faire face à de nombreux obstacles.

Les difficultés de couplage à la cystéine sont principalement causées par un manque de sélectivité de la réaction d'acylation puisque les produits isolés montrent qu'elle a eu lieu à la fois sur les extrémités *N*- et *S*- terminales de la cystéine et cela quelle que soit la méthode de couplage. L'obtention de ce produit *S*-acylé empêche la suite de l'étude puisque la nitrosation de la fonction thiol ne pourra être envisagée.

De nombreuses complications ont également été rencontrées lors des essais de substitution d'un atome d'halogène par une fonction thiol. En effet, il s'est avéré impossible d'éviter l'oxydation très rapide des fonctions thiol, que ce soit l'oxydation observée durant la synthèse mais aussi l'oxydation spontanée lors de l'étape de purification sur la silice. Face à cette réaction inévitable, une étape de réduction du pont disulfure formé a dû être envisagée. Malheureusement, toutes les méthodes de réduction se sont avérées inefficaces.

Néanmoins, même si ce n'était pas la forme visée au début des travaux, la présence d'un pont disulfure sur une molécule portant deux fonctions amidoximes aromatiques et

symétrique peut présenter des intérêts biologiques et chimiques. En effet, cette molécule peut être considérée comme un double donneur de NO par deux modèles possibles: un double donneur hybride de NO présent grâce à la réduction du pont disulfure et la nitrosation des fonctions thiols qui pourraient se faire spontanément par les enzymes dans le milieu intracellulaire *in vivo* ou un double donneur de NO à base d'amidoxime grâce à la présence de deux fonctions amidoximes symétriques potentiellement capables à libérer la quantité double de NO sans réduction des ponts.

La présence de deux fonctions amidoximes sur la même molécule a permis d'orienter différemment la suite des travaux de thèse. La synthèse d'un nouveau type de doubles donneurs de NO basé sur la présence de deux fonctions amidoximes seront développées dans le chapitre suivant.

Références du chapitre

- (1) Marley, R.; Patel, R. P.; Orie, N.; Ceaser, E.; Darley-USmar, V.; Moore, K. Formation of Nanomolar Concentrations of S-Nitroso-Albumin in Human Plasma by Nitric Oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, 31 (5), 688–696.
- (2) Ollosson, R. S-Nitrosothiols, Nitric Oxide and Platelet and Vascular Dysfunction in Cirrhosis, Royal Free and University College Medical School: London, 2008.
- (3) Weller, T.; Alig, L.; Beresini, M.; Blackburn, B.; Bunting, S.; Hadváry, P.; Hürzeler Müller, M.; Knopp, D.; Levet-Trafit, B.; Lipari, M. T.; et al. Orally Active Fibrinogen Receptor Antagonists. 2. Amidoximes as Prodrugs of Amidines. *J. Med. Chem.* **1996**, 39 (16), 3139–3147.
- (4) Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their CN(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, 37 (49), 17179–17191.
- (5) Caro, A. A.; Cederbaum, A. I.; Stoyanovsky, D. A. Oxidation of the Ketoxime Acetoxime to Nitric Oxide by Oxygen Radical-Generating Systems. *Nitric Oxide* **2001**, 5 (4), 413–424.
- (6) Gaucher, C.; Boudier, A.; Dahboul, F.; Parent, M.; Leroy, P. S-Nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-Nitrosothiols. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, 19 (3), 458–472.
- (7) Dahboul, F.; Leroy, P.; Maguin Gate, K.; Boudier, A.; Gaucher, C.; Liminana, P.; Lartaud, I.; Pompella, A.; Perrin-Sarrado, C. Endothelial γ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of S-Nitrosoglutathione in Rat Aorta. *PLOS ONE* **2012**, 7 (9), e43190.
- (8) Gavens, E. Applications Thérapeutiques en Cardiologie des Médicaments Libérant du Monoxyde d'Azote. Conception et Synthèse Organique de «Doubles Donneurs» Hybrides de Monoxyde d'Azote, Université de Limoges: France, 2015.
- (9) Wardell, J. L. Preparation of Thiols. In *The Chemistry of the Thiol Group*; 1974.
- (10) Russell, G. A.; Law, W. C.; Zaleta, M. Spin Probes Derived from Dithiols. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107 (14), 4175–4182.
- (11) Turk, S. D.; Louthan, R. P.; Cobb, R. L.; Bresson, C. R. Addition of Hydrogen Sulfide to Unsaturated Amines. *J. Org. Chem.* **1962**, 27 (8), 2846–2853.

- (12) Mashkina, A. V.; Khairulina, L. N. Catalytic Reactions of N-Propanol and n-Butanol with Hydrogen Sulfide. *Kinet. Catal.* **2002**, *43* (5), 684–690.
- (13) Guidotti, T. L. Hydrogen Sulfide: Advances in Understanding Human Toxicity. *Int. J. Toxicol.* **2010**, *29* (6), 569–581.
- (14) Kudelko, A. Reactions of α -Mercaptocarboxylic Acid Hydrazides with Triethyl Orthoesters: Synthesis of 1,3,4-Thiadiazin-5(6H)-Ones and 1,3,4-Oxadiazoles. *Tetrahedron* **2012**, *68* (18), 3616–3625.
- (15) Kielbasiński, P.; Łuczak, J.; Cierpień, T.; Błaszczyk, J.; Sieroń, L.; Wiktorska, K.; Lubelska, K.; Milczarek, M.; Chilmończyk, Z. New Enantiomeric Fluorine-Containing Derivatives of Sulforaphane: Synthesis, Absolute Configurations and Biological Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 332–342.
- (16) Wang, Z.; Shi, C.; Wu, X.; Chen, Y. Efficient Access to the Non-Reducing End of Low Molecular Weight Heparin for Fluorescent Labeling. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (53), 7004–7006.
- (17) Bandgar, B. P.; Pawar, S. B. Solid Supported Reagents and Reactions. Part 21.1 Rapid and Clean Synthesis of Thiols from Halides Using Polymer-Supported Hydrosulfide. *J. Chem. Res.* **1998**, *4* (4), 212–213.
- (18) Choi, J.; Yoon, N. M. Direct Synthesis of Thiols from Halides and Epoxides Using Exchange Resine in Methanol. *Synthesis* **1995**, *4*, 373–375.
- (19) Sato, S.; Ohashi, Y.; Kojima, M.; Watanabe, T.; Honda, Y.; Watanabe, T. Degradation of Sulfide Linkages Between Isoprenes by Lipid Peroxidation Catalyzed by Manganese Peroxidase. *Chemosphere* **2009**, *77* (6), 798–804.
- (20) Blount, K. F.; Uhlenbeck, O. C. Internal Equilibrium of the Hammerhead Ribozyme Is Altered by the Length of Certain Covalent Cross-Links. *Biochemistry* **2002**, *41* (21), 6834–6841.
- (21) Friebe, M.; Mahmood, A.; Spies, H.; Berger, R.; Johannsen, B.; Mohammed, A.; Eisenhut, M.; Bolzati, C.; Davison, A.; Jones, A. G. ‘3+1’ Mixed-Ligand Oxotechnetium(V) Complexes with Affinity for Melanoma: Synthesis and Evaluation in Vitro and in Vivo.’ *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (14), 2745–2752.
- (22) Li, Z.; Wu, Z.; Luo, F. Synthesis and Antifungal Activities of Alkyl N-(1,2,3-Thiadiazole-4-Carbonyl) Carbamates and S-Alkyl N-(1,2,3-Thiadiazole-4-Carbonyl) Carbamothioates. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 3872–3876.
- (23) Han, C.-C.; Balakumar, R. Mild and Efficient Methods for the Conversion of Benzylic Bromides to Benzylic Thiols. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8255–8258.

- (24) Schuster, T.; Schellenberger, S.; Friedrich, R.; Klapper, M.; Müllen, K. Branched Fluorinated Amphiphiles Based on Carbohydrates. *J. Fluor. Chem.* **2013**, *154*, 30–36.
- (25) Bandgar, B. P.; Sadavarte, V. S. One Pot Rapid Synthesis of Thiols from Alcohols under Mild Conditions. *Synlett* **2000**, *2000* (06), 908–910.
- (26) Broniowska, K. A.; Diers, A. R.; Hogg, N. S-Nitrosoglutathione. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (5), 3173–3182.
- (27) Matsumura, M.; Signor, G.; Matthews, B. W. Substantial Increase of Protein Stability by Multiple Disulphide Bonds. *Nature* **1989**, *342* (6247), 291–293.
- (28) Go, Y.-M.; Jones, D. P. Cysteine/Cystine Redox Signaling in Cardiovascular Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50* (4), 495–509.
- (29) Harte, A. J.; Gunnlaugsson, T. Synthesis of α -Chloroamides in Water. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (35), 6321–6324.
- (30) Sano, T.; Sugaya, T.; Inoue, K.; Mizutaki, S.; Ono, Y.; Kasai, M. Process Research and Development of L-Alanyl-L-Glutamine, a Component of Parenteral Nutrition. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4* (3), 147–152.
- (31) Sharma, C. S.; Nema, R. K.; Sharma, V. K. Synthesis, Anticonvulsant Activity and in-Silico Study of Some Novel Amino Acids Incorporated Bicyclo Compounds. *Stamford J. Pharm. Sci.* **2009**, *2* (2), 42–47.
- (32) Katritzky, A. R.; Tala, S. R.; Abo-Dya, N. E.; Gyanda, K.; El-Gendy, B. E.-D. M.; Abdel-Samii, Z. K.; Steel, P. J. Selective Synthesis and Structural Elucidation of S-Acyl- and N-Acylcysteines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (18), 7165–7167.
- (33) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRX* **2005**, *2* (4), 541–553.
- (34) Hussain, A.; Truelove, J. E. Prodrug Approaches to Enhancement of Physicochemical Properties of Drugs IV: Novel Epinephrine Prodrug. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65* (10), 1510–1512.
- (35) Wu, Z.; MacDonald, M. A.; Chen, J.; Zhang, P.; Jin, R. Kinetic Control and Thermodynamic Selection in the Synthesis of Atomically Precise Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (25), 9670–9673.
- (36) Iimura, S.; Manabe, K.; Kobayashi, S. Hydrophobic Polymer-Supported Catalyst for Organic Reactions in Water: Acid-Catalyzed Hydrolysis of Thioesters and Transprotection of Thiols. *Org. Lett.* **2003**, *5* (2), 101–103.
- (37) Humphrey, R. E.; Potter, J. L. Investigation of 1,3-Diaminopropanol-2 Interactions with Copper and Nickel Ions. *Anal. Chem.* **1965**, *37* (1), 165–166.

- (38) Kim, B.; Kodomari, M.; Regen, S. L. Polystyryltri-n-Butylphosphine. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (17), 3233–3235.
- (39) Erlandsson, M.; Hällbrink, M. Metallic Zinc Reduction of Disulfide Bonds between Cysteine Residues in Peptides and Proteins. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2005**, *11* (4), 261–265.
- (40) Brown, W. G. Reductions by Lithium Aluminum Hydride. In *Organic Reactions*; John Wiley and Sons, Inc., 2011; p 470.
- (41) Maiti, S. N.; Spevak, P.; Singh, M. P.; Micetich, R. G.; Narender Reddy, A. V. Reductive Cleavage of Symmetrical Disulfides with Hydrazines. *Synth. Commun.* **1988**, *18* (6), 575–581.
- (42) Aldeek, F.; Mustin, C.; Balan, L.; Roques-Carmes, T.; Fontaine-Aupart, M.-P.; Schneider, R. Surface-Engineered Quantum Dots for the Labeling of Hydrophobic Microdomains in Bacterial Biofilms. *Biomaterials* **2011**, *32* (23), 5459–5470.
- (43) Konigsberg, W. [13] Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol. *Methods Enzymol.* **1972**, *25*, 185–188.
- (44) Abaee, M. S.; Mojtahedi, M. M.; Navidipoor, S. Diethylamine-Catalyzed Dimerization of Thiols: An Inexpensive and Green Method for the Synthesis of Homodisulfides Under Aqueous Conditions. *Synth. Commun.* **2010**, *41* (2), 170–176.
- (45) García Ruano, J. L.; Parra, A.; Alemán, J. Efficient Synthesis of Disulfides by Air Oxidation of Thiols under Sonication. *Green Chem.* **2008**, *10* (6), 706–711.
- (46) Arunachalam, B.; Phan, U. T.; Geuze, H. J.; Cresswell, P. Enzymatic Reduction of Disulfide Bonds in Lysosomes: Characterization of a Gamma-Interferon-Inducible Lysosomal Thiol Reductase (GILT). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (2), 745–750.
- (47) Li, J.; Yin, Y.; Wang, L.; Liang, P.; Li, M.; Liu, X.; Wu, L.; Yang, H. Synthesis, Characterization, and Anti-Inflammatory Activities of Methyl Salicylate Derivatives Bearing Piperazine Moiety. *Molecules* **2016**, *21* (11), e1544.
- (48) Liu, W.-Q.; Megale, V.; Borriello, L.; Leforban, B.; Montès, M.; Goldwaser, E.; Gresh, N.; Piquemal, J.-P.; Hadj-Slimane, R.; Hermine, O.; et al. Synthesis and Structure–Activity Relationship of Non-Peptidic Antagonists of Neuropilin-1 Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (17), 4254–4259.
- (49) Zhang, C.-Y.; Liu, X.-H.; Wang, B.-L.; Wang, S.-H.; Li, Z.-M. Synthesis and Antifungal Activities of New Pyrazole Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction: Antifungal Activities of New Pyrazole Derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75* (5), 489–493.

Chapitre II

Synthèse de donneurs de NO à base d'amidoximes

Introduction du chapitre

Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera consacré à la synthèse de composés portant une fonction amidoxime, une des fonctions les plus exploitées pour sa capacité à libérer NO. Ce type de donneurs a déjà montré ses capacités à pouvoir être facilement oxydé et ainsi libérer NO. Différentes recherches, présentées dans l'étude bibliographique de ce manuscrit (cf. partie I), montrent l'intérêt et les propriétés de ces molécules (effet dilatateurs et capacité à inhiber la formation de thrombus). Les mono-amidoximes aromatiques sont, jusqu'à présent, les amidoximes les plus couramment décrites pour leurs capacités à libérer du NO par voies biologiques. Plus rarement, d'autres types d'amidoximes ont également été testées, comme les mono- et les bis-amidoximes aliphatiques.

Dans ce chapitre, différents types de composés comportant des fonctions amidoximes ont été ciblés : des composés mono donneurs aromatiques ou aliphatiques, double donneurs aromatique / aliphatique, double donneurs aromatiques et multi donneurs (Figure II.25).

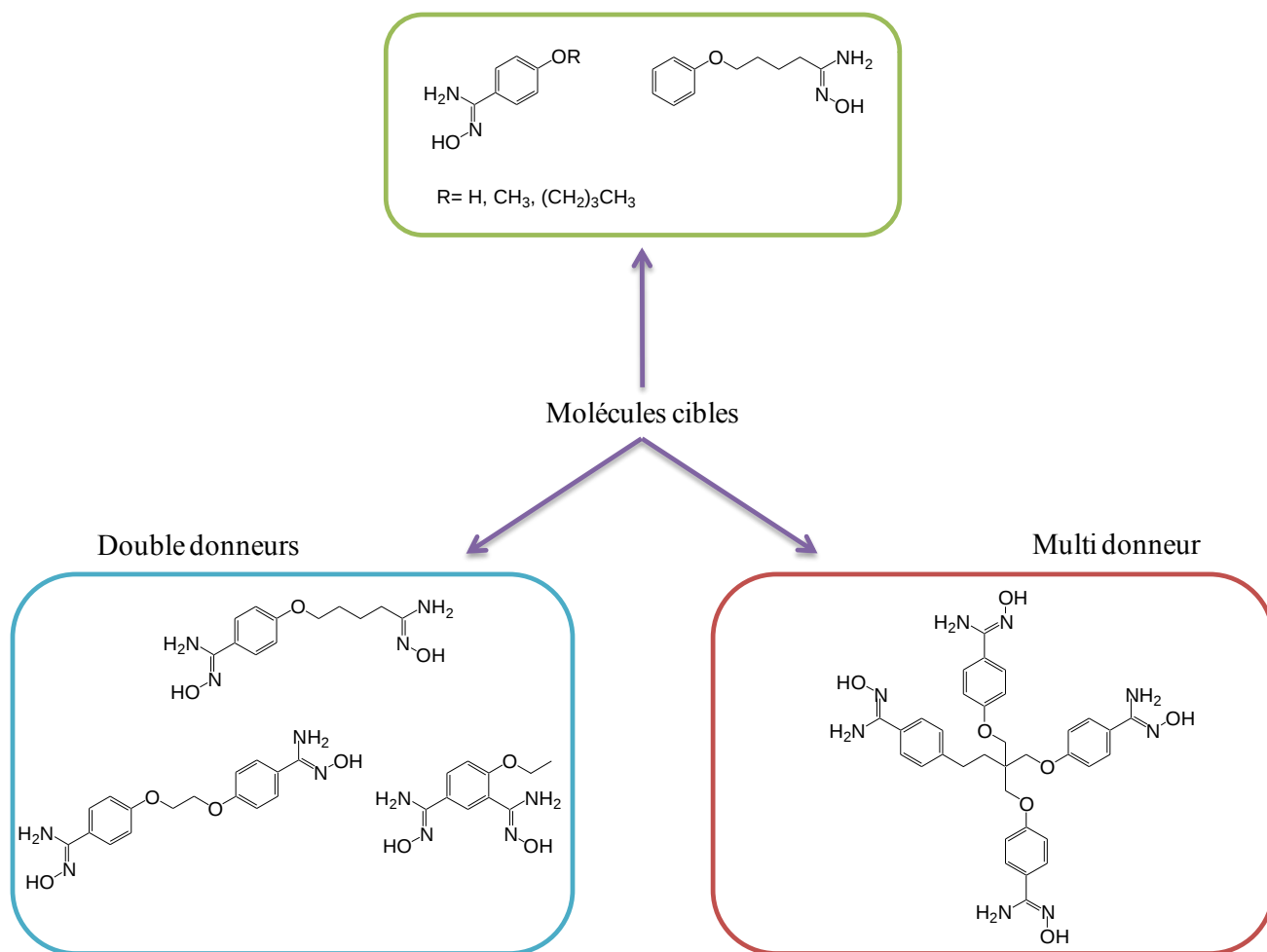


Figure II. 25. Molécules à base d'amidoximes ciblées dans ce travail

1. Plan général de synthèse des donneurs à base d'amidoximes

Dans ce travail, les amidoximes sont obtenues, selon la méthode de synthèse la plus usuelle, à partir des nitriles correspondants traités par de l'hydroxylamine.

Une fois les amidoximes synthétisées, les molécules pourront être testées au laboratoire CITHEFOR afin d'étudier leur capacité à libérer du NO. Deux tests sont prévus pour évaluer le caractère donneur des amidoximes : test de libération de NO en présence des microsomes de foie de rats contenant des CYP450 et le test de libération de NO en présence de cellules musculaires lisses humaines.

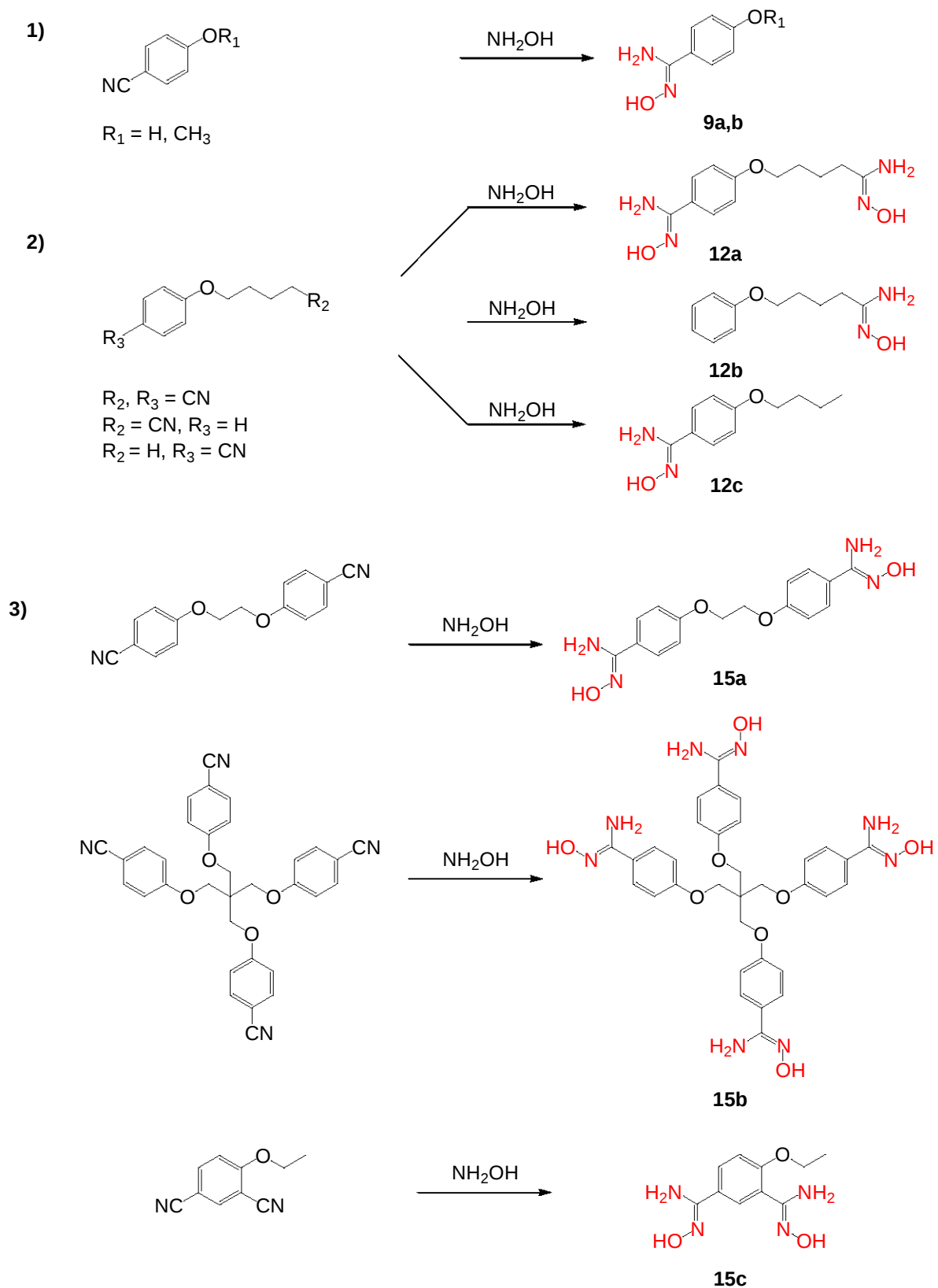


Figure II. 26. Plan de synthèse des donneurs de NO à base d'amidoxime

Comme présenté sur la Figure II.26, le plan de synthèse est divisé en trois grandes parties.

La première partie sert de mise au point de la méthode d'obtention des amidoximes en la réalisant sur les mono-amidoximes aromatiques **9a,b**. Ce modèle de molécules possède une amidoxime aromatique en position *para* d'un groupement inductif accepteur d'électrons -I et mésomère donneur d'électrons +M. Il a été établi selon le modèle de la 4-chlorobenzamidoxime,¹ qui a montré une capacité élevée de libération de NO et qui sera utilisée comme référence lors de l'étude biologique.

La deuxième partie est consacrée à la synthèse de la bis-amidoxime aromatique / aliphatique **12a** ainsi que de ses analogues mono-donneurs **12b,c**. La bis-amidoxime **12a** possède une fonction amidoxime sur le noyau aromatique et située en position *para* d'un groupement -I/+M doté lui-même d'une seconde fonction amidoxime, aliphatique sur sa chaîne carbonée. L'étude de cette bis-amidoxime est intéressante, dans un premier temps, pour évaluer sa capacité potentielle à libérer une quantité de NO deux fois plus importante que pour une mono-amidoxime et, dans un second temps, pour détailler la cinétique de libération du NO par chacune de ces fonctions. Cette cinétique de libération, à partir des deux types de fonctions amidoximes présentes sur la molécule n'a, auparavant, jamais été étudiée. De plus, d'un point de vue pharmacologique, la présence de la chaîne carbonée devrait permettre d'augmenter l'absorption et la diffusion passive de la molécule à travers les membranes plasmiques. Idéalement, le logP de la molécule doit être situé entre 1 et 3.² Le logP est le coefficient de partage d'une molécule entre deux phases non miscibles, autrement dit, c'est la valeur de la solubilité d'une molécule entre deux solvants, normalement n-octanol et eau. Le logP permet de mesurer la lipophilie d'une substance chimique : plus la valeur du LogP est élevée plus la molécule présente un caractère lipophile et inversement.

Afin de tester la différence entre la capacité de libération de NO des amidoximes aromatiques et celle des amidoximes aliphatiques, la synthèse de deux mono-amidoximes **12b,c** est envisagée. Leur modèle, semblable à la **12a** est conçu sans la fonction amidoxime aromatique pour l'amidoxime **12b** et sans la fonction amidoxime aliphatique pour l'amidoxime **12c**.

Enfin, la synthèse de composés double ou des multi donneurs de NO (possédant deux ou plusieurs fonctions amidoximes aromatiques sur le même cycle ou sur des cycles différents) a également été prévue selon le même protocole.

2. Mise au point de la synthèse des mono-amidoximes aromatiques **9a, b**

Comme décrit dans la littérature, les fonctions amidoximes aromatiques peuvent être obtenues directement par transformation d'une fonction nitrile en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine et d'une base comme par exemple la triéthylamine, le carbonate de potassium ou de sodium.³⁻⁵ Les solvants utilisés sont très souvent le méthanol et l'éthanol.

Deux méthodes classiques ont été testées et comparées pour la synthèse des premières amidoximes **9a,b** (méthode I et II) en effectuant quelques variations sur le nombre d'équivalents de réactif, le choix de la base, du solvant et de la température.

Dans une optique d'optimisation de cette réaction (vitesse de réaction et rendement), une autre série de tests a également été effectuée mais en utilisant la technique des micro-ondes et en variant plusieurs paramètres.

2.1. Mise au point de la synthèse des amidoximes aromatiques par les méthodes classiques

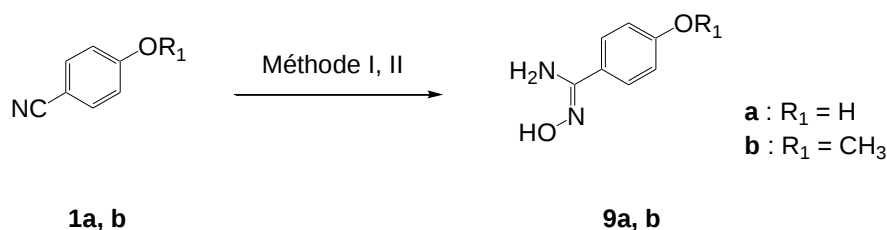


Figure II. 27. Synthèse de la 4-hydroxybenzamidoxime **9a** et 4-méthoxybenzamidoxime **9b** par les méthodes classiques

Les mono-amidoximes aromatiques **9a** et **9b** ont été synthétisées par une méthode classique déjà utilisée au LCPM (méthode I) en employant le chlorhydrate d'hydroxylamine en présence de triéthylamine à partir du nitrile correspondant dans du méthanol à température ambiante.³ Cette méthode a permis de générer les produits souhaités avec des rendements moyens de 50-60%. (Figure II.27, Tableau II.4)

Afin d'améliorer le rendement, une autre méthode (méthode II) a ensuite été envisagée et s'est avérée nettement plus efficace avec des rendements de 95-98%. (Figure II.27, Tableau II.4)

Tableau II. 4. Comparaison des méthodes I et II pour la synthèse des amidoximes **9a,b**

Méthode	Réactifs	Solvant	T°	Temps (h)	Rendement (%)
I	NH ₂ OH.HCl (3eq) Et ₃ N (3eq)	MeOH	t.a.	48	50-60
II	NH ₂ OH.HCl (2×2eq) Na ₂ CO ₃ (2×2eq)	EtOH	Reflux	48	95-98

L'utilisation du chlorhydrate d'hydroxylamine avec le carbonate de sodium à reflux s'avère être la méthode la plus efficace. Cependant, l'augmentation du nombre d'équivalents de chlorhydrate d'hydroxylamine et de carbonate de sodium n'induit pas de diminution du temps de réaction.

Par analyse par RMN des déplacements chimiques des protons des deux molécules synthétisées (Tableau II.5), la détection de signaux correspondant aux deux groupements caractéristiques de ces fonctions, NH₂ et OH, prouvent la présence des fonctions amidoxime aromatiques.

Tableau II. 5. Données RMN ¹H des amidoximes **9a,b** dans du DMSO-d₆

Molécule	δ (ppm)				
	2H, H _{ar}	2H, H _{ar}	2H, NH ₂	1H, N-OH	R ₁ (1H, OH ou 3H, CH ₃)
9a	7,48, <i>J</i> = 8,7 Hz	6,73, <i>J</i> = 8,4 Hz	5,61	9,57	9,33
9b	7,61, <i>J</i> = 8,7 Hz	6,92, <i>J</i> = 8,7 Hz	5,70	9,2	3,77

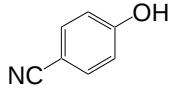
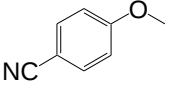
2.2. Mise au point de la méthode de synthèse des amidoximes **9a,b** par micro-ondes

Plusieurs essais de chauffage sous micro-ondes ont été réalisés afin de générer les amidoximes **9a,b** à partir des nitriles correspondants **1a,b**. Les conditions et les paramètres testés lors de ces synthèses sont représentés dans le Tableau II.6.

Un suivi par CCM a permis de constater que les différentes conditions employées ne permettent pas d'obtenir les amidoximes cibles. Les produits de départ utilisés (les nitriles) restent présents en grande quantité dans le milieu réactionnel, sans aucune formation d'amidoxime. Le manque total de réactivité, même après 60 minutes de chauffage à 300 W, signifie que l'hydroxylamine n'est pas capable de réagir sur les fonctions nitrile des composés **1a,b** sous micro-ondes.

Suite à ces résultats décevants, la méthode de choix pour la synthèse des amidoximes cibles reste la méthode II qui génère les composés désirés avec des rendements quasi quantitatifs.

Tableau II. 6. Conditions et paramètres utilisés pour la synthèse des mono-amidoximes aromatiques **9a,b**

Molécule	Conditions	Temps (min)	T°	Puissance (W)
 1a	NH ₂ OH.HCl (5eq) Na ₂ CO ₃ (5eq) EtOH	60	Reflux	300
	NH ₂ OH.HCl (9eq en 40 min) Na ₂ CO ₃ (9eq en 40 min) EtOH	60	Reflux	300
	NH ₂ OH.HCl (10eq en 50min) Na ₂ CO ₃ (10eq en 50min) EtOH	60	Reflux	300
 1b	NH ₂ OH.HCl (5eq) Na ₂ CO ₃ (5eq) EtOH	60	Reflux	300
	NH ₂ OH.HCl (6eq en 30min) Na ₂ CO ₃ (6eq en 30min) EtOH	60	Reflux	300

3. Synthèse de la bis-amidoxime aromatique / aliphatique

12a et des mono-amidoximes analogues 12b,c

La synthèse d'une molécule double donneuse de NO **12a** portant conjointement une fonction amidoxime de type aromatique et une autre de type aliphatique a été envisagée en s'inspirant de la molécule utilisée comme référence : la 4-chlorobenzamidoxime. En effet, il a été projeté de placer la fonction amidoxime aromatique en position *para* d'un groupement donneur d'électrons comme une chaîne alkoxy et la fonction amidoxime aliphatique en bout de chaîne carbonée.

La synthèse de deux autres mono-amidoximes a été proposée en se basant sur le modèle de la bis-amidoxime **12a** présentée précédemment. En effet, l'obtention d'une mono-amidoxime aliphatique **12b** et d'une autre aromatique **12c** permettrait de pouvoir étudier la cinétique et la puissance de libération du NO de chaque type de fonction afin de savoir laquelle des deux est plus performante.

3.1. Synthèse des produits intermédiaires 10a-c par incorporation des différentes chaînes lipophiles

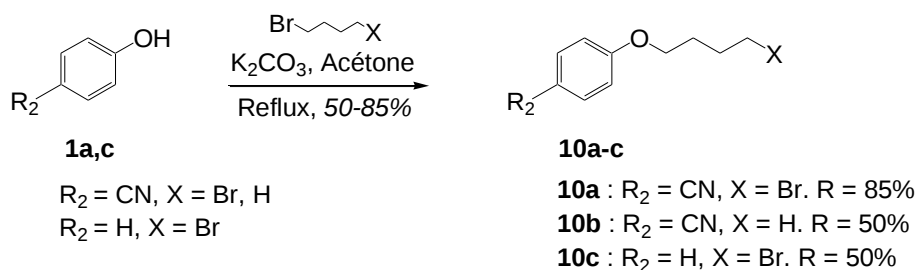


Figure II. 28. Incorporation des chaînes lipophiles pour la synthèse de **10a-c**

L'incorporation de ces chaînes est réalisée selon le protocole d'O-alkylation présenté dans le paragraphe 3.1 du premier chapitre (page 83). Les trois réactions d'ancrage des chaînes lipophiles sont réalisées en présence de carbonate de potassium au reflux de l'acétone. (Figure II.28) Les chaînes carbonées retenues comportent trois atomes de carbone permettant d'augmenter la lipophilie et d'obtenir par la suite des amidoximes dont les logP se situent entre 1 et 5.

