

# Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE  
STRASBOURG

Discipline : Chimie Organique

Par

Frédérique HAUSS

---

**Composés hybrides resvératrol/ $\omega$ -alcanols :  
Modulateurs de l'activation microgliale  
et inducteurs de la différenciation cellulaire**

---

Soutenue le 25 octobre 2006 devant la commission d'examen

|            |                              |                       |
|------------|------------------------------|-----------------------|
| Professeur | Marcel HIBERT                | Rapporteur interne    |
| Professeur | Jacqueline MARCHAND-BRYNAERT | Rapporteur externe    |
| Docteur    | Yves CHAPLEUR                | Rapporteur externe    |
| Docteur    | Bang LUU                     | Directeur de thèse    |
| Professeur | Paul HEUSCHLING              | Co-directeur de thèse |

## RÉSUMÉ

Les neuropathologies dégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques, sont souvent accompagnées de phénomènes inflammatoires. La microglie, une population de monocytes-macrophages résidant dans le système nerveux central, est en grande partie responsable de la régulation des phénomènes inflammatoires et immunitaires dans le cerveau. Après certains stimuli, la microglie se différencie en cellules immuno-compétentes capables de faire de la phagocytose. Cette activation microgliale se traduit également par une libération de divers radicaux libres, de certaines protéases ainsi que de cytokines pro-inflammatoires. Elle est souvent observée lors de lésions ou infections cérébrales, ainsi qu'au cours de neuropathies comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques.

Une approche thérapeutique intéressante consiste à protéger les cellules des différentes formes de dégénérescence tout en régénérant ou en remplaçant les cellules nerveuses mortes ou lésées à partir de cellules souches neurales.

Dans cette optique nous avons synthétisé des molécules hybrides, les **RFA** (*Resveratrol Fatty Alcohols*) combinant un noyau anti-oxydant, le resvératrol, pour son effet neuroprotecteur et une chaîne  $\omega$ -hydroxylée pour son aspect neurorégénérateur. La synthèse adoptée repose sur un couplage de Sonogashira permettant de greffer la chaîne oméga-alcanol et sur un couplage de Wadsworth-Emmons permettant la création de la double liaison carbone-carbone exclusivement *trans* et donnant ainsi naissance au noyau stilbène.

Les RFA possèdent de bonnes capacités anti-oxydantes. De plus, les RFA et plus particulièrement le RFA12, portant 12 atomes de carbone, est capable d'atténuer la réponse inflammatoire en modulant l'activation microgliale tout en induisant la différenciation des cellules souches neurales en neurones matures. Des études préliminaires du mécanisme d'action permettent de postuler en faveur d'une implication du RFA12 dans la voie de signalisation Notch.

**Mots clé :** Neuropathologies, resvératrol, alcools gras resvératroliques, couplages de Sonogashira et de Wadsworth-Emmons, neuro-inflammation, anti-oxydation, activation microgliale, cellules souches neurales, différenciation cellulaire, voie de signalisation Notch.

## **ABSTRACT**

Inflammatory events are often observed during degenerative neuropathies like Alzheimer's disease or multiple sclerosis. Microglial cells, the brain resident monocyte-macrophage cell population, play an important role during neuro-inflammation processes. Upon appropriate stimulation, these cells continue their previously halted differentiation to become immunocompetent phagocytic cells. This activation is accompanied by the production of numerous free radicals, proteases and pro-inflammatory cytokines. This type of activation is observed after brain injury or infections, as well as during the development of neuropathies, like Alzheimer's disease or multiple sclerosis.

A new therapeutic approach consists in protecting cells against degeneration while regenerating nerve cells from existing neural stem cells.

So, we investigated the synthesis of compounds presenting neuroprotective as well as neuroregenerative activities. These compounds, Resveratrol Fatty Alcohols (RFAs) bear a neuroprotective moiety, resveratrol, and a neurotrophic omega-alkanol structure. A Sonogashira cross-coupling followed by a Wadsworth-Emmons reaction leads to the RFAs.

The different RFAs have good antioxidative capacities. Beside, RFA's, especially RFA12, bearing 12 carbon atoms on the side chain, have a down regulating effect on neuroinflammation by modulating the microglial activation while promoting the differentiation of neural stem cells into mature neurons at 0.1  $\mu$ M. Preliminary mechanistic studies showed that these effects act at least partially through the Notch signalling pathway.

**Keywords:** Neuropathologies, resveratrol, resveratrol fatty alcohols, Sonogashira and Wadsworth-Emmons couplings, neuro-inflammation, antioxidation, microglial modulation, neural stem cells, differentiation, Notch signaling pathway.

A mes parents, pour leur soutien  
et pour leur affection sans failles.  
Sans vous, rien n'aurait été possible !

A Thierry, pour m'avoir accompagnée tout  
au long de cette aventure. Pour son immense  
compréhension, sa générosité et son amour.

## **Remerciements**

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles sous la direction du Docteur **Bang Luu** ainsi qu'au Laboratoire de NeuroBiologie sous la direction du Professeur **Paul Heuschling**.

Au Docteur **Bang Luu** et au Professeur **Paul Heuschling**,

Je tiens à vous remercier très sincèrement de m'avoir accueillie dans vos équipes de recherche et de m'avoir proposé un sujet passionnant mêlant la chimie et la biologie du système nerveux. Merci aussi pour la liberté d'initiatives que vous m'avez laissée ainsi que pour vos nombreux encouragements.

Aux Professeurs **Jacqueline Marchand-Brynaert**, **Marcel Hibert** et au Docteur **Yves Chapleur**,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce mémoire, consciente du travail que cela représente.

A **Thierry**, merci pour ton soutien sans failles aussi bien dans les bons comme dans les mauvais moments. Pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton amour.

A **Sandra**, ma sœur, qui malgré nos caractères opposés, m'a toujours soutenue et fait confiance, sans oublier **Chris** et leur petit bout **Mathilde**.

A **Phil**, pour tout ce que nous avons partagé et tout ce que tu m'as apporté pendant toutes ces années passées ensemble.

Aux Docteurs **Eleonora Morga**, **Elisabeth Trifilieff**, **Laurent Désaubry**, **Luc Grandbarbe** pour leurs conseils enrichissants.

A **Djalil**, qui a guidé mes premiers pas au sein du laboratoire. Merci pour ta patience, ton aide et de m'avoir fait découvrir les joies de la paillasse! Au début tu étais un collègue, maintenant tu es un ami.

A **Nadège**, qui a su m'accepter telle que je suis. Merci pour ton soutien quotidien, ton immense gentillesse, ta disponibilité et surtout, merci de m'avoir donné ta confiance et ton amitié. Tu es devenue une « meilleure Amie ».

Un grand merci à **Nadège**, **Djalil**, **Thierry**, **Nora**, **Alessandro**, **Luc** et **Tony** pour le temps qu'ils ont passé à corriger ce mémoire.

Je tiens à remercier **Alessandro** et **Jiaweī** pour leur aide très précieuse quant à la réalisation des études biologiques primordiales à ce travail de thèse.

Merci, en particulier à mes amis et complices du Centre de Neurochimie, **Nadège**, **Djalil**, **Thierry**, **Jiaweī**, **Ludivine**, **Mazen**, **Nigel**, **Karim**, **Marie** et **Julien**. Ainsi qu'aux différents stagiaires qui ont séjourné au labo, et plus particulièrement **Jakob** et **Philippe**.

A toute ma famille qui représente énormément à mes yeux et plus particulièrement ma grand-mère, mes cousines **Genny** et **Véro**, mon parrain **Georges**, tata **Françoise**, mes beaux-parents **Marie-Jeanne** et **Maurice** ainsi qu'**Eliane** et **Jean-Jacques**.

Finalement, un grand merci à mes amis « non-chimistes » et plus particulièrement **Chantal**, pour ne m'avoir jamais laissée tomber! Sans oublier, **Estelle**, **Didi**, **Mimoun**, **Séverine**, **Bruno**, **Caro**, **Fabien** et **Nico**.

---

# *Sommaire*

---

# SOMMAIRE

## Introduction générale

|   |    |
|---|----|
| I. Problématique.....   | 1  |
| II. Le système nerveux central.....   | 1  |
| A. Les neurones.....  | 2  |
| B. Les cellules gliales.....  | 3  |
| C. Les cellules souches neurales.....   | 4  |
| III. Les maladies dégénératives et inflammatoires du système<br>nerveux central et leurs traitements..... | 4  |
| A. La maladie d'Alzheimer.....  | 5  |
| 1. Généralités.....   | 5  |
| 2. Les lésions histologiques.....   | 5  |
| 3. Implication des phénomènes inflammatoires et immunitaires.....   | 7  |
| 4. Les stratégies thérapeutiques.....   | 7  |
| 4.1. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.....   | 8  |
| 4.2. Inhibition de la formation de la protéine A $\beta$ .....  | 9  |
| 4.3 Anti-inflammatoires.....  | 9  |
| 4.4 Autres voies de recherches.....   | 10 |
| B. La sclérose en plaques.....  | 10 |
| 1. Généralités.....   | 10 |
| 2. Une maladie dite « auto-immune ».....  | 11 |
| 3. Evolutions et formes cliniques de la maladie.....  | 12 |
| 4. Les stratégies thérapeutiques.....   | 13 |
| 4.1. Prise en charge d'une poussée.....   | 13 |