Les produits **10a-c** sont obtenus par réaction du 4-hydroxybenzonitrile **1a** ou du phénol **1c** avec des dérivés mono- ou di-bromés. L'attaque du phénate sur le produit de monoalkylation pourrait engendrer la formation de produits secondaires non désirés (dans le

cas de l'utilisation du 1,4-dibromobutane). Afin d'augmenter la sélectivité, un large excès du composé dibromé est utilisé durant ces réactions (respectivement 5 équivalents pour former le composé **10a** et seulement 2,5 équivalents pour le produit **10c** afin de faciliter la purification de ce dernier au détriment du rendement). Pour la synthèse du composé **10b**, un rendement de 50% est obtenu après utilisation de 2,5 équivalents de 2-bromobutane. Vu que le produit utilisé durant cette réaction est un monobromé, l'attaque du phénate sur le produit de monoalkylation est inexistante d'où l'utilisation dès le début de 2,5 équivalents à la place de 5 équivalents, afin d'essayer de réduire l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques.

3.2. Synthèse des produits intermédiaires **11a,b** par substitution des atomes de brome par la fonction nitrile

La synthèse d'une molécule possédant une fonction amidoxime aliphatique nécessite la présence d'une fonction nitrile aliphatique sur la molécule cible. La substitution nucléophile d'un atome de brome aliphatique par un groupement cyano est possible *via* l'utilisation de sels de cyanure sur l'halogénure d'alkyle. Les cyanures les plus utilisés pour la substitution des halogènes aliphatiques sont le cyanure de potassium (KCN) et le cyanure de sodium (NaCN).^{6,7}

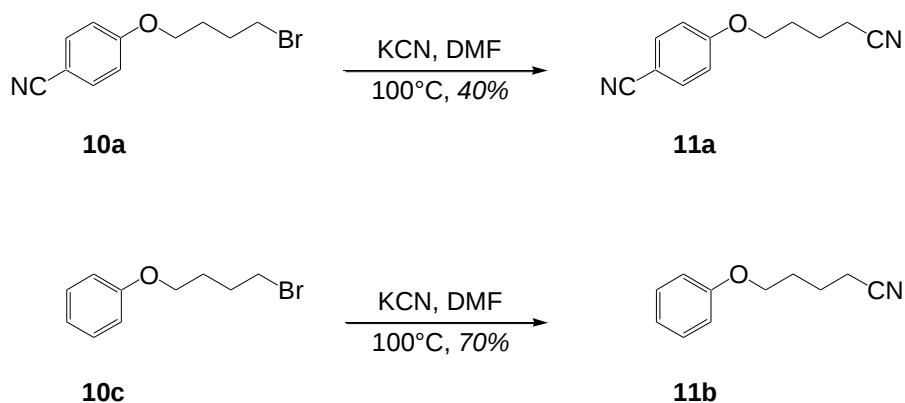


Figure II. 29. Substitution des atomes de brome aliphatiques par le cyanure de potassium pour la synthèse de **11a,b**

Ces réactions sont menées sur les composés précurseurs des amidoximes aliphatiques. Elles sont conduites dans du diméthylformamide porté à 100°C en présence du cyanure de potassium durant 72 heures (Figure II.29). Une différence de réactivité est observée entre les deux produits avec un rendement de 40% pour la molécule **11a** qui possède deux fonctions nitriles contre un rendement de 70% pour la molécule **11b** comportant une seule fonction

nitrile. Cette différence de réactivité entre les composés **10a** et **10c** est surtout visible d'après le suivi de la réaction en chromatographie sur couche mince (CCM) montrant une importante présence du produit de départ **10a** résiduel à la fin de la réaction, ce qui n'était pas le cas de la molécule **10c**.

Les fonctions nitriles sont habituellement détectées par spectroscopie infrarouge (IR-TF) par l'apparition d'une bande de vibration d'élongations caractéristique se situant entre 2300-2200 cm^{-1} et d'intensité généralement importante.⁸ Les spectres obtenus lors de l'analyse des deux molécules synthétisées ci-dessus présentent clairement une bande dans cette région, preuve de la réussite de ces synthèses. Les spectres IR de la molécule **11a** et de la molécule **11b** sont respectivement représentés en bleu et en rose et superposés afin de les comparer (Figure II.30).

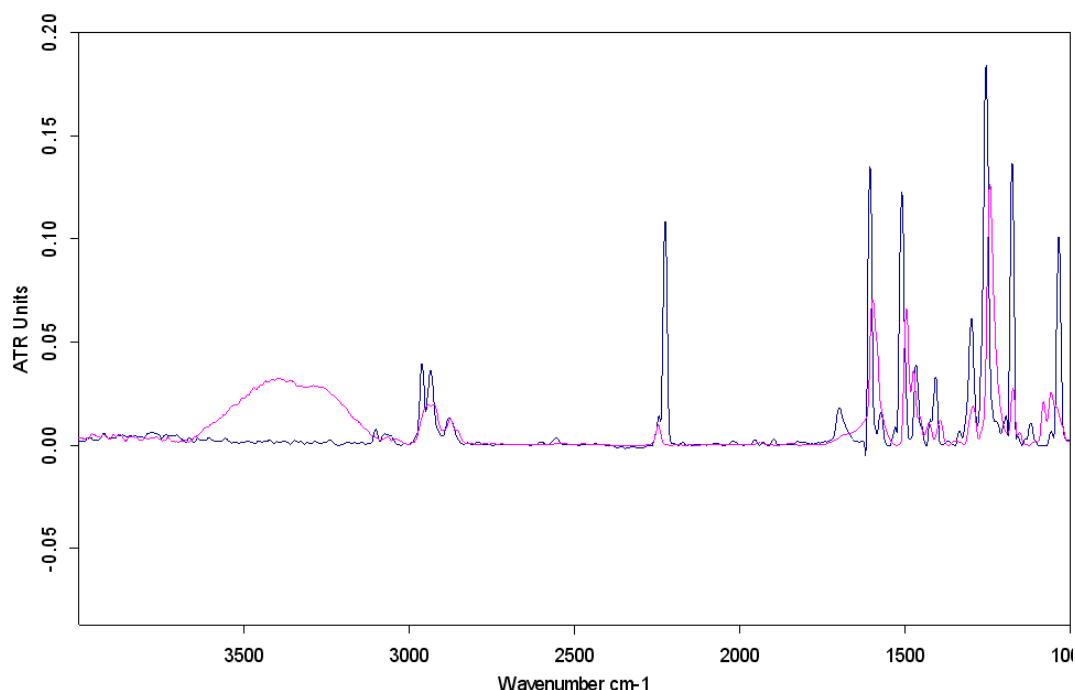


Figure II. 30. Comparaison des spectres IR des molécules **11a** (bleu) et **11b** (rose)

Sur l'agrandissement de la zone d'apparition des bandes correspondant aux groupements nitrile (Figure II.31) et dans le cas de la molécule **11b**, possédant une fonction nitrile aliphatique, seule une bande d'intensité faible apparaît à 2246 cm^{-1} . En revanche, dans le cas de la molécule bis-nitrile **11a** deux bandes sont visibles dans cette région. La première bande située à 2244 cm^{-1} est également d'intensité faible tandis que la seconde est d'intensité forte et est située à 2225 cm^{-1} ; ces deux bandes correspondent aux deux fonctions nitrile portées par la molécule **11a**. La différence d'intensité des deux bandes nitrile peut s'expliquer par la

différence de position de ces deux fonctions sur la molécule étant donné que l'une est aromatique et l'autre aliphatique. Il s'agit d'un effet bathochrome puisque le déplacement de la bande est observé vers les grandes longueurs d'ondes du spectre.

Par conséquent, en se basant sur la comparaison de ces deux spectres, il est possible d'attribuer la bande de faible intensité apparaissant à 2244 cm^{-1} de la molécule **11a** à la fonction nitrile aliphatique alors que la seconde bande très intense peut être due à la vibration de la fonction nitrile aromatique.

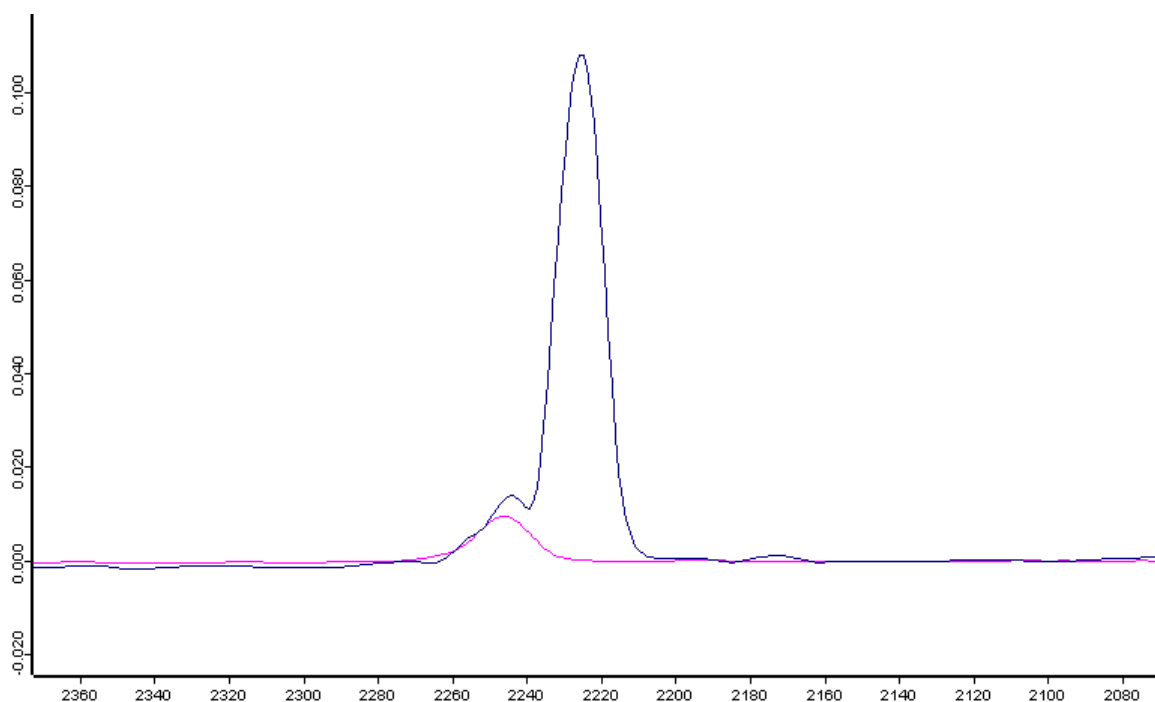


Figure II. 31. Agrandissement de la zone caractéristique du spectre IR des fonctions nitrile de la molécule **11a** (bleu) et **11b** (rose)

La présence des fonctions nitrile sur les deux molécules suite aux réactions de substitution nucléophile est aussi démontrée par analyse par spectroscopie par RMN, et plus particulièrement par analyse des spectres ^{13}C . En effet, le spectre du bis-nitrile **11a**, Figure II.32, montre à 119.9 ppm et 119.8 ppm la présence de deux atomes de carbones quaternaires des deux groupements cyano. Enfin, sur le spectre ^{13}C de la molécule **11b**, portant une unique fonction nitrile aliphatique apparaît également le déplacement chimique du carbone quaternaire correspondant à 120,6 ppm (Figure II.33).

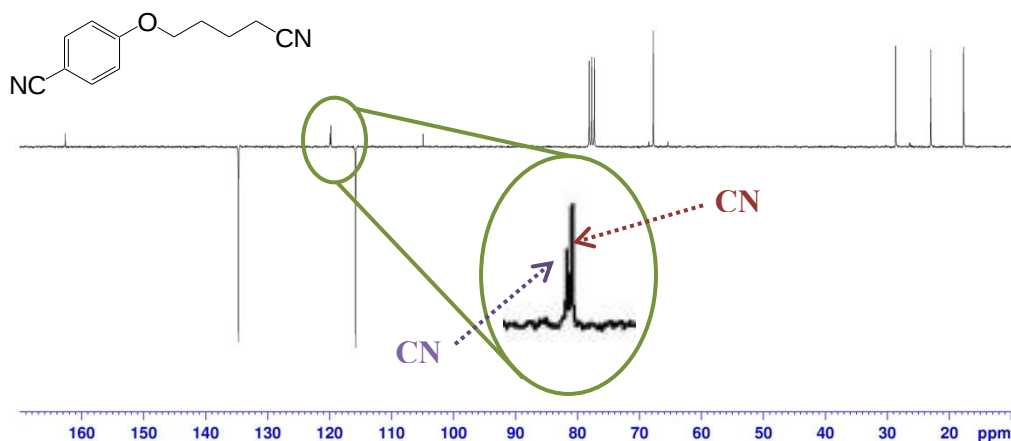


Figure II. 32. Spectre RMN ^{13}C JMOD de **11a** dans le CDCl_3 et un agrandissement de la région des CN

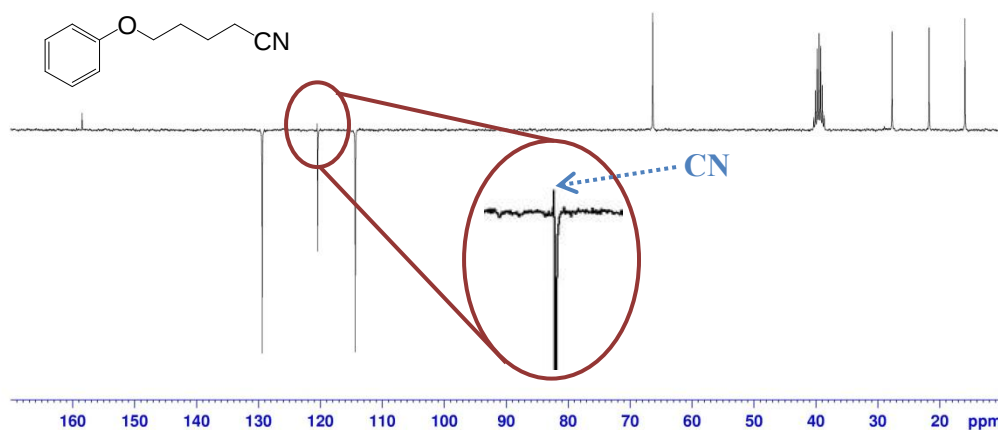
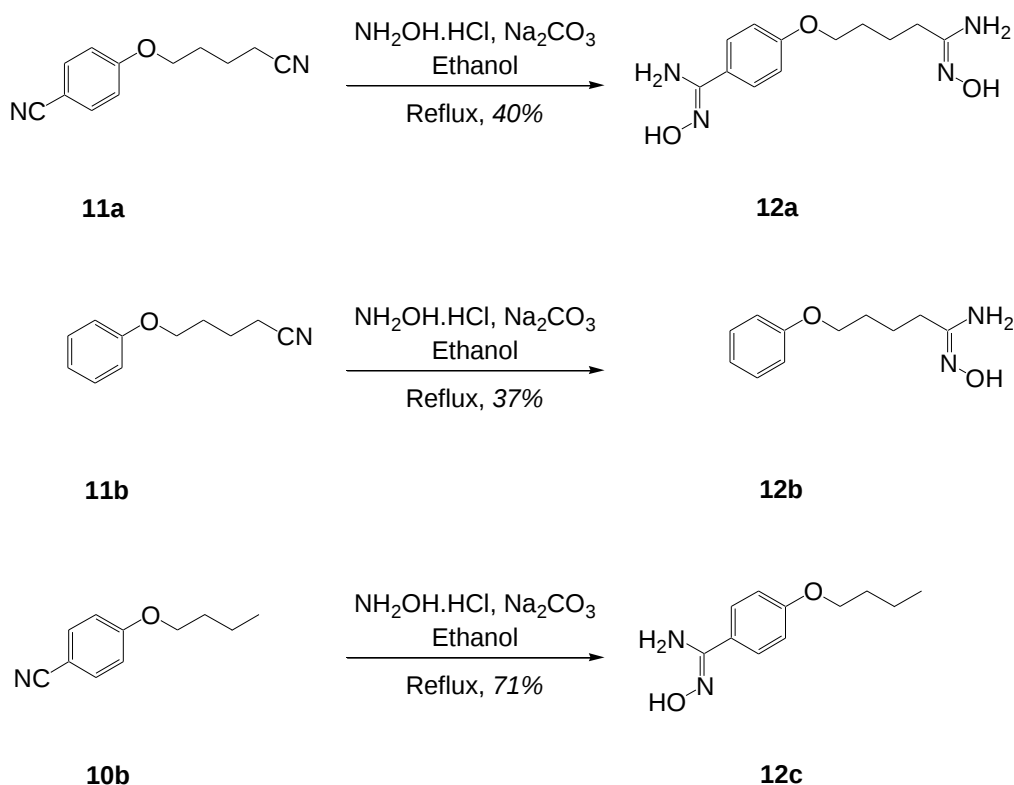


Figure II. 33. Spectre RMN ^{13}C JMOD de **11b** dans du $\text{DMSO}-d_6$ et un agrandissement de la région des CN

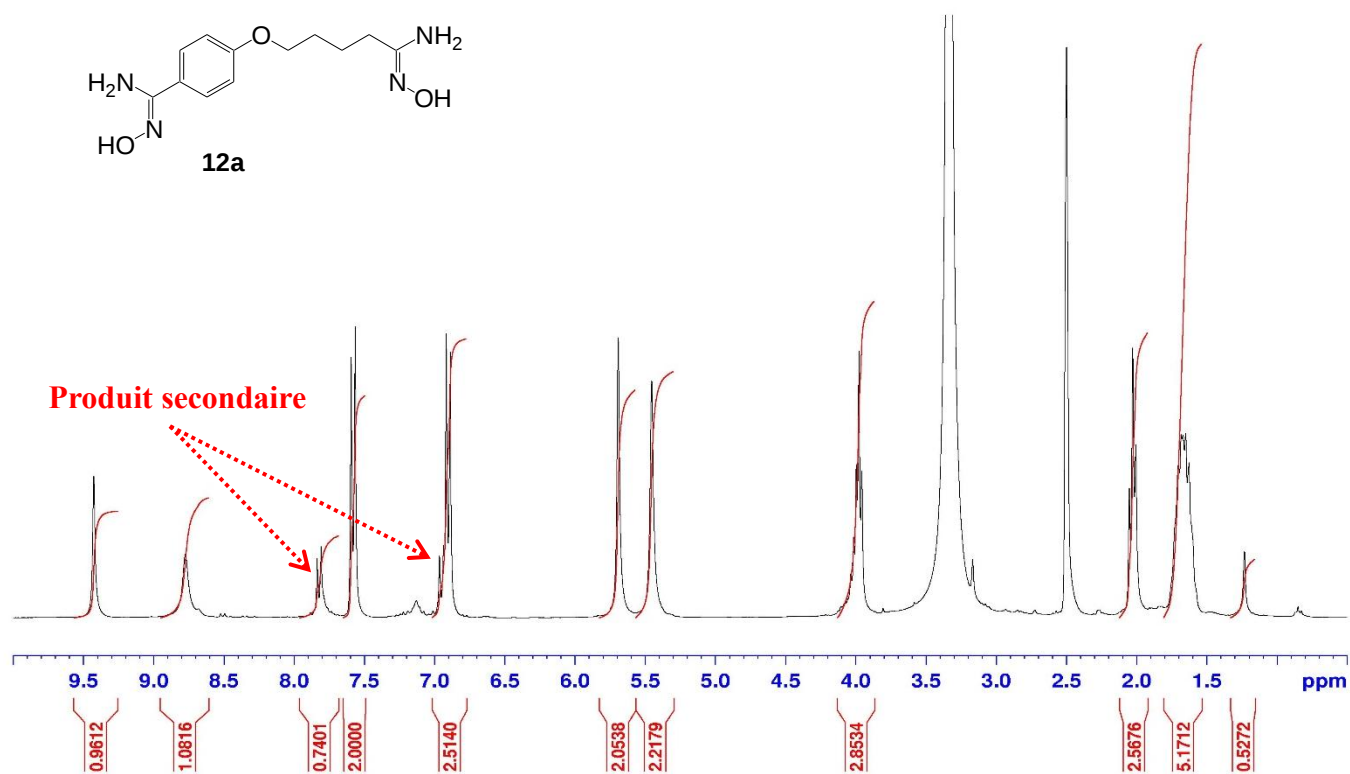
3.3. Synthèse des amidoximes **12a-c**

Dans un premier temps, la synthèse de ces amidoximes est menée selon la méthode II qui était la plus efficace pour la synthèse des mono-amidoximes aromatiques **9a,b** (paragraphe 2.1.). Cependant, lors de sa réalisation, cette méthode s'est montrée moins efficace en termes de rendements et générant une contamination des molécules cibles par un produit secondaire identifié comme étant l'amide. Par conséquent, il a été nécessaire de changer de méthode afin d'optimiser cette synthèse.

3.3.1. Synthèse des amidoximes **12a-c** par la méthode IIFigure II. 34. Schéma de synthèse des amidoximes **12a-c** suivant la méthode II

La bis-amidoxime aromatique / aliphatique **12a** et les mono-amidoximes analogues **12b** et **12c** ont été engagées selon les conditions décrites dans la méthode II qui permettait de générer de façon quasi-quantitative les mono-amidoximes aromatiques, en utilisant le chlorhydrate d'hydroxylamine en présence du carbonate de sodium dans de l'éthanol à reflux. Cette même méthode a permis la synthèse de la nouvelle mono-amidoxime aromatique **12c** avec un bon rendement de 71%. Cependant, la méthode transposée aux deux amidoximes **12a** et **12b**, possédant des fonctions aliphatiques, n'a pas été aussi efficace qu'attendu puisque générant les produits avec de faibles rendements aux alentours de 40% (Figure II.34) même après 72 heures à reflux. Cette différence suggère une difficulté plus prononcée de conversion des nitriles aliphatiques que les nitriles aromatiques, dans le cas des produits de départ **11a,b** utilisés dans cette étude. Outre les faibles rendements, l'analyse des spectres RMN de la bis-amidoxime **12a**, après purification sur colonne chromatographique, a montré une contamination de la bis-amidoxime par un produit secondaire dont les signaux sont visibles surtout dans la région des protons aromatiques (Figure II.35). Les rapports frontaux observés par CCM sont extrêmement proches puisqu'ils ont une valeur de 0,17 pour le produit inconnu et de 0,15 pour l'amidoxime (1:9 méthanol:dichlorométhane). Par conséquent, cette faible

différence de migration lors de l'élution n'a pas permis la séparation sur colonne chromatographique des deux produits. Suivant cette méthode II, un rendement de 40% est obtenu constitué de 29% de la bis-amidoxime **12a** et 11% du produit secondaire inséparable (comme calculé d'après les spectres RMN) dont la structure reste à déterminer.



*Figure II. 35. Spectre RMN ^1H de la bis-amidoxime **12a** synthétisée selon la méthode II*

3.3.2. Identification du produit secondaire de la molécule **12a** : l'amide

L'analyse par SM haute résolution de la molécule **12a** prouve sans équivoque la présence de la bis-amidoxime suite à la détection du rapport m/z à 267,1475 correspondant à $[\text{M}+\text{H}]$. Ce dernier est accompagné d'un autre produit de m/z à 252,1364. Cette différence de 15 pourrait correspondre à la molécule cible possédant une fonction amide $[251,1270+\text{H}]$ en lieu et place d'une fonction amidoxime.

Afin de prouver cette hypothèse, la synthèse du bis-amide a été réalisée (Figure II.36).⁹

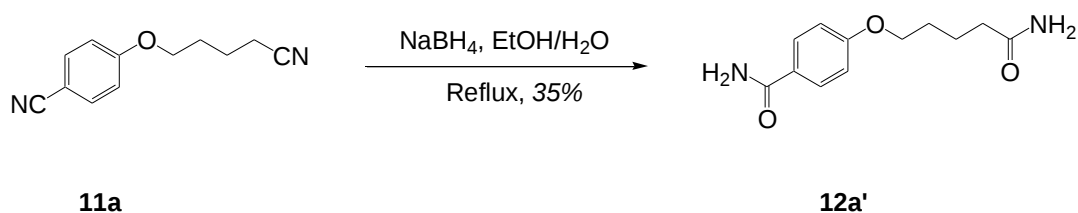


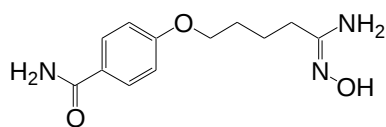
Figure II. 36. Synthèse du bis-amide **12a'** à partir de **11a**

La mise en présence du bis-nitrile **11a** avec du borohydrure de sodium dans un mélange eau / éthanol à reflux a permis la formation du bis-amide désiré **12a'**. Une comparaison des déplacements chimiques des protons aromatiques de la molécule **12a** avec ceux de la molécule **12a'**, est présentée dans le Tableau II.7.

Tableau II. 7. Comparaison des déplacements chimiques des protons aromatiques de **12a** et **12a'** par RMN ¹H dans du DMSO-d₆

Molécule	δ (ppm)	
	2H, H _{ar}	2H, H _{ar}
12a (produit majoritaire)	7,60 – 7,57	6,92 – 6,89
12a (produit secondaire)	7,84 – 7,81	6,97 – 6,94
12a'	7,84 – 7,81	6,97 – 6,94

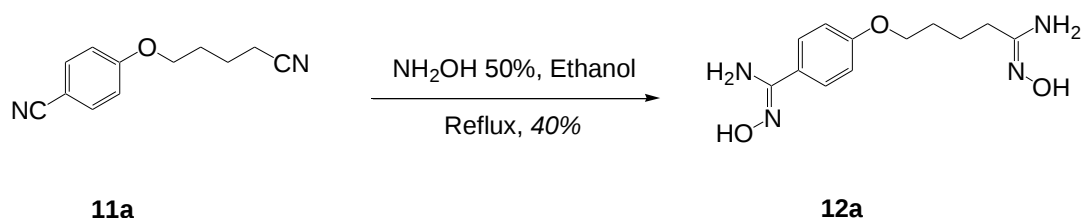
Les déplacements chimiques des protons aromatiques du produit secondaire accompagnant la bis-amidoxime **12a**, sont bien identiques aux déplacements chimiques des protons aromatiques du bis-amide **12a'** synthétisé précédemment. En revanche, les déplacements chimiques du produit majoritaire obtenu lors de la synthèse de la bis-amidoxime **12a** sont différents de ceux du bis-amide **12a'**, ce qui signifie que ce produit secondaire possède une fonction amide aromatique à la place de la fonction amidoxime car les différences sont marquées dans la zone des aromatiques. Ceci est en parfait accord avec la masse identifiée par SM. Il est possible de conclure que le produit secondaire porte une fonction amide très probablement sur le cycle aromatique plutôt que sur la chaîne aliphatique. Il est alors possible de proposer la structure du produit secondaire **12a''** (Figure II.37).

**12a''***Figure II. 37. Structure proposée pour le produit secondaire 12a''*

3.3.3. Optimisation de la méthode de synthèse des amidoximes 12a, b

Dans la littérature, très peu de méthodes décrivent la synthèse d'amidoximes aliphatiques en comparaison à celle d'amidoximes aromatiques. Cependant, un brevet publié en 2009, montre que l'utilisation d'une solution aqueuse d'hydroxylamine pour la synthèse d'amidoximes aliphatiques permet de générer des mono- et bis-amidoximes aliphatiques avec des rendements qui se situent entre 63 et 100%. Cette méthode a donc été appliquée à la synthèse des différentes amidoximes de ce travail afin d'améliorer les résultats précédents.

Le chlorhydrate d'hydroxylamine a été remplacé par une solution aqueuse d'hydroxylamine à 50%. Ces nouvelles conditions ont permis d'obtenir le produit souhaité, après seulement 24 heures de reflux avec un rendement de 40% mais totalement pur (Figure II.38).¹⁰

*Figure II. 38. Synthèse de 12a à l'aide de la solution aqueuse d'hydroxylamine*

Cette méthode a permis une diminution des produits secondaires (amide) comme le prouve le spectre ¹H RMN du composé 12a (Figure II.39). Ceci peut être dû à la diminution du nombre d'équivalents utilisés dans cette méthode et/ou à la diminution du temps de chauffage. Par ailleurs, le produit obtenu, avec une pureté d'au moins 95% (déterminée par CLHP analytique), pourra être engagé dans des études biologiques.

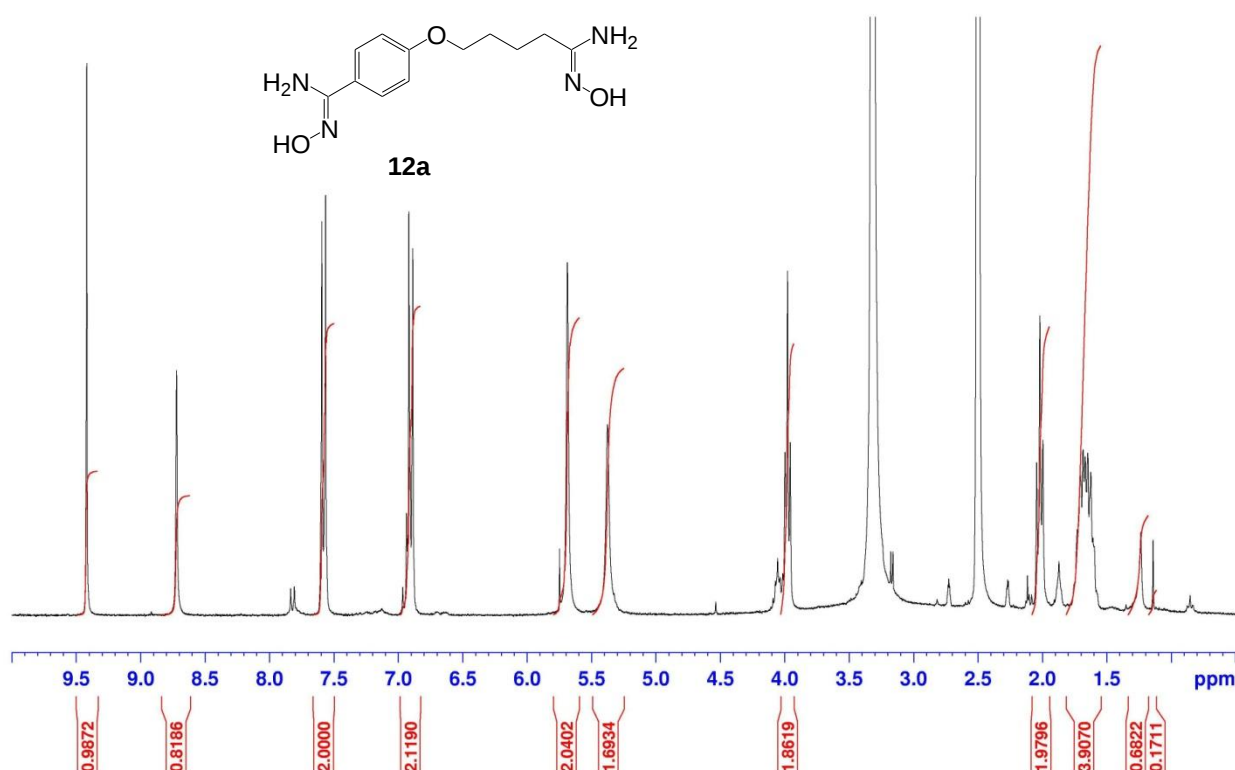


Figure II. 39. Spectre RMN ^1H de la bis-amidoxime **12a** dans le $\text{DMSO-}d_6$ obtenu selon la méthode III

L'efficacité de la méthode III, utilisant une solution aqueuse d'hydroxylamine, comparée à la méthode II, utilisant le chlorhydrate d'hydroxylamine et le carbonate de sodium, est démontrée car elle permet simultanément :

- une amélioration de la pureté du produit obtenu,
- une augmentation du rendement d'amidoxime de 29% (méthode II) à 40% (méthode III),
- une diminution du nombre d'équivalents de réactifs utilisés et
- une forte diminution du temps de réaction : 24 heures au lieu de 72 heures (Tableau II.8).

Tableau II. 8. Tableau comparatif des méthodes II et III pour la synthèse de la bis-amidoxime **12a**

Méthode	Réactifs	Solvant	Conditions	Rendement
II	$\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ ($3 \times 2\text{eq}$) Na_2CO_3 ($3 \times 2\text{eq}$)	EtOH	Reflux, 72h	40% mélange amidoxime et amide (29:11)
III	NH_2OH 50% (2,5eq)	EtOH	Reflux, 24h	40% pur

Suite à ce résultat, la synthèse de la mono-amidoxime aliphatique **12b** a été réalisée selon la méthode III afin d'améliorer le rendement de 37% (méthode II). L'utilisation de la solution

aqueuse d'hydroxylamine a conduit à une amélioration conséquente du rendement (60%) en 24 heures (Figure II.40). Comme précédemment, la quantité d'hydroxylamine utilisée avec cette méthode est réduite de 4 à 1,5 équivalents.

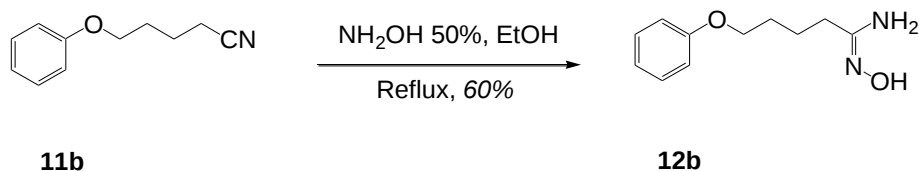


Figure II. 40. Synthèse de la mono-amidoxime aliphatique 12b selon la méthode III

Cette méthode paraît plus efficace pour la synthèse des fonctions amidoximes aliphatiques au vu des rendements plus élevés et de la disparition des produits secondaires parasites.

4. Etapes de synthèse des bis- et poly-amidoximes aromatiques 15a-c

Après la description de la synthèse de potentiels mono- et double-donneurs de NO dans les parties précédentes, il est alors envisagé la synthèse de nouveaux types de double- et multi-donneurs. Effectivement, comme les amidoximes aromatiques ont montré une meilleure efficacité à libérer le NO que les fonctions amidoximes aliphatiques (Partie II, chapitre 3), les nouveaux donneurs visés seront exclusivement à base de fonctions amidoximes aromatiques. Ceci étant surtout visible suite à la comparaison de la libération de NO de la bis-amidoxime **12a** et de la mono-amidoxime aliphatique **12b**.