|  |    |
|--|----|
| VI. La neuroprotection, un outil thérapeutique complémentaire essentiel .....              | 29 |
| A. Implication de la glie dans les processus inflammatoires et immunitaires .....          | 29 |
| 1. Généralités .....   | 29 |
| 1.1 Microgliocytes et astrocytes .....   | 29 |
| 1.2 Le système immunitaire .....   | 30 |
| 1.3 Notion de neuroimmunologie .....   | 30 |
| 2. La microglie .....  | 31 |
| 2.1 Activation de la microglie .....   | 31 |
| 2.2 Production de cytokines .....  | 32 |
| 2.3 Production de monoxyde d'azote .....   | 33 |
| 2.4 Interaction avec le système immunitaire .....  | 33 |
| 3. Les astrocytes .....  | 34 |
| 3.1 Fonctions .....  | 34 |
| 3.2 La gliose réactionnelle .....  | 34 |
| 4. Importance de l'inflammation dans les neuropathies dégénératives .....                  | 35 |
| B. Le stress oxydant .....   | 35 |
| 1. Définition .....  | 36 |
| 2. Pathologies du système nerveux et stress oxydant .....                                  | 36 |
| 3. Lutte contre le stress oxydant .....  | 37 |
| VII. Approche thérapeutique innovante .....  | 38 |
| VIII. Les polyphénols naturels .....   | 39 |
| A. Généralités .....   | 39 |
| B. Le resvératrol : un polyphénol aux vertus thérapeutiques variées et intéressantes ..... | 40 |
| 1. Généralités .....   | 40 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2. Les activités biologiques du resvératrol .....              | 41        |
| <b>IX. Cadre de travail .....</b>                              | <b>42</b> |
| A. Approche thérapeutique innovante des neuropathologies ..... | 42        |
| B. Travaux effectués au laboratoire .....                      | 43        |
| 1. Les alcools à longue chaîne hydrocarbonnée .....            | 43        |
| 2. Molécules hybrides .....                                    | 43        |
| C. Projet d'étude .....  | 43        |
| <b>Références bibliographiques .....</b>                       | <b>45</b> |

## **Chapitre I : Synthèse des alcools gras resvératroliques (RFA)**

|  |    |
|--|----|
| I. Introduction .....  | 54 |
| II. Formation de la double liaison <i>trans</i> du resvératrol :<br>Rappels bibliographiques ..... | 55 |
| A. Couplage de Wadsworth-Emmons .....  | 55 |
| B. Condensation lithiatrice .....  | 56 |
| C. Couplages au palladium .....  | 56 |
| 1. Couplage de Heck .....  | 56 |
| 2. Couplage de Suzuki .....  | 58 |
| D. Métathèse croisée .....   | 58 |
| III. Couplage d'une chaîne carbonée sur un noyau<br>aromatique : Rappels bibliographiques .....    | 59 |
| A. Alkylations de dérivés du resvératrol .....   | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 1. Addition d'halogénures d'alkyles.....      | 60 |
| 2. Friedel-Crafts.....                        | 61 |
| B. Réaction de Wittig.....                    | 61 |
| C. Utilisation de la chimie du palladium..... | 62 |
| 1. Couplage de Heck.....                      | 62 |
| 2. Couplage de Suzuki.....                    | 62 |
| 3. Couplage de Sonogashira.....               | 63 |

#### IV. Voie de synthèse choisie..... 64

|  |    |
|--|----|
| A. La voie de synthèse A.....                              | 66 |
| 1. Echange halogène-métal / <i>ortho</i> -métallation..... | 66 |
| 2. Couplage de Suzuki.....                                 | 67 |
| B. La voie de synthèse B.....                              | 67 |
| C. Récapitulatif.....                                      | 69 |

#### V. Synthèse des différents RFA..... 70

|   |    |
|---|----|
| A. Greffage de la chaîne latérale : Couplage de Sonogashira.....            | 70 |
| 1. Synthèse des alcynes vrais <i>O</i> -silylés.....                        | 70 |
| 2. Synthèse de l'iodure aromatique.....                                     | 71 |
| 3. Couplage de Sonogashira.....   | 72 |
| B. Formation du noyau du resvératrol : Couplage de<br>Wadsworth-Emmons..... | 73 |
| 1. Synthèse des aldéhydes.....  | 73 |
| 2. Synthèse des différents phosphonates.....                                | 73 |
| 2.1 Phosphonates mono- et diméthoxylés.....                                 | 74 |
| 2.1.1 A partir du bromure benzylique.....                                   | 74 |
| 2.1.2 A partir de l'alcool benzylique en une étape.....                     | 75 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.2 | Phosphonates silylés.....                            | 75 |
| 2.3 | Phosphonates méthoxyméthyl éthers.....               | 76 |
| 3.  | Couplage de Wadsworth-Emmons.....                    | 77 |
| 3.1 | Formation des RFA méthoxylés.....                    | 77 |
| 3.2 | Formation des dérivés méthoxylés du resvératrol..... | 80 |
| 3.3 | Autres dérivés des RFA.....                          | 80 |
| 4.  | Déprotection des différents RFA méthoxylés.....      | 82 |
| 4.1 | Déprotection des RFA triméthoxylés.....              | 82 |
| 4.2 | Déprotection des RFA tétraméthoxylés.....            | 85 |
| VI. | Récapitulatif.....                                   | 86 |
|     | Références bibliographiques.....                     | 87 |

## **Chapitre II : Nouvelle voie de synthèse des RFA**

|      |  |    |
|------|--|----|
| I.   | Introduction.....                                  | 91 |
| II.  | Objectifs.....                                     | 92 |
| III. | Voie de synthèse choisie.....                      | 93 |
| A.   | Rappels bibliographiques.....                      | 93 |
| B.   | Voie de synthèse.....                              | 94 |
| IV.  | Synthèse du RFA10 et du RFA12.....                 | 95 |
| A.   | Couplage de Sonogashira.....                       | 96 |
| 1.   | Synthèse des alcynes vrais <i>O</i> -protégés..... | 96 |
| 2.   | Synthèse de l'iodure aromatique.....               | 96 |

|  |     |
|--|-----|
| 3. Couplage de Sonogashira .....             | 98  |
| B. Couplage de Heck .....                    | 99  |
| 1. Synthèse des chlorures d'acides .....     | 99  |
| 2. Formation des styrènes disubstitués ..... | 100 |
| 3. Couplage de Heck décarbonylant .....      | 101 |
| 4. Déprotection des dérivés acétylés .....   | 102 |
| V. Conclusion .....                          | 103 |
| Références bibliographiques .....            | 104 |

## **Chapitre III : Etudes biologiques**

|  |     |
|--|-----|
| I. Introduction .....  | 106 |
| II. Projet d'étude .....   | 107 |
| A. Etudes des capacités anti-oxydantes des RFA .....                                       | 107 |
| B. Effets des différents RFA au cours de l'activation microgliale .....                    | 107 |
| C. Effets neurotrophiques des RFA : Différenciation des cellules<br>souches neurales ..... | 108 |
| D. Implication de la voie de signalisation Notch .....                                     | 108 |
| III. Capacité anti-oxydante des différents RFA .....                                       | 109 |
| A. Test au DPPH .....  | 109 |
| 1. Principe du test .....  | 109 |
| 2. Résultats – Discussion .....  | 110 |
| B. Test à l'ABTS .....   | 111 |

|   |     |
|---|-----|
| 1. Principe du test .....                                   | 111 |
| 2. Résultats – Discussion .....                             | 112 |
| C. Conclusion .....   | 114 |
| <br>  |     |
| IV. Modulation de l'activation microgliale .....            | 114 |
| <br>  |     |
| A. Test de toxicité : Test au MTT .....                     | 114 |
| 1. Principe du test .....                                   | 115 |
| 2. Résultats – Discussion .....                             | 115 |
| 3. Conclusion .....   | 116 |
| B. Monoxyde d'azote .....                                   | 116 |
| 1. Mesure du taux de NO .....                               | 117 |
| 2. Dosage de l'ARN <sub>m</sub> de la NOS II (iNOS) .....   | 119 |
| C. Protéine TNF- $\alpha$ .....                             | 119 |
| 1. Mesure du taux de TNF- $\alpha$ .....                    | 120 |
| 2. Dosage de l'ARN <sub>m</sub> du TNF- $\alpha$ .....      | 122 |
| D. Capacité phagocytaire .....                              | 122 |
| 1. Principe du test .....                                   | 123 |
| 2. Résultats – Discussion .....                             | 123 |
| E. Conclusion .....   | 124 |
| <br>  |     |
| V. Différenciation des cellules souches neurales .....      | 125 |
| <br>  |     |
| A. Les neurosphères .....                                   | 125 |
| B. Les RFA, inducteurs de différenciation cellulaire? ..... | 125 |
| 1. Protocole expérimental .....                             | 126 |
| 2. Résultats – Discussion .....                             | 127 |
| 3. Etudes de prolifération .....                            | 130 |
| 4. Conclusion .....   | 132 |

|  |     |
|--|-----|
| VI. Implication du RFA12 dans la voie de signalisation Notch | 132 |
| A. La voie Notch dans les cellules MMGT-12                   | 132 |
| 1. Expression de la voie Notch dans les cellules MMGT-12     | 132 |
| 2. Implication du RFA12                                      | 133 |
| B. La voie Notch et les neurosphères                         | 134 |
| VII. Conclusion  | 135 |
| Références bibliographiques                                  | 136 |

## **Conclusion générale et perspectives**

|                        |     |
|------------------------|-----|
| I. Synthèse organique  | 138 |
| II. Etudes biologiques | 139 |
| III. Perspectives      | 141 |

## **Partie expérimentale**

|  |     |
|--|-----|
| I. Partie expérimentale Chimie                   | 142 |
| II. Partie expérimentale Physico-chimie/Biologie | 204 |

---

*Abréviations,  
acronymes, symboles  
et noms triviaux*

---

## ABBREVIATIONS, ACRONYMES, SYMBOLES ET NOMS TRIVIAUX

|                   |  |
|-------------------|--|
| °C                | degré Celsius  |
| ABTS              | [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] |
| Ac                | acétyle  |
| AcOEt             | acétate d'éthyle   |
| ADN               | acide désoxyribonucléique                                |
| ADNc              | acide désoxyribonucléique complémentaire                 |
| ARN               | acide ribonucléique                                      |
| ARNm              | acide ribonucléique messenger                            |
| arom              | aromatique   |
| BCA               | bicinchoninic acid                                       |
| BDNF              | brain derived neurotrophic factor                        |
| benz              | benzyle  |
| BnBr              | bromure de benzyle                                       |
| $\beta$ -Br-9-BBN | $\beta$ -bromo-9-borabicyclo[3.3.1]nonane                |
| BSA               | bovine serum albumine                                    |
| <i>n</i> -BuLi    | <i>n</i> -butyllithium                                   |
| <i>t</i> -BuLi    | <i>t</i> -butyllithium                                   |
| <i>t</i> BuOK     | <i>t</i> -butylate de potassium                          |
| CCM               | chromatographie sur couche mince                         |
| CNTF              | ciliary neurotrophic factor                              |
| d                 | doublet  |
| dd                | doublet dédoublé   |
| DPPH              | 2,2'-di(4- <i>tert</i> -octylphényl)-1-picrylhydrazyle   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| DMEM               | Dulbecco's modified Eagle medium          |
| DMF                | <i>N, N</i> -diméthylformamide            |
| DMSO               | diméthylsulfoxyde                         |
| dNTP               | désoxyribonucléotides triphosphate        |
| ECL                | enhanced chemi-luminescence               |
| éq                 | équivalent                                |
| EGF                | Epidermal Growth Factor                   |
| EtOH               | éthanol                                   |
| Et <sub>2</sub> O  | éter                                      |
| g                  | gramme                                    |
| GAPDH              | glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase |
| h                  | heure                                     |
| Hz                 | hertz                                     |
| IgG                | immunoglobuline G                         |
| IFN- $\gamma$      | interféron-gamma                          |
| IL                 | interleukine                              |
| IR                 | infrarouge                                |
| J                  | constante de couplage                     |
| LiAlH <sub>4</sub> | hydrure de lithium et d'aluminium         |
| m                  | mètre                                     |
| m                  | multiplet                                 |
| M                  | molaire                                   |
| MeOH               | méthanol                                  |
| mg                 | milligramme                               |
| MHz                | mégahertz                                 |

|        |   |
|--------|---|
| min    | minute  |
| mL     | millilitre  |
| mmol   | millimole   |
| mol    | mole  |
| MTT    | bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium |
| NaOMe  | méthylate de sodium   |
| NEM    | <i>N</i> -éthylmorpholine                                       |
| NGF    | nerve growth factor   |
| NMO    | <i>N</i> -methyilmorpholine- <i>N</i> -oxide                    |
| NOS II | monoxyde d'azote synthase de type II                            |
| PBS    | phosphate saline buffer   |
| PCR    | Polymer Chain reaction  |
| Pd/C   | palladium sur charbon   |
| Ph     | phényle   |
| PM     | poids moléculaire   |
| ppm    | partie par million  |
| q      | quadruplet  |
| qn     | quintuplet  |
| qnd    | quintuplet dédoublé   |
| Rf     | rétention frontale  |
| RFA    | Resveratrol Fatty Alcohols                                      |
| RMN    | résonance magnétique nucléaire                                  |
| RT     | rétrotranscription  |
| s      | singulet  |

|               |   |
|---------------|---|
| SVF           | Sérum de veau foetal                      |
| SDS           | sodium dodécyl sulfate                    |
| t             | triplet                                   |
| ta            | température ambiante                      |
| TBAF          | fluorure de tétrabutylammonium            |
| TBDMS ou TBS  | <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle          |
| TMS           | triméthylsilyle                           |
| td            | triplet dédoublé                          |
| THF           | Tétrahydrofurane                          |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor $\alpha$            |
| TPAP          | Tétrapropylammonium perrhuthénate         |
| Tris          | 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol |
| $\delta$      | déplacement chimique                      |
| $\nu$         | fréquence d'absorption                    |

---

***Introduction  
générale***

---

## **I. Problématique**

Les maladies dégénératives, se traduisant par la dégénérescence d'un type cellulaire donné, sont très nombreuses et ont un impact de plus en plus important. Leur fréquence s'est vue augmentée principalement à cause de l'allongement de l'espérance de vie.

Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux maladies dégénératives du système nerveux central qui se caractérisent par une perte fonctionnelle des cellules nerveuses. Les maladies les plus fréquentes dues au vieillissement du système nerveux central comprennent :

- la maladie d'Alzheimer
- la maladie de Parkinson
- la sclérose latérale amyotrophique

Ces maladies peuvent, au contraire, également toucher des adultes jeunes (20-40 ans), c'est notamment le cas de la sclérose en plaques. A l'inverse des autres maladies, pour la sclérose en plaques, la dégénérescence des cellules nerveuses est secondaire. La cause première de la maladie est un processus inflammatoire.

Nous nous intéressons plus précisément à la conception et à la synthèse d'agents thérapeutiques potentiels permettant de combattre voire d'empêcher les phénomènes de dégénérescences nerveuses. Ainsi, nous développons de nouvelles molécules susceptibles d'être utilisées dans le traitement des diverses neuropathies dégénératives.

## **II. Le système nerveux central**

Le système nerveux humain est composé du système nerveux central (SNC) constitué par la moelle épinière et l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et du système nerveux périphérique (SNP) englobant tous les nerfs rattachés au système nerveux central.

Le système nerveux est responsable de l'envoi, de la réception et du traitement de l'influx nerveux. Il contrôle également toutes les actions et sensations des différentes parties du corps ainsi que les émotions, la pensée et la mémoire.

Le système nerveux central est principalement constitué de deux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales.

Les neurones constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ils permettent la transmission d'un signal, l'influx nerveux.

Les cellules gliales quant à elles assurent essentiellement un rôle de soutien et de nutrition des neurones. Par ailleurs, ces cellules jouent un rôle déterminant dans l'établissement de nouvelles connexions.

Récemment, la présence dans le cerveau d'un autre type de cellules nerveuses a été démontrée. En effet, de petites quantités de cellules souches adultes, permettant la maintenance du cerveau ainsi que le remplacement des différents types cellulaires nerveux, ont été mises en évidence.

## A. Les neurones

Les neurones représentent 10 à 20% des cellules du cerveau. Ce sont des cellules hautement spécialisées dans la réception, le traitement et la transmission de l'influx nerveux. Un neurone comporte fondamentalement trois parties (schéma 1) :

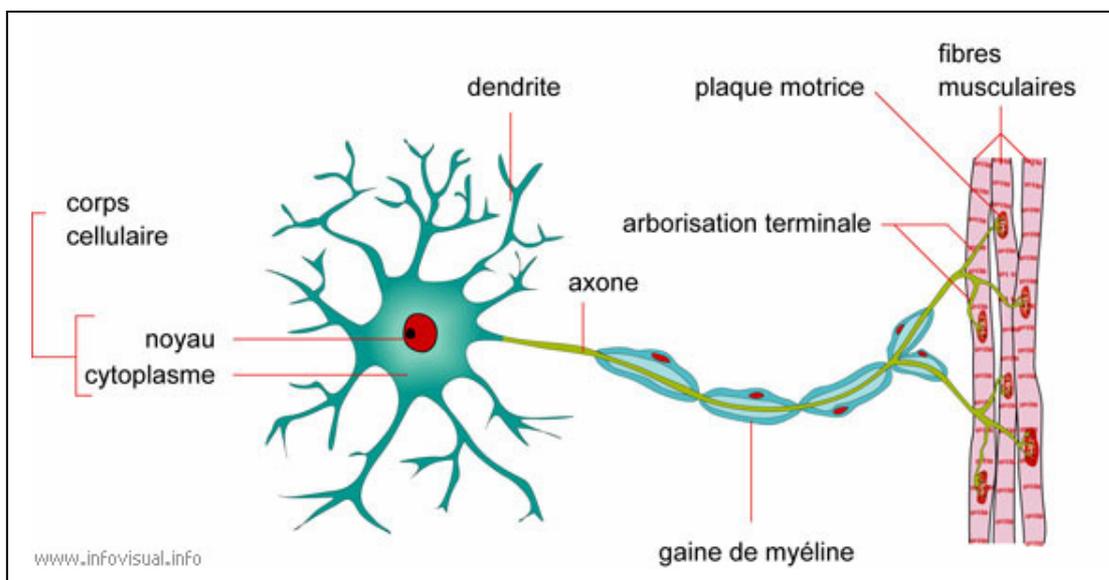


Schéma 1 : Le neurone.

- **Le soma** (péricaryon) ou corps cellulaire contenant le noyau cellulaire et la plupart des composantes cytoplasmiques. Il assure la synthèse des constituants nécessaires à la structure et au fonctionnement du neurone.
- **L'axone** (cylindraxe), la partie allongée du neurone qui assure la conduction de l'influx nerveux du corps cellulaire jusqu'à son extrémité. Il prend naissance au niveau d'une expansion du soma (cône d'émergence) et se termine par des boutons terminaux.

- **Les dendrites** représentent le deuxième type de prolongement prenant naissance au niveau du soma. Ils se différencient de l'axone par leur taille plus courte sous forme d'arborescence et constituent la principale structure de réception de l'influx nerveux.