Trois nouveaux modèles de donneurs de NO sont ciblés dans la suite de ce travail (Figure II.26, page 109) ;

- une première molécule **15a**, formée à partir de deux fonctions amidoxime situées sur deux cycles différents, symétriques et reliés par une chaîne carbonée : ce modèle est fortement inspiré de la molécule **5b** (partie II, chapitre 1) où les deux cycles sont liés par un pont disulfure.
- une deuxième amidoxime **15b**, formée par quatre cycles aromatiques substitués par des fonctions nitrile qui seront ultérieurement transformés en fonctions amidoxime.
- une troisième molécule **15c**, double donneur mais dont les fonctions amidoxime substituent un unique cycle aromatique

4.1. Synthèse des nitriles intermédiaires 13a,b et 14a par substitutions nucléophiles

L'obtention des trois amidoximes cibles de cette série nécessite de synthétiser des produits intermédiaires par substitution nucléophile résultant de l'attaque :

- de deux 4-cyanophénolates sur le 1,2-dibromoéthane créant ainsi une molécule symétrique à deux cycles **13a**.
- de quatre 4-cyanophénolates sur le tétrabromure de pentaerythritol générant une molécule symétrique à quatre cycles **13b**.
- de deux ions cyanures sur le 2,4-dibromo-1-ethoxy-benzène **13c** afin d'obtenir la molécule **14a**.

4.1.1. Synthèse des nitriles 13a,b

Afin d'obtenir les composés possédant deux ou quatre fonctions amidoxime sur des noyaux aromatiques différents et symétriques, la synthèse de deux produits précurseurs a été réalisée.

La molécule **13a** a été générée suivant le protocole décrit antérieurement et utilisé pour toutes les réactions d'*O*-alkylation. Cette réaction s'effectue sur le 4-hydroxybenzonitrile en présence du 1,2-dibromoéthane et de carbonate de potassium dans de l'acétone à reflux (Figure II.41). Contrairement aux synthèses précédentes, le 1,2-dibromoéthane est utilisé comme réactif limitant afin de provoquer une réaction d'*O*-alkylation sur chaque extrémité de la chaîne carbonée. Par conséquent, 0,5 équivalent du produit dibromé sont utilisés pour 1 seul équivalent de 4-hydroxybenzonitrile et a permis d'obtenir le produit désiré avec un rendement de 30% après purification sur colonne chromatographique.

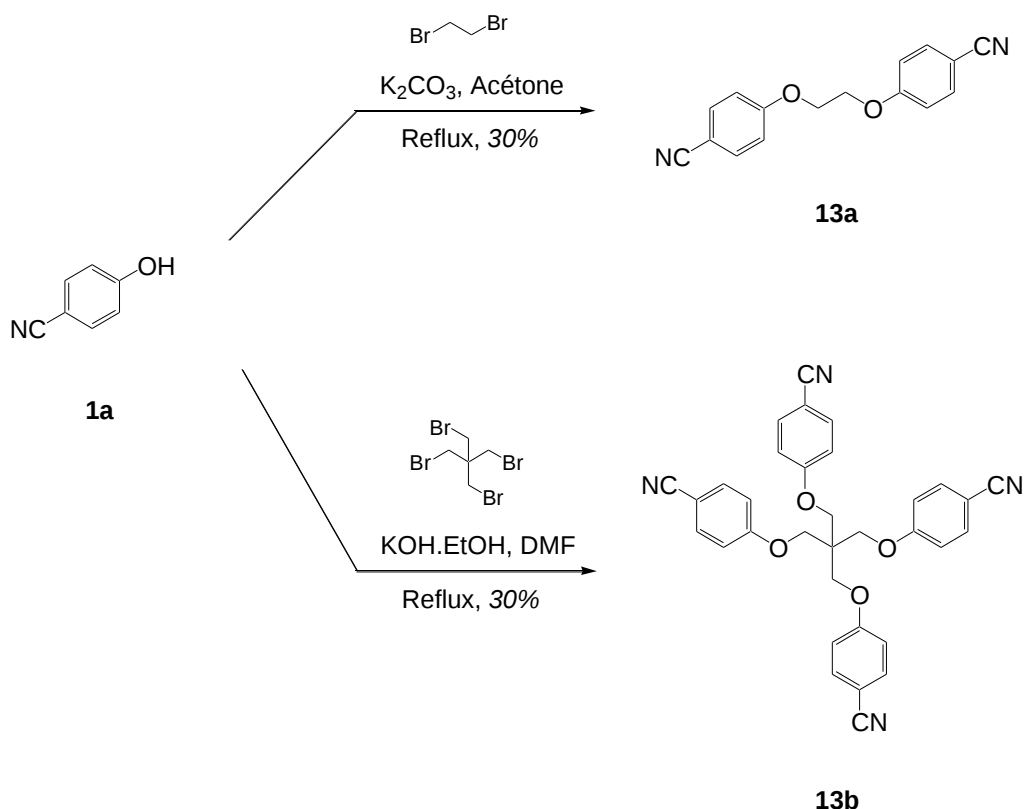


Figure II. 41. Synthèse des composés symétriques **13a,b** par réaction de poly-substitution nucléophile

Selon les mêmes conditions, une absence totale de réactivité a été observée par CCM lors de la mise en jeu du 4-hydroxybenzonitrile **1a** avec du tétrabromure de pentaerythritol. Pour cette raison, un changement de base et de solvant a été envisagé afin de favoriser les réactions de poly-*O*-alkylation.

Le carbonate de potassium a été remplacé par une base plus forte, l'hydroxyde de potassium, qui est capable de déprotoner plus facilement la fonction hydroxyle du 4-hydroxybenzonitrile. En effet, le pKa de l'hydroxyde de potassium, égal à 15,7, est beaucoup plus élevé que le pKa du 4-hydroxybenzonitrile ayant une valeur de 7,97. Cette différence des pKa est considérablement plus prononcée que dans le cas du carbonate de potassium qui a un pKa seulement de 10,33. Cependant, l'utilisation de l'hydroxyde de potassium doit être strictement limitée à 1 équivalent par rapport au 4-hydroxybenzonitrile engagé afin de ne pas provoquer l'hydrolyse de la fonction nitrile.

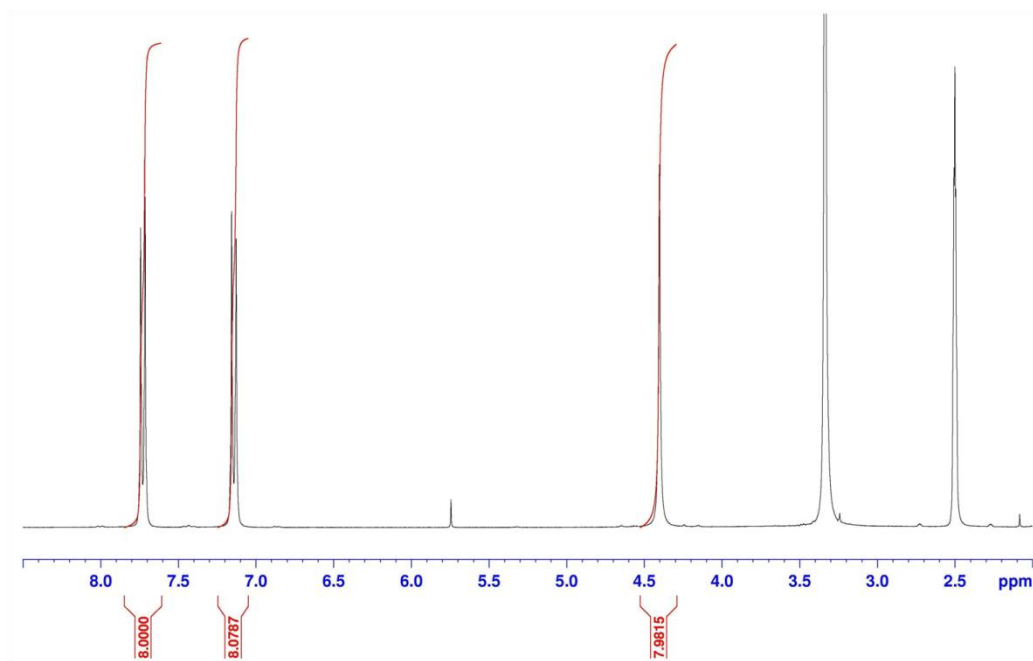
L'hydroxyde de potassium, préparé dans de l'éthanol, est mélangé avec le 4-hydroxybenzonitrile et le tétrabromure dans du diméthylformamide à reflux. L'utilisation du DMF ($T_{\text{eb}}^{\circ}=153^{\circ}\text{C}$) permet la réalisation des manipulations à de plus hautes températures qu'avec l'acétone ($T_{\text{eb}}^{\circ}=56^{\circ}\text{C}$) et donc d'augmenter la vitesse de la réaction. Cette réaction a

produit 30% de la molécule **13b** après purification par colonne chromatographique (Figure II.41).¹¹

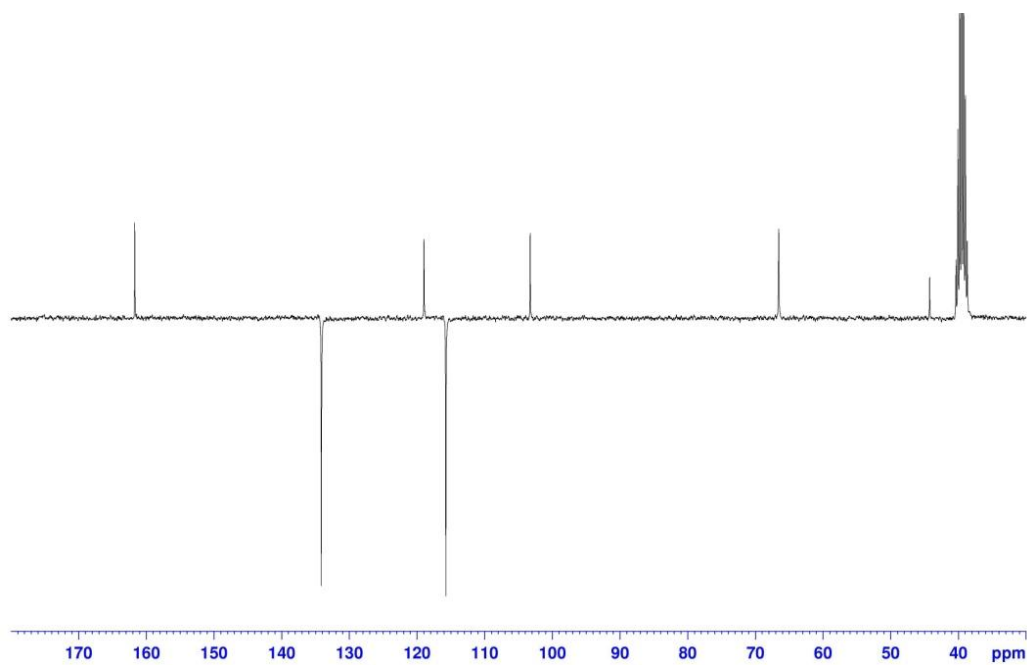
Le *tétra*-nitrile **13b** a ensuite été caractérisé par IR et RMN (Figure II.42). En se basant sur le spectre ¹H de la RMN, la présence d'une molécule symétrique est, dans ce cas, mise en évidence grâce à la détection :

- d'un signal unique correspondant aux huit protons des quatre fonctions CH₂ (4,40 ppm)
- de deux signaux correspondant aux seize protons aromatiques (7,74 – 7,71 ppm et 7,16 – 7,13 ppm) et intégrant chacun huit protons.

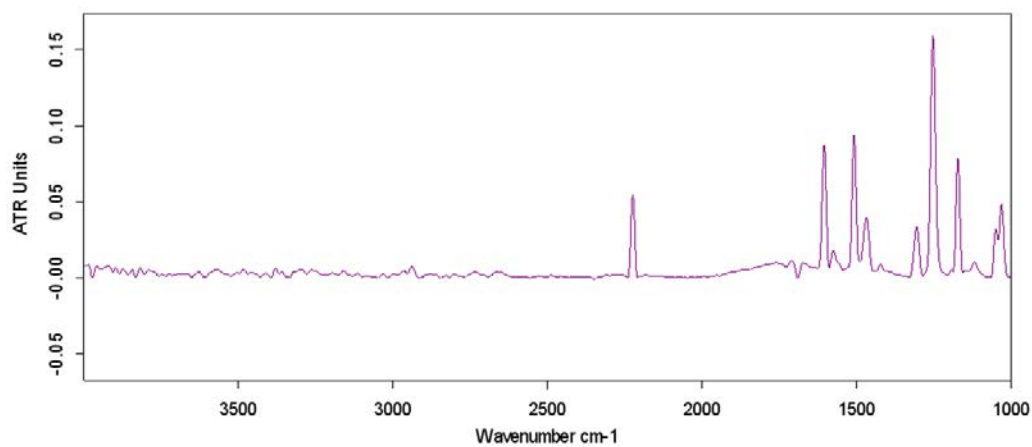
Par ailleurs, suite aux précautions prises lors de la mise au point de la réaction, les fonctions nitrile sont bien restées intactes et n'ont pas été hydrolysées par l'hydroxyde de potassium. Cela a été validé suite à la détection sur les spectres RMN du ¹³C du signal du carbone quaternaire à 119,0 ppm ainsi qu'en spectroscopie IR par une bande d'intensité moyenne à 2223 cm⁻¹ correspondant à la zone des fonctions nitrile.



(a) Spectre RMN ^1H de la molécule **13b** dans du CDCl_3



(b) Spectre RMN ^{13}C de la molécule **13b** dans du CDCl_3



(c) Spectre IR de la molécule **13b**

Figure II. 42. Spectres IR et RMN (^1H et ^{13}C) de la molécule **13b**

4.1.2. Synthèse du produit intermédiaire 14a

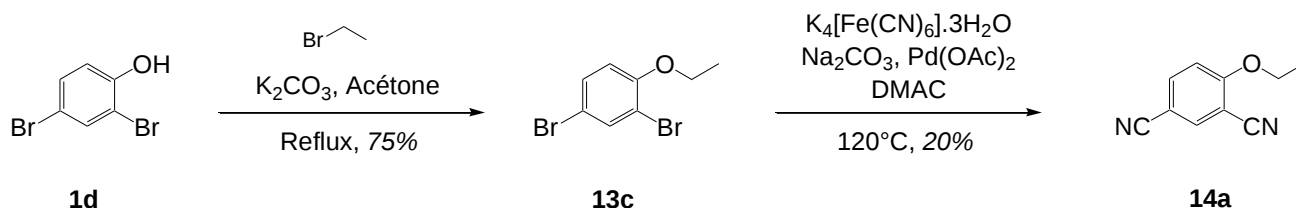


Figure II. 43. Synthèse du produit précurseur **14a** obtenu par substitution nucléophile aromatique

La synthèse de ce produit précurseur possédant des fonctions nitrile est réalisée en deux étapes : tout d'abord l'addition d'une courte chaîne lipophile sur la fonction hydroxyle de la molécule **1d** afin d'augmenter la lipophilie de la molécule puis la substitution nucléophile aromatique des deux atomes de brome par deux fonctions nitriles.

La première étape suit le protocole utilisé précédemment pour l'addition de toutes les chaînes carbonées et bromées : 2,5 équivalents du bromoéthane sont ajoutés au 2,4-dibromophénol en présence du carbonate de potassium dans l'acétone à reflux. Cette réaction a généré 75% du produit **13c** pur et utilisable pour la prochaine étape (Figure II.43).

L'étape suivante est une substitution nucléophile aromatique d'un atome d'halogène qui nécessite des conditions bien particulières. La substitution nucléophile aromatique ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) est une réaction durant laquelle un groupement attracteur d'électrons, qui se trouve sur un noyau aromatique, est substitué par un groupement nucléophile. Cette réaction est activée par la présence d'un autre groupement attracteur d'électrons en position *para* ou *ortho* du groupement à substituer. Normalement, une base est utilisée pour la catalyse de ce type de réaction. Selon la littérature, la substitution nucléophile aromatique d'un halogène par une fonction nitrile est possible en utilisant différents réactifs comprenant des ions cyanures. La réaction de Rosenmund-von Braun est utilisée pour ce type de synthèse en utilisant des quantités stœchiométriques de cyanure de cuivre dans un solvant polaire ayant une température d'ébullition élevée.^{12,13} Cette réaction est de moins en moins utilisée pour cause de toxicité du cyanure de cuivre ainsi que pour le caractère polluant de son traitement post-réaction. D'autres méthodes plus récentes sont actuellement utilisées et se basent sur la présence de catalyseurs comme le nickel, le palladium ou le cuivre.¹⁴ Ces catalyseurs peuvent être utilisés en présence de cyanures alcalins tels que le cyanure de potassium¹⁵, le cyanure de sodium¹⁶ ou encore plus récemment le ferricyanure de potassium. Contrairement aux autres composés chimiques cités précédemment, ce dernier est une source non-toxique de cyanure.

Différents halogénures présents sur des cycles aromatiques ont été substitués par des fonctions nitriles en utilisant le ferricyanure de potassium avec du palladium sous chauffage. En effet, les synthèses menées par Weissman *et al.* sur plusieurs dérivés halogénés aromatiques, dans du diméthylacétamide avec ajout de carbonate de sodium à 120°C, se sont avérées efficaces avec des rendements compris entre 83 et 96%.¹⁷ Une autre série de synthèse utilisant les mêmes réactifs mais dans du DMF à 85-90°C et en remplaçant le carbonate de sodium par du phosphate tripotassique a permis l'obtention des nitriles correspondants avec des rendements de 21 à 98% .¹⁸

Dans ce travail, le produit **14a** a été synthétisé en utilisant les conditions de Weissman *et al.* à partir du produit **13c**. Cependant, cette réaction ne conduit au produit recherché qu'avec un rendement de 20%. Un suivi de la réaction sur CCM montre une faible réactivité donc une faible conversion du produit de départ **13c** même après 72 heures de chauffage.

Le spectre infrarouge de la molécule **14a** (Figure II.44) montre la présence du nitrile par une bande d'intensité moyenne à 2235 cm⁻¹.

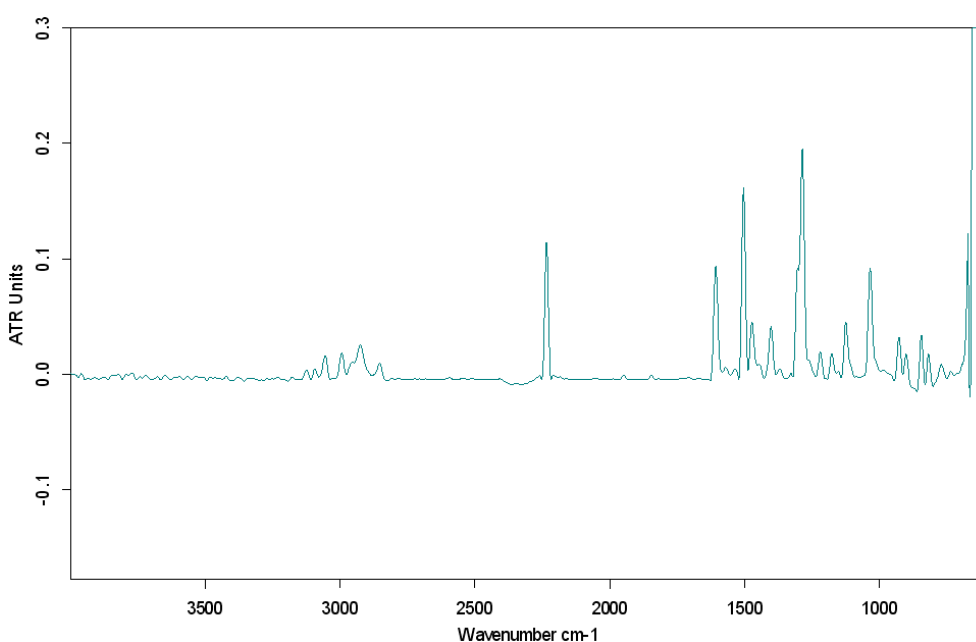


Figure II. 44. Spectre IR de la molécule **14a** montrant la présence des fonctions nitrile

4.2. Synthèse des bis- et poly-amidoximes 15a-c

L'élaboration d'une dernière série d'amidoximes (bis- et poly-amidoximes aromatiques) a été envisagée. La synthèse de chaque molécule a été réalisée selon la méthode III.

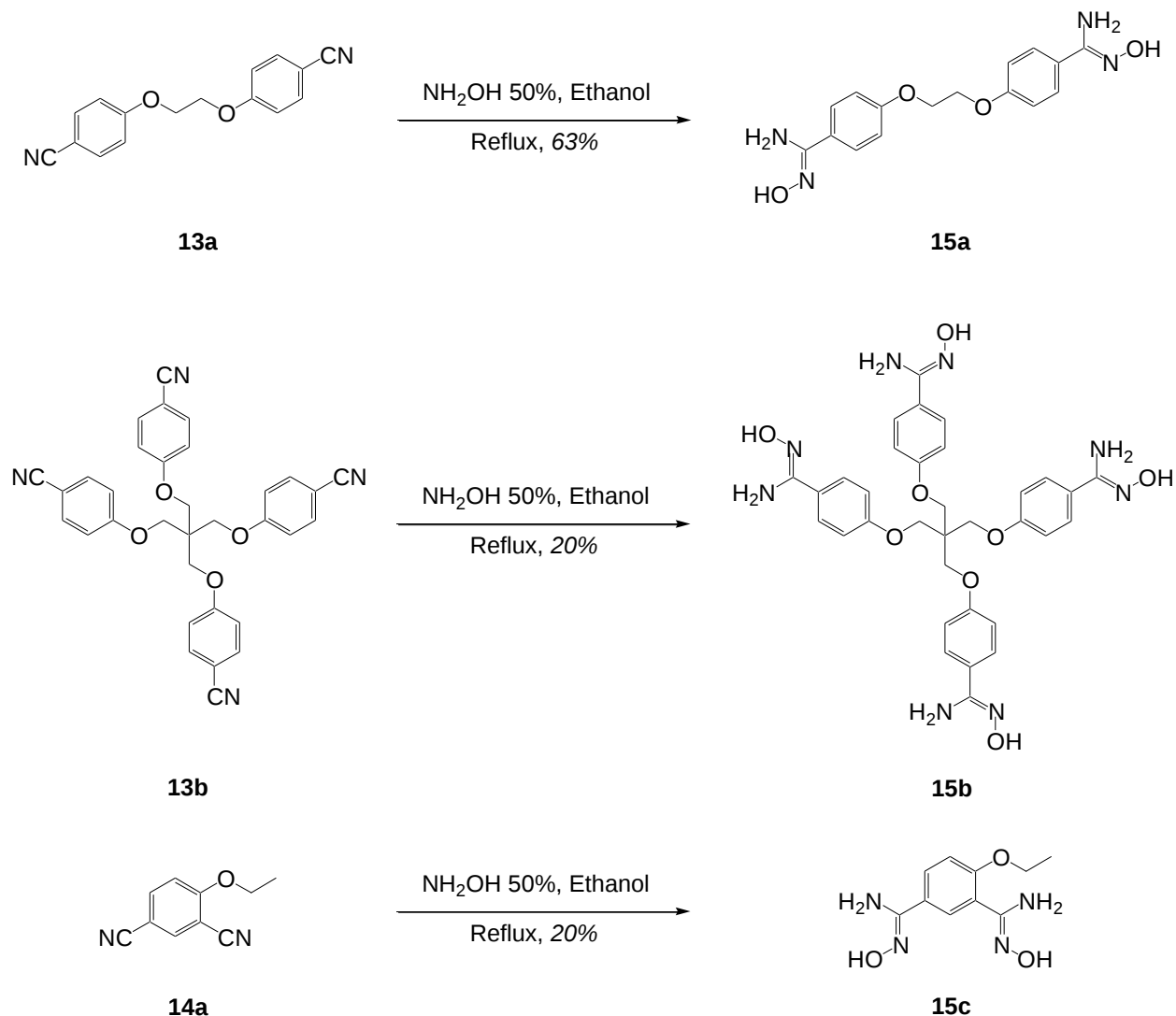


Figure II. 45. Synthèse des bis- et poly-amidoximes 15a-c

L'utilisation d'une solution aqueuse d'hydroxylamine dans de l'éthanol à reflux a permis de générer les trois molécules cibles (Figure II.45). La bis-amidoxime aromatique **15a**, présentant ses fonctions sur deux cycles différents, a été synthétisée avec un bon rendement (63%). Par contre, la poly-amidoxime **15b** et la bis-amidoxime **15c** ont été obtenues avec des rendements plus faibles (20%). Il est très probable que l'encombrement stérique joue un rôle néfaste lors de la synthèse de **15c** ce qui pourrait expliquer ce faible rendement. Durant la synthèse de **15b**, la conversion des quatre fonctions nitriles en amidoximes n'était pas totale

généralisant ainsi des produits secondaires portant en même temps des fonctions nitriles et des fonctions amidoximes.

Toutes les molécules obtenues ont été purifiées sur colonne chromatographique et analysées par RMN, IR et SM haute résolution.

4.3. Caractérisation des amidoximes 15a-c et analyse des résultats

Les trois spectres RMN ^1H des molécules obtenues **15a-c** montrent des signaux inattendus supplémentaires et visibles principalement dans la zone des protons aromatiques (Figure II.46).

Ces résultats montrent la présence de produits secondaires qui n'ont pas pu être séparés lors de purification par chromatographie sur colonne. Deux hypothèses se posent sur la nature de ces produits :

Hypothèse 1 : Les produits secondaires sont des isomères des fonctions amidoxime étant donné leurs structures probablement très proches. Comme décrit lors de l'étude bibliographique, certains travaux ont démontré la présence des *Z*-aminonitrone et des *E*-amidoxime en mélange avec la *Z*-amidoxime.

Hypothèse 2 : Les produits secondaires minoritaires observés sont des molécules comportant des fonctions amide en lieu et place d'une ou plusieurs fonctions amidoxime. En effet, la présence en faible quantité de ces amides avait été précédemment observée, lors de l'utilisation de la méthode II pour la synthèse de la molécule **12a** avec une importante amélioration lors de l'utilisation de la méthode III. Cependant, ceci ne permet pas d'exclure la possible présence d'amides lors de l'utilisation de la méthode III pour la synthèse des amidoximes **15a-c**.

Les parties suivantes seront consacrées à trouver des arguments valables afin de valider une seule de ces deux hypothèses.

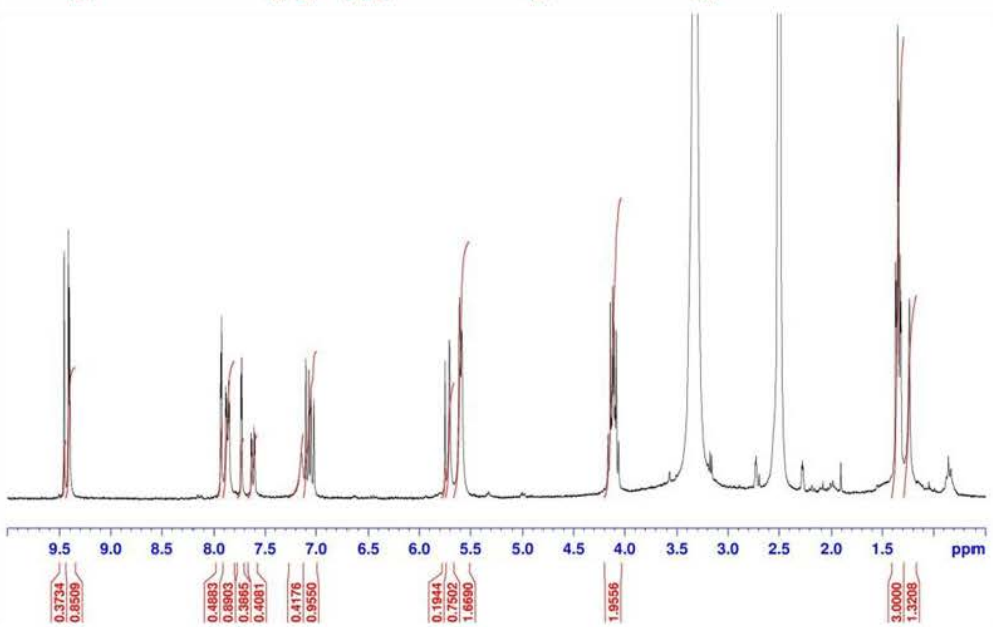
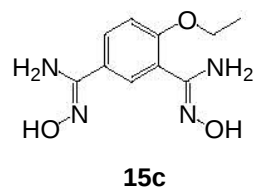
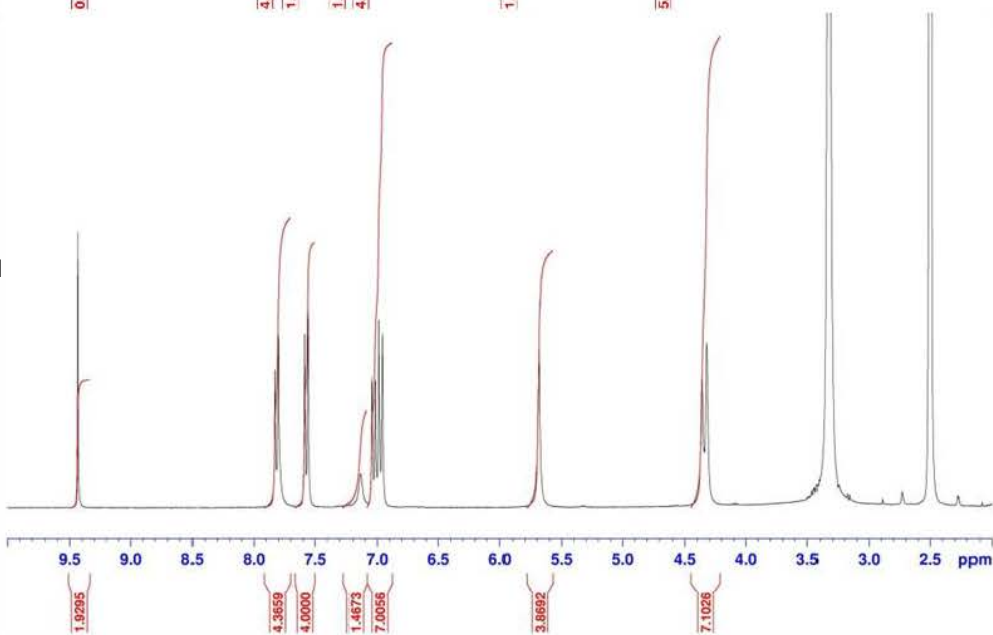
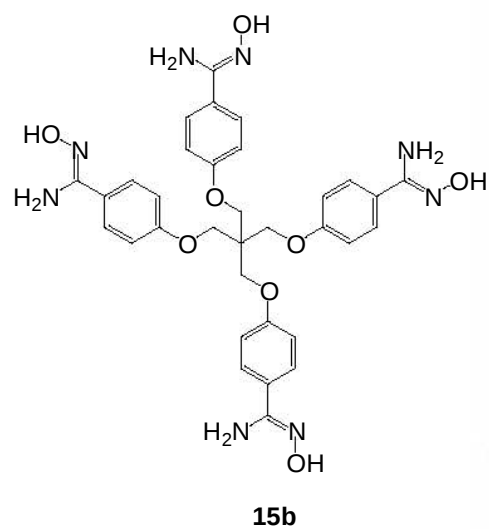
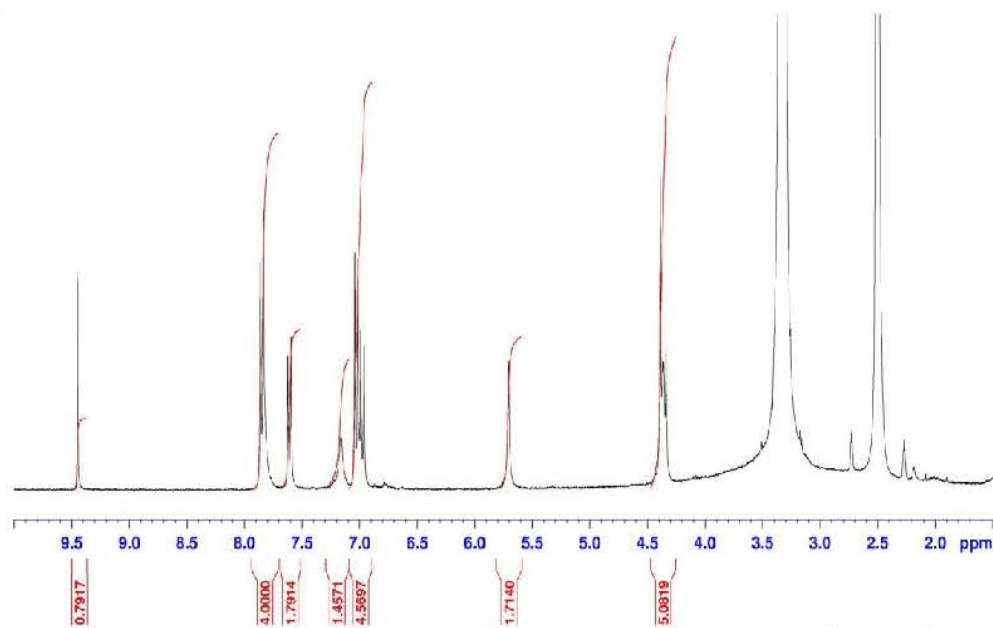
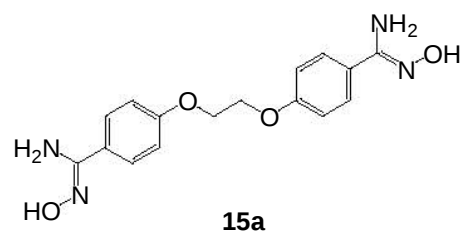


Figure II. 46. Spectres RMN ¹H des amidoximes **15a-c** dans le DMSO-*d*₆

4.3.1. Hypothèse 1 : présence d'isomérisation

Cette étude est menée uniquement sur la molécule **15c** avec l'hypothèse que les trois produits secondaires obtenus après chaque synthèse sont de même nature, ce qui est très probable étant donné la similitude entre les spectres RMN de ces produits. La molécule **15c** a été sélectionnée car les signaux du produit majoritaire et ceux du produit secondaire minoritaire y sont clairement différenciés. Dans ce travail et en accord avec la littérature, il est important de noter que toutes les amidoximes ont été considérées majoritairement sous leur forme *Z*.