## **B. Les cellules gliales**

Les cellules gliales représentent 80 à 90% des cellules du SNC et occupent environ la moitié du volume du cerveau. Elles assurent principalement un rôle de soutien et de nutrition des neurones. En réalité, elles exercent un rôle bien plus complexe et étendu, indispensable au bon fonctionnement du système nerveux.

- Les **astrocytes** (40% des cellules du cerveau) constituent les cellules les plus répandues du système nerveux. Ils sont caractérisés par leur forme étoilée et leurs nombreux prolongements. En fonction de la région où ils se situent, ils occupent soit un rôle nourricier au niveau de la substance grise, soit un rôle de squelette ou de soutien élémentaire au niveau de la substance blanche.

- Les **oligodendrocytes** (20% des cellules du cerveau) sont de petites cellules émettant peu de prolongements. Elles sont à l'origine de la formation des gaines de myéline qui s'enroulent autour des axones et permettent l'accélération du passage de l'influx nerveux.

- Les **cellules épendymaires** tapissent les formations ventriculaires. Elles constituent le liquide céphalo-rachidien et sont susceptibles de jouer un rôle lors de la migration de certaines cellules au cours du développement cérébral.

- Les **cellules microgliales** (10% des cellules du cerveau) possèdent les caractéristiques morphologiques et immunologiques des monocytes-macrophages. Les microgliocytes jouent un rôle essentiel au cours des réponses inflammatoires et immunitaires du système nerveux. Les cellules microgliales activées sécrètent des radicaux libres, des protéases, ainsi que des cytokines impliqués dans les phénomènes inflammatoires.

Les cellules restantes sont principalement constituées de **cellules endothéliales** qui font partie de la barrière hémato-encéphalique, une protection du cerveau contre différentes substances nocives ou non du flux sanguin, et d'une petite quantité de **cellules souches neurales**.

## **C. Les cellules souches neurales**

La majorité des cellules du système nerveux central dérive d'un précurseur multipotentiel commun appelé, cellule souche neurale.

Une cellule souche est définie par deux caractéristiques principales. Elles sont capables de s'autorenouveler quasi indéfiniment (autorenouvellement) et peuvent donner naissance aux trois types cellulaires majeurs du système nerveux central : neurones, oligodendrocytes et astrocytes.

## **III. Les maladies dégénératives et inflammatoires du système nerveux central et leurs traitements**

Les maladies du système nerveux central, qu'elles soient à composantes dégénératives et/ou inflammatoires se caractérisent par une dégénérescence progressive pour aboutir à une mort des différentes catégories de cellules nerveuses.

Dans la grande majorité des cas, ces pathologies dégénératives sont essentiellement associées au vieillissement du système nerveux central mais peuvent également être dues à des agents infectieux ou aux formes pathogènes du prion comme la maladie de Creutzfeld-Jacob. Elles peuvent également être associées à des phénomènes inflammatoires comme dans le cas de la sclérose en plaques.

Ces neuropathies dégénératives peuvent être principalement classées en deux catégories :

- les pathologies provoquant des démences séniles et/ou des troubles moteurs comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la chorée de Huntington
- les maladies neurologiques entraînant des paralysies comme la sclérose latérale amyotrophique ou la sclérose en plaques.

Dans cet exposé nous allons détailler plus précisément deux maladies du système nerveux central, la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques.

## A. La maladie d'Alzheimer

### 1. Généralités

La maladie d'Alzheimer doit son nom au psychiatre allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915) qui a décrit en 1906 pour la première fois les symptômes de la maladie. La maladie d'Alzheimer n'a été reconnue qu'en 1963 comme maladie en tant que telle et non comme un processus normal de vieillissement du cerveau.

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative. Cette démence se traduit par une perte fonctionnelle progressive des cellules nerveuses. Les premières lésions apparaissent dans les zones corticales du cerveau, zones impliquées dans la mémoire. Au fur et à mesure de son évolution, la maladie va affecter de nouvelles régions du cerveau ce qui va se traduire par des difficultés du langage, de raisonnement, des capacités gestuelles mais aussi par des troubles du comportement.<sup>[1]</sup>

Cette maladie est fortement liée à l'âge et au sexe. De manière générale les femmes sont plus touchées que les hommes et les personnes de plus de 65 ans (environ 5%) sont moins exposées que les personnes de plus de 85 ans (environ 30%). Actuellement en France on dénombre 800 000 personnes atteintes d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer existe sous deux formes. Une forme dite **sporadique** qui est la plus courante (90 à 95% des cas) et la **forme familiale autosomique dominante** moins répandue où le gène autosomique dominant est transmis d'une génération à l'autre et où les premiers symptômes de la maladie apparaissent en général bien avant 65 ans.

### 2. Les lésions histologiques

La maladie d'Alzheimer se caractérise par deux types de lésions histologiques majeures : les plaques séniles (PS) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF).

- *Les plaques séniles* sont des dépôts extracellulaires constitués essentiellement de la protéine **Amyloïde béta (A $\beta$ )** mais également de différents cofacteurs comme l'apolipoprotéine E, des protéoglycanes, ainsi que de cellules inflammatoires.<sup>[2]</sup> La protéine A $\beta$  provient du clivage de la glycoprotéine transmembranaire appelée « **Amyloïd Precursor Protein** » ou **APP** (schéma 2).

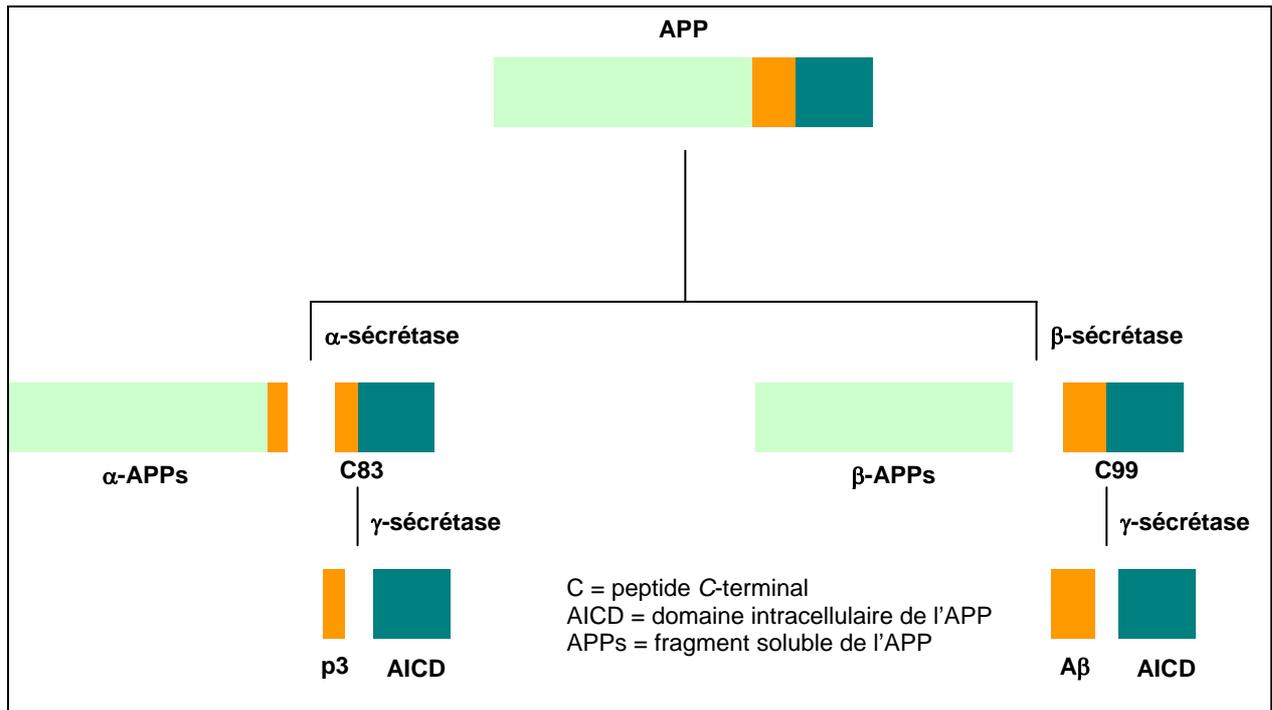


Schéma 2 : Clivage de la glycoprotéine APP.

L'APP est une protéine très répandue dans l'organisme. Dans le SNC elle joue plusieurs rôles importants dont celui de facteur de croissance permettant l'adhésion cellulaire et la stabilité membranaire. L'APP peut être clivée par différentes enzymes, les sécrétases.

Son clivage par l' $\alpha$ -sécrétase est le plus courant et conduit à la formation d'un dérivé soluble permettant son transport vers les synapses. Le clivage par la  $\beta$ -sécrétase, minoritaire, est responsable de la formation de la protéine A $\beta$  lors du processus normal de vieillissement du cerveau. Le peptide A $\beta$  est un produit de clivage non-soluble de l'APP. Au cours de la maladie d'Alzheimer ce peptide est formé en excès et va s'associer à des cellules inflammatoires pour s'agréger sous forme de feuillets  $\beta$  insolubles et très résistants.<sup>[3]</sup> Au contact de ces plaques dites « séniles » les membranes des cellules nerveuses voisines vont être endommagées provoquant ainsi leur mort.

- Les **dégénérescences neurofibrillaires (DNF)** sont des lésions intra-neurales dues à l'accumulation de fibrilles constituées de microtubules, **les neurofilaments** et de **protéines Tau hyperphosphorylées**.<sup>[4]</sup>

Les microtubules font partie du cytosquelette des cellules et permettent le transport de substances du corps cellulaire du neurone vers les terminaisons nerveuses. La protéine Tau est associée aux microtubules du cytosquelette. Elle permet la polymérisation et la stabilisation des microtubules. Au cours de la maladie, une hyperphosphorylation de la protéine Tau va l'empêcher d'exercer son rôle. Il s'ensuit une perturbation du réseau microtubulaire et donc du transport axonal. Les protéines Tau hyperphosphorylées et les microtubules s'associent alors pour former des filaments insolubles appariés en hélice, **les paires hélicoïdales de**

**filaments**, qui induisent la dégénérescence neurofibrillaire ou tauopathie suivie d'une mort neuronale.

### **3. Implication des phénomènes inflammatoires et immunitaires**

De nombreuses études ont été menées dans le but de déterminer les origines possibles de la maladie d'Alzheimer. Des études épidémiologiques ont montré que la prise d'anti-inflammatoires par des patients souffrants de polyarthrite rhumatoïde a un effet protecteur contre la maladie d'Alzheimer. Aussi, l'implication de processus inflammatoires et immunitaires au cours de la maladie est de plus en plus discutée.<sup>[5, 6, 7]</sup>

Ces processus jouent un rôle incontestable dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer.<sup>[6]</sup> Les cellules microgliales et les astrocytes activés par des anomalies ou des lésions s'accumulent autour des plaques séniles en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres générant ainsi une inflammation chronique autour des plaques d'A $\beta$ .<sup>[8, 9]</sup>

La microglie activée sécrète diverses cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukin-1 (IL-1) qui active la synthèse de l'APP.<sup>[10, 11]</sup> Cette production excessive de l'APP engendrerait une saturation de l' $\alpha$ -sécrétase permettant sa métabolisation et donc une déviation vers la formation de la protéine A $\beta$ .

Au cours des processus inflammatoires les cellules gliales vont également sécréter une grande quantité de radicaux libres qui permettrait l'agrégation de l'A $\beta$  via l'augmentation excessive de l'oxydation protéique.

A ce jour, rien ne prouve que l'origine de la maladie d'Alzheimer soit due à des phénomènes inflammatoires. Cependant, au cours de ces dernières années, il a été largement démontré que les processus immunitaires et inflammatoires contribuent de façon significative et incontestable à l'évolution néfaste de la maladie.<sup>[12]</sup>

### **4. Les stratégies thérapeutiques**

Actuellement, il n'existe pas de thérapie efficace pour la maladie d'Alzheimer. Les médicaments disponibles permettent uniquement un traitement symptomatique en retardant l'aggravation des troubles cognitifs.

Les approches thérapeutiques envisageables et intéressantes pour le traitement de la maladie sont par exemple :

- de pallier la baisse de différents neurotransmetteurs
- d'empêcher la mort neuronale et/ou augmenter leur survie

- de diminuer le clivage de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase
- de protéger les cellules nerveuses de métabolites toxiques
- de diminuer la formation des dégénérescences neurofibrillaires
- d'inhiber la réaction inflammatoire au niveau des plaques séniles.

#### 4.1 Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les maladies neurodégénératives sont souvent accompagnées d'une perturbation de la neurotransmission. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer une diminution de la quantité d'acétylcholine (60 à 90%) dans le cerveau est observée.

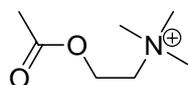
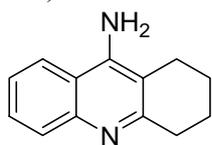


Schéma 3 : L'acétylcholine.

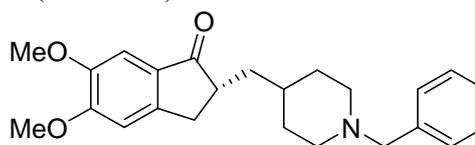
L'acétylcholine (schéma 3) est un neurotransmetteur impliqué dans la mémoire, les facultés d'apprentissage et de raisonnement.

Aussi, pallier ce déficit en acétylcholine représente une approche thérapeutique très intéressante.

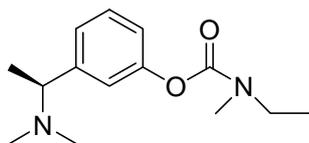
Celle-ci repose sur l'utilisation de molécules permettant de bloquer l'activité de l'enzyme responsable de la dégradation de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase et ainsi compenser le déficit de ce neurotransmetteur. Depuis plusieurs années, quatre inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (**Tacrine**<sup>[13, 14]</sup>, **Donézépil**<sup>[15, 16]</sup>, **Rivastigmine**<sup>[17]</sup> et **Bromhydrate de galantamine**<sup>[18]</sup>) sont commercialisés en France (schéma 4).



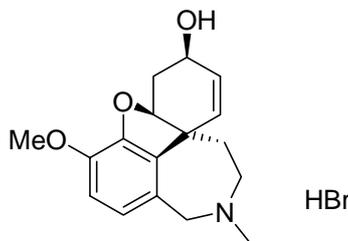
Tacrine (Cognex®)



Donézépil (Aricept®)



Rivastigmine (Exélon®)



HBr

Bromhydrate de galantamine (Reminyl®)

Schéma 4 : Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Tous ces médicaments permettent de retarder la progression de la maladie et d'améliorer la sémiologie mais en aucun cas de stopper la dégénérescence nerveuse. Par ailleurs, ils présentent des effets secondaires assez importants : hépato-toxicité, effet sédatif, nausées et douleurs musculaires.

#### 4.2 Inhibition de la formation du peptide A $\beta$

Une autre approche thérapeutique intéressante consiste à diminuer voire empêcher la formation du peptide A $\beta$  dans la mesure où la synthèse de ce peptide est l'élément central de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Pour ce faire, une des voies de recherche engagées repose sur l'utilisation d'inhibiteurs des sécrétases impliquées dans la métabolisation de l'APP et donc dans la formation de la protéine A $\beta$ . Des inhibiteurs sélectifs de la  $\beta$ -sécrétase (**Bafilomycin A**<sup>[19]</sup>) ainsi que de la  $\gamma$ -sécrétase (**DAPT**<sup>[20, 21]</sup>) sont actuellement en cours d'évaluation (schéma 5).

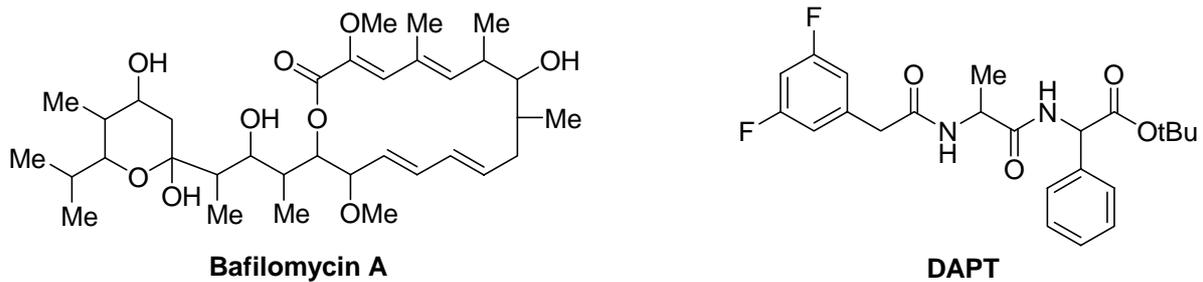


Schéma 5 : Inhibiteurs sélectifs des sécrétases.

#### 4.3 Anti-inflammatoires

Des études épidémiologiques menées chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ont montré un effet protecteur de la prise d'anti-inflammatoires contre la survenue de la maladie d'Alzheimer. Cependant, leur utilisation en thérapie s'est avérée décevante. Ils permettent de retarder l'apparition des symptômes en début de maladie mais deviennent inefficaces au cours de l'évolution de la maladie.

#### 4.4 Autres voies de recherches

D'autres voies de recherches concernant le traitement des troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer sont explorées.

Des études d'inhibiteurs de la phosphorylation de la protéine Tau sont également en cours. Les dégénérescences neurofibrillaires sont dues à une hyperphosphorylation<sup>[4]</sup> de cette protéine. Ainsi, une inhibition de cette phosphorylation anormalement élevée semble être une stratégie thérapeutique prometteuse.

Une autre voie de recherche explorée est l'immunothérapie.<sup>[22, 23]</sup> Des études ont montré que l'immunisation contre le peptide Amyloïde- $\beta$  permet de faire baisser notablement la charge amyloïde cérébrale.<sup>[22]</sup> Cependant, les effets secondaires rencontrés chez des patients traités par vaccination<sup>[24]</sup> (5% : embolie pulmonaire sévère) par un peptide A $\beta$  entier a été abandonnée.

Par ailleurs, de nombreux moyens sont déployés pour la recherche de composés dits « neuroprotecteurs ». Les cibles principales de ces composés sont la perturbation de l'homéostasie calcique, la peroxydation lipidique et l'induction de l'apoptose.

### B. La sclérose en plaques

#### 1. Généralités

La sclérose en plaques <sup>[25]</sup> doit son nom à Jean Cruveilhier qui a décrit pour la première fois les lésions anatomiques de la maladie en 1835. Mais les premières descriptions des formes cliniques ont été faites par Jean-Marie Charcot en 1868. La sclérose en plaques est l'affection neurologique chronique la plus fréquente du sujet jeune puisqu'elle touche essentiellement les adultes de 20 à 40 ans. La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire du système nerveux central, également appelée leuco-encéphalomyélite.<sup>[26]</sup> Elle se caractérise par des **poussées inflammatoires** à l'origine d'une démyélinisation des gaines de myéline entourant les axones se traduisant par la formation de plaques au sein de la substance blanche du cerveau. En parallèle, dès le début de la maladie, une atteinte axonale qui va s'aggraver avec l'évolution est observée. La localisation des lésions est extrêmement variable au sein du système nerveux central ce qui se traduit par une grande diversité de symptômes comme des troubles de l'équilibre et de la vue, des difficultés d'élocution ainsi que des paralysies plus ou moins sévères.