Tout d'abord, une première analyse du produit **15c** a été effectuée par CLHP équipée avec un détecteur UV sur une colonne analytique de type RP-C18 en utilisant un gradient d'élution (Tableau II.9) de deux solvants : solvant A= CH₃CN + 0,1% TFA et solvant B= H₂O + 0,1% TFA. Deux pics distincts apparaissent sur le chromatogramme à 8,3 et 10,3 minutes. Étant donné que la phase stationnaire utilisée est achirale, les seuls isomères séparables sont les diastéréoisomères.¹⁹ Ceci signifie que le produit secondaire pourrait correspondre à l'*E*-amidoxime et sinon à un autre produit non-isomère.

Tableau II. 9. Conditions d'élution sur la CLHP du produit 15c

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	5	95
20	50	50
25	50	50
30	5	95

Afin de conclure sur l'éventuelle présence du diastéréoisomère, une analyse par RMN ¹H de la variation des déplacements chimiques lors d'une montée en température est réalisée. Sur la Figure II.47, il est possible de remarquer que le gradient de température, allant de 30°C à 80°C par palier de 5°C, n'affecte pas les déplacements chimiques : aucune coalescence des signaux n'est observée. Ceci est particulièrement visible sur les déplacements chimiques des protons aromatiques, situés entre 7,0 et 8,0 ppm, qui n'ont subi aucun changement. Par conséquent, cette étude a permis de rejeter l'hypothèse de la présence d'isomères dans l'échantillon. L'hypothèse 2 concernant la présence d'un produit non-isomère des amidoximes est donc privilégiée.

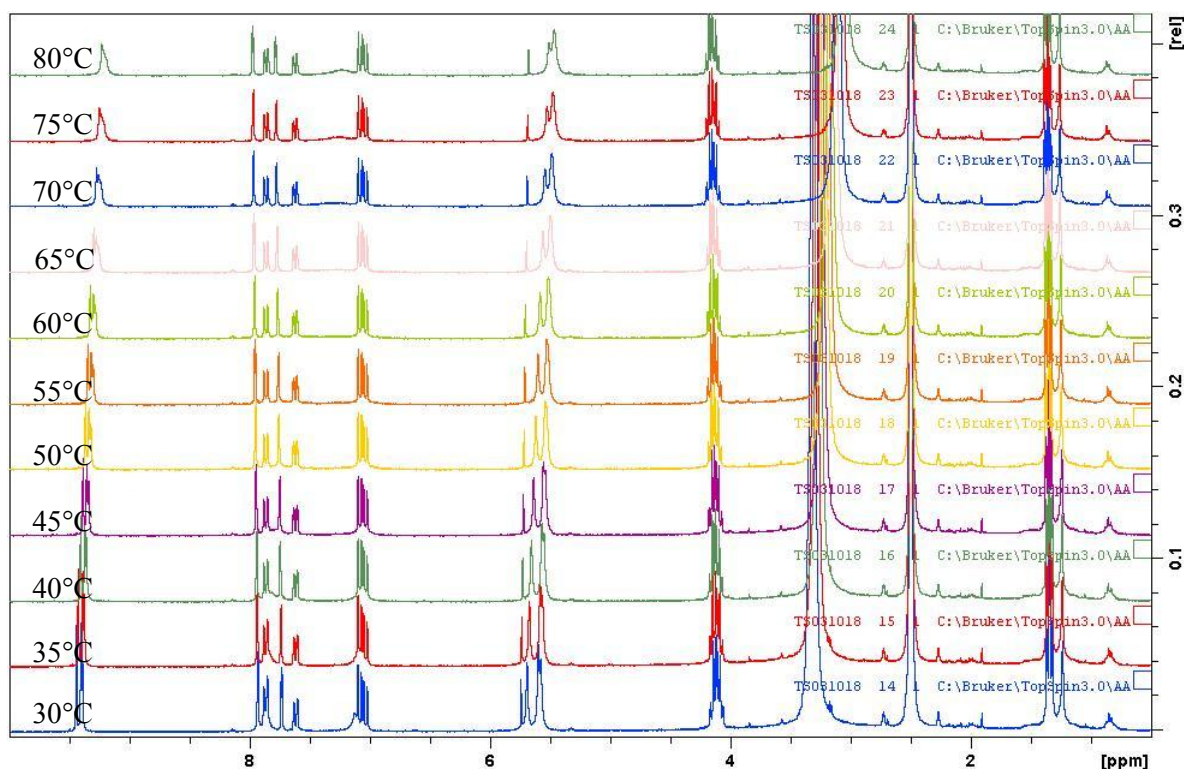


Figure II. 47. Montée en température et dépendance des déplacements chimiques en RMN ^1H de **15c**

4.3.2. Hypothèse 2 : présence des fonctions amides

Suite à ces premiers constats, il est maintenant nécessaire de déterminer la structure du produit secondaire issu de cette réaction. En se basant sur les résultats obtenus lors de la synthèse de la bis-amidoxime **12a** selon la méthode II, la première piste à explorer reste à prouver ou non la présence d'une ou de plusieurs fonctions amide en lieu et place des fonctions amidoxime, et cela même si l'utilisation de la méthode III avait permis précédemment d'éliminer la quasi-totalité de ces composés.

Afin de détecter les produits secondaires présents dans les différents mélanges, une analyse par spectrométrie de masse haute résolution des échantillons des trois molécules **15a-c** a semblé être pertinente.

Tableau II. 10. Rapport m/z des molécules **15a-c** mesurés par SM haute résolution

Molécule	Masse exacte	m/z [M+H]
15a	330,1328	331,1373
15b	672,2656	673,2661
15c	238,1066	239,1177

Les spectres de masse ainsi obtenus confirment bien la présence de pics moléculaires correspondants aux amidoximes ciblées (Tableau II.10). Ces résultats permettent ainsi de valider l'obtention des molécules **15a-c**. En revanche, il est intéressant de souligner la présence dans chaque échantillon de signaux possédant des rapports $m/z = [M-15]$ (Figure II.48). Comme constaté précédemment, cette différence de 15 peut correspondre à la présence d'une fonction amide à la place d'une fonction amidoxime. D'autre part, l'analyse du spectre de la poly-amidoxime **15b** montre la présence de trois pics possédant des rapports m/z de $[M-15]$, $[M-30]$ et $[M-45]$. Cette différence, multiple de 15, peut être due à la présence simultanée de trois produits différents possédant chacun une, deux ou trois fonctions amide.

Les analyses effectuées sur les bis-amidoximes **15a** et **15c** montrent la présence d'un unique produit secondaire possédant conjointement une seule fonction amide (en position *ortho* ou *para*) et une fonction amidoxime.

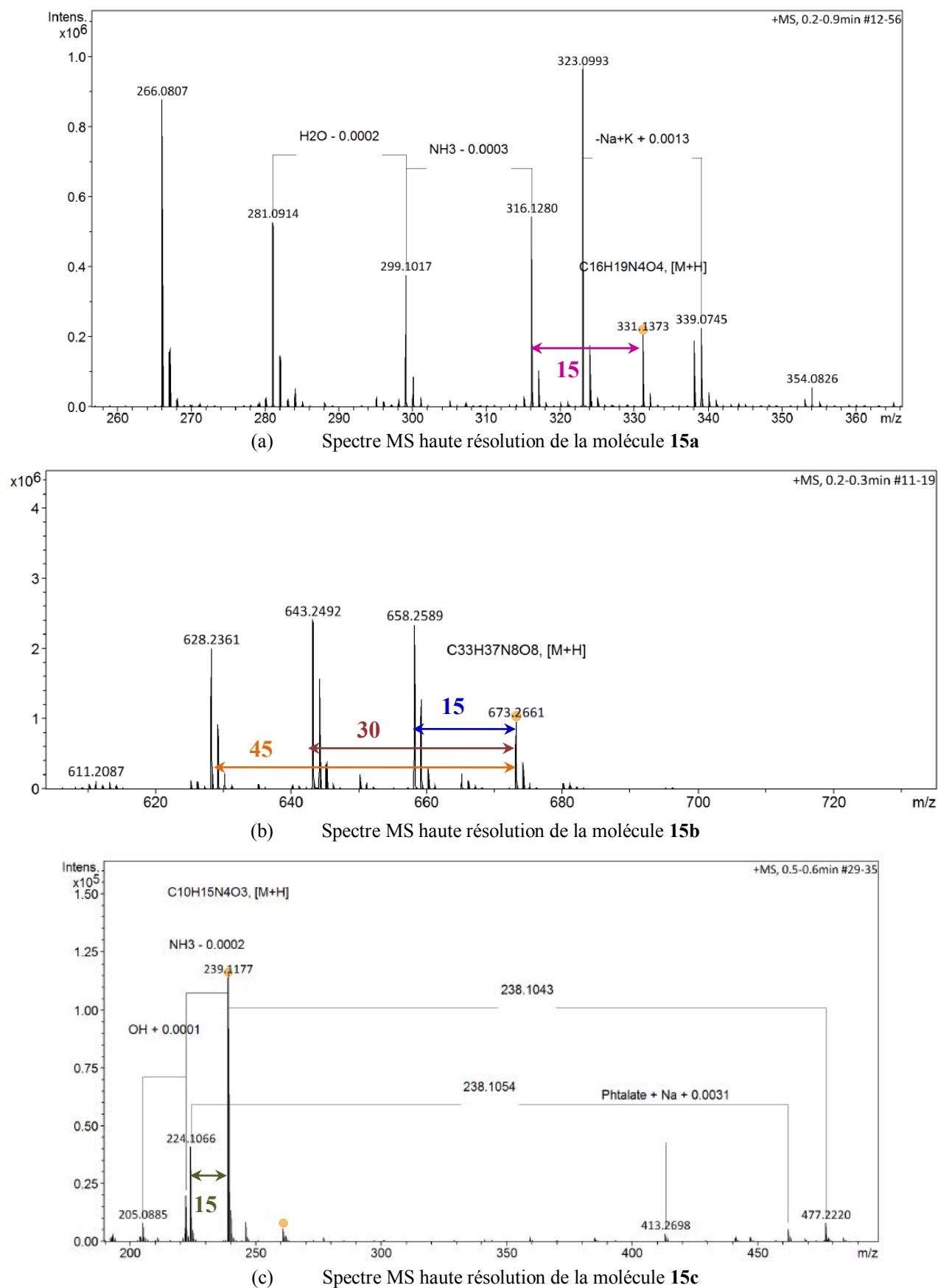


Figure II. 48. Spectres SM haute résolution des amidoximes **15a-c**

4.3.3. Mécanisme de la formation du produit secondaire : l'amide

4.3.3.1. Explication du mécanisme selon la littérature

Dans la littérature, la formation non désirée d'amides lors de la synthèse d'amidoximes à partir des nitriles correspondants est très faiblement discutée. En 1969, Stephenson *et al.* étaient les premiers à indiquer la présence de ces produits secondaires lors de la synthèse d'amidoximes aromatiques.²⁰ Il est décrit que la réaction du composé nitrile avec de l'hydroxylamine dans du méthanol ou de l'éthanol (solvants anhydres ou aqueux) à température ambiante avait provoqué une contamination des amidoximes souhaitées par des amides. Les auteurs ont enfin pu conclure que la présence de ces fonctions amide n'était pas due à l'hydrolyse de l'amidoxime mais à l'attaque nucléophile de l'atome de carbone électropositif de la fonction nitrile par l'hydroxylamine formant un produit intermédiaire **2** (Figure II.49). Une seconde attaque de ce produit par l'excès d'hydroxylamine dans le milieu, engendrerait ensuite la formation d'amide(s).²¹ Les auteurs ne donnent aucune précision sur les éventuels facteurs favorisant cette attaque et aboutissant à la formation de ces fonctions amide. Cependant, il semblerait que la présence de groupements inductifs accepteurs d'électrons -I sur le benzène, en position *ortho* ou *para*, faciliterait cette réaction secondaire. En effet, l'effet inductif de ces groupements rend le carbone du nitrile plus électropositif, ce qui induit son attaque par l'élément le plus électronégatif de l'hydroxylamine qui est l'oxygène.

Une deuxième étude, menée en 2009 par Srivastava *et al.*, a démontré à nouveau la présence d'amides lors des différents essais d'obtention d'arylamidoximes. Durant ces synthèses, une solution aqueuse d'hydroxylamine et de carbonate de sodium est ajoutée au nitrile correspondant solubilisé dans du méthanol.^{22,23} Après agitation à reflux, les amidoximes formées se retrouvent en mélange avec les amides. Les auteurs ont proposé un probable mécanisme expliquant la formation de ces composés non désirés (Figure II.49).²⁴ Selon leur étude, l'hydroxylamine est capable d'attaquer l'atome de carbone du nitrile *via* l'atome d'azote ou l'atome d'oxygène. La première attaque *via* l'atome d'azote et qui n'est pas celle favorisée selon le principe de la théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases, ou théorie de Pearson), permet cependant la formation de l'amidoxime souhaitée.

Selon la théorie HSAB qui n'est rien d'autre que la version moderne du principe d'Empédocle : "ce qui se ressemble, s'assemble", une base dure réagit plus vite avec un acide

dur alors qu'une base molle réagit plus rapidement avec un acide mou.²⁵ Partant de ce principe, l'attaque de l'atome d'oxygène de l'hydroxylamine (base dure) est favorisée sur l'atome de carbone du nitrile qui est un acide plutôt dur. Ceci donne le produit intermédiaire **2** qui après prototropie génère le produit intermédiaire **3**. Ce dernier est un acide plus dur et permet la formation d'un cycle à trois atomes **5** suite à l'attaque de l'atome de carbone par le doublet non liant de l'atome d'azote primaire suivie d'une prototropie.²⁴

Le cycle formé, peu stable, peut subir deux coupures :

- A température ambiante, la coupure de la liaison entre les atomes de carbone et d'oxygène est la plus favorable et permet la formation du produit **7**, tautomère de l'amidoxime. En effet, la liaison entre l'atome de carbone ($Q_C = 0,66$) et l'atome d'oxygène ($Q_O = -0,24$) est de plus faible énergie que la liaison entre l'atome de carbone et l'atome d'azote ($Q_N = -0,51$). Cette coupure conduit à l'intermédiaire **6** qui, après prototropie, génère le tautomère iminohydroxylamine **7** qui, n'étant pas le plus stable énergétiquement, se transforme spontanément en sa forme amidoxime la plus stable **8**.
- A haute température, l'apport en énergie permet la coupure de la liaison entre les atomes de carbone et d'oxygène ou entre les atomes de carbone et d'azote. L'équilibre entre les produits **3** et **5** est déplacé vers **3**. La réaction de ce dernier avec l'hydroxylamine permet la coupure de la liaison O-N et donc la formation du tautomère de l'amide **10** puis de l'amide **11**.

Un autre mécanisme possible est l'hydrolyse de la fonction amidoxime suite à la présence d'eau ou même des traces dans le milieu, se transformant ainsi en fonction amide.

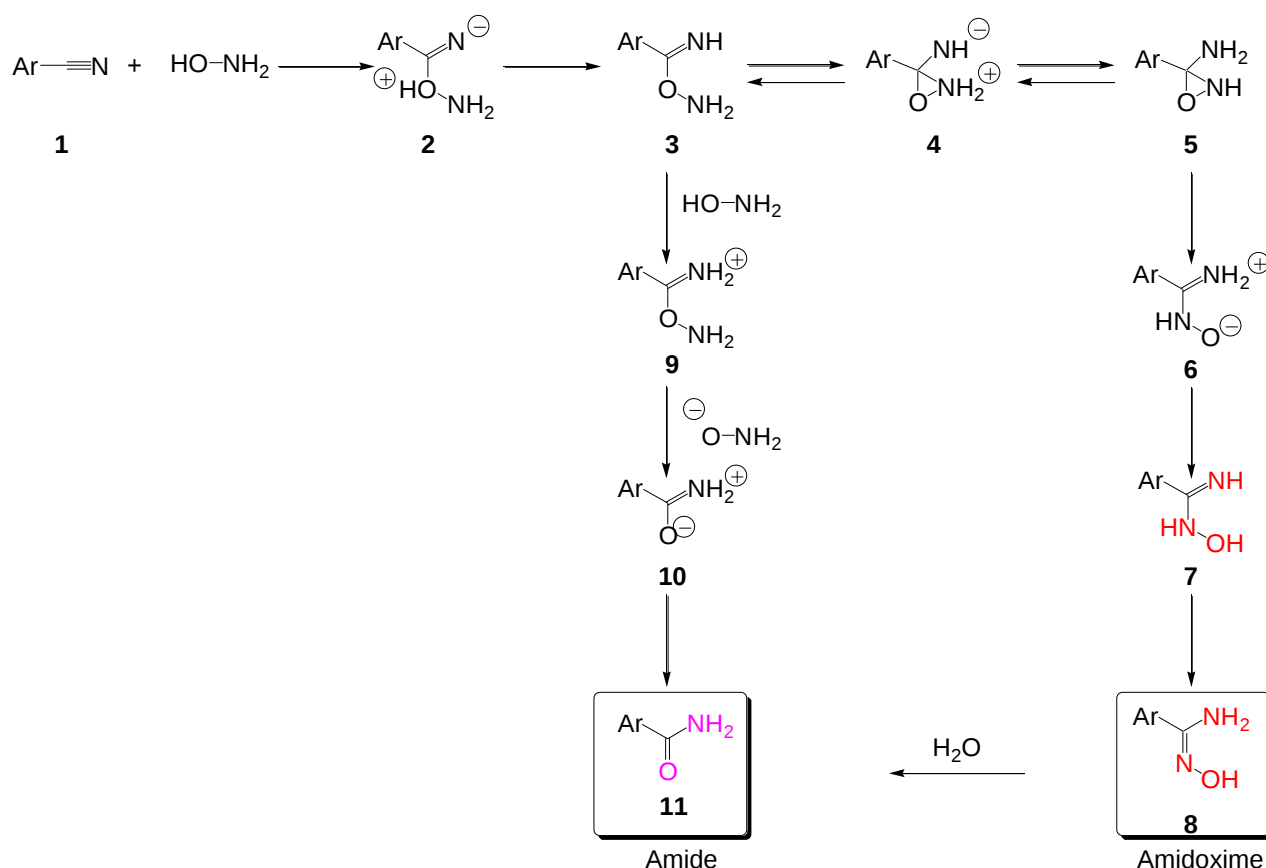


Figure II. 49. Mécanisme majoritaire de la formation des amidoximes et des amides selon Srivastava *et al.*

4.3.3.2. Essai de réduction de la formation des amides

Srivastava *et al.* proposent un autre protocole qui favorise la synthèse des amidoximes au détriment de celle des amides. Ce protocole consiste à préparer une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine avec du carbonate de sodium et ensuite de l'ajouter à une solution du nitrile dans de l'éthanol. L'hydroxylamine et le nitrile sont utilisés dans des proportions stœchiométriques. Après agitation à température ambiante pendant 20 heures, 0,5 équivalents de chlorhydrate d'hydroxylamine sont ajoutés et l'agitation est poursuivie entre 24 et 50 heures selon la molécule étudiée. Cette méthode permet l'obtention d'amidoximes avec de très bons rendements (72-93%) et surtout une diminution conséquente de la formation des amides (inférieure à 5%, selon les spectres RMN ¹H). ²⁴

Durant ce travail, ce même protocole, nommé dans ce travail méthode IV, a été testé sur la poly-amidoxime **15b** afin d'essayer de minimiser la formation des amides. Toutefois, aucune réaction ne s'est produite dans le milieu, même après cinq jours d'agitation à température ambiante, et le composé de départ a été récupéré. Ce résultat prouve

l'importance du chauffage, durant la synthèse des amidoximes cibles de ce travail, *a priori* indispensable pour initier la réaction. En revanche, il reste à trouver les conditions optimales à température élevée, permettant de favoriser la coupure de la liaison C-O par rapport à la liaison C-N, comme par exemple utiliser le chauffage mais à des températures plus modérées que le reflux ou bien initier la réaction sous chauffage et continuer à température ambiante.

Conclusion du chapitre

La synthèse de trois séries de donneurs de NO à base de fonctions amidoximes a été développée dans ce chapitre.

Dans la première série étudiée, des mono-amidoximes **9a,b** aromatiques en position *para* de groupements -I/+M plus ou moins lipophiles ont été obtenues à partir des nitriles correspondants, avec des rendements quantitatifs. Néanmoins, ces synthèses menées classiquement à reflux (méthode II) se sont montrées irréalisables par chauffage sous micro-ondes.

Dans la deuxième série d'amidoximes synthétisées, l'objectif consistait à déterminer l'impact du caractère aromatique ou aliphatique de l'amidoxime sur la libération de NO. Ainsi, un composé double donneur de NO comportant deux amidoximes aromatique / aliphatique **12a** et ses deux mono-donneurs analogues **12b** et **12c** qui possèdent respectivement une fonction amidoxime aliphatique et une fonction aromatique, ont été synthétisés. La mono-amidoxime aromatique a pu être obtenue selon la même méthode II que les mono-amidoximes de la première série avec un rendement élevé. Cependant, les molécules possédant des fonctions amidoximes aliphatiques ont non seulement été obtenues avec des rendements bien plus faibles mais, en plus, dans le cas de l'amidoxime **12a** avec une contamination par un autre produit possédant une fonction amide à la place d'une fonction amidoxime. Pour toutes ces raisons et afin d'améliorer les rendements, une nouvelle méthode III a été élaborée, remplaçant le chlorhydrate d'hydroxylamine et la base par une solution aqueuse d'hydroxylamine. Ces changements se sont révélés très efficaces pour améliorer fortement les rendements et ont également permis de diminuer la présence de l'amide.

Les donneurs de NO proposés dans la troisième et dernière série sont des bis- et poly-amidoximes aromatiques **15a-c**. Ces amidoximes ont bien été obtenues, mais comme précédemment, toutes contaminées par des produits secondaires possédant une ou plusieurs fonctions amide. Même si ces molécules ont été synthétisées en utilisant la solution aqueuse d'hydroxylamine (méthode III), la présence des amides a pu être détectée dans le milieu. D'après la littérature, la présence d'un groupement inductif accepteur d'électrons -I, en position *ortho* ou *para*, augmente le risque de formation d'amide par l'augmentation du caractère électropositif du carbone du nitrile ce qui induit son attaque par l'oxygène de l'hydroxylamine. Ceci est en cohérence avec les résultats obtenus vu que les produits

intermédiaires **13a,b** et **14a**, précurseurs de la synthèse des amidoximes **15a-c**, contiennent tous les trois des groupements OR (R = chaîne alkyle), inductifs accepteurs d'électrons, en position *ortho* ou *para* des nitriles. La purification par chromatographie de ces amidoximes reste très difficile puisque les produits présentent des rapports frontaux très proches.

Après l'échec de la méthode IV proposée dans la littérature pour réduire la formation des amides non désirées, une étape d'optimisation des conditions doit être menée, ce qui contribuera à améliorer le rendement de synthèse des amidoximes.

Toutes les amidoximes synthétisées ont pour but d'être testées pour leur pouvoir donneur de NO. Pour cela, après solubilisation dans un tampon physiologique, les amidoximes seront mises en contact avec des microsomes de foie de rat et des cellules musculaires lisses humaines afin de mesurer le taux de libération de NO. Ces travaux sont présentés dans le chapitre III de cette partie.

Références du chapitre

- (1) Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their CN(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, 37 (49), 17179–17191.
- (2) Waring, M. J. Lipophilicity in Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, 5 (3), 235–248.
- (3) Ovdiiichuk, O. V.; Hordiyenko, O. V.; Arrault, A. Synthesis and Conformational Study of Novel Pyrazine-Based Pseudopeptides Bearing Amidoxime, Amidoxime Ester and 1,2,4-Oxadiazole Units. *Tetrahedron* **2016**, 72 (24), 3427–3435.
- (4) Festa, C.; Finamore, C.; Marchianò, S.; Di Leva, F. S.; Carino, A.; Monti, M. C.; del Gaudio, F.; Ceccacci, S.; Limongelli, V.; Zampella, A.; et al. Investigation around the Oxadiazole Core in the Discovery of a New Chemotype of Potent and Selective FXR Antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10 (4), 504.
- (5) Flesch, D.; Gabler, M.; Lill, A.; Gomez, R. C.; Steri, R.; Schneider, G.; Stark, H.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Fragmentation of GW4064 Led to a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist with Improved Drug-Like Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23 (13), 3490–3498.
- (6) Sun, L.; Bera, H.; Chui, W. K. Synthesis of Pyrazolo[1,5-a][1,3,5]Triazine Derivatives as Inhibitors of Thymidine Phosphorylase. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 65, 1–11.
- (7) Cinelli, M. A.; Li, H.; Chreifi, G.; Martásek, P.; Roman, L. J.; Poulos, T. L.; Silverman, R. B. Simplified 2-Aminoquinoline-Based Scaffold for Potent and Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibition. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (4), 1513–1530.
- (8) Bernstein, M. P.; Sandford, S. A.; Allamandola, L. J. The Infrared Spectra of Nitriles and Related Compounds Frozen in Ar and H₂O. *Astrophys. J.* **1997**, 476, 932–942.
- (9) Verma, P. K.; Kumar, N.; Sharma, U.; Bala, M.; Kumar, V.; Singh, B. Transition Metal-Free Sodium Borohydride Promoted Controlled Hydration of Nitriles to Amides. *Synth. Commun.* **2013**, 43 (21), 2867–2875.
- (10) Wai Mun Lee. Copper Cmp Polishing Pad Cleaning Composition Comprising of Amidoxime Compounds. WO2009058272 A1, 2009.
- (11) Abbas, A. A.; Elwahy, A. H. M. Synthesis of Spiro-Linked Macrocyclic Crown Formazans and a Bis(Crown Formazan). *Arkivoc* **2009**, x, 65–70.

- (12) Bunnett, J. F.; Zahler, R. E. Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions. *Chem. Rev.* **1951**, 49 (2), 273–412.
- (13) Tamilselvan, P. A Study of Cobalt(II) Catalysis: Highly Selective Friedel Crafts Acylation of Electron Rich Aromatics, and Efficient Dehydration of Aldoximes to Nitriles, University of Mysore: India, 2009.
- (14) Wen, Q.; Jin, J.; Zhang, L.; Luo, Y.; Lu, P.; Wang, Y. Copper-Mediated Cyanation Reactions. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (7), 1271–1280.
- (15) Zeidan, N.; Bogнар, S.; Lee, S.; Lautens, M. Palladium-Catalyzed Synthesis of 2-Cyanoindoles from 2-*gem*-Dihalovinylanilines. *Org. Lett.* **2017**, 19, 5058–5061.
- (16) Zanon, J.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. Copper-Catalyzed Domino Halide Exchange-Cyanation of Aryl Bromides. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (10), 2890–2891.
- (17) Weissman, S. A.; Zewge, D.; Chen, C. Ligand-Free Palladium-Catalyzed Cyanation of Aryl Halides. *J. Org. Chem.* **2005**, 70 (4), 1508–1510.
- (18) Grossman, O.; Gelman, D. Novel Trans-Spanned Palladium Complexes as Efficient Catalysts in Mild and Amine-Free Cyanation of Aryl Bromides under Air. *Org. Lett.* **2006**, 8 (6), 1189–1191.
- (19) Gamond, V. Séparation des Enantiomères: Innovation Thérapeutique et/ou Stratégie Industrielle?, Université Joseph Fourier: France, 2006.
- (20) The Chemistry of Amidoximes. In *The Chemistry of Acid Derivatives*; Patai, S., Ed.; The Chemistry of Functional Groups; Wiley: Chichester ; New York, 1992; Vol. 2, pp 875–927.
- (21) Stephenson, L.; Warburton, W. K.; Wilson, M. J. Reaction of Some Aromatic Nitriles with Hydroxylamine to Give Amides, and an Alternative Preparation of Amidoximes. *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, No. 6, 861–864.
- (22) Srivastava, R. M. Preparacao de Benزامidoxima E 5-Etil-3-Fenil-4,5-Dihidro-1,2,4-Oxadiazol. *Quimica Nova* **1995**, 18 (3), 303–304.
- (23) Srivastava, R. M.; Brinn, I. M.; Machuca-Herrera, J. O.; Faria, H. B.; Carpenter, G. B.; Andrade, D.; Venkatesh, C. G.; de Moraes, L. P. F. Benزامidoximes: Structural, Conformational and Spectroscopic Studies. I. *J. Mol. Struct.* **1997**, 406 (1–2), 159–167.
- (24) Srivastava, R. M.; Pereira, M. C.; Faustino, W. W. M.; Coutinho, K.; dos Anjos, J. V.; de Melo, S. J. Synthesis, Mechanism of Formation, and Molecular Orbital Calculations of Arylamidoximes. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2009**, 140 (11), 1319–1324.

- (25) Ho, T.-L. The Hard Soft Acids Bases (HSAB) Principle and Organic Chemistry.
Chem. Rev. 75 (1), 1–20.

Chapitre III

***Evaluation biologique du
caractère donneur de NO des
amidoximes***

Introduction du chapitre

Toutes les molécules synthétisées dans les chapitres précédents ont pour but d'être étudiées pour leurs capacités à libérer NO. Ces évaluations sont menées *in vitro* et servent à identifier les potentiels donneurs capables d'être étudiés ultérieurement sur des modèles d'aorte de rats afin de tester leurs capacités à causer une vasodilatation.

Des études menées sur les amidoximes ont montré leur capacité à être oxydées en présence des CYP450 ou d'autres réductases NADPH-dépendantes, ce qui n'était pas possible en présence des NOS.^{1,2} L'évaluation des amidoximes en présence des CYP450 est intéressante afin de pouvoir sélectionner, dans un premier temps, les donneurs potentiels.

L'identification et la comparaison des amidoximes donneuses de NO sont présentées dans ce chapitre. Le premier test est mené en présence de microsomes de foie de rats, contenant des CYP450, et additionné de NADPH en adaptant un protocole décrit dans la littérature.³ Les amidoximes sont ensuite évaluées sur cellules musculaires lisses issues d'aorte thoracique humaine (CRL-1999) en termes de cytocompatibilité et de capacité à donner NO. Ce dernier test permet d'évaluer la capacité des cellules humaines à oxyder les amidoximes ce qui donne une meilleure idée de leur comportement *in cellulo*. Le résultat de ces tests sera présenté aussi dans les parties qui suivent.

Avant toute étude, la solubilité des molécules cibles doit être testée dans un tampon physiologique, le PBS (Phosphate Buffered Saline). En effet ce tampon sera utilisé durant les tests biologiques et donne une idée sur la solubilité des molécules dans les milieux de culture utilisés aussi par la suite. Il est, en effet, important de s'assurer que les molécules soient bien solubles dans le milieu avant d'évaluer leur oxydation.

1. Plan général des tests biologiques

Les mono- bis- et poly-amidoximes obtenues durant ce travail seront étudiées dans ce chapitre. Cependant, seules les molécules solubles dans le milieu physiologique (isotonique au plasma, pH 7,4) ou solubles dans du DMSO et diluées fortement dans le milieu physiologique pourront passer aux étapes d'évaluations biologiques. Pour cette raison et avant de mesurer le caractère donneur des amidoximes, une étude de leur solubilité, dans le tampon PBS avec un taux maximal de 0,1% en DMSO, est menée. Le DMSO est toxique pour les cellules à taux élevé d'où la nécessité de le diluer à 0,1%.

Toutes les amidoximes solubles dans ces conditions seront testées pour étudier leur capacité à libérer NO en présence de microsomes de rats et de cellules musculaires lisses humaines. Cependant, des études préliminaires de cytocompatibilité sont exigées afin de s'assurer de la viabilité cellulaire après incubation avec les molécules cibles. (Figure II.50) Tous les tests biologiques (libération NO et cytocompatibilité) ont été menés au CITHEFOR-EA3452 « Cibles thérapeutiques, formulation et expertise préclinique du médicament, laboratoire de l'Université de Lorraine.

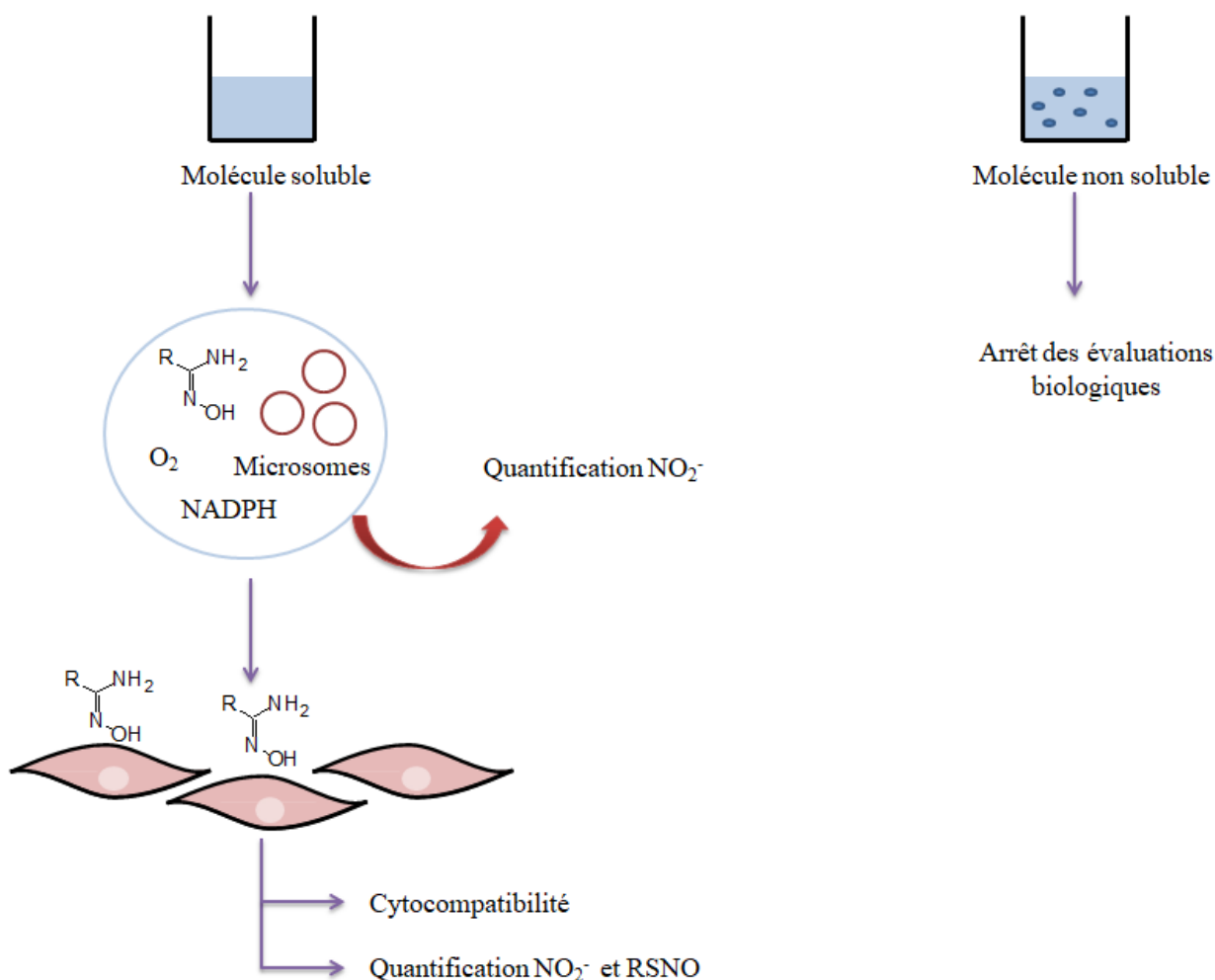


Figure II. 50. Plan des tests biologiques réalisés

2. Solubilité des amidoximes dans le milieu physiologique

Les molécules cibles seront évaluées par des tests biologiques pour leur capacité à libérer le NO. Cependant, ces tests sont menés dans des milieux de culture et des tampons physiologiques dans lesquelles les molécules doivent être solubles.

2.1. Test de solubilité des amidoximes synthétisées

Toutes les amidoximes développées dans ce travail sont solubles dans le DMSO mais pas dans le tampon physiologique seul. Pour cette raison, la solubilité est testée dans un milieu formé de 0,1% de DMSO dans le PBS. Le pourcentage du DMSO est fixé à 0,1% afin de ne pas risquer une cytotoxicité due à une présence accrue de DMSO.^{3,4}

La solubilité des molécules est étudiée à une concentration de 100 μM qui sera la concentration utilisée durant les tests biologiques ultérieurs. La préparation des solutions

mères est réalisée à 100 mM dans 100% de DMSO et des dilutions de facteur de 10 sont effectuées dans du PBS afin d'arriver à une concentration de 100 μ M (0,1 mM) en présence de 0,1% de DMSO (Figure II.51).

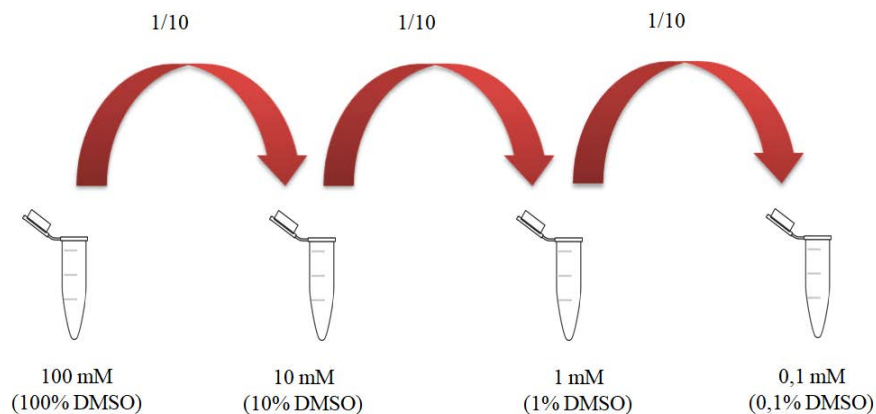
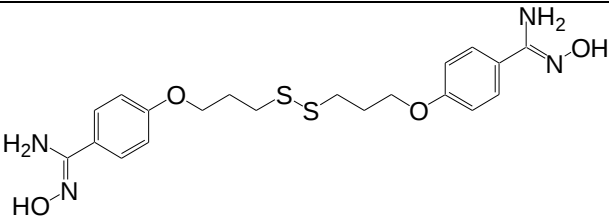
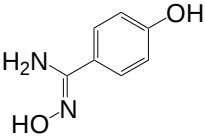
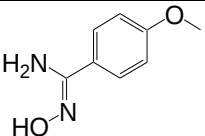
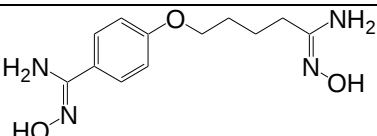
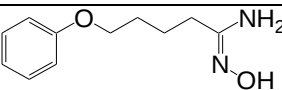
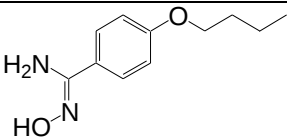
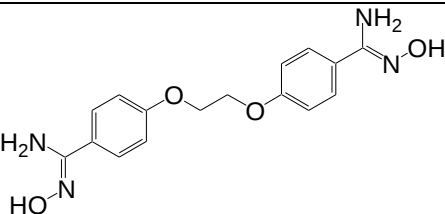
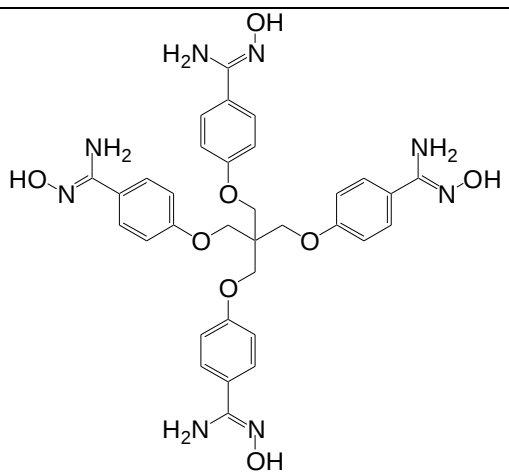
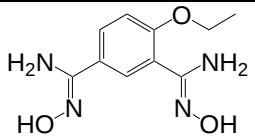


Figure II. 51. Préparation des solutions de 100 à 0,1 mM pour l'étude de la solubilité des amidoximes dans le PBS

Toutes ces molécules ont été préparées avec comme cibles des valeurs de logP situées entre 1 et 5, ou aux alentours de 1 (molécules **9a** et **15c**), afin de s'assurer du caractère lipophile de la molécule nécessaire pour le passage transmembranaire. Les valeurs de logP idéales pour qu'une molécule devienne un médicament sont situées entre 1 et 3.⁶ Cependant, toutes les molécules n'étaient pas solubles dans le mélange.

Tableau II. 11. Solubilité des amidoximes synthétisées dans 100% à 0,1% DMSO dans du PBS

Molécule	LogP	Solubilité			
		100% DMSO	10% DMSO	1% DMSO	0,1% DMSO
 5b	3,73				
 9a	0,95				
 9b	1,22				
 12a	1,23				
 12b	1,92				
 12c	2,46				

Molécule	Log P	Solubilité			
		100% DMSO	10% DMSO	1% DMSO	0,1% DMSO
 15a	2,19				
 15b	4,27				
 15c	0,87				

Tous les résultats obtenus lors des tests de solubilité sont présentés dans le Tableau II.11. Les quatre amidoximes **9a,b** et **12a,b** sont les seules à être solubles dans le milieu contenant 0,1% DMSO. Toutes les autres amidoximes ne sont plus solubles dès la première dilution dans le PBS (10% DMSO), à l'exception de la molécule **12c** qui n'est plus soluble dès la deuxième dilution soit dans 1% de DMSO. Il a été remarqué que la présence d'une chaîne plus ou moins lipophile sur l'oxygène peut être la cause de l'insolubilité de la molécule dans le tampon. Il est possible de le remarquer en comparant les trois molécules **12a,b** et **c**. Ces trois molécules ont des structures similaires mais avec une différence située soit au niveau de la position de la fonction amidoxime, aromatique ou aliphatique, ou le nombre d'amidoximes présentes sur la molécule. Les produits contenant des amidoximes aliphatiques **12a** et **12b** sont bien solubles dans le milieu contenant 0,1% DMSO. Par contre, la molécule **12c**,

possédant la même chaîne aliphatique mais une fonction amidoxime aromatique supplémentaire, n'était pas soluble sous le seuil des 10% en DMSO.

Toutes les molécules possédant des cœurs lipophiles (**5b** et **15a-c**) entourés par des noyaux aromatiques où se situent les amidoximes, ne sont solubles que dans le milieu formé de 100% DMSO uniquement.

2.2. Molécules retenues pour les tests biologiques

Après cette première étape d'évaluation de la solubilité de toutes les amidoximes, seulement les quatre amidoximes **9a,b** et **12a,b** sont solubles dans le milieu contenant la quantité maximale autorisée de 0,1% de DMSO. Ce sont donc les seules retenues pour poursuivre les tests biologiques en vue d'évaluer leur capacité à libérer le NO.

Conséquemment trois types d'amidoximes seront comparés pour leurs effets donneurs de NO : deux mono-amidoximes aromatiques **9a,b**, une mono-amidoxime aliphatique **12b** et une dernière bis-amidoxime aromatique/aliphatique **12a**. Cette comparaison est intéressante afin de mesurer la différence de libération entre les amidoximes aromatiques et les amidoximes aliphatiques et particulièrement la différence de cinétique de libération entre ces deux types d'amidoximes. De plus, la comparaison entre le pouvoir donneur des mono- et de la bis-amidoxime est intéressante afin de savoir si réellement cette dernière est capable de libérer le double de la quantité de NO de celle libérée par une mono-amidoxime.

3. Test de libération de NO en présence de microsomes de foie de rats

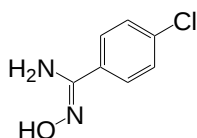
Les CYP450 sont des hémoprotéines ubiquitaires exprimées en grandes quantités dans le foie et qui sont connues pour leur intervention dans le métabolisme d'une grande partie des médicaments en plus de leurs rôles dans les réactions d'oxydoréduction de produits endogènes.⁷ Le rôle de ces enzymes dans l'oxydation des amidoximes a été démontré par Jousserandot *et al.* Leurs travaux ont mis en évidence la capacité des CYP450 à métaboliser les amidoximes en utilisant des microsomes de foie de rats en présence de NADPH et d'oxygène.⁸

En se basant sur ces travaux, le premier test de libération de NO est mené en utilisant des microsomes de foie de rats contenant des CYP450 suivi par une quantification des ions

nitrites libérés selon la méthode de Griess.⁸ Ce test est intéressant comme étude préliminaire du pouvoir donneur des amidoximes : l'incubation avec les microsomes permet en effet de sélectionner les amidoximes capables ou non d'être oxydées.

La libération de NO en présence des microsomes est menée sur les quatre amidoximes **9a,b** et **12a,b** ainsi qu'une cinquième amidoxime, la 4-chlorobenzamidoxime, qui sera utilisée comme référence (Figure II.52). Cette molécule est choisie comme référence pour différentes raisons :

- sa bonne libération de NO en présence de microsomes de foies de rats (travaux de Jousserandot *et al.*⁸)
- son utilisation comme modèle pour la conception des amidoximes de ce travail (mono-amidoxime aromatique en position para d'un groupement -I, +M)
- sa disponibilité commerciale



Référence

Figure II. 52. Structure de la 4-chlorobenzamidoxime utilisée comme référence durant les tests biologiques de ce travail

3.1. Méthode de Griess

La méthode de Griess est une méthode, décrite pour la première fois en 1879 par J.P. Griess, qui permet la détection des ions nitrites dans une solution. Cette méthode est utilisée dans ce travail pour détecter et quantifier les ions nitrites libérés suite à l'oxydation des amidoximes par les CYP450. Les ions nitrites sont quantifiés à la place de NO car ce dernier est un radical libre qui s'oxyde extrêmement rapidement, une fois libéré, en ions nitrites puis en ions nitrates. Les ions nitrites, stables et non volatiles, peuvent être détectés par la méthode de Griess.⁹

La méthode de Griess est une réaction de diazotation qui se base sur l'utilisation de deux réactifs : le sulfanilamide connu sous le nom de réactif de Griess et le *N*-(1-naphtyl)éthylènediamine ou NED.

Les ions nitrites, en présence de sulfanilamide, forment un ion diazonium qui est capable de se coupler au NED résultant en un composé coloré qui absorbe à 540 nm. Ces deux étapes sont présentées Figure II.53.

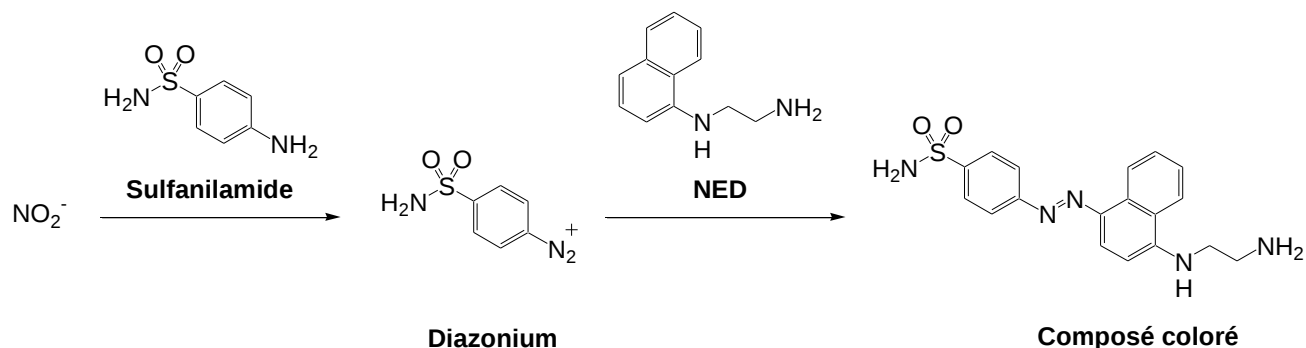


Figure II. 53. Principe de la méthode de Griess : détection des ions nitrites par synthèse d'un composé azoïque

Afin de calculer la concentration des ions nitrites libérés dans les échantillons, une gamme d'étalonnage en ions nitrites allant de 10^{-6} M à 10^{-5} M est préparée. La gamme d'étalonnage est préparée dans une microplaque à 96 puits où seront ajoutés ultérieurement le sulfanilamide et le NED afin de dresser la droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en ions nitrites.

Un exemple d'une droite d'étalonnage obtenue durant ce travail est présenté Figure II.54. La droite obtenue a une équation répondant à la formule $y = a[\text{NO}_2^-] + b$ ($a = 0,0185 \pm 0,0008$ et $b = -0,0015 \pm 0,0020$ ($n=3$)), avec un coefficient de détermination d'une valeur de $0,9963 \pm 0,0018$. Ce résultat est acceptable puisque le coefficient de détermination doit être $\geq 0,99$ ce qui est la preuve d'une bonne linéarité de la droite.

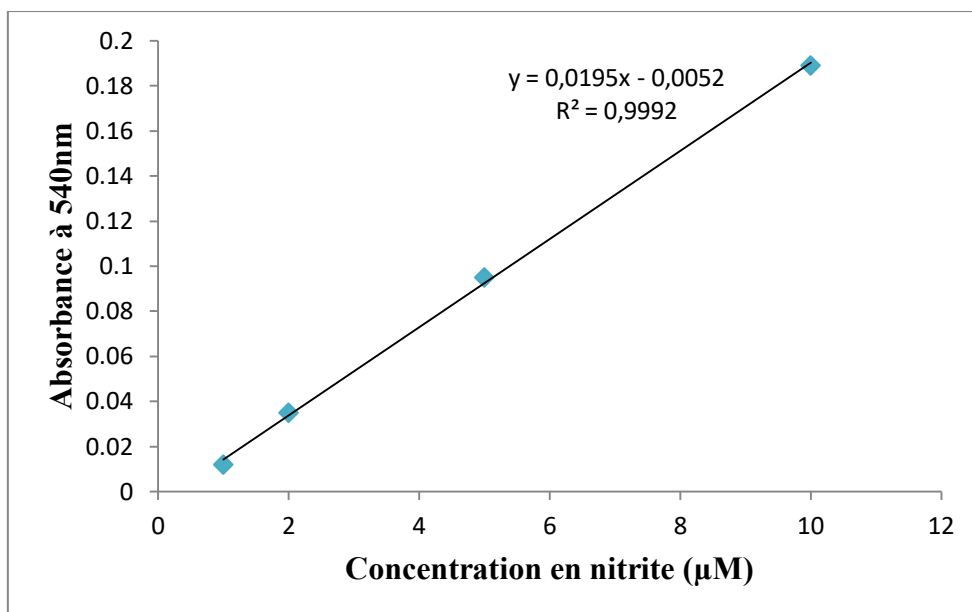


Figure II. 54. Droite d'étalonnage représentant l'absorbance en fonction de la concentration en ions nitrites suivant la méthode de Griess

3.2. Préparation des échantillons pour l'évaluation de la libération de NO en présence des microsomes

Suite à la préparation de la gamme d'étalonnage, les échantillons sont préparés afin de mesurer la libération du NO par la quantification des ions nitrites.

Les amidoximes sont incubées à 37°C pendant 10 minutes en présence de microsomes de foie de rats (contenant 0,25 mg de protéines), de NADPH et d'O₂ dans du PBS. Pour chaque amidoxime quatre échantillons contrôles ont été préparés : sans microsome, sans amidoxime, sans NADPH et en remplaçant les amidoximes par les nitriles correspondants (Tableau II.12). Ceci est effectué en gardant toujours un volume final de 550 µL de l'échantillon.

Tableau II. 12. Echantillons préparés pour le test de libération de NO en présence des microsomes et de NADPH

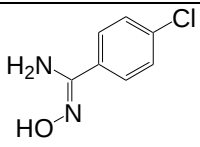
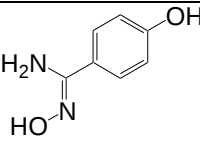
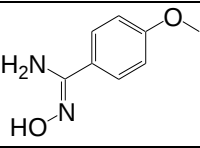
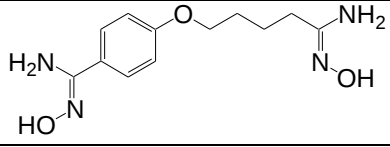
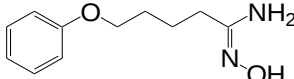
Echantillon	Microsomes	Amidoxime	NADPH	Nitriles
Test	✓	✓	✓	-
Contrôle 1	-	✓	✓	-
Contrôle 2	✓	-	✓	-
Contrôle 3	✓	✓	-	-
Contrôle 4	✓	-	✓	✓

Ces tests ont été effectués sur les cinq amidoximes retenues (Tableau II.13). Chaque mesure est répétée entre 3 et 5 fois afin de valider les résultats obtenus et d'en calculer la moyenne et l'écart-type.

Les CYP450 sont inactivés par chauffage à 100°C pour trois minutes. Les surnageants sont collectés après centrifugation et mélangés avec le sulfanilamide et le NED pour la quantification des ions nitrites par la méthode de Griess.

La quantité des ions nitrites mesurée dans les échantillons de contrôle est soustraite des valeurs obtenues des échantillons test.¹⁰

Tableau II. 13. Récapitulatif des structures des molécules testées dans la suite de ce chapitre

	Molécule	LogP
Référence		1,90
9a		0,95
9b		1,22
12a		1,23
12b		1,92

Les résultats sont exprimés en nmol de NO₂⁻ par mg de cytochrome P450 pour 10 minutes (Figure II.55). Comme il est remarqué sur l'histogramme, toutes les amidoximes étudiées ont libéré des ions nitrites ce qui signifie qu'elles sont toutes capables d'être oxydées par les microsomes de foie de rats en présence de NADPH. La libération des ions nitrites était la plus élevée pour les mono-amidoximes aromatiques **9a** et **9b** (2,4 et 1,5 nmol NO₂⁻/mg P450 pour 10 minutes, respectivement). Il est à noter que ces deux amidoximes ont libéré des ions nitrites avec des valeurs plus élevées que celles de la référence (1,3 nmol NO₂⁻/mg P450 pour 10 minutes).¹⁰

Par contre, la bis-amidoxime **12a** et la mono-amidoxime aliphatique **12b** ont libéré des quantités, en ions nitrites, significativement plus faibles que la référence. Cette capacité

modeste de libération peut être causée par la forme ou la structure inadéquate de ces molécules ce qui ne permet pas leur oxydation rapide par les enzymes et/ou par la faible réactivité des amidoximes aliphatiques durant la réaction d'oxydation.

La molécule **9a** a montré la libération la plus importante en ions nitrites et elle est significativement différente de la référence ce qui la rend très intéressante.¹⁰

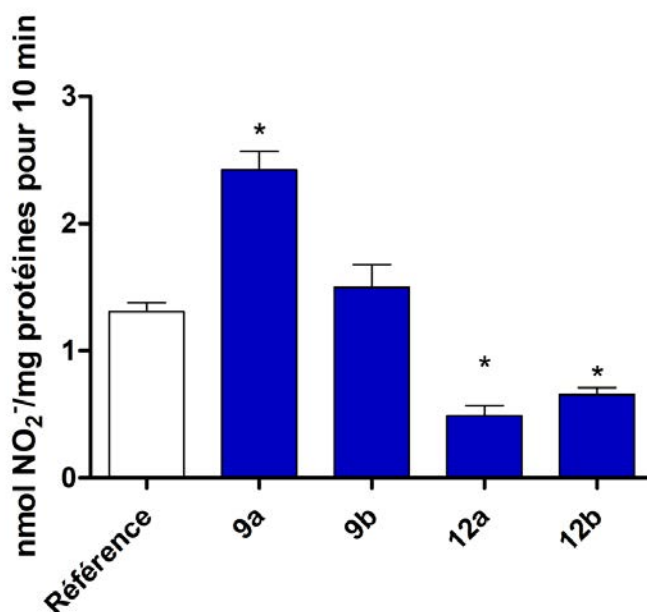


Figure II. 55. Concentration des ions nitrites libérés par les amidoximes suite à une incubation de 10 minutes avec les microsomes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ESM de trois à cinq expériences indépendantes et comparées par One-way ANOVA; * $p < 0,05$ versus référence

Une étude de la cinétique de libération de NO en présence des microsomes est menée en augmentant le temps d'incubation des amidoximes avec les microsomes et le NADPH de 10 minutes à 30 puis 90 minutes. Cette augmentation du temps d'incubation n'a pas affecté la quantité des ions nitrites libérés. Ceci signifie que, en présence des microsomes, l'oxydation des amidoximes ne se fait pas en deux temps différents et que 10 minutes est un temps suffisant afin d'obtenir le maximum d'oxydation.

4. Test de cytocompatibilité des amidoximes avec les cellules musculaires lisses humaines

La capacité des quatre amidoximes à libérer du NO en présence de cellules musculaires lisses issues d'aorte thoracique humaine est testée dans la partie qui suit. Ce test est précédé par le test de cytocompatibilité avec la même lignée cellulaire.

Le test de cytocompatibilité utilisé dans cette étude est le test MTT qui est une méthode permettant la mesure de la viabilité cellulaire.

4.1. Principe du test MTT

Le test MTT prend son nom du réactif principal utilisé, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium connu sous le nom de MTT. C'est un test colorimétrique de numération des cellules vivantes permettant l'évaluation de la cytocompatibilité des molécules testées.^{11,12}

La viabilité cellulaire est mesurée par l'activité mitochondriale : le réactif MTT, présent sous forme de sel hydrosoluble de couleur jaune, quand incubé avec les cellules, est métabolisé par une enzyme mitochondriale des cellules vivantes, la succinate déshydrogénase, en cristaux de formazan. (Figure II.56) Ces cristaux, insolubles de couleur pourpre, seront ensuite solubilisés dans du DMSO afin d'être soumis à des mesures d'absorbance réalisées à 630 nm. Cette conversion prend place strictement dans les cellules vivantes ce qui signifie que la concentration en formazan reflète le nombre de cellules vivantes présentes après incubation avec le médicament.¹¹

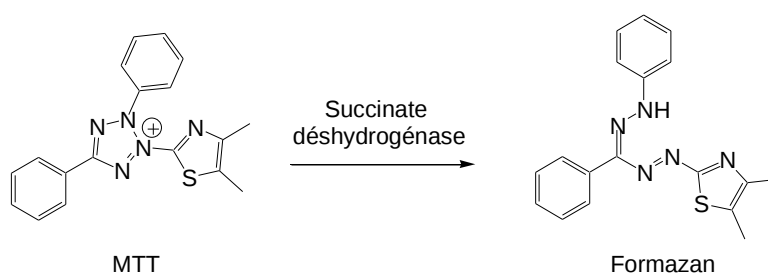


Figure II. 56. Conversion du MTT en formazan par les mitochondries pour la mesure de la cytocompatibilité (principe du test MTT)

4.2. Préparation des échantillons pour la mesure de la cytocompatibilité

Les quatre amidoximes étudiées précédemment, ainsi que la référence, seront testées sur les cellules humaines pour évaluer leur pouvoir donneur. Pour cette raison tous ces produits doivent être évalués pour leur cytocompatibilité avec la même lignée cellulaire.

Les amidoximes sont préparées à différentes concentrations, multiples de dix, se situant entre 0,001 et 100 μM , à 0,1% DMSO dans le milieu de culture en contact avec les cellules. Pour chaque amidoxime, trois à quatre échantillons de chaque concentration sont préparés en les incubant avec les cellules musculaires lisses issues d'aorte thoracique humaine (HVSMC) pour une durée de 24 heures. En parallèle, deux types de contrôles sont préparés : une série de contrôle à partir de cellules incubées uniquement dans le milieu de culture et une deuxième série à partir des cellules incubées dans le milieu de culture avec 0,1% de DMSO.¹⁰

Après l'incubation des échantillons avec le MTT, les cristaux sont dissous dans du DMSO et leur absorbance est mesurée par le spectrophotomètre (lecteur de microplaque). La viabilité cellulaire est proportionnelle à l'absorbance et elle est calculée par rapport au contrôle contenant 0,1% de DMSO.¹⁰

Les résultats de la cytocompatibilité des amidoximes avec les HVSMC sont présentés Figure II.57 où la viabilité cellulaire est mesurée suite à l'incubation des amidoximes aux différentes concentrations.¹⁰

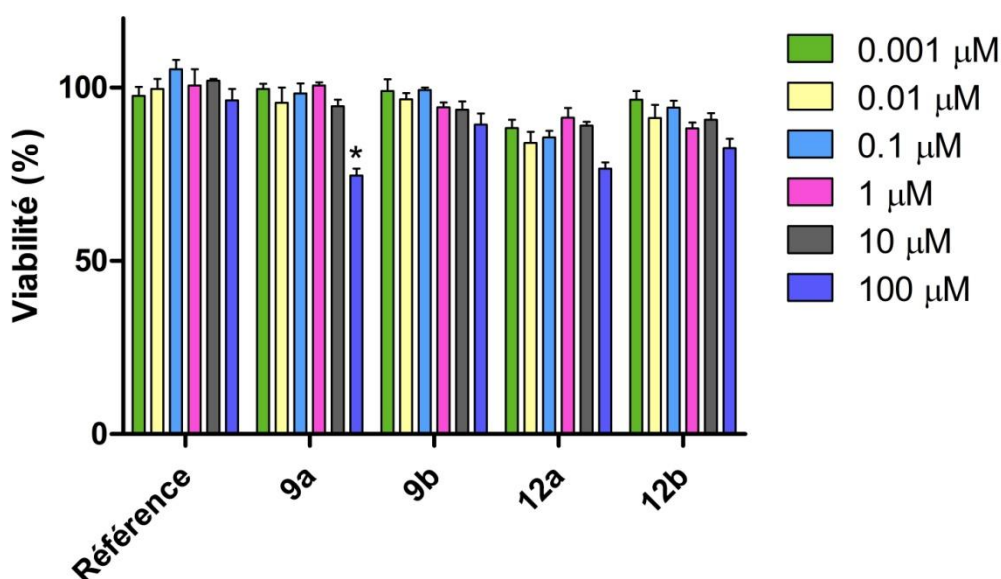


Figure II. 57. Viabilité des cellules musculaires lisses après 24 heures d'incubation à des concentrations se situant entre 0,001 et 100 µM. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ESM de trois à quatre échantillons et comparés par Two-way ANOVA ; * $p < 0,001$ 100 µM versus toutes les concentrations (post-test de Bonferroni)

Comme montré sur la Figure II.57, à l'exception de la mono-amidoxime **9a** qui a induit la viabilité cellulaire la plus faible à 100 µM ($74,67\% \pm 2,03$), les HVSMC sont restées actives et donc vivantes en présence des autres amidoximes préparées à différentes concentrations et même avec des concentrations élevées.¹⁰

Ces résultats montrent que l'utilisation des amidoximes à toutes ces concentrations est possible puisqu'elles n'auront aucun effet toxique sur la viabilité cellulaire. La concentration de 100 µM est choisie pour la suite des expériences afin d'essayer d'atteindre un taux de NO libéré élevé, et surtout plus haut que le seuil de détection de la méthode fluorescente utilisée dans la partie suivante. Il est à noter que la toxicité de la molécule **9a** détectée à 100 µM a été mesurée après 24 heures d'incubation tandis que le test de libération sur les cellules requiert seulement 1 heure d'incubation : le temps de contact avec les cellules sera plus faible et donc la toxicité plus faible également. La cinétique de libération est étudiée après 1 heure, 6 heures et 18 heures d'incubation avec les cellules, toujours inférieures à 24 heures.

5. Test de libération de NO sur les cellules humaines

Le test de libération de NO à partir des amidoximes en présence des HVSMC est le dernier test biologique qui a été conduit dans ce travail pour mesurer le pouvoir donneur de ces molécules. Après une première évaluation de la capacité des amidoximes à libérer du NO en présence des microsomes de foie de rats, une étude réalisée sur des cellules humaines semble intéressante afin de mesurer ce pouvoir donneur dans des conditions plus proches de leur oxydation par le corps humain.

Cette étude est divisée en deux parties principales :

- une étude cinétique, après s'être assuré de la libération de NO, qui va permettre d'étudier si la libération s'effectue en deux temps différents suivant le type d'amidoximes aromatiques et aliphatiques (avec des prélèvements effectués à 1 heure, 6 heures et 18 heures),
- une mesure de la quantité de NO libéré à partir des amidoximes à un temps choisi et la comparaison entre les capacités des différents types d'amidoximes.

L'oxydation des amidoximes par les cellules est mesuré en quantifiant les ions nitrites libérés et les *S*-nitrosothiols (RSNO) formés dans les milieux intra et extracellulaire. La quantification des RSNO correspond au NO libéré capable de se lier ultérieurement aux fonctions thiol des protéines cellulaires (*S*-nitrosation intracellulaire).¹³ Les ions nitrites et RSNO libérés peuvent être quantifiés par une méthode de fluorescence nommée la méthode de DAN (2,3-diaminonaphthalène).

Les quatre amidoximes évaluées auparavant feront partie de cette étude ainsi que la référence, la 4-chlorobenzamidoxime. En plus, le GSNO,¹⁴ un donneur de NO bien connu et capable de livrer du NO biodisponible pour les cellules musculaires lisses et les vaisseaux sanguins,¹⁵⁻¹⁷ a été préparé afin de servir également de référence.

Les contrôles utilisés comprennent du milieu de culture en présence de 0,1% de DMSO et subissent les mêmes traitements que les solutions tests.

5.1. Méthode fluorescente de DAN

La méthode de DAN, décrite pour la première fois en 1970 par Wiersma *et al.*, est une méthode de fluorescence, capable de détecter de très faibles concentrations en ions nitrites. L'incubation des molécules avec les cellules cause la libération du NO dans le milieu

intracellulaire et/ou extracellulaire. Le NO, transformé en ions nitrites et RSNO, pourra être quantifié par la méthode de DAN, utilisée dans cette partie de ce travail.¹⁸

Ce test se base sur une réaction entre le réactif de DAN, faiblement fluorescent, et les ions nitrites en milieu acide formant ainsi du 2,3-naphthotriazole (NAT). Ce NAT, en milieu basique, présente une forte fluorescence à 415 nm après excitation à 375 nm.¹⁹ (Figure II.58) Pour la détection du NO attaché aux protéines sous forme de RSNO, l'utilisation des ions mercuriques est nécessaire afin de cliver la liaison thiol-NO. Ce clivage permet la libération du NO qui s'oxyde en ions nitrite quantifiables par la méthode de DAN en condition acide.

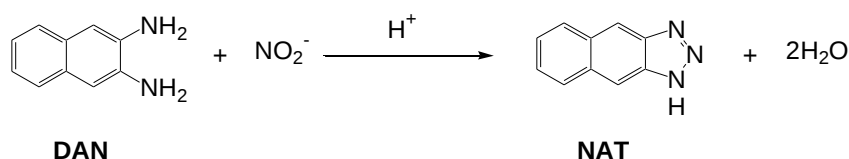


Figure II. 58. Mécanisme de la méthode de DAN pour la quantification des ions nitrite

Afin de quantifier les ions nitrite libérés ainsi que les RSNO, une droite d'étalonnage est dressée de 0,1 à 2 μM . Les différents échantillons mis en présence d'une solution de DAN seront analysés et les résultats utilisés pour dresser la droite d'étalonnage permettant la quantification des ions nitrite libres. De plus, les mesures effectuées lorsqu'ils sont mis en présence d'une solution de DAN- HgCl_2 permettront de dresser la droite d'étalonnage pour la quantification des ions nitrites après le clivage des RSNO formés. Un exemple de chaque droite est représenté Figure II.59, présentant respectivement les équations suivantes : $y = a[\text{NO}_2^-] + b$ ($R^2 = 0,9912 \pm 0,0011$, $a = 945,60 \pm 3,71$ et $b = 630,13 \pm 3,79$ ($n=3$)) et $y = a[\text{RSNO}] + b$ ($R^2 = 0,9968 \pm 0,0011$, $a = 906,87 \pm 5,03$ et $b = 507,07 \pm 9,44$ ($n=3$)). Ces deux droites montrent des coefficients de détermination $R^2 \geq 0,99$ ce qui est acceptable pour poursuivre l'étude.