## **2. Une maladie dite « auto-immune »**

Les causes de la sclérose en plaques sont à ce jour encore mal connues. L'hypothèse admise de façon générale est celle d'un processus auto-immun, c'est-à-dire une réaction immunitaire contre certaines cellules nerveuses saines. Des études épidémiologiques laissent à penser que deux facteurs principaux seraient impliqués dans le développement de la maladie, un facteur environnemental et un facteur génétique.<sup>[26]</sup>

Des études de migrations de populations entre zones de prévalence différente ont montré que les personnes ayant migré après l'âge de 15 ans conservent le risque de leur région d'origine alors que celles qui se sont déplacées avant l'âge de 15 ans ont le risque de la région d'arrivée. Ces observations semblent indiquer la survenue d'un événement décisif à l'adolescence plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie. L'hypothèse infectieuse, faisant intervenir le virus morbilleux ou le rétrovirus HTLV1, est souvent évoquée pour rendre compte de ce phénomène.<sup>[27]</sup>

Il a été mis en évidence que certaines populations comme les noirs d'origine africaine, les asiatiques ou encore les aborigènes d'Australie sont moins touchés par la maladie. Par ailleurs, chez les jumeaux monozygotes, si l'un des jumeaux est atteint, le risque que le second ait la maladie est de l'ordre de 30%. Ces données jouent en faveur d'un facteur génétique.

Une théorie dite « mixte » combine ces deux hypothèses. La sclérose en plaques serait ainsi multifactorielle, probablement en rapport avec un événement lié à l'environnement, de nature probablement virale, entraînant dans une tranche d'âge déterminée et chez des sujets génétiquement prédisposés, une réaction auto-immune dirigée contre la myéline entourant les axones des neurones. L'origine de la maladie reste inconnue, même si l'hypothèse infectieuse en combinaison avec un facteur génétique semble fortement probable.<sup>[28]</sup> Par contre, une perturbation du système immunitaire quant à elle est tout à fait certaine.

La sclérose en plaques se caractérise par une atteinte inflammatoire du système nerveux central associée à une gliose réactionnelle. La gliose réactionnelle ou encore cicatrice gliale se traduit par une réponse des cellules gliales endogènes au cours de lésions neurales.<sup>[29]</sup> La cible principale de ce processus pathologique est la gaine de myéline entourant les axones des neurones. Cette gaine étant responsable de la bonne conduction de l'influx nerveux, celui-ci est donc perturbé et explique les signes cliniques observés.

La première étape de la maladie est une réaction immunitaire et plus particulièrement auto-immune faisant intervenir des lymphocytes ciblant des antigènes de la myéline. Cette infiltration de cellules immunitaires dans le cerveau est rendue possible par des ruptures ponctuelles de la barrière hémato-encéphalique qui sont, à ce jour encore mal comprises. La

deuxième étape est la participation des cellules du système nerveux central au processus inflammatoire. Des cascades de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , chimiokines, ...) sont mises en jeu, accompagnées de la libération de protéases et de radicaux libres par les cellules infiltrantes, les microgliocytes<sup>[30]</sup> et les astrocytes. Cette succession d'évènements va conduire à la démyélinisation des axones puis à la mort des oligodendrocytes, cellules produisant la myéline. Au début de la maladie, les lésions causées peuvent se résorber grâce à une régénération de la population des oligodendrocytes, on parle de remyélinisation spontanée. Au cours de l'évolution, une destruction de l'axone est cependant observée ce qui conduit inévitablement à la mort neuronale. Par ailleurs, les précurseurs des oligodendrocytes vont également être touchés par le processus inflammatoire. L'activation de la voie de signalisation Notch (voir §.VI de ce chapitre) va empêcher leur différenciation en oligodendrocytes matures et fonctionnels.<sup>[31]</sup> Ces différents phénomènes vont rendre les lésions définitives.

### 3. Evolutions et formes cliniques de la maladie

La sclérose en plaques est caractérisée par une démyélinisation sélective de la substance blanche de l'encéphale et de la moelle respectant l'intégrité des axones : c'est la dissociation axono-myélinique. L'atteinte axonale survient généralement quelques temps après la destruction myélinique. Cette démyélinisation est responsable d'un ralentissement ou d'un blocage de la conduction de l'influx nerveux.

Les premiers symptômes rapportés sont en général des troubles visuels et/ou sensitifs. Ces signes peuvent disparaître après quelques semaines sans traitements particuliers. La caractéristique qui permet de diagnostiquer la maladie est la présence d'une ou plusieurs **poussées**.<sup>[25]</sup> Une poussée se définit par la survenue de signes neurologiques ou l'aggravation de signes préexistants. La durée minimale, pour parler de poussée, est de l'ordre de vingt-quatre heures et leur fréquence est de minimum une par an. Le plus souvent une amélioration partielle ou complète est observée. Dans la majorité des cas, les premières années d'évolution sont marquées par la récurrence de poussées avant que les symptômes permanents responsables du handicap fonctionnel n'apparaissent.

La sclérose en plaques peut être répertoriée sous trois formes principales :

- **La forme rémittente** est la forme la plus répandue (80% des cas). Elle évolue d'emblée par poussées séparées par des périodes de rémission. Au début de la maladie, la récupération après une poussée est totale mais après quelques années d'évolution, elles laissent des séquelles.

- **La forme secondairement progressive** est une aggravation progressive de l'état neurologique des patients ayant débuté leur maladie par une forme rémittente (environ 50% des patients atteints de la forme rémittente).
- **La forme progressive d'emblée** est beaucoup plus rare (environ 10% des cas). Elle aboutit à un handicap rapide et sévère. Elle concerne essentiellement les personnes débutant la maladie plus tardivement, après quarante ans.

#### 4. Les stratégies thérapeutiques

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la sclérose en plaques. Par ailleurs, la diversité des formes cliniques de la maladie rend l'élaboration de traitements difficile.

Actuellement, la prise en charge des patients atteints de sclérose en plaques repose essentiellement sur trois volets :

- le traitement des poussées
- le traitement de fond
- le traitement symptomatique.

##### 4.1 Prise en charge d'une poussée

La prise en charge d'une poussée se fait généralement par corticothérapie « en flash », c'est-à-dire l'utilisation de corticoïdes de façon brève et intense (Prednisone<sup>®</sup>[32], Solumédrol<sup>®</sup>[33], AdrenoCorticoTropic Hormone ACTH)<sup>[34]</sup> (schéma 6). Ce traitement diminue la durée et la gravité de la poussée sans pour autant agir sur l'évolution générale de la maladie.

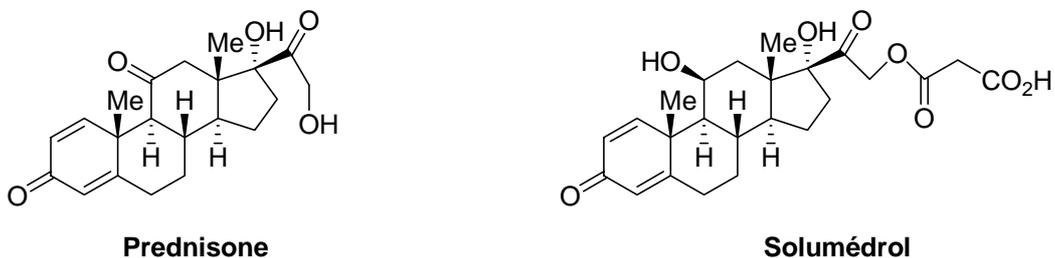


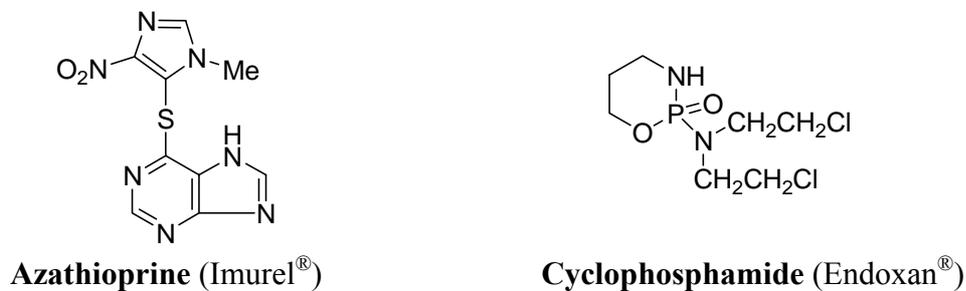
Schéma 6 : Prise en charge d'une poussée.

Les effets secondaires, bien connus de la corticothérapie, sont l'amyotrophie (diminution du volume d'un muscle due à une lésion du motoneurone périphérique), l'excès pondéral et l'ostéoporose.

## 4.2 Traitement de fond

Cette approche thérapeutique vise à réduire le processus inflammatoire et la démyélinisation des axones. Ce type de traitement a pour but de réduire la fréquence des poussées et de ralentir la progression du handicap. Il est généralement proposé en ambulatoire chez des patients ayant développé au moins deux poussées dans les deux années précédentes.

L'utilisation d'immunosuppresseurs pour les traitements de fond est très répandue. L'**azathioprine** (Imurel<sup>®</sup>)<sup>[35]</sup> est l'immunosuppresseur le plus couramment utilisé en France. Il agit sur les formes rémittentes de la maladie, cependant son efficacité sur les formes plus sévères n'est pas établie. Le **cyclophosphamide** (Endoxan<sup>®</sup>)<sup>[36]</sup>, quant à lui, est utilisé dans les traitements des formes progressives sévères (schéma 7).