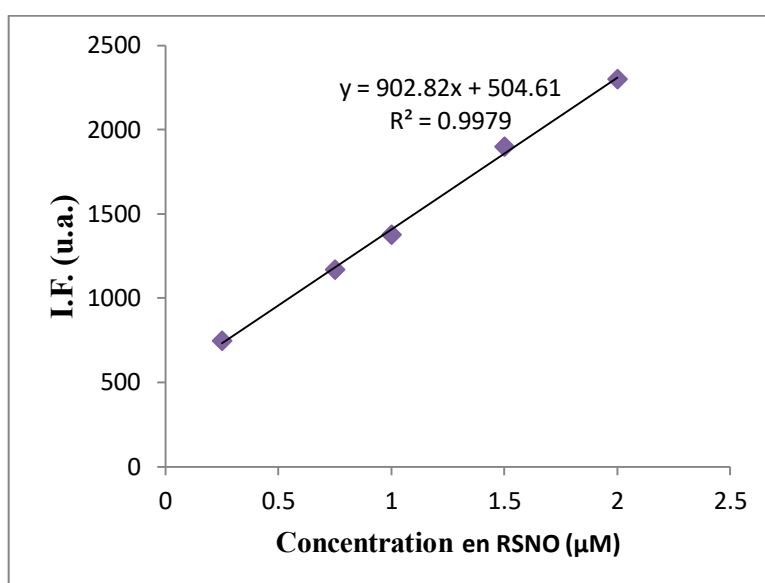
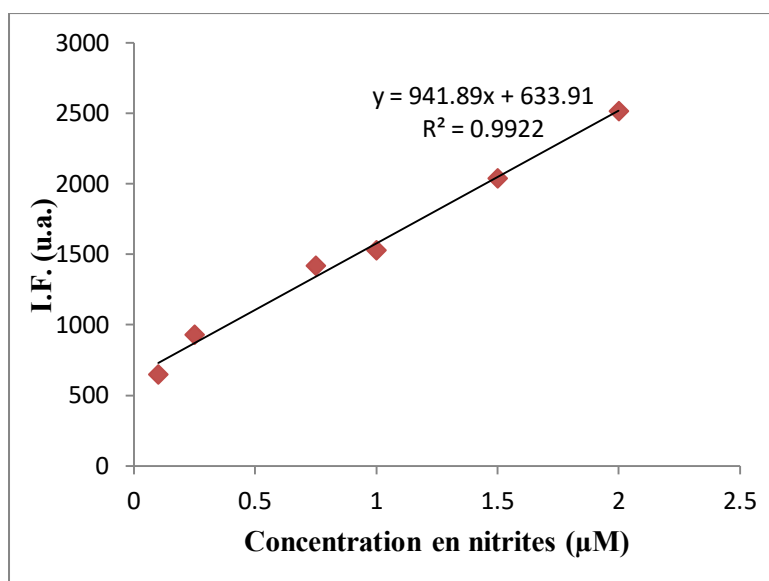


Figure II. 59. Droites d'étalonnage de la méthode de DAN pour la quantification des nitrites et des RSNO, respectivement

5.2. *Mesure de la cinétique de libération de NO à partir des amidoximes*

L'étude de la cinétique de libération de NO à partir des amidoximes aromatiques et aliphatiques est menée en présence des HVSMC. Pour cela, trois mono-amidoximes aromatiques (la référence et **9a,b**), la bis-amidoxime **12a** et le GSNO ont été incubés avec les HVSMC à 37°C. Toutes les mono-amidoximes et le GSNO sont préparés et utilisés à 100 µM, par contre la bis-amidoxime **12a** est utilisée à 50 µM car c'est une molécule possédant deux fonctions amidoxime donneuses de NO et donc théoriquement capable de libérer le double de la quantité de NO que les composés mono donneurs. Ainsi, les études sont menées à concentration constante en fonction amidoxime.

Trois séries d'échantillons contenant la molécule à tester avec les cellules ont été préparés et placés en incubation. Trois temps d'incubation sont prévus pour chaque amidoxime : 1 heure, 6 heures et 18 heures. A la fin de chaque durée d'incubation, un prélèvement du milieu extracellulaire a été réalisé et suivi par une lyse des cellules nécessaire pour la quantification en ions nitrite et RSNO du milieu intracellulaire. Le prélèvement des milieux extracellulaires est traité par une solution de DAN pour la mesure de la quantité des ions nitrite libérés. Dans les milieux intracellulaires, le prélèvement est divisé en deux pour être traité soit par la solution de DAN pour la quantification des ions nitrite, soit par la solution de DAN-HgCl₂ pour la quantification des ions nitrite et RSNO. La concentration en RSNO est ensuite obtenue par soustraction de la concentration des ions nitrites à celle des ions nitrites plus RSNO.

Dans le milieu extracellulaire et indépendamment du temps d'incubation, les concentrations en ions nitrites mesurées dans tous les échantillons se trouvent inférieure à la limite de quantification de la méthode DAN. Dans le milieu intracellulaire, la concentration en ions nitrites est inférieure à la limite de la quantification de la méthode DAN. La concentration en RSNO intracellulaire (Figure II.60) reste presque constante que ce soit après 1 heure, 6 heures ou 18 heures, pour tous les produits étudiés. La quantité de RSNO mesurée atteint son maximum à 1 heure ce qui signifie que tout le NO est libéré après 1 heure d'incubation sans observation d'une cinétique de libération à durée prolongée. L'absence de cinétique est particulièrement remarquée dans le cas de la molécule **12a** qui possède une amidoxime aromatique et une autre aliphatique et qui a présenté un comportement identique à celui de toutes les autres molécules, c'est-à-dire libérant tout le NO en un seul temps.

D'après ces résultats, il est donc constaté qu'il n'y a pas une différence de cinétique de libération de NO à partir des amidoximes aromatiques et aliphatiques à longue durée et qu'une incubation d'1 heure s'avère suffisante pour atteindre le maximum d'oxydation des fonctions amidoximes. Pour cette raison, et pour la suite des tests de quantification de la libération du NO, les ions nitrites et les RSNO seront mesurés dans le milieu intracellulaire après juste 1 heure d'incubation des molécules avec les HVSMC.

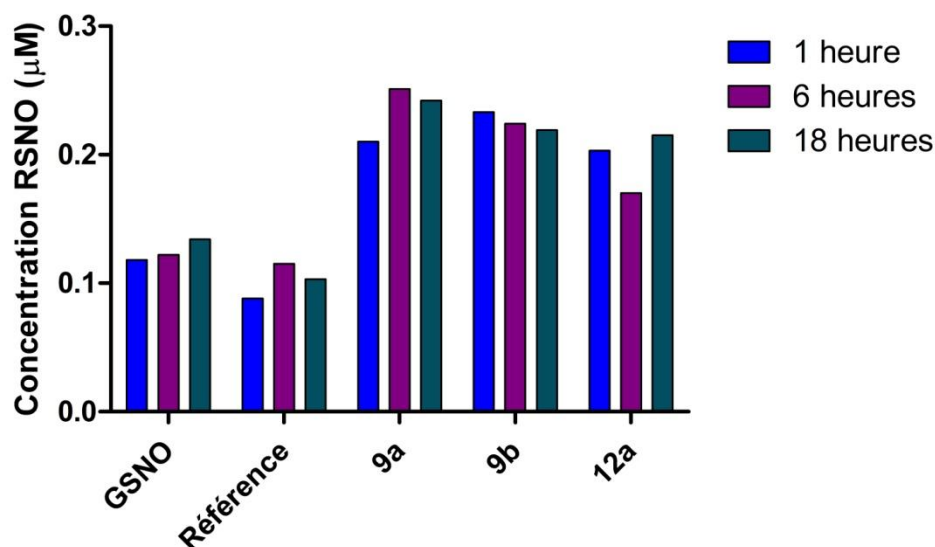


Figure II. 60. Concentration en RSNO intracellulaire d'un échantillon ($n=1$) après 1h, 6h et 18h d'incubation des cellules musculaires lisses avec 100 μM des produits à l'exception de 12a à 50 μM

5.3. Mesure du pouvoir donneur des différents types d'amidoxime et comparaison des résultats

Afin de pouvoir comparer le pouvoir donneur des différentes amidoximes synthétisées un nouveau test en présence des cellules musculaires lisses est mené. Les HVSMC ont été ensemencées dans une plaque à 6 puits 48 heures avant l'incubation avec les amidoximes et le GSNO à 37°C pendant 1 heure. Les mono-amidoximes **9a,b** et **12b**, la référence et le GSNO ont été utilisés à 100 μM tandis que la bis-amidoxime **12a** a été utilisée à 50 μM .¹⁰

Après la lyse des cellules, les ions nitrites et les RSNO ont été immédiatement quantifiés par la méthode fluorescente de DAN en utilisant la solution de DAN et la solution de DAN-HgCl₂. Les contrôles, formés à partir des HVSMC incubées avec le milieu de culture contenant 0,1% de DMSO, étaient sous la limite de détection de la méthode pour les ions nitrites et pour les RSNO.¹⁰

Tous les produits étudiés, comme montré sur la Figure II.61, ont induit la formation de RSNO à l'intérieur des cellules. Par contre, dans tous les échantillons, les ions nitrites libérés étaient sous la limite de quantification de la méthode de DAN. Le GSNO, les mono-amidoximes aromatiques **9a,b** et la bis-amidoximes **12a** ont tous produit une concentration de RSNO intracellulaire ($0,20 \pm 0,01 \mu\text{M}$, $0,21 \pm 0,01 \mu\text{M}$ et $0,17 \pm 0,02 \mu\text{M}$, respectivement) significativement plus élevée que la référence, la 4-chlorobenzamidoxime ($0,03 \pm 0,03 \mu\text{M}$). Le processus de *S*-nitrosation intracellulaire est moins prononcé chez la mono-amidoxime aliphatique **12b**. Il reste à noter que les amidoximes **9a,b** et **12a** ont toutes les trois montré un potentiel de formation de RSNO intracellulaire plus élevé que celui du GSNO.¹⁰

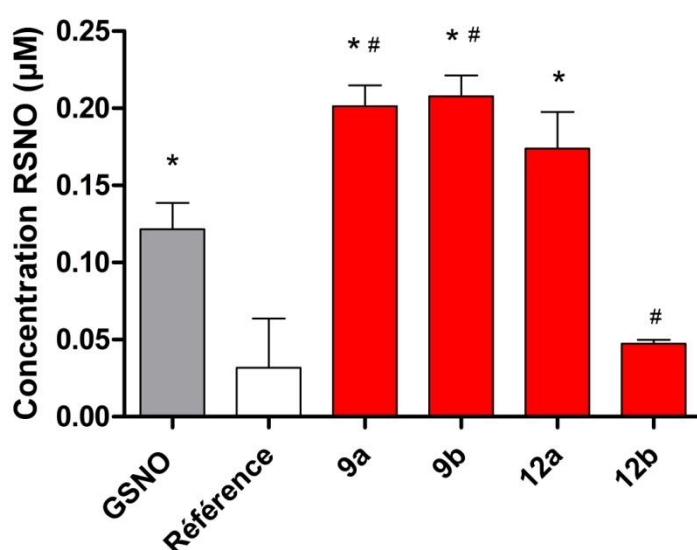


Figure II. 61. Concentration du RSNO intracellulaire après 1 h d'incubation des cellules musculaires avec 100 µM des molécules à l'exception de la molécule 12a à 50 µM. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ESM de trois échantillons indépendants et comparés par One-way ANOVA; * $p < 0,05$ versus GSNO (post-test de comparaisons multiples de Dunnett)

De toutes les amidoximes étudiées, les mono-amidoximes aromatiques **9a,b** ont montré une meilleure capacité à former des RSNO intracellulaires par rapport aux autres mono-donneurs de NO comme le GSNO et la référence. En revanche, la bis-amidoxime aromatique/aliphatique **12a** est de grand intérêt car sa capacité à produire du NO et par la suite augmenter le stockage de NO dans les cellules à travers la formation de RSNO intracellulaire est similaire aux amidoximes **9a,b** mais à une concentration deux fois moindre. La présence d'une seule fonction amidoxime aliphatique (molécule **12b**) a engendré une plus faible formation de RSNO. Ce résultat peut être expliqué par une plus faible capacité d'oxydation de l'amidoxime aliphatique par rapport aux amidoximes aromatiques **9a,b**.¹⁰

Deux points essentiels peuvent être tirés de cette étude :

- L'augmentation de l'effet inductif accepteur d'électrons $-I$ et mésomère donneur d'électrons $+M$ en position *para* de l'amidoxime peut favoriser la libération du NO. Ceci est surtout visible à partir des résultats de la référence, ayant un atome de chlore en position *para*, et les amidoximes **9a,b** possédant un groupement hydroxyle et un groupement méthoxy, respectivement, en position *para* des amidoximes.
- La présence de deux fonctions amidoximes sur une seule molécule augmente effectivement la formation de NO.

Les tests biologiques menés sur ces amidoximes ont été publiés en 2018 par notre équipe dans le journal *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*.

Conclusion du chapitre

Des tests de solubilité dans un tampon physiologique ont été réalisés sur toutes les amidoximes synthétisées durant ce travail afin d'envisager l'évaluation de leur pouvoir donneur de NO. Seulement quatre amidoximes (**9a,b** et **12a,b**) se sont révélées solubles dans le PBS avec 0,1% DMSO, milieu acceptable pour les tests biologiques, et ont été utilisées pour les tests de libération de NO ultérieurs.

En utilisant les microsomes de foie de rats, seules les mono-amidoximes aromatiques **9a,b** ont montré une importante capacité à libérer du NO en présence des CYP450, tandis que la bis-amidoxime aromatique/aliphatique **12a** et la mono-amidoxime aliphatique **12b** ont montré une plus faible oxydation et donc une plus faible libération de NO dans ces mêmes conditions. Il est probable que la taille ou la forme des amidoximes **12a,b** soient inadéquates pour leur métabolisme par les CYP450. En effet, ces amidoximes présentent une taille plus grande que les mono-amidoximes aromatiques **9a,b** et que la référence, et en plus, elles présentent une différence de forme à cause de leur chaîne latérale aliphatique ce qui peut causer l'incapacité des cytochromes à les oxyder.

Avant de tester l'oxydation de ces amidoximes par des cellules humaines et de comparer leurs cinétiques de libération, une étude préliminaire de la cytocompatibilité des amidoximes en présence des mêmes cellules a été réalisée. Toutes les amidoximes ont montré une cytocompatibilité avec les cellules musculaires lisses issues d'aorte thoracique humaine à des concentrations allant de 0,001 à 100 μ M.

L'incubation, pendant 1, 6 et 18 heures, des amidoximes **9a,b**, **12a** et de la référence ainsi que le GSNO avec les cellules musculaires lisses humaines n'a pas permis de mettre en évidence la formation d'ions nitrites dans le milieu extracellulaire mais une formation de RSNO dans le milieu intracellulaire. Par contre, aucune différence dans la quantité de RSNO formés n'était observée suivant la durée d'incubation. Ceci suggère qu'il n'y a pas de différence de cinétique de libération de NO entre les fonctions amidoximes aromatiques et aliphatiques. Ceci est d'autant plus flagrant dans le cas de la bis-amidoxime **12a** qui a libéré sa quantité maximale de NO après 1 heure d'incubation.

Un dernier test d'incubation (d'une durée d'une heure) des molécules avec les cellules musculaires lisses humaines a été mené afin de pouvoir comparer le pouvoir donneur de NO des différents types d'amidoximes à l'intérieur des cellules. Les amidoximes **9a,b** et **12a** ont

montré une grande capacité à former des RSNO dans le milieu intracellulaire ce qui signifie que ces trois amidoximes étaient capables de traverser la membrane cellulaire, de pénétrer les cellules et d'être oxydées par les CYP450 des cellules musculaires lisses. La libération de NO la plus faible a été reportée lors de l'utilisation de la mono-amidoxime aliphatique **12b**. Parmi les trois amidoximes qui ont montré les meilleures capacités à former des RSNO intracellulaires suite à la libération de NO, la bis-amidoxime **12a** présente un important potentiel étant donné que sa concentration était deux fois plus faible que toutes les autres amidoximes. De plus, elle a montré une libération de NO semblable aux meilleures mono-amidoximes **9a,b**. Ceci prouve que la nouvelle bis-amidoxime **12a** présenterait un grand intérêt puisque la réduction de moitié du dosage de cette molécule permettrait de conserver les mêmes effets thérapeutiques tout en réduisant les effets secondaires potentiels. Les résultats obtenus avec les mono-amidoximes aromatiques **9a,b** montrent aussi leurs importantes capacités à être utilisées comme donneurs de NO. Elles peuvent être considérées parmi les meilleurs mono donneurs de NO qui existent jusqu'à présent.

Références du chapitre

- (1) Chalupsky, K.; Lobysheva, I.; Nepveu, F.; Gadea, I.; Beranova, P.; Entlicher, G.; Stoclet, J.-C.; Muller, B. Relaxant Effect of Oxime Derivatives in Isolated Rat Aorta: Role of Nitric Oxide (NO) Formation in Smooth Muscle. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 67 (6), 1203–1214.
- (2) Sahyoun, T.; Arrault, A.; Schneider, R. Amidoximes and Oximes: Synthesis, Structure, and Their Key Role as NO Donors. *Molecules* **2019**, 24 (13), 2470.
- (3) Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their CN(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, 37 (49), 17179–17191.
- (4) Qi, W.; Ding, D.; Salvi, R. J. Cytotoxic Effects of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) on Cochlear Organotypic Cultures. *Hear. Res.* **2008**, 236 (1–2), 52–60.
- (5) Jamalzadeh, L.; Ghafoori, H.; Sariri, R.; Rabuti, H.; Nasirzade, J.; Hasani, H.; Aghamaali, M. R. Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Avicenna J. Med. Biochem.* **2016**, *In press* (In press).
- (6) Waring, M. J. Lipophilicity in Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, 5 (3), 235–248.
- (7) Nebert, D. W.; Russell, D. W. Clinical Importance of the Cytochrome P450. *The Lancet* **2002**, 360, 1155–1162.
- (8) Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their C=N(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, 37 (49), 17179–17191.
- (9) Tsikas, D. Analysis of Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Assays Based on the Griess Reaction: Appraisal of the Griess Reaction in the L-Arginine/Nitric Oxide Area of Research. *J. Chromatogr. B* **2007**, 851 (1–2), 51–70.
- (10) Sahyoun, T.; Gaucher, C.; Zhou, Y.; Ouaini, N.; Schneider, R.; Arrault, A. Synthesis of Novel Mono and Bis Nitric Oxide Donors with High Cytocompatibility and Release Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28 (20), 3329–3332.

- (11) Chacon, E.; Acosta, D.; Lemasters, J. J. Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments. In *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*; Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., Eds.; Academic Press: San Diego, Calif., 1996; pp 209–223.
- (12) van Meerloo, J.; Kaspers, G. J.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237–245.
- (13) Nagababu, E.; Rifkind, J. M. Routes for Formation of S-Nitrosothiols in Blood. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *67* (2), 385–398.
- (14) Parent, M.; Dahboul, F.; Schneider, R.; Clarot, I.; Maincent, P.; Leroy, P.; Boudier, A. A Complete Physicochemical Identity Card of S-Nitrosoglutathione. *Curr. Pharm. Anal.* **2013**, *9*, 31–42.
- (15) Dahboul, F.; Leroy, P.; Maguin Gate, K.; Boudier, A.; Gaucher, C.; Liminana, P.; Lartaud, I.; Pompella, A.; Perrin-Sarrado, C. Endothelial γ -Glutamyltransferase Contributes to the Vasorelaxant Effect of S-Nitrosoglutathione in Rat Aorta. *PLOS ONE* **2012**, *7* (9), e43190.
- (16) Belcastro, E.; Wu, W.; Fries-Raeth, I.; Corti, A.; Pompella, A.; Leroy, P.; Lartaud, I.; Gaucher, C. Oxidative Stress Enhances and Modulates Protein S-Nitrosation in Smooth Muscle Cells Exposed to S-Nitrosoglutathione. *Nitric Oxide* **2017**, *69*, 10–21.
- (17) Wu, W.; Perrin-Sarrado, C.; Ming, H.; Lartaud, I.; Maincent, P.; Hu, X.-M.; Sapin-Minet, A.; Gaucher, C. Polymer Nanocomposites Enhance S-Nitrosoglutathione Intestinal Absorption and Promote the Formation of Releasable Nitric Oxide Stores in Rat Aorta. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12* (7), 1795–1803.
- (18) Carré, M.-C.; Mahieux, B.; André, J.-C.; Viriot, M.-L. Fluorimetric Nitrite Analysis Using 2,3-Diaminonaphthalene: An Improvement of the Method. *Analisis* **1999**, *27* (10), 835–838.
- (19) Wu, W.; Gaucher, C.; Diab, R.; Fries, I.; Xiao, Y.-L.; Hu, X.-M.; Maincent, P.; Sapin-Minet, A. Time Lasting S-Nitrosoglutathione Polymeric Nanoparticles Delay Cellular Protein S-Nitrosation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *89*, 1–8.

PARTIE III

EXPERIMENTAL PART

General methods

1. Commercial chemicals and biological products

All chemicals were purchased with the highest purity commercially available products and were used as received without further purification. All solvents used during the reactions were purchased in their anhydrous form.

Bleach (Eau de Javel) was prepared and used for the cleaning of all the glassware used during the synthesis of the nitrile functions in order to neutralize all cyanides.

Rat liver microsomes are from male rats liver (Sprague-Dawley). They were purchased from Sigma.

The cells used were human smooth muscular cells issued from human thoracic aorta (CRL-1999).

2. Instrumentation and Characterization

Amidoxime synthesis trials under microwave were done using CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Model Discover, in a septa capped 10 mL reaction vessels with stirring. The temperature was monitored and measured by Infrared Temperature Control System containing an infrared sensor.

All reactions were monitored by TLC silica plates. Melting points were measured on a Buchi M-560 Melting Point Apparatus.

Infrared spectroscopy was used for the synthesized nitrile compounds and amidoximes in order to identify the synthesized groups. FT-IR spectra were recorded by a Bruker Tensor 27 spectrometer equipped with liquid nitrogen cooled MCT-detector. FT-IR spectra were obtained at 6 cm⁻¹ resolution using the Attenuated Total Reflectance (ATR) Technique.

¹H and ¹³C NMR spectroscopy were performed in order to elucidate the structures of the synthesized compounds. NMR spectra were measured with a Bruker Avance 300 (300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C) with tetramethylsilane as standard. Chemical shifts are reported in parts per million.

Partie III : Experimental part

High resolution mass spectroscopy was performed on the final products (amidoximes). Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Bruker MicroTof-Q HR spectrometer, Faculté des Sciences et Techniques, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

The purity of the amidoximes, used during biological evaluation, was measured by HPLC. HPLC spectra were recorded on a Shimadzu High Performance Liquid Chromatography apparatus with UV detection (245 nm). HPLC parameters: Reprospher RP-C18 (5 μ M); 250×4.6 mm; gradient elution of solvent A= CH₃CN + 0.1% THF and solvent B= H₂O + 0.1% THF; eluent flow: 1 mL/min; volume of injected sample: 20 μ L; UV detector at 254 nm.

The absorbance for the Griess assay during biological tests was measured by using EL 800 microplate reader (Bio-TEK Instrument, INC®, France). All fluorescence for DAN assay was measured by using the FP-8300iRM fluorescence spectrophotometer (JASCO, France) coupled with FMP Micro-well plate reader.

3. Biological tests procedures

3.1. Oxidation of amidoximes using rat liver microsomes

Control and test samples were prepared by using the protocol described below. However, during the control samples preparation, the volume of the missing component would be replaced by phosphate buffer in order to maintain a constant final volume.

The incubation media was prepared by mixing the substrate (111 μ M) with rat liver microsomes (0.25 mg of proteins) and 148 mM phosphate buffer pH 7.4 (final volume, 450 μ L). This media was pre-incubated for 1 min at 37°C. NADPH (1.11 mM) was added to start the reaction and the mixture was incubated for 10 min at 37°C. The reaction was stopped by heating the mixture for 3 min at 100°C. The proteins were precipitated by centrifugation for 15 min at 10000 rpm at 4°C. Supernatants were collected for quantification of the nitrite by the Griess assay.^{1,2}

3.2. Griess assay

The stock solutions were prepared fresh before each set of tests.

The sulfanilamide (Griess) stock solution was prepared at 3.48×10^{-2} M by dissolving sulfanilamide in 0.4 M HCl.

The NED stock solution was prepared at 2.31×10^{-2} M by dissolving *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 0.4 M HCl.

The nitrite stock solution was prepared at 10^{-2} M by dissolving NaNO_2 in PBS. This solution was used for the preparation of the calibration range.

3.2.1. Preparation of the calibration range

The nitrite stock solution 10^{-2} M was diluted in PBS in order to obtain a nitrite solution at 10^{-4} M. Successive dilutions of this solution in acetoacetic solution 11% (v/v) pH 2.5 (final volume 200 μL) were performed in order to obtain a range of increasing NO_2^- concentrations, set between 10^{-6} M and 10^{-5} M. This range was prepared in a 96-wells plate where 40 μL of the sulfanilamide solution were added to form the diazonium salt which reacts with 10 μL of the NED solution to form a chromophoric azo product. The readings of the absorbance were done at 540 nm using the microplate reader.

The calibration curve obtained follows the form of the equation: $y = a[\text{NO}_2^-] + b$ with $R^2 > 0.99$. An example of this curve is depicted in Figure II.54, Part II Chapter III.

3.2.2. Nitrite quantification in samples

Briefly, 100 μL of the sample's supernatant were diluted with 100 μL acetoacetic solution 11% (v/v) (pH 2.5) and added with 40 μL of the sulfanilamide solution. Finally, the diazonium salt formed reacts with 10 μL of the *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine solution to form the chromophoric azo product. Results are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using one-way ANOVA test followed by Bonferroni's multiple comparisons test. The GraphPad Prism software (GraphPad Software version 5.0, San Diego, USA) was used for all the presented results.²

3.3. Cytocompatibility assay

3.3.1. Human smooth muscle cells culture

HVSMC (CRL-1999, ATCC, USA) were grown in F-12K (ATCC-30-2004) medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1 % (v/v) penicilline-streptomycin cocktail (10000 units penicillin and 10 mg streptomycin per mL), 0.01 mg/mL insuline, 0.05 mg/mL ascorbic acid, 10 mM TES, 0.01 mg/mL transferrine, 10 ng/mL sodium selenite, 0.03 mg/mL ECGS et 10 mM HEPES. Cells were cultured at 37°C under 5% (v/v) CO₂ in a humidified incubator. HVSMC were seeded at 6.25×10^4 cells/cm² in 96-wells plates for 24 h before being incubated with amidoximes.²

3.3.2. Amidoximes incubation and MTT assay

Amidoximes were prepared in a 100% DMSO solution and diluted in PBS in order to get a final concentration, when in contact with the cells, of 0.1% DMSO. Control samples were prepared by the incubation of the cells with the culture medium with or without 0.1% DMSO.

After 24 h at 37°C with 0.001 to 100 µM of compounds **9a,b** and **12a,b**, cytocompatibility regarding metabolic activity was checked using the MTT assay. Briefly, 0.5 mg/mL MTT was incubated with the cells for 3 h. Then, 50 µL DMSO was added under stirring for 5 min to extract the formazan crystals. The absorbance was read at 570 nm with a reference at 630 nm using EL 800 microplate reader (Bio-TEK Instrument, INC[®], France). Metabolic activity in the presence of treatments was compared to the control condition with 0.1% DMSO.²

3.4. NO release experiments on HVSMC

3.4.1. Preparation of the GSNO

The reference GSNO was synthesized as previously described by Parent *et al.*³ Briefly, reduced glutathione (GSH) was incubated with an equivalent amount of sodium nitrite under acidic conditions (0.626 M HCl). The concentration of GSNO was calculated using the specific molar absorbance of S-NO bond at 334 nm ($\epsilon = 922 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and the Beer-Lambert law.²

3.4.2. Cells incubation with amidoximes

Amidoximes stock solutions were prepared in 100% DMSO and diluted in culture media in order to get a diluted solution of 0.1% DMSO when in contact with the cells.

HVSMC cells were seeded at 6,400 cells/cm² in 6-wells plates 48 h before incubation with amidoximes. After 1 h at 37°C with 100 µM (a concentration of 50 µM was used only for **12a**) of each amidoxime, or 100 µM of GSNO, cells were washed with PBS and lysed in 50 mM of Tris, 150 mM of NaCl, 1% of Igepal CA-630 (v/v), 0.1% of SDS (v/v), 1 mM of EDTA, 0.1 mM of neocuproine, 20 mM of sodium tetraborate and 10 mM of NEM. RSNO and nitrite ions were immediately quantified using a fluorimetric method (DAN assay) as previously described by Wu *et al.*⁴

Control cells were incubated with culture medium added with 0.1% DMSO.

3.4.3. DAN assay

The main stock solutions were prepared fresh before each set of tests.

The **DAN stock solution** was prepared at **0.316 mM** by dissolving 2,3-diaminonaphthalene in 0.6 M HCl. A dilution of this solution is made in 0.6 M HCl in order to obtain the **DAN solution** at **0.105 mM**.

The **HgCl₂ stock solution** was prepared at **3.17 mM** by dissolving HgCl₂ in 0.6 M HCl.

The **0.105 mM DAN-1.05 mM HgCl₂** was prepared by mixing dilutions of the 0.316 mM DAN stock solution and the 3.17 mM HgCl₂ stock solution.

The **nitrite stock solution** was prepared at **10⁻² M** by dissolving **NaNO₂** in PBS. This solution was used for the preparation of the calibration range.

3.4.3.1. DAN assay calibration ranges preparation

Two dilutions were made of the nitrite stock solution 10⁻² M for the preparation of the calibration range: the first dilution in PBS to obtain the 10⁻⁴ M NaNO₂ solution which was also diluted but in lysis buffer in order to obtain a final concentration of 2.10⁻⁶ M of NaNO₂. Successive dilutions of this final solution in lysis buffer (final volume 1000 µL) were performed in order to obtain a range of increasing NO₂⁻ concentrations, set between 0.1 µM and 2 µM. This range was prepared in tubes from which 100 µL were transferred to a 96-well plate with 20 µL of the 0.105 mM DAN solution (for the nitrite measurement) or 20 µL of the

DAN-HgCl₂ solution (for the RSNO + nitrite measurement). The detection of the fluorescent formed product 2,3-naphthotriazole is enhanced by the addition of 20 µL of 2.1 M NaOH solution.

Two calibration curves for the detection of nitrites or nitrites and RSNO were obtained following the equation form $y = a[\text{NO}_2^-] + b$ with $R^2 > 0.99$. An example of each curve is depicted in Figure II.59, Part II Chapter III.

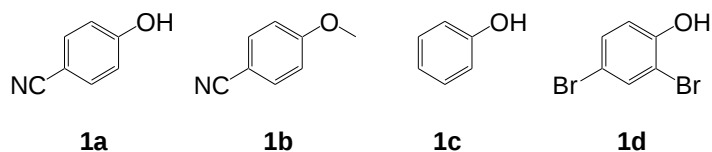
3.4.3.2. Nitrites/RSNO quantification from incubated samples

After the 1 h incubation with different treatment (control, GSNO, amidoximes) in contact with smooth muscle cells, intracellular RSNO and nitrite ions were quantified. Briefly, N₂O₃ generated from acidified nitrite ions reacts with 0.105 mM DAN with or without 1.05 mM of HgCl₂ producing naphthotriazole that emit fluorescence at 415 nm after excitation at 375 nm (JASCO FP-8300, France).^{2,4}

Control samples were under the limit of detection for both RSNO and nitrite ions.