**Schéma 7 :** Immunosuppresseurs utilisés en traitement de fond.

Des composés très prometteurs sont les **interférons**. Les interférons sont de petites protéines sécrétées dans l'organisme impliquées dans la stimulation et la régulation du système immunitaire jouant donc le rôle d'immunomodulateurs. Parmi eux, **les interférons  $\beta$ -1b** (Bêtaféron<sup>®</sup>) et  **$\beta$ -1a** (Avonex<sup>®</sup>, Rebif<sup>®</sup>) permettent de réduire efficacement le nombre de poussées et de lésions.<sup>[37]</sup> Ces traitements sont très coûteux et nécessitent en général des injections sous-cutanée ou intra-musculaire régulières. Par ailleurs, ces composés provoquent un syndrome pseudogrippal et nécessitent une co-prescription d'antipyrétiques.

Une nouvelle approche thérapeutique est ouverte avec le **Natalizumab** ou **Antegren** (Tysabri<sup>®</sup>). Cette molécule est un anticorps monoclonal humanisé, elle empêcherait les lymphocytes activés d'entrer dans le cerveau et réduirait ainsi la formation de nouvelles plaques de lésions.<sup>[38]</sup> Une étude menée aux Etats-Unis a montré que la prise de Tysabri<sup>®</sup> permet une diminution des poussées de l'ordre de 66%, effet supérieur à celui de tous les traitements actuellement disponibles.<sup>[39]</sup>

A ce jour, le Tysabri® n'est pas encore disponible en Europe. L'agence européenne du médicament attend les résultats d'une deuxième année d'études afin d'évaluer la réelle efficacité de ce composé et son innocuité à plus long terme.

### **4.3 Traitement symptomatique**

Le traitement symptomatique est primordial dans la prise en charge de la maladie. Il a pour but de traiter les complications dues à la maladie et par voie de conséquence d'améliorer la qualité de vie des patients. Les complications généralement rencontrées sont des troubles urinaires, la spasticité (état d'exagération du tonus musculaire), la fatigue, les douleurs ou la dépression. La rééducation ainsi que le soutien psychologique sont bien évidemment fondamentales pour la vie quotidienne des malades.

## **IV. Approche thérapeutique : la régénération nerveuse**

La grande majorité des médicaments utilisés jusqu'à présent pour le traitement des neuropathologies dégénératives ne sont pas curatifs. Ils permettent essentiellement un traitement symptomatique. Ces dernières années de nombreuses études cliniques ont permis d'améliorer les différents traitements de fond, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives.

Cependant, ces traitements ne tiennent pas compte d'un facteur essentiel, lié à toute pathologie neurodégénérative, la mort neuronale.

Aussi, une approche thérapeutique innovante consisterait à combattre la dégénérescence nerveuse tout en régénérant les différents types cellulaires du système nerveux central à partir de cellules souches neurales.

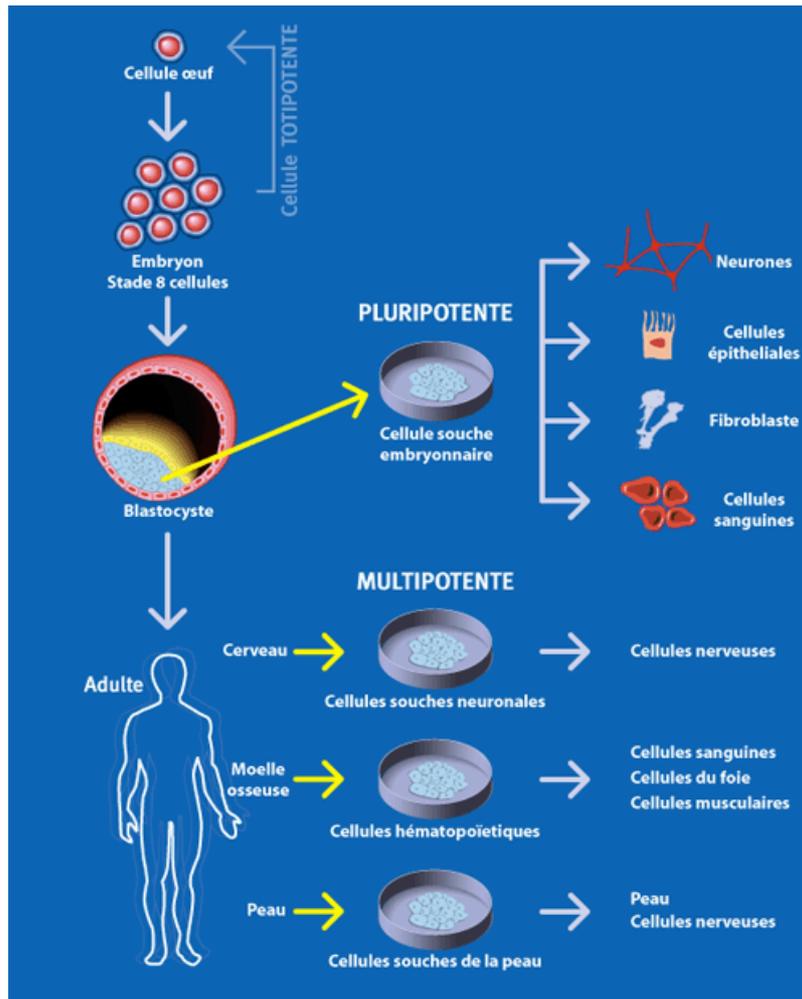
### **A. Utilisation des cellules souches en médecine régénérative**

Depuis maintenant plusieurs années, de nombreuses études sont menées sur l'utilisation des cellules souches embryonnaires ou adultes pour le traitement des pathologies dégénératives du SNC.<sup>[40, 41, 42]</sup>

## 1. Les cellules souches

### 1.1 Généralités

Les organismes vivants pluricellulaires sont constitués de milliards de cellules. Certaines d'entre elles, les cellules souches, sont capables de se multiplier indéfiniment et de se différencier en de nombreux types cellulaires différents (schéma 8).



**Schéma 8** : Notion de totipotentialité, pluripotentialité et multipotentialité au cours du développement embryonnaire.

Au cours du développement embryonnaire, les premières divisions de l'œuf fécondé (zygote) donnent des cellules dites « **totipotentes** », c'est-à-dire qu'elles peuvent donner n'importe quel type cellulaire et donc former un organisme complet. Après quelques jours une spécialisation va s'installer et les cellules vont devenir **pluripotentes** (capacité de formation de tous les types cellulaires sauf un embryon) pour finalement aboutir à des cellules **multipotentes**. Ces cellules souches multipotentes, selon leur localisation dans l'embryon,

peuvent donner les différents types cellulaires d'un tissu donné ce qui permet aux tissus de l'organisme d'avoir des fonctions spécialisées.

La division d'une cellule souche multipotente donne naissance à deux cellules différentes : une cellule fille identique capable de s'autorenouveler et un précurseur multipotentiel. Ce précurseur n'est pas doué d'autorenouvellement puisqu'il va se différencier, c'est-à-dire former différents types de cellules spécialisées. La cellule fille identique obtenue, permet de régénérer le stock de cellules souches et évite leur diminution progressive qui conduirait à un arrêt prématuré du développement embryonnaire.

## **1.2 Les cellules souches adultes**

### **1.2.1 Définition et caractéristiques**

Les cellules souches sont essentiellement impliquées au cours du développement d'un organisme vivant. Cependant, des cellules souches ont été mises en évidence avec certitude dans l'organisme adulte.<sup>[43, 44]</sup>

Elles permettent le maintien physiologique d'un organe ou tissu, en remplaçant les cellules mortes ou lésées naturellement ou au cours d'une lésion. Ainsi, la pérennité des différentes fonctions des organes est assurée pendant la vie d'un individu. Parmi les cellules souches identifiées chez l'adulte, on compte par exemple :

- les cellules souches nerveuses
- les cellules souches hématopoïétiques
- les cellules souches épidermiques
- les cellules souches intestinales, ...

Les cellules souches adultes ne sont pas pluripotentes car elles sont généralement programmées pour donner un type de tissu précis. Cependant, certaines sont dites « multipotentes » dans la mesure où elles peuvent produire des cellules de morphologie et de fonction très différentes mais toujours au sein d'un même organe ou tissu. Les cellules souches nerveuses, par exemple, peuvent donner naissance aux neurones mais également aux cellules macrogliales, les astrocytes et les oligodendrocytes.<sup>[43]</sup>

### **1.2.2 Plasticité des cellules souches adultes**

Les cellules souches adultes ont montré une plasticité extraordinaire chez l'animal. En effet, il a été démontré que le déterminisme cellulaire de ces cellules n'était pas irréversible. Des études récentes indiquent que des cellules souches nerveuses de souris peuvent produire des neurones mais également des cellules musculaires<sup>[45]</sup> et très probablement des cellules sanguines<sup>[46]</sup> selon les conditions de culture. De même, des cellules souches de la moelle osseuse peuvent engendrer une multitude de type cellulaire spécialisé (foie<sup>[47]</sup>, muscle<sup>[48]</sup>, système nerveux<sup>[49, 50]</sup>).

## **1.3 Les cellules souches neurales**

Ces dix dernières années les travaux de plusieurs équipes de recherche ont permis de mettre en évidence qu'il existait une neurogenèse persistante dans le cerveau.<sup>[51, 52]</sup> Cette neurogenèse remet en cause le dogme selon lequel chaque individu naît avec un nombre limité de neurones, sans possibilité de régénération.