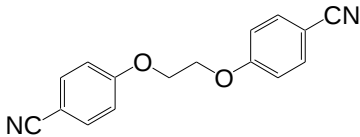
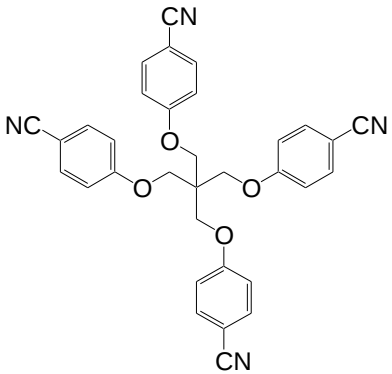
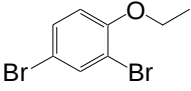
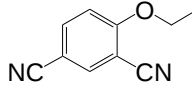
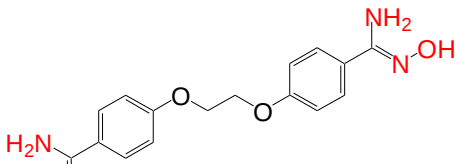
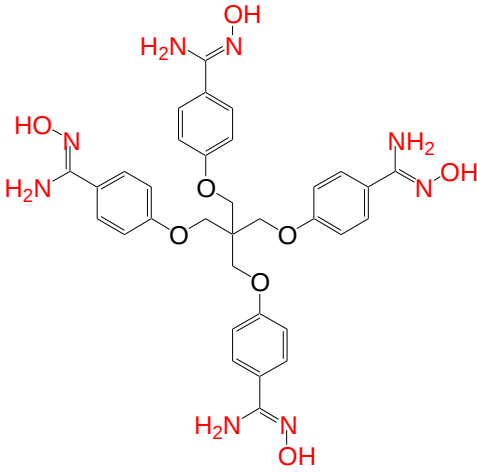
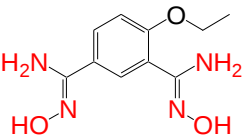
List of compounds

Starting compounds (commercial source)



Synthesized compounds (intermediates and amidoximes)

First intermediates	<chem>N#Cc1ccc(OCCBr)cc1</chem> 2a	<chem>CC(=O)SCCCOc1ccc(N#Cc2ccc(OCCBr)cc2)cc1</chem> 3b	
First bis-amidoxime	<chem>N#Cc1ccc(OCCSSCCOc2ccc(N=C(N)O)cc2)cc1</chem> 5b		
Second intermediates	<chem>CCOC(=O)CCCOc1ccc(N#Cc2ccc(OCCBr)cc2)cc1</chem> 6a	<chem>OC(=O)CCCOc1ccc(N#Cc2ccc(OCCBr)cc2)cc1</chem> 7a	
First mono-amidoximes	<chem>N#Cc1ccc(O)cc1</chem> 9a	<chem>N#Cc1ccc(OC)cc1</chem> 9b	
Third intermediates	<chem>N#Cc1ccc(OCCCCBr)cc1</chem> 10a	<chem>N#Cc1ccc(OCCCC)cc1</chem> 10b	<chem>N#Cc1ccc(OCCCCBr)cc1</chem> 10c
	<chem>N#Cc1ccc(OCCCCCN)cc1</chem> 11a	<chem>N#Cc1ccc(OCCCCCN)cc1</chem> 11b	
Bis-amidoxime and its analogue mono-amidoximes	<chem>N#Cc1ccc(OCCCCC=C(N)O)cc1</chem> 12a	<chem>N#Cc1ccc(OCCCCC=C(N)O)cc1</chem> 12b	<chem>N#Cc1ccc(OCCCC)cc1</chem> 12c

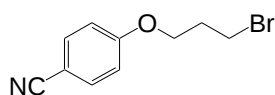
Fourth intermediates	 13a	 13b
	 13c	 14a
Bis- and poly-amidoximes	 15a	 15b
	 15c	

Experimental procedures

General procedure for the synthesis of compound 2a

To a stirred solution of the 4-hydroxybenzonitrile **1a** (238 mg, 2 mmol) in acetone (15 mL), were added potassium carbonate (415 mg, 3 mmol, 1.5 eq) and 1,3-dibromopropane (1.02 mL, 10 mmol, 5 eq). The mixture was heated to reflux for 7 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over sintered glass and Celite and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with dichloromethane (30 mL) and the organic phase washed with a 10% NaOH solution (20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (2/8) as eluent.

4-(3-Bromopropoxy)-benzonitrile (2a)



2a

Analytical Data:

White crystals. C₁₀H₁₀BrNO. **Yield:** 279 mg (58%).

mp 38.2°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 4.12 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, O-CH₂), 3.56 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, Br-CH₂), 2.34-2.26 (m, 2H, CH₂).

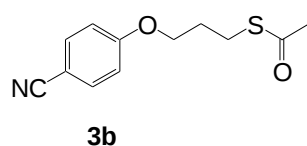
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 162.5 (C_{ar}), 134.5 (2 CH_{ar}), 119.6 (CN), 115.8 (2 CH_{ar}), 104.6 (C_{ar}), 66.2 (OCH₂), 32.4 (CH₂), 30.1 (CH₂Br).

IR (neat): 2218 (s), 1604 (s), 1508 (m), 714 (w), 680 (w).

General procedure for the synthesis of compound 3b

To a stirred solution of the bromo derivative **2a** (1.20 g, 5 mmol) in acetone (15 mL), was added potassium thioacetate (1.14 g, 10 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was extracted dichloromethane (2 × 50 mL) and the organic phase washed with 25 mL of water. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (2/8) as eluent.

Thioacetic acid S-[3-(4-cyano-phenoxy)-propyl]ester (3b)



Analytical Data:

Yellowish powder. C₁₂H₁₃NO₂S. **Yield:** 1.13 g (96%).

mp 170.4°C.

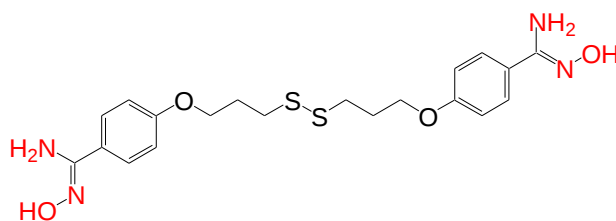
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 4.06 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, O-CH₂), 3.05 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, S-CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃) 2.14-2.05 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 196.2 (C=O), 162.7 (C_{ar}), 134.7 (2 CH_{ar}), 119.9 (CN), 115.9 (2 CH_{ar}), 104.8 (C_{ar}), 67.3 (OCH₂), 31.3 (CH₃), 29.8 (CH₂), 26.3 (CH₂S).

General procedure for the synthesis of aromatic bis-amidoxime 5b

To a stirred solution of the thioacetic acid derivative **3b** (471 mg, 2 mmol) in methanol (10 mL), were added hydroxylamine hydrochloride (1.11 g, 8 mmol, 4 eq, 2 × 2 eq) and triethylamine (1.12 mL, 8 mmol, 4 eq, 2 × 2 eq). The mixture was left at room temperature for 24 h. The solvent was evaporated and the residue was extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic phase was washed with water (30 mL), dried over MgSO₄ and finally concentrated under vacuum. The amidoxime was purified by flash chromatography using 100% of ethyl acetate as eluent.

Disulfanediyldi(propane-3,1-diyl)bis(N'-hydroxybenzene-1-carboximidamide) (5b)



5b

Analytical Data:

Yellow powder. C₂₀H₂₆N₄O₄S₂. **Yield:** 361 mg (40%).

mp 166.0°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.44 (s, 2H, OH), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz 4H, H_{ar}), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz 4H, H_{ar}), 5.70 (s, 4H, NH₂), 4.07 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H, O-CH₂), 2.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, S-CH₂), 2.12-2.04 (m, 4H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 159.0 (2 C_{ar}), 150.6 (2 C=(NOH)NH₂), 126.7 (4 CH_{ar}), 125.8 (2 C_{ar}), 114.0 (4 CH_{ar}), 65.7 (2 OCH₂), 34.2 (2 CH₂S), 28.3 (2 CH₂).

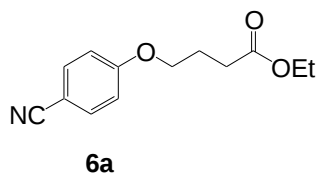
IR (neat): 3441 (m), 3343 (m), 3250 (br), 2926 (m), 1654 (s), 1610 (s), 1520 (s).

HRMS (ESI, *m/z*): MNa⁺, found 473.1328. C₂₀H₂₆N₄NaO₄S₂ requires 473.1288.

General procedure for the synthesis of compound 6a

To a stirred solution of the 4-hydroxybenzonitrile **1a** (596 mg, 5 mmol) in acetone (15 mL), were added potassium carbonate (760 mg, 5.5 mmol, 1.1 eq) and ethyl 4-bromobutyrate (0.79 mL, 5.5 mmol, 1.1 eq). The mixture was heated to reflux overnight. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over sintered glass and Celite and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with dichloromethane (30 mL) and the organic phase washed with a 10% NaOH solution (20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using methanol/dichloromethane (0.6/9.4) as eluent.

4-(4-Cyano-phenoxy)-butyric acid ethyl ester (6a)



Analytical Data:

Colorless crystals. C₁₃H₁₅NO₃. **Yield:** 1.11 g (95%).

mp 136.3°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.49 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 4.11-4.04 (m, 2H, COO-CH₂), 4.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, O-CH₂), 2.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-COOEt), 2.11-2.02 (m, 2H, CH₂), 1.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃).

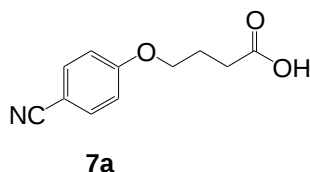
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 173.3 (C=O), 162.6 (C_{ar}), 134.4 (2 CH_{ar}), 119.6 (CN), 115.7 (2 CH_{ar}), 104.4 (C_{ar}), 67.6 (OCH₂-C₂H₄), 60.9 (OCH₂), 31.0 (CH₂-CO₂Et), 24.8 (CH₂), 14.7 (CH₃).

IR (neat): 2221 (m), 1732 (vs), 1637 (s), 1605 (s), 1264 (s), 1180 (s).

General procedure for the synthesis of compound 7a

To a stirred solution of the ester derivative **6a** (233 mg, 1 mmol) in ethanol (10 mL), was added 1M NaOH (0.03 mL, 1.13 mmol, 1.13 eq). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with dichloromethane (50 mL) and water (20 mL) and then acidified with 1M HCl aqueous solution under cooling. The resulting precipitate was recovered, washed with water and then lyophilized.

4-(4-Cyano-phenoxy)-butyric acid (7a)



Analytical Data:

White powder. C₁₁H₁₁NO₃. **Yield:** 201 mg (98%).

mp 263.1°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 4.08 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, O-CH₂), 2.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂-CO), 2.17-2.13 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 178.9 (C=O), 162.7 (C_{ar}), 134.7 (2 CH_{ar}), 119.8 (CN), 115.9 (2 CH_{ar}), 104.9 (C_{ar}), 67.6 (OCH₂), 30.8 (CH₂-CO₂H), 24.8 (CH₂).

IR (neat): 3421 (w), 3201 (br), 2232 (s), 1735 (s), 1606 (s), 1263 (vs), 1080 (vs).

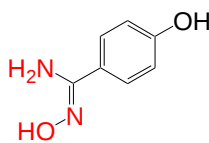
General procedure for the synthesis of aromatic mono-amidoximes 9a,b

To a stirred solution of the nitrile compound **1a** (477 mg, 4 mmol) or **2b** (533 mg, 4 mmol) in ethanol (40 mL), were added hydroxylamine hydrochloride and sodium carbonate (see Table III.1). The mixture was heated to reflux for 48 h. After cooling to room temperature the solvent was evaporated and the residue was extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic phase was washed with water (30 mL), dried over MgSO₄ and finally concentrated under vacuum. The corresponding amidoximes were purified by flash chromatography using methanol/dichloromethane (1/9) as eluent.

Table III. 1. *Synthesis conditions of amidoximes 9a and 9b*

Entry	Product	Conditions	Yield (%)
1	9a	NH ₂ OH.HCl (1.67 g, 24 mmol, 3 × 2eq), Na ₂ CO ₃ (2.54 g, 24 mmol, 3 × 2eq), EtOH, reflux	98
2	9b	NH ₂ OH.HCl (1.11 g, 16 mmol, 2 × 2eq), Na ₂ CO ₃ (1.70 g, 16 mmol, 2 × 2eq), EtOH, reflux	95

4-Hydroxybenzamidoxime (9a)



9a

Analytical Data:

Yellow-brown powder. C₇H₈N₂O₂. **Yield:** 596 mg (98%).

mp: 150.1°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.57 (s, 1H, =N-OH), 9.33 (s, 1H, OH), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{ar}), 5.61 (s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 158.1 (C_{ar}), 150.8 (C=(NOH)NH₂), 126.7 (2 CH_{ar}), 124.1 (C_{ar}), 114.7 (2 CH_{ar}).

IR (neat): 3434 (br), 3319 (br), 3211 (br), 1645 (m), 1609 (m), 1509 (m).

HRMS (ESI, *m/z*): MH⁺, found 153.0688. C₇H₉N₂O₂ requires 153.0659.

HPLC Analysis R_t = 8.862, Area percentage = 96.791 %

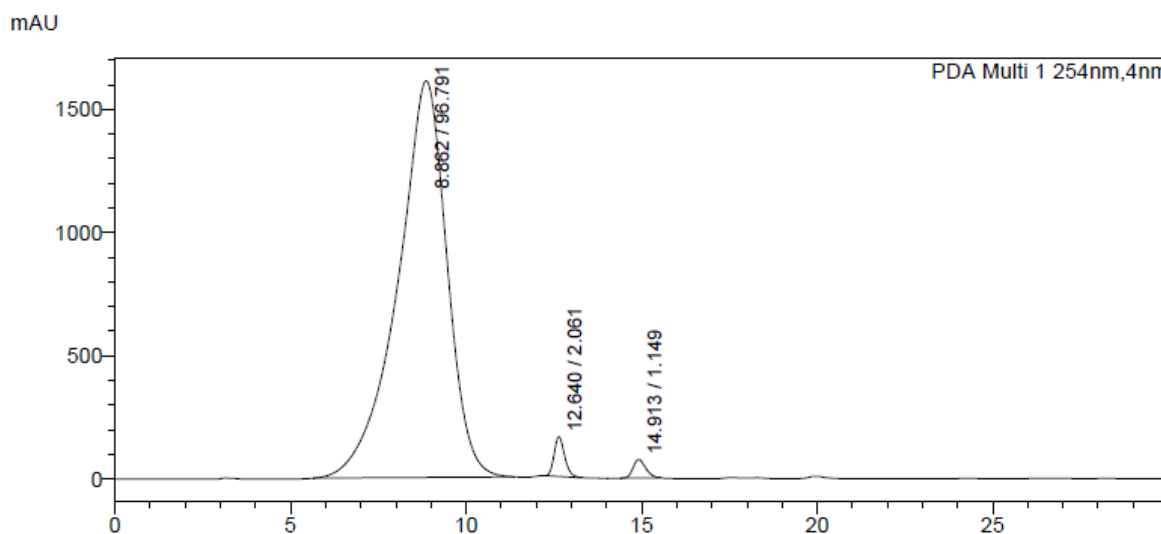
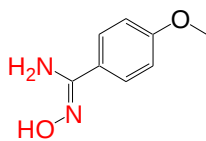


Figure III. 1. HPLC analysis of the mono-amidoxime **9a**

4-Methoxybenzamidoxime (9b)



9b

Analytical Data:

White powder. C₈H₁₀N₂O₂. **Yield:** 631 mg (95%).

mp 120.2°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.42 (s, 1H, OH), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 5.70 (s, 2H, NH₂), 3.77 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 159.8 (C_{ar}), 150.5 (C=(NOH)NH₂), 126.7 (2 CH_{ar}), 125.7 (C_{ar}), 113.4 (2 CH_{ar}), 55.1 (CH₃).

IR (neat): 3443 (s), 3353 (s), 2968 (w), 2841 (w), 1646 (s), 1608 (m), 1518 (s).

HRMS (ESI, *m/z*): MH⁺, found 167.0836. C₈H₁₁N₂O₂ requires 167.0815.

HPLC Analysis R_t = 13.433, Area percentage = 98.886 %.

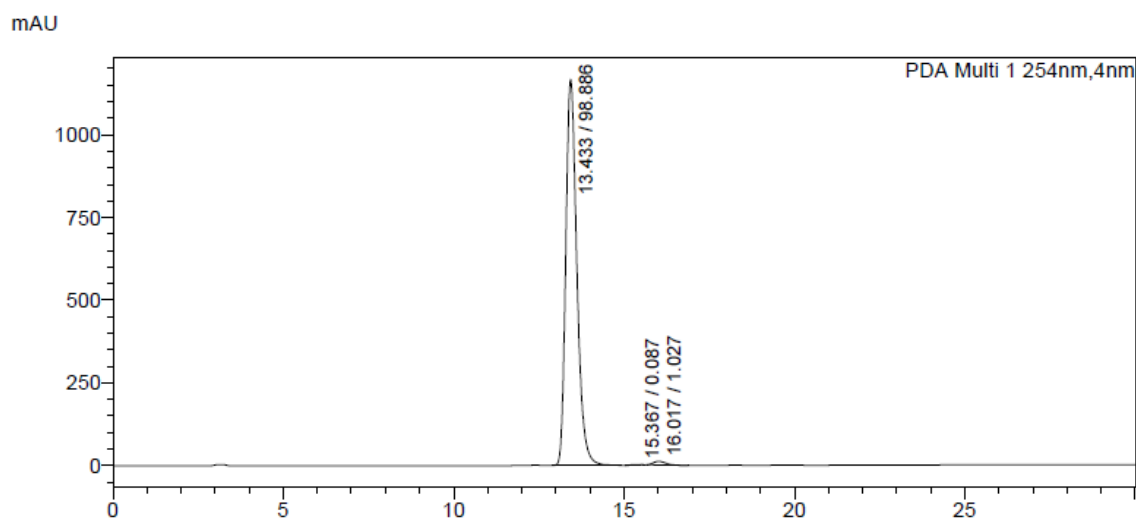


Figure III. 2. HPLC analysis of the mono-amidoxime **9b**

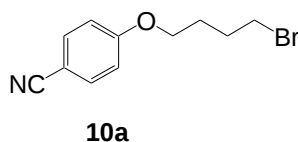
General procedure for the synthesis of compounds 10a-c

To a stirred solution of the 4-hydroxybenzonitrile **1a** or phenol **1c** (10 mmol) in acetone (50 mL), were added potassium carbonate (1.5 eq) and the corresponding bromo alkane (Table III.2). The mixture was heated to reflux overnight. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over sintered glass and Celite and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with dichloromethane (50 mL) and the organic phase washed with a 10% NaOH solution (30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (2/8) as eluent.

Table III. 2. Synthesis conditions of intermediate compounds 10a-c

Entry	Product	Conditions	Yield (%)
1	10a	1a (1.19 g, 10 mmol), 1,4-dibromobutane (5.97 mL, 50 mmol, 5 eq), K ₂ CO ₃ (2.07 g, 15 mmol, 1.5 eq), acetone, reflux	85
2	10b	1a (1.19 g, 10 mmol), 1-bromobutane (2.70 mL, 25 mmol, 2.5 eq), K ₂ CO ₃ (2.07 g, 15 mmol, 1.5 eq), acetone, reflux	50
3	10c	1c (941 mg, 10 mmol), 1,4-dibromobutane (2.99 mL, 25 mmol, 2.5 eq), K ₂ CO ₃ (1.5 eq), acetone, reflux	50

4-(4-Bromo-butoxy)-benzonitrile (10a)



Analytical Data:

Colorless crystals. C₁₁H₁₂BrNO. **Yield:** 2.16 g (85%).

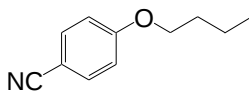
mp 47.1°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 4.04 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, O-CH₂), 3.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-Br), 2.09-1.95 (m, 4H, (CH₂)₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 162.8 (C_{ar}), 134.7 (2 CH_{ar}), 119.8 (CN), 115.8 (2 CH_{ar}), 104.7 (C_{ar}), 68.0 (OCH₂), 33.8 (CH₂Br), 29.9 (CH₂), 28.3 (CH₂).

IR (neat): 2950 (w), 2221 (s), 1250 (s), 1181 (s), 845 (s), 758 (w), 653 (s).

4-Butoxy-benzonitrile (10b)



10b

Analytical Data:

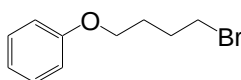
Colorless oily liquid. C₁₁H₁₃NO. **Yield:** 876 mg (50%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 7.08 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 4.05 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, O-CH₂), 1.75-1.65 (m, 2H, CH₂), 1.48-1.36 (m, 2H, CH₂), 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 162.1 (C_{ar}), 134.1 (2 CH_{ar}), 119.1 (CN), 115.4 (2 CH_{ar}), 102.6 (C_{ar}), 67.7 (OCH₂), 30.4 (CH₂), 18.6 (CH₂), 13.5 (CH₃).

IR (neat): 2961 (br), 2874 (w), 2225 (m), 1606 (s), 1573(s),

(4-Bromo-butoxy)-benzene (10c)



10c

Analytical Data:

Colorless oily liquid. C₁₁H₁₃NO. **Yield:** 1.15 g (50%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.30-7.25 (m, 2H, H_{ar}), 6.93-6.89 (m, 3H, H_{ar}), 3.99 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, O-CH₂), 3.62-3.54 (m, 2H, CH₂-Br), 2.00-1.81 (m, 4H, (CH₂)₂).

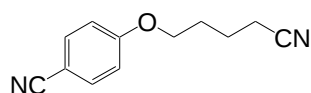
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 158.4 (C_{ar}), 129.2 (2 CH_{ar}), 120.3 (CH_{ar}), 114.2 (2 CH_{ar}), 66.3 (OCH₂), 33.7 (CH₂Br), 30.7 (CH₂), 29.0 (CH₂).

IR (neat): 1591 (m), 1494 (m), 1240 (s), 754 (m), 690 (w).

General procedure for the synthesis of compounds 11a,b

To a stirred solution of the corresponding bromo derivative **10a** (3.81 g, 15 mmol) or **10c** (3.44 g, 15 mmol) in DMF (15 mL), was added potassium cyanide (3.91 g, 60 mmol, 4 eq). The mixture was heated to reflux for 72 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over sintered glass and Celite and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with ethyl acetate (4 × 40 mL) and the organic phase washed with an aqueous 1M NaOH solution. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (8/2) as eluent.

4-(4-Cyano-butoxy)-benzonitrile (11a)



11a

Analytical Data:

Yellowish crystals. C₁₂H₁₂N₂O. **Yield:** 1.23 g (41%).

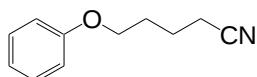
mp: 74.2°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H_{ar}), 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{ar}), 4.06 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, O-CH₂), 2.46 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CN-CH₂), 2.03-1.84 (m, 4H, (CH₂)₂)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 162.6 (C_{ar}), 134.7 (2 CH_{ar}), 119.9 (CN), 119.8 (CN), 115.8 (2 CH_{ar}), 104.9 (C_{ar}), 67.8 (OCH₂), 28.6 (CH₂), 23.0 (CH₂), 17.7 (CH₂-CN).

IR (neat): 2961 (w), 2934 (w), 2244 (w), 2225 (s), 1606 (s), 1510 (s).

5-Phenoxy-pentanenitrile (11b)



11b

Analytical Data:

Transparent oily liquid. C₁₁H₁₃NO. **Yield:** 1.71 g (65%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 7.31-7.25 (m, 2H, H_{ar}), 6.94-6.90 (m, 3H, H_{ar}), 3.99 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, O-CH₂), 2.57 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CN-CH₂), 1.83-1.69 (m, 4H, (CH₂)₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 158.4 (C_{ar}), 129.4 (2 CH_{ar}), 120.6 (CN), 120.4 (CH_{ar}), 114.4 (2 CH_{ar}), 66.3 (OCH₂), 27.7 (CH₂), 21.7 (CH₂), 15.9 (CH₂-CN).

IR (neat): 2924 (w), 2875 (w), 2246 (w), 1598 (m).

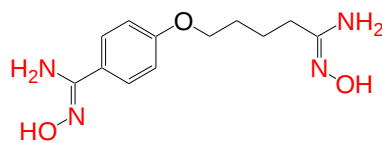
General procedure for the synthesis of amidoximes 12a,b

To a stirred solution of the corresponding nitrile **11a** (601 mg, 3 mmol) or **11b** (526 mg, 3 mmol), respectively in ethanol (40 mL), was added an aqueous hydroxylamine solution (50 wt. % in H₂O) (see Table III.3). The reaction was heated to reflux for 24 h. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated and the residue was extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic phase was washed with water, dried over MgSO₄ and finally concentrated under vacuum. The product was purified by flash chromatography using methanol/dichloromethane (1/9) as eluent.

Table III. 3. *Synthesis conditions of amidoximes 12a and 12b*

Entry	Product	Conditions	Yield (%)
1	12a	NH ₂ OH 50 wt. % in H ₂ O (0.23 mL, 7.5 mmol, 2.5 eq), EtOH, reflux	40
2	12b	NH ₂ OH 50 wt. % in H ₂ O (0.14 mL, 4.5 mmol, 1.5 eq), EtOH, reflux	60

N-Hydroxy-4-[4-(N-hydroxycarbamimidoyl)-butoxy]-benzamidinium (12a)



12a

Analytical Data:

Green powder. C₁₂H₁₈N₄O₃. **Yield:** 320 mg (40%).

mp 166.6°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.42 (s, 1H, OH), 8.72 (s, 1H, OH), 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}), 5.69 (s, 2H, NH₂), 5.38 (s, 2H, NH₂), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, O-CH₂), 2.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.73-1.61 (m, 4H, (CH₂)₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 159.2 (C_{ar}), 152.8 (C=(NOH)NH₂), 150.6 (C=(NOH)NH₂), 126.7 (2 CH_{ar}), 125.6 (C_{ar}), 113.9 (2 CH_{ar}), 67.2 (OCH₂), 30.3 (CH₂-C=(NOH)NH₂), 28.1 (CH₂), 22.9 (CH₂).

IR (neat): 3452 (br), 3303 (br), 2941 (w), 2869 (w), 1679 (s), 1627 (s), 1522 (m).

HRMS (ESI, *m/z*): MNa⁺, found 289.1291. C₁₂H₁₈N₄NaO₃ requires 289.1271.

HPLC Analysis R_t = 13.942, Area percentage = 95.183 %.

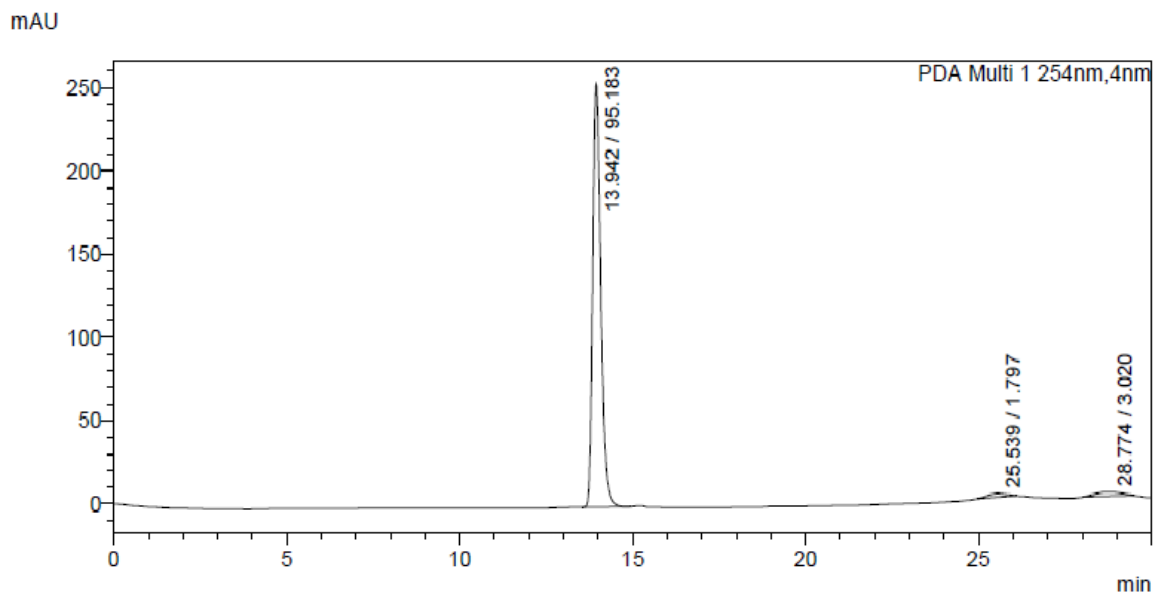
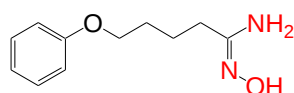


Figure III. 3. HPLC analysis of the bis-amidoxime **12a**

N-hydroxy-5-phenoxy-pentanamidine (12b)



12b

Analytical Data:

Black purple powder. C₁₁H₁₆N₂O₂. **Yield:** 375 mg (60%).

mp 96.5°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 8.70 (s, 1H, OH), 7.30-7.24 (m, 2H, H_{ar}), 6.93-6.88 (m, 3H, H_{ar}), 5.32 (s, 2H, NH₂), 3.95 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, O-CH₂), 2.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.73-1.61 (m, 4H, (CH₂)₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 158.6 (C_{ar}), 152.6 (C=(NOH)NH₂), 129.4 (2 CH_{ar}), 120.3 (CH_{ar}), 114.4 (2 CH_{ar}), 67.0 (OCH₂), 30.4 (CH₂-C=(NOH)NH₂), 28.2 (CH₂), 22.9 (CH₂).

IR (neat): 3475 (br), 3361 (br), 3229 (br), 2926 (w), 2871 (w), 1681 (w), 1589 (w).

HRMS (ESI, *m/z*): MH⁺, found 209.1323. C₁₁H₁₇N₂O₂ requires 209.1285.

HPLC Analysis R_t = 10.859, Area percentage = 96.731 %.

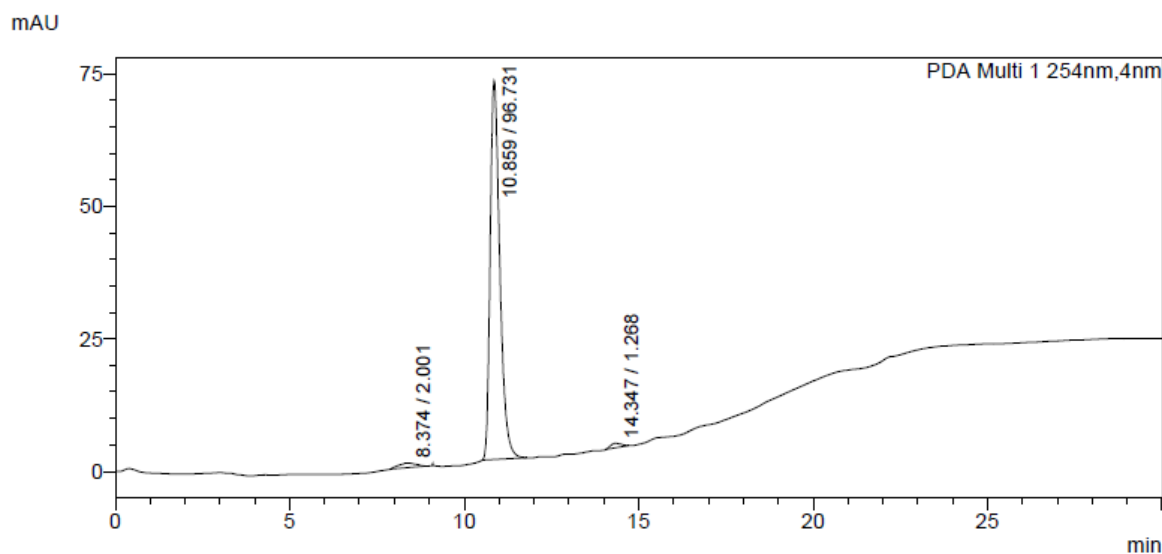
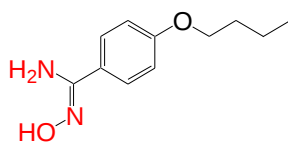


Figure III. 4. HPLC analysis of the mono-amidoxime **12b**

General procedure for the synthesis of aromatic mono-amidoxime 12c

To a stirred solution of the nitrile compound **10b** (876 mg, 5 mmol) in ethanol (25 mL), were added hydroxylamine hydrochloride (1.39 g, 20 mmol, 2×2 eq) and sodium carbonate (2.12 g, 20 mmol, 2×2 eq). The mixture was heated to reflux overnight. After cooling to room temperature the solvent was evaporated and the residue was extracted with ethyl acetate (2×30 mL). The organic phase was washed with water (30 mL), dried over MgSO_4 and finally concentrated under vacuum. Amidoximes were purified by flash chromatography using methanol/dichloromethane (0.5/9.5) as eluent.

4-Butoxy-N-hydroxybenzamidine (12c)



12c

Analytical Data:

Green powder. $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$. **Yield:** 739 mg (71%).

mp 106.2°C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6 , 25°C): δ = 9.42 (s, 1H, OH), 7.59-7.57 (m, 2H, H_{ar}), 6.94-6.89 (m, 2H, H_{ar}), 5.68 (s, 2H, NH_2), 3.98 (t, J = 6.6 Hz, 2H, O- CH_2), 1.73-1.64 (m, 2H, CH_2), 1.49-1.37 (m, 2H, CH_2), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

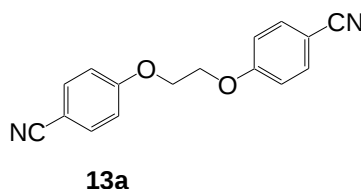
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6 , 25°C): δ = 159.2 (C_{ar}), 150.6 ($\text{C}=(\text{NOH})\text{NH}_2$), 126.6 (2 CH_{ar}), 125.6 (C_{ar}), 113.9 (2 CH_{ar}), 67.1 (OCH_2), 30.7 (CH_2), 18.7 (CH_2), 13.6 (CH_3).

IR (neat): 3440 (w), 3349 (br), 2958 (w), 1646 (m), 1608 (m), 1520 (m).

General procedure for the synthesis of compound 13a

To a stirred solution of the 4-hydroxybenzonitrile compound **1a** (3.57 g, 30 mmol) in acetone (100 mL), were added potassium carbonate (12.44 g, 90 mmol, 3 eq), and 1,2-dibromoethane (1.30 mL, 15 mmol, 0.5 eq). The mixture was heated to reflux for 48 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over sintered glass and Celite and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with dichloromethane (2×40 mL) and the organic phase washed with 10% NaOH solution (20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (2/8) as eluent.

4-[2-(4-Isocyanophenoxy)ethoxy]benzonitrile (13a)



Analytical Data:

Yellowish powder. $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$. **Yield:** 1.2 g (30%).

mp 200.8°C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 7.63-7.60 (m, 4H, H_{ar}), 7.01-6.98 (m, 4H, H_{ar}), 4.40 (s, 4H, $(\text{CH}_2)_2$).

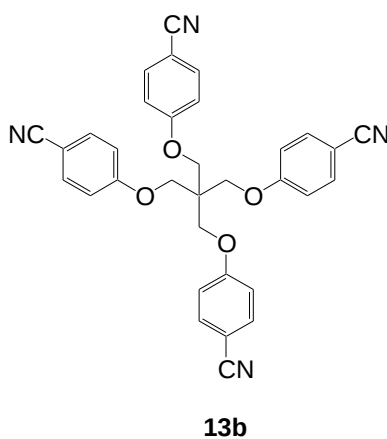
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 162.3 (2 C_{ar}), 134.8 (4 CH_{ar}), 119.6 (2 CN), 116.0 (4 CH_{ar}), 105.5 (2 C_{ar}), 67.1 (2 CH_2).

IR (neat): 2926 (w), 2224 (s), 1603 (s), 1510 (s), 1486 (m), 1253 (vs).

General procedure for the synthesis of compound 13b

4-Hydroxybenzonitrile **1a** (1.19 g, 10 mmol) was dissolved in a solution of ethanolic potassium hydroxide (561 mg, 10 mmol, 1 eq in 10 mL of Ethanol). The solvent was evaporated under reduced pressure, and the precipitate was dissolved in DMF (10 mL). To the stirred solution were added pentaerythritol tetrabromide (1.06 g, 2.5 mmol, 0.25 eq). The mixture was heated to reflux for 48 h. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by crystallization with 2-methoxymethanol.

4,4'-[[2,2-bis[(4-isocyanophenoxy)methyl]propane-1,3-diyl]bis(oxy)]bis-benzonitrile (13b)



Analytical Data:

White powder. C₃₃H₂₄N₄O₄. **Yield:** 405 mg (30%).

mp 224.0°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 7.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H_{ar}), 7.14 (d, *J* = 9.0 Hz, 8H, H_{ar}), 4.40 (s, 8H, CH₂).

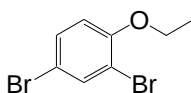
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 161.7 (4 C_{ar}), 134.1 (8 CH_{ar}), 119.0 (4 CN), 115.7 (8 CH_{ar}), 103.3 (4 C_{ar}), 66.5 (4 CH₂), 44.2 (C).

IR (neat): 2223 (s), 1604 (s), 1508 (s), 1463 (w), 1303 (w), 1253 (vs).

General procedure for the synthesis of compound 13c

To a stirred solution of the 2,4-dibromo-phenol **1d** (7.56 g, 30 mmol) in acetone (100 mL), were added potassium carbonate (6.22 g, 45 mmol, 1.5 eq) and bromoethane (5.56 mL, 75 mmol, 2.5 eq). The mixture was heated to reflux overnight. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over sintered glass and Celite and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with dichloromethane (50 mL) and the organic phase washed with a 10% NaOH solution (30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (2/8) as eluent.

2,4-Dibromo-1-ethoxy-benzene (13c)



13c

Analytical Data:

Brownish crystals. C₈H₈Br₂O. **Yield:** 6.3 g (75%).

mp 57.7°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7.66-7.65 (m, 1H, H_{ar}), 7.36-7.35 (m, 1H, H_{ar}), 6.75 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H_{ar}), 4.10-4.03 (m, 2H, CH₂), 1.46 (t, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

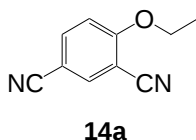
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 155.4 (C_{ar}), 136.2 (CH_{ar}), 131.8 (CH_{ar}), 115.1 (CH_{ar}), 113.8 (C_{ar}-Br), 113.5 (C_{ar}-Br), 65.8 (CH₂), 15.3 (CH₃).

IR (neat): 3249 (br), 2986 (w), 2928 (w), 1579 (s), 1465 (s), 1393 (m).

General procedure for the synthesis of compound 14a

To a stirred solution of the dibromo compound **13c** (560 mg, 2 mmol) in DMF (5 mL), were added potassium ferricyanide (290 mg, 0.88 mmol, 0.44 eq), sodium carbonate (424 mg, 4 mmol, 2 eq) and palladium(II) acetate (4.50 mg, 0.02 mmol, 0.01 eq). The mixture was heated to reflux for 18 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over filter paper and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was extracted with ethyl acetate (4 × 20 mL) and the organic phase washed with H₂O (2 × 15 mL) and 5% ammonia solution (2 × 25 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (4/6) as eluent.

4-Ethoxy-isophthalonitrile (14a)



Analytical Data:

Yellow to white powder. C₈H₈Br₂O. **Yield:** 69 mg (20%).

mp 158.3°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 8.37-8.36 (m, 1H, H_{ar}), 8.14-8.11 (m, 1H, H_{ar}), 7.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H_{ar}), 4.34-4.27 (m, 2H, CH₂), 1.54 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 163.0 (O-C_{ar}), 139.0 (CH_{ar}), 138.2 (CH_{ar}), 117.4 (CN), 114.7 (CN), 114.2 (CH_{ar}), 103.6 (C_{ar}), 101.9 (C_{ar}), 65.7 (CH₂), 14.1 (CH₃).

IR (neat): 3055 (w), 2993 (w), 2924 (w), 2852 (w), 2234 (s), 1607 (m).

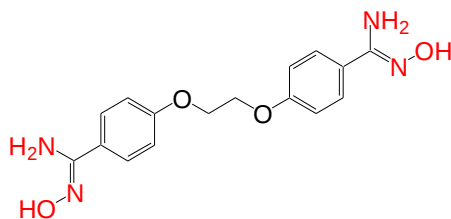
General procedure for the synthesis of amidoximes 15a-c

To a stirred solution of the corresponding nitrile **13a** (264 mg, 1 mmol), **13b** (541 mg, 1 mmol) or **14a** (172 mg, 1 mmol), respectively, in ethanol (30 mL), was added an aqueous hydroxylamine solution (50 wt. % in H₂O) (see **Error! Reference source not found.**). The reaction was heated to reflux for 24 h. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated and the residue was extracted with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic phase was washed with water, dried over MgSO₄ and finally concentrated under vacuum. The product was purified by flash chromatography using methanol/dichloromethane (1/9) as eluent.

Table III. 4. Synthesis conditions for bis- and poly-amidoximes 15a-c

Entry	Product	Conditions	Yield (%)
1	15a	NH ₂ OH 50 wt. % in H ₂ O (0.12 mL, 4 mmol, 2.5 and 1.5 eq), EtOH, reflux	63
2	15b	NH ₂ OH 50 wt. % in H ₂ O (0.18 mL, 6 mmol, 6 eq), EtOH, reflux	20
3	15c	NH ₂ OH 50 wt. % in H ₂ O (0.12 mL, 4 mmol, 2 × 2 eq), EtOH, reflux	20

4,4'-[Ethane-1,2-diylbis(oxy)]bis-(*N*'-hydroxybenzene-1-carboximidamide) (15a)



15a

Analytical Data:

Yellow powder. C₁₆H₁₈N₄O₄. **Yield:** 208 mg (63%).

mp 303.4°C.

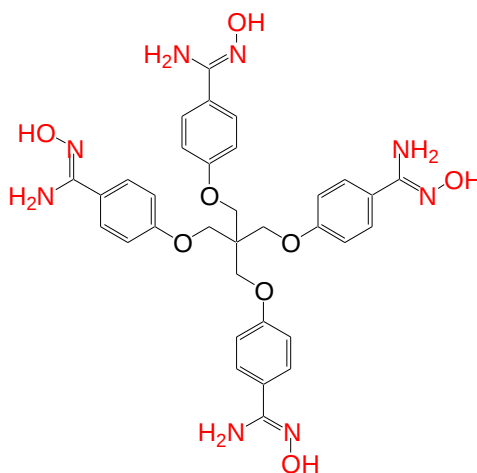
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.45 (s, 2H, OH), 7.63-7.60 (m, 4H, H_{ar}), 6.99-6.96 (m, 4H, H_{ar}), 5.71 (s, 4H, NH₂), 4.40-4.34 (m, 4H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 167.4 (2 C_{ar}), 150.6 (2 C=(NOH)NH₂), 129.4 (4 CH_{ar}), 126.8 (2 C_{ar}), 114.1 (CH_{ar}), 66.5 (2 CH₂).

IR (neat): 3423 (br), 3320 (br), 2945 (w), 2883 (w), 1640 (m), 1603 (s), 1572 (m).

HRMS (ESI, *m/z*): MH⁺, found 331.1373. C₁₆H₁₉N₄O₄ requires 331.1401.

4,4'-[Propane-1,3-diylbis(oxy)]bis-*N*'-hydroxybenzene-1-carboximidamide (15b)



15b

Analytical Data:

White powder. C₃₃H₃₆N₆O₆. **Yield:** 135 mg (20%).

mp 191.2°C.

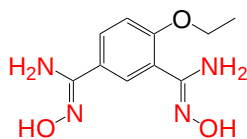
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.43 (s, 4H, OH), 7.59-7.56 (m, 8H, H_{ar}), 6.99-6.96 (m, 8H, H_{ar}), 5.69 (s, 8H, NH₂), 4.32 (s, 8H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 167.3 (4 C_{ar}), 150.5 (4 C=(NOH)NH₂), 126.7 (8 CH_{ar}), 126.2 (4 C_{ar}), 114.2 (8 CH_{ar}), 66.1 (4 CH₂), 44.3 (C).

IR (neat): 3183 (br), 2945 (br), 2884 (br), 1637 (m), 1602 (s), 1569 (m).

HRMS (ESI, *m/z*): MH⁺, found 673.2661. C₃₃H₃₇N₈O₈ requires 673.2729.

4-Ehoxy-*N*¹,*N*³-dihydroxybenzene-1,3-dicarboximidamide (15c)



15c

Analytical Data:

White powder. C₁₀H₁₄N₄O₃. **Yield:** 48 mg (20%).

mp 174.4°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 9.45 (s, 1H, OH), 9.41 (s, 1H, OH), 7.93.-7.92 (m, 1H, H_{ar}), 7.74-7.73 (m, 1H, H_{ar}), 7.10-7.02 (m, 1H, H_{ar}), 5.61 (s, 2H, NH₂), 5.59 (s, 2H, NH₂), 4.16-4.06 (m, 2H, CH₂), 1.37-1.32 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 167.1 (C_{ar}), 156.8 (C=(NOH)NH₂), 150.5 (C=(NOH)NH₂), 129.5 (CH_{ar}), 127.0 (CH_{ar}), 125.9 (C_{ar}), 122.3 (C_{ar}), 112.0 (CH_{ar}), 64.0 (CH₂), 14.5 (CH₃).

IR (neat): 3081 (br), 2918 (w), 2849 (w), 1658 (s), 1506 (m).

HRMS (ESI, *m/z*): MH⁺, found 239.1177. C₁₀H₁₅N₄O₃ requires 239.1139.

References

- (1) Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their C=N(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **1998**, 37 (49), 17179–17191.
- (2) Sahyoun, T.; Gaucher, C.; Zhou, Y.; Ouaini, N.; Schneider, R.; Arrault, A. Synthesis of Novel Mono and Bis Nitric Oxide Donors with High Cytocompatibility and Release Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28 (20), 3329–3332.
- (3) Parent, M.; Dahboul, F.; Schneider, R.; Clarot, I.; Maincent, P.; Leroy, P.; Boudier, A. A Complete Physicochemical Identity Card of S-Nitrosoglutathione. *Curr. Pharm. Anal.* **2013**, 9, 31–42.
- (4) Wu, W.; Gaucher, C.; Diab, R.; Fries, I.; Xiao, Y.-L.; Hu, X.-M.; Maincent, P.; Sapin-Minet, A. Time Lasting S-Nitrosoglutathione Polymeric Nanoparticles Delay Cellular Protein S-Nitrosation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, 89, 1–8.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le monoxyde d'azote NO est une molécule utilisée comme traitement contre les maladies cardiovasculaires grâce à ses effets vasodilatateurs. Les molécules donneuses de NO, utilisées jusqu'à présent, présentent des effets secondaires importants, un phénomène de tolérance et dans quelques cas une toxicité dose dépendante, ce qui limite leur utilisation. Les maladies cardiovasculaires sont, à ce jour, la première cause de mortalité dans le monde, la deuxième en France (première pour les femmes) juste après les cancers. Pour cette raison, les chercheurs se sont intéressés à l'élaboration de nouveaux donneurs de NO qui semblent prometteurs et plus performants comme les *S*-nitrosothiols et les amidoximes qui ont déjà montré des résultats intéressants.

L'objectif de ce travail était la synthèse de molécules donneuses de NO afin d'évaluer leur activité biologique. Dans ce manuscrit trois parties principales ont été détaillées : la synthèse de composés hybrides et doubles donneurs de NO portant une fonction *S*-nitrosothiol et une fonction amidoxime, la synthèse de produits mono, bis- et poly-donneurs à base d'amidoximes et l'évaluation biologique des composés synthétisés afin d'étudier la potentielle libération de NO.

Dans le premier chapitre, l'intérêt s'est focalisé sur la synthèse de donneurs de NO possédant à la fois une fonction amidoxime et une fonction *S*-nitrosothiol. La présence de ces deux fonctions permettrait d'assurer la libération cinétique du monoxyde d'azote : une libération rapide à partir des *S*-nitrosothiols permettant un effet direct et la libération retardée à partir des amidoximes assurant un effet prolongé du NO. Afin d'obtenir les *S*-nitrosothiols, la première étape était la synthèse des composés portant des fonctions thiol libres, destinés à être nitrosés ultérieurement, soit par substitution nucléophile des halogénures correspondants soit par intégration d'une molécule de cystéine par *N*-acylation. Des oxydations presque instantanées des fonctions thiol, la difficulté de leurs réductions ainsi que le manque de sélectivité de la réaction de *N*-acylation (qui était accompagnée de *S*-acylation) n'ont pas permis d'aboutir aux molécules soufrées désirées et par conséquent, à l'obtention des doubles donneurs possédant le motif *S*-nitrosothiol. En revanche, la molécule **5b**, obtenue durant les essais et portant deux fonctions amidoximes portées sur deux cycles différents liées par un pont disulfure, a permis l'orientation des travaux vers la synthèse de nouveaux doubles donneurs à base d'amidoximes.

Dans le deuxième chapitre, la synthèse de différents types de donneurs à base d'amidoximes a été présentée. Deux mono-amidoximes aromatiques **9a,b**, une bis-

amidoxime aromatique/aliphatique **12a** ainsi que les mono-amidoximes analogues **12b,c**, et trois bis et poly-amidoximes aromatiques **15a-c** ont été synthétisées. Lors de la synthèse des bis et poly-amidoximes **12a** et **15a-c**, la présence de produits secondaires non désirables et identifiés durant ce travail comme étant les amides a été remarquée. D'après la littérature, la présence de ces amides était causée par la température élevée nécessaire lors de la synthèse des amidoximes. Il a été possible de diminuer la température et le temps de réaction lors de la synthèse de la molécule **12a** en remplaçant le chlorhydrate d'hydroxylamine par une solution aqueuse d'hydroxylamine mais ceci n'a pas été transposable à la synthèse des molécules **15a-c** qui nécessitait un long temps de réaction (même en utilisant la solution d'hydroxylamine). En outre, toutes les tentatives de purification de ces amidoximes par colonne chromatographique se sont avérées infructueuses puisque les amides présentent des rapports frontaux très proches de ceux des amidoximes.

Finalement, le dernier chapitre de ce travail de thèse a concerné l'évaluation biologique du pouvoir donneur de NO de toutes les molécules synthétisées dans les deux premiers chapitres de ce manuscrit. Avant toute chose, il était indispensable de réaliser un test de solubilité de chaque molécule. Seules les amidoximes **9a,b** et **12a,b** ont pu être solubilisées dans le tampon PBS contenant 0,1% de DMSO, les sélectionnant ainsi seulement pour la suite des tests biologiques. Ces molécules ont montré une capacité à libérer le NO en présence des CYP450 et particulièrement les mono-amidoximes aromatiques **9a,b** qui présentent les meilleurs taux. Les quatre amidoximes **9a,b** et **12a,b**, cytocompatibles avec les cellules musculaires lisses humaines, ont ensuite été également testées pour étudier leurs capacités à libérer du NO en présence de ces cellules. D'après ce test, le caractère donneur de NO puissant des mono-amidoximes **9a,b** a non seulement été démontré mais s'est même révélé plus important que la référence choisie, la 4-chloroenzamidoxime, et que le GSNO. La bis-amidoxime **12a** est l'amidoxime qui a présenté le plus grand intérêt dans cette étude vu qu'elle a pu libérer la même quantité de NO que les mono-amidoximes **9a,b** mais à une concentration réduite de moitié. Les médicaments candidats potentiels pouvant conserver l'effet thérapeutique mais à des concentrations plus faibles présentent l'avantage de limiter les effets secondaires lors de leur utilisation. En revanche, aucune différence de cinétique de libération de NO entre les amidoximes aromatiques et aliphatiques n'a été observée.

Ces travaux de thèse ont présenté la synthèse des donneurs de NO à base d'amidoximes et leurs capacités à réellement libérer des quantités importantes de NO ce qui les rend parmi les

meilleurs donneurs de NO conçus jusqu'à présent. Cependant, plusieurs points restent intéressants à étudier :

- l'optimisation des conditions de synthèse des bis- et poly-amidoximes par diminution de la température de réaction ou du temps de réaction afin d'augmenter les rendements et diminuer le taux de formation de produits secondaires, les amides.
- la conception de nouveaux modèles de multi donneurs de NO à base d'amidoximes aromatiques.
- l'encapsulation des amidoximes synthétisées non solubles dans le PBS avec 0,1% de DMSO afin qu'elles soient solubles et capables d'être étudiées dans les tests biologiques pour leurs pouvoirs donneurs.
- l'évaluation du pouvoir vasodilatateur des donneurs de NO **9a,b** et **12a,b** sur un modèle d'aorte de rats.

Liste des tableaux

Tableaux Partie I revue :

<i>Table 1. Infrared bands in solid and liquid phases of amidoximes.</i>	<i>51</i>
<i>Table 2. Amidoxime syntheses using hydroxylamine.</i>	<i>53</i>
<i>Table 3. Reaction of ammonia and amines with oximinoethers and hydroximic acid chlorides. .</i>	<i>54</i>
<i>Table 4. Miscellaneous reactions allowing the preparation of amidoximes.</i>	<i>54</i>
<i>Table 5. Summary of the major oxidation products after amidoxime reaction with different chemical and biomimetic oxidants.</i>	<i>56</i>
<i>Table 6. Comparison of some studied amidoximes and oximes for their aorta relaxation and pressure decrease abilities.</i>	<i>62</i>

Tableaux Partie II :

<i>Tableau II. 1. Mise au point d'une méthode de substitution des halogénures par les fonctions thiol</i>	<i>88</i>
<i>Tableau II. 2. Conditions de réduction des premiers ponts disulfures</i>	<i>92</i>
<i>Tableau II. 3. Conditions de la mise au point du couplage des chlorures d'acyle aux cystéines..</i>	<i>96</i>
<i>Tableau II. 4. Comparaison des méthodes I et II pour la synthèse des amidoximes 9a,b</i>	<i>114</i>
<i>Tableau II. 5. Données RMN ¹H des amidoximes 9a,b dans du DMSO-d₆</i>	<i>114</i>
<i>Tableau II. 6. Conditions et paramètres utilisés pour la synthèse des mono-amidoximes aromatiques 9a,b.....</i>	<i>115</i>
<i>Tableau II. 7. Comparaison des déplacements chimiques des protons aromatiques de 12a et 12a' par RMN ¹H dans du DMSO-d₆</i>	<i>123</i>
<i>Tableau II. 8. Tableau comparatif des méthodes II et III pour la synthèse de la bis-amidoxime 12a.....</i>	<i>125</i>
<i>Tableau II. 9. Conditions d'élution sur la CLHP du produit 15c.....</i>	<i>136</i>

<i>Tableau II. 10. Rapport m/z des molécules 15a-c mesurés par SM haute résolution.....</i>	<i>137</i>
<i>Tableau II. 11. Solubilité des amidoximes synthétisées dans 100% à 0,1% DMSO dans du PBS.....</i>	<i>155</i>
<i>Tableau II. 12. Echantillons préparés pour le test de libération de NO en présence des microsomes et de NADPH</i>	<i>160</i>
<i>Tableau II. 13. Récapitulatif des structures des molécules testées dans la suite de ce chapitre.</i>	<i>161</i>

Tableaux Partie III :

<i>Table III. 1. Synthesis conditions of amidoximes 9a and 9b</i>	<i>191</i>
<i>Table III. 2. Synthesis conditions of intermediate compounds 10a-c</i>	<i>194</i>
<i>Table III. 3. Synthesis conditions of amidoximes 12a and 12b</i>	<i>197</i>
<i>Table III. 4. Synthesis conditions for bis- and poly-amidoximes 15a-c</i>	<i>205</i>

Liste des figures

Figures Partie I étude bibliographique :

<i>Figure I. 1. Causes de mortalités mondiales en 2016 selon l'OMS.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure I. 2. Chemin d'activation de la production de NO dans l'endothélium et la relaxation des fibres musculaires lisses.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure I. 3. Utilisation des dérivés nitrés commercialisés.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure I. 4. Structure du « chef de file » des nitrates organiques, la nitroglycerine.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure I. 5. Structure du nitroprussiate de sodium.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure I. 6. Les structures de la molsidomine et du nicorandil.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure I. 7. Formes mésomères des diazéniumdiolates</i>	<i>34</i>
<i>Figure I. 8. Structure du glutathion et de sa forme nitrosée le S-nitrosoglutathion</i>	<i>37</i>
<i>Figure I. 9. Types de S-nitrosothiols endogènes autre que le GSNO</i>	<i>38</i>
<i>Figure I. 10. Structures de la SNAC et la SNAP.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure I. 11. Structure de la S,S-dinitrosobuccilamine</i>	<i>40</i>

Figures Partie I revue :

<i>Figure 1. Structures of amidoximes and oximes.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 2. In vivo NO synthesis from arginine.</i>	<i>50</i>
<i>Figure 3. Structure of N-hydroxy-5,6-dimethoxy-1H-indene-2-carboximidamide.HCl.</i>	<i>50</i>
<i>Figure 4. Summary of the stability of amidoxime isomers.</i>	<i>51</i>
<i>Figure 5. Tautomers of oximes.</i>	<i>52</i>
<i>Figure 6. Amidoximes releasing NO in the presence of K₃Fe[(CN)₆].....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 7. Dimeric product obtained from 4-chlorobenzamidoxime.</i>	<i>56</i>
<i>Figure 8. Structures of amidoximes able to be oxidized after photooxygenation or by treatment 2-iodobenzoic acid or IBX/tetraethylammonium bromide.</i>	<i>57</i>

<i>Figure 9. Structures of tested mono- and bis-amidoximes for NO release on rat liver microsomes and human vascular smooth muscle cells.</i>	<i>58</i>
<i>Figure 10. Most potent amidoximes and oximes in the inhibition of thrombus formation according to the studies of Rehse et al.</i>	<i>60</i>
<i>Figure 11. Some of the studied amidoximes and oximes for their activity in rat aorta relaxation.</i>	<i>61</i>
<i>Figure 12. Imidazole amidoximes able to increase cGMP formation.</i>	<i>62</i>
<u>Figures Partie II :</u>	
<i>Figure II. 1. Etapes d'étude biologique des produits synthétisés</i>	<i>73</i>
<i>Figure II. 2. Travaux précédents au LCPM des étapes de synthèse d'un double donneur hybride de NO par protection et déprotection du thiol.</i>	<i>78</i>
<i>Figure II. 3. Synthèse des thiols à partir des halogénures et de NaSH</i>	<i>79</i>
<i>Figure II. 4. Méthode de préparation d'une résine échangeuse de thiol rapporté par Bandgar et al. ¹⁷</i>	<i>80</i>
<i>Figure II. 5. Substitution des halogénures à partir de la résine échangeuse de thiol rapporté par Bandgar et al. ¹⁷</i>	<i>81</i>
<i>Figure II. 6. Substitution des halogénures par la thiourée</i>	<i>81</i>
<i>Figure II. 7. Substitution des halogénures en présence du thioacétate de potassium</i>	<i>82</i>
<i>Figure II. 8. Oxydation de la L-cystéine en cystine</i>	<i>83</i>
<i>Figure II. 9. Couplage de la cystéine au chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle rapporté par Sharma et al.</i>	<i>84</i>
<i>Figure II. 10. Couplage de la cystéine au chlorure d'acyle activé par le benzotriazole rapporté par Katritzky et al.</i>	<i>84</i>
<i>Figure II. 11. Stratégie de synthèse des donneurs hybrides de NO par ajout d'un thiol nitrosé et d'une amidoxime</i>	<i>85</i>

Figure II. 12. Synthèse de la molécule intermédiaire 2a portant une chaîne bromée.....	86
Figure II. 13. Premiers essais de substitution nucléophile des halogénures par des fonctions thiols et synthèse des amidoximes.....	87
Figure II. 14. Spectre RMN ^1H des disulfures dans CDCl_3	89
Figure II. 15. Synthèse du produit intermédiaire thioacétate 3b	90
Figure II. 16. Synthèse de l'amidoxime et déprotection du thiol par l'hydroxylamine donnant la molécule 5b.....	90
Figure II. 17. Essais de réduction des disulfures obtenus	91
Figure II. 18. Incorporation de la chaîne lipophile fonctionnalisée par O-alkylation du 4- hydroxybenzonitrile.....	94
Figure II. 19. La saponification de la fonction ester générant 7a.....	94
Figure II. 20. Mise au point de la méthode du couplage des chlorures d'acide avec la cystéine.	95
Figure II. 21. Activation du chlorure du benzoyle avec le benzotriazole avant couplage avec la cystéine	97
Figure II. 22. Synthèse du chlorure d'acyle et couplage à la cystéine.....	97
Figure II. 23. Couplage de l'acide 7a avec la cystéine en présence de l'EDC et HOBt.....	98
Figure II. 24. Spectre RMN ^1H des produits de N- et de S-acylation dans CDCl_3	99
Figure II. 25. Molécules à base d'amidoximes ciblées dans ce travail.....	110
Figure II. 26. Plan de synthèse des donneurs de NO à base d'amidoxime	111
Figure II. 27. Synthèse de la 4-hydroxybenzamidoxime 9a et 4-méthoxybenzamidoxime 9b par les méthodes classiques.....	113
Figure II. 28. Incorporation des chaînes lipophiles pour la synthèse de 10a-c.....	116
Figure II. 29. Substitution des atomes de brome aliphatiques par le cyanure de potassium pour la synthèse de 11a,b	117
Figure II. 30. Comparaison des spectres IR des molécules 11a (bleu) et 11b (rose).....	118

Figure II. 31. Agrandissement de la zone caractéristique du spectre IR des fonctions nitrile de la molécule 11a (bleu) et 11b (rose).....	119
Figure II. 32. Spectre RMN ^{13}C de 11a dans le CDCl_3 et un agrandissement de la région des CN	120
Figure II. 33. Spectre RMN ^{13}C de 11b dans du DMSO-d_6 et un agrandissement de la région des CN	120
Figure II. 34. Schéma de synthèse des amidoximes 12a-c suivant la méthode II.....	121
Figure II. 35. Spectre RMN ^1H de la bis-amidoxime 12a synthétisée selon la méthode II.....	122
Figure II. 36. Synthèse du bis-amide 12a' à partir de 11a	123
Figure II. 37. Structure proposée pour le produit secondaire 12a''	124
Figure II. 38. Synthèse de 12a à l'aide de la solution aqueuse d'hydroxylamine.....	124
Figure II. 39. Spectre RMN ^1H de la bis-amidoxime 12a dans le DMSO-d_6 obtenu selon la méthode III.....	125
Figure II. 40. Synthèse de la mono-amidoxime aliphatique 12b selon la méthode III.....	126
Figure II. 41. Synthèse des composés symétriques 13a,b par réaction de poly-substitution nucléophile.....	128
Figure II. 42. Spectres IR et RMN (^1H et ^{13}C) de la molécule 13b.....	130
Figure II. 43. Synthèse du produit précurseur 14a obtenu par substitution nucléophile aromatique.....	131
Figure II. 44. Spectre IR de la molécule 14a montrant la présence des fonctions nitrile	132
Figure II. 45. Synthèse des bis- et poly-amidoximes 15a-c.....	133
Figure II. 46. Spectres RMN ^1H des amidoximes 15a-c dans le DMSO-d_6	135
Figure II. 47. Montée en température et dépendance des déplacements chimiques en RMN ^1H de 15c	137
Figure II. 48. Spectres SM haute résolution des amidoximes 15a-c	139

<i>Figure II. 49. Mécanisme majoritaire de la formation des amidoximes et des amides selon Srivastava et al.</i>	142
<i>Figure II. 50. Plan des tests biologiques réalisés</i>	153
<i>Figure II. 51. Préparation des solutions de 100 à 0,1 mM pour l'étude de la solubilité des amidoximes dans le PBS</i>	154
<i>Figure II. 52. Structure de la 4-chlorobenzamidoxime utilisée comme référence durant les tests biologiques de ce travail</i>	158
<i>Figure II. 53. Principe de la méthode de Griess : détection des ions nitrites par synthèse d'un composé azoïque</i>	159
<i>Figure II. 54. Droite d'étalonnage représentant l'absorbance en fonction de la concentration en ions nitrites suivant la méthode de Griess</i>	160
<i>Figure II. 55. Concentration des ions nitrites libérés par les amidoximes suite à une incubation de 10 minutes avec les microsomes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ESM de trois à cinq expériences indépendantes et comparées par One-way ANOVA; * $p < 0,05$ versus référence</i>	162
<i>Figure II. 56. Conversion du MTT en fromazan par les mitochondries pour la mesure de la cytocompatibilité (principe du test MTT)</i>	163
<i>Figure II. 57. Viabilité des cellules musculaires lisses après 24 heures d'incubation à des concentrations se situant entre 0,001 et 100 μM. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ESM de trois à quatre échantillons et comparés par Two-way ANOVA ; * $p < 0,001$ 100 μM versus toutes les concentrations (post-test de Bonferroni)</i>	165
<i>Figure II. 58. Mécanisme de la méthode de DAN pour la quantification des ions nitrite</i>	167
<i>Figure II. 59. Droites d'étalonnage de la méthode de DAN pour la quantification des nitrites et des RSNO, respectivement</i>	168

Figure II. 60. Concentration en RSNO intracellulaire d'un échantillon (n=1) après 1h, 6h et 18h d'incubation des cellules musculaires lisses avec 100 μ M des produits à l'exception de 12a à 50 μ M.....170

*Figure II. 61. Concentration du RSNO intracellulaire après 1 h d'incubation des cellules musculaires avec 100 μ M des molécules à l'exception de la molécule 12a à 50 μ M. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ ESM de trois échantillons indépendants et comparés par One-way ANOVA; * $p < 0,05$ versus GSNO (post-test de comparaisons multiples de Dunnett)171*

Figures Partie III :

Figure III. 1. HPLC analysis of the mono-amidoxime 9a.....192

Figure III. 2. HPLC analysis of the mono-amidoxime 9b.....193

Figure III. 3. HPLC analysis of the bis-amidoxime 12a.....198

Figure III. 4. HPLC analysis of the mono-amidoxime 12b.....199

Synthèse de double donneurs de monoxyde d'azote, évaluation de leur cytotoxicité et de leur activité pharmacologique

Mots clés : *S*-nitrosothiol, amidoxime, monoxyde d'azote, maladies cardiovasculaires

Ce travail décrit la synthèse de différentes familles de composés donneurs de monoxyde d'azote (NO) à base d'amidoximes ainsi que l'évaluation biologique de leur capacité à libérer NO.

Dans un premier temps, la synthèse de double donneurs hybrides de NO portant conjointement une fonction amidoxime et une fonction *S*-nitrosothiol a été envisagée. Lors de ces essais, une molécule possédant deux fonctions amidoximes liées par un pont disulfure a été élaborée, avec pour objectif ultérieur sa réduction en thiol libre suivi d'une nitrosation par les enzymes des cellules.

La suite des travaux a été consacrée à l'élaboration de différents types de donneurs de NO constitués uniquement d'amidoximes. Plusieurs mono-, bis- et poly-amidoximes ont été synthétisées et caractérisées.

Toutes les amidoximes solubles dans le milieu physiologique ont été testées et se sont avérées cytocompatibles vis-à-vis de cellules musculaires lisses humaines. Les capacités de libération de NO et les cinétiques de ces libérations ont été évaluées.

Finalement, les études biologiques visant à doser NO libéré ont montré que deux mono-amidoximes aromatiques permettaient de délivrer des quantités élevées de NO à la fois sur des microsomes de foie de rats et sur des cellules lisses humaines. Enfin, la bis-amidoxime aromatique/aliphatique présente une aptitude similaire à la libération de NO sur les cellules que les mono-amidoximes aromatiques mais à une concentration réduite de moitié, ce qui montre que cette molécule est la plus performante de tous les composés donneurs de NO testés dans le cadre de cette étude.

Synthesis of nitric oxide double donors, evaluation of their cytotoxicity and pharmacological activity

Keywords : *S*-nitrosothiol, amidoxime, nitric oxide, cardiovascular disease

This work describes the synthesis of different families of nitric oxide (NO) donor compounds based on amidoximes as well as the biological evaluation of their NO release ability.

Firstly, the synthesis of hybrid NO double donors possessing jointly an amidoxime function and an *S*-nitrosothiol function has been considered. During these trials, a molecule having two amidoxime functions linked by a disulfide bond was developed, with a view to its subsequent reduction into free thiol followed by a nitrosation by the cells enzymes.

The following part of this work has been devoted to the development of different types of NO donors consisting solely of amidoximes. Various mono-, bis- and poly-amidoximes have been synthesized and characterized. All the amidoximes that are soluble in the physiological medium have been tested and were shown to be cytocompatible with human smooth muscle cells. The NO release capabilities and the kinetics of these releases were evaluated.

Finally, the biological studies aimed to evaluate the release of NO showed that two aromatic mono-amidoximes allowed providing high quantities of NO on both rat liver microsomes and on human smooth cells. Lastly, the aromatic/aliphatic bis-amidoxime presents a similar ability to release NO on cells as the aromatic mono-amidoximes but at a twice lower concentration, which shows that this molecule is the most powerful among all NO donor compounds tested during this study.