### **1.3.1 Définition et caractéristiques**

Les cellules souches neurales sont des cellules souches multipotentes du système nerveux. Ces cellules sont capables de se différencier en neurones fonctionnels mais également en cellules macrogliales, astrocytes et oligodendrocytes. En 1992, Reynolds et Weiss<sup>[53]</sup> ont été les premiers à isoler, dans le cerveau de souris adultes, des cellules souches et à les mettre en culture.

Plusieurs zones germinatives de ces cellules souches neurales ont été identifiées au sein du système nerveux central de mammifères adultes dont la zone sous-ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux<sup>[54]</sup>, l'hippocampe ou encore la moelle épinière. Les régions cérébrales impliquées dans la neurogenèse de ces cellules sont le bulbe olfactif, le cortex<sup>[55]</sup> et l'hippocampe.<sup>[56]</sup> Les « nouveaux » neurones retrouvés dans le bulbe olfactif proviennent de cellules souches de la ZSV qui ont ensuite migré jusque là. Les cellules souches neurales sont donc capables de se différencier mais également de migrer vers une région définie du cerveau.<sup>[57]</sup>

Cependant, le rôle exact joué par les cellules souches adultes dans le cerveau n'est pas encore élucidé. Leur principal rôle est de participer à la reconstruction des différents tissus lésés et ainsi assurer leur survie. Mais, à l'heure actuelle, cette contribution n'a pas encore pu être mise en évidence de façon certaine. *In vivo*, ces cellules ne semblent pas pouvoir générer une quantité suffisante de nouveaux neurones permettant la réparation du tissu lésé. Paradoxalement, elles favorisent plutôt une prolifération astrocytaire ou encore cicatrice gliale qui, au contraire, empêche la repousse des neurones après une lésion.

Ces données suggèrent la présence et la nécessité de facteurs environnementaux permettant la différenciation de ces cellules souches en cellules hautement spécialisées.

### **1.3.2 Prolifération, différenciation et maturation des cellules souches neurales**

La prolifération des précurseurs neuronaux est l'un des processus majeurs au cours de la neurogenèse, elle permet de générer un maximum de cellules de phénotypes différents dans le cerveau. Ce processus est complexe et dépend de plusieurs variables : le nombre de cellules qui se divisent, le rythme de division et la proportion de cellules filles qui entrent en différenciation. Ces différents facteurs sont constamment en changement. Au cours de processus dégénératifs, il a été démontré que des facteurs de croissance (EGF, FGF-2, TGF $\alpha$  ou IGF-1)<sup>[58, 59]</sup> peuvent réguler ces différentes variables. L'hormone thyroïdienne T3, quant à elle, permet d'augmenter la prolifération.

La différenciation est une spécialisation d'un précurseur donné. Par exemple, une cellule souche neurale pourra se différencier soit en neurone, en astrocyte ou encore en oligodendrocyte. Très souvent on parle aussi de **choix cellulaire**.

Cette différenciation est également contrôlée et régulée par un certain nombre de facteurs environnementaux également impliqués dans la neurogenèse et le développement des cellules souches. Des études<sup>[60]</sup> *in vitro* sur des cellules souches nerveuses ont montré que des facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou le FGF (Fibroblast Growth Factor) sont capables de contrôler cette différenciation.

Finalement, la maturation va permettre l'obtention de cellules spécialisées fonctionnelles et matures. Une fois de nouveaux neurones obtenus, ces derniers doivent émettre des prolongements afin de pouvoir établir des connexions avec les autres cellules et ainsi assurer la bonne transmission de l'influx nerveux.

## **2. Neurogenèse des cellules souches adultes**

### **2.1 Neurogenèse chez l'adulte**

Chez les mammifères adultes, et notamment chez l'homme, la neurogenèse a lieu dans essentiellement deux régions du cerveau, le gyrus denté (GD) de l'hippocampe, impliqué dans les processus de mémorisation, et la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui borde les cavités du cerveau ou ventricules.<sup>[54]</sup> Les précurseurs neuraux produits dans la région sous-granulaire du GD se différencient en cellules neuronales et gliales. Ceux produits dans la ZSV migrent vers le bulbe olfactif, où ils se différencient en neurones et expriment les phénotypes neuronaux suivant leur destination.<sup>[57]</sup> Des signes émergents ont montré l'approvisionnement constant en neurones fonctionnels nouvellement formés qui sont ensuite intégrés dans le cerveau adulte. La grande plasticité des cellules souches permet d'obtenir les différents phénotypes (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) au cours de la neurogenèse en réponse à des modifications environnementales et en fonction des exigences cellulaires.

### **2.2 Neurogenèse et réparation nerveuse endogène**

L'existence d'une neurogenèse continue dans les régions germinatives du cerveau suggère une régénération endogène des cellules nerveuses lésées au cours du vieillissement normal ou de pathologies neurologiques.

En effet, des études récentes ont montré que, lors d'une lésion ou d'une maladie du système nerveux, la neurogenèse est augmentée et que donc de nouvelles cellules neuronales sont produites aux sites de lésions, où elles remplacent une partie des cellules nerveuses dégénérées.<sup>[61]</sup> Des autopsies chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont révélé une augmentation de l'expression de marqueurs de cellules neurales immatures dans le gyrus denté, ce qui suggère une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe au cours de la maladie.<sup>[62]</sup>

Ces résultats montrent qu'il y a une tentative de régénération endogène mais qui n'est pas suffisante pour réparer la lésion. Une stimulation de la neurogenèse pourrait donc être bénéfique pour cette réparation.

## **3. Utilisation des cellules souches adultes en thérapeutique**

L'utilisation des cellules souches adultes afin de pallier la perte neurale au cours des diverses pathologies du système nerveux repose sur deux voies principales :

- les greffes intracérébrales ou transplantations, permettant le remplacement des cellules neuronales lésées
- la stimulation de la neurogenèse des cellules souches adultes endogènes par des inducteurs de différenciation cellulaire.

### **3.1 La transplantation**

L'utilisation des cellules souches en thérapie cellulaire présente de nombreuses difficultés. Avant de pouvoir transplanter ces cellules, il faut s'assurer de contrôler leur multiplication en culture, guider leur différenciation et éviter le risque de prolifération tumorale.

Il est possible de maîtriser la division et le phénotypage des cellules, mais cela ne garantit pas qu'une fois transplantées, les cellules puissent être incorporées correctement dans les tissus lésés. En général, la thérapie cellulaire n'est efficace que lorsque la dégénérescence affecte une population cellulaire distincte et bien localisée dans le cerveau.

De nombreuses études<sup>[63]</sup> ont révélé que des cellules souches embryonnaires ou adultes après transplantation dans le cerveau de rat ou de primates ont pu proliférer, migrer et se différencier. L'utilisation de cellules souches neurales sur des modèles de la maladie de Parkinson<sup>[64]</sup> ou encore de la sclérose en plaques<sup>[65]</sup> a donné des résultats très prometteurs.

La principale limitation à ce jour, est l'accès aux sources de cellules souches. En effet, ces cellules se trouvent pour la plupart dans le cerveau. Cependant, des observations récentes ont montré que des cellules souches de la moelle osseuse peuvent engendrer une multitude de types cellulaires spécialisés, dont ceux du système nerveux<sup>[49,50]</sup>.

La moelle osseuse étant facilement accessible chez tout individu, elle peut donc être considérée comme une source de cellules réparatrices de nombreux tissus. Aussi, il n'est pas exclu, que dans le futur, l'on puisse à partir d'un simple prélèvement de moelle osseuse réparer les tissus lésés au cours de certaines pathologies du foie ou des muscles ou encore de certaines maladies neurodégénératives.

### **3.2 Induction de la prolifération et de la différenciation des cellules souches endogènes**

Une neurogenèse persistante a été mise en évidence dans le cerveau adulte de par la présence de cellules souches adultes. Par ailleurs, il a été démontré qu'au cours de maladies neurologiques cette neurogenèse pouvait être stimulée ce qui suggère une auto-réparation du

système nerveux. Cependant cette régénération endogène n'est pas suffisante puisque la maladie continue d'évoluer.

Aussi, une stratégie thérapeutique très prometteuse repose sur la stimulation externe de cette neurogenèse.

De nombreuses recherches ont été effectuées sur l'utilisation de facteurs permettant cette stimulation. Beaucoup d'attention a été portée aux facteurs de croissance dans la mesure où ils sont capables de promouvoir la survie, la différenciation et la croissance des neurones et des cellules gliales *in vitro* et *in vivo*.<sup>[66]</sup> Au niveau du système nerveux central<sup>[67]</sup> les facteurs permettant la maturation des cellules souches neurales en neurones sont les neurotrophines (NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), ...) et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). A l'opposé, le CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor) et l'activine favorisent la différenciation des cellules souches neurales en précurseurs astrocytaires.

Les travaux de Calza et coll.<sup>[68]</sup> ont montré que le traitement d'une lésion provoquée aux neurones cholinergiques par des mitogènes, l'acide rétinoïque et le NGF amélioreraient le comportement des animaux dont le cerveau a été lésé. Ces résultats montrent qu'en présence d'une ou plusieurs molécules exogènes, les cellules souches endogènes sont en mesure de réparer les lésions formées au cours de maladies neurodégénératives.

## **B. Les facteurs neurotrophiques comme agents thérapeutiques**

Les facteurs neurotrophiques sont des facteurs de croissance spécifiques du système nerveux capables de promouvoir la survie, la différenciation et la croissance des neurones et des cellules gliales. Ce sont des agents essentiels au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du système nerveux. Une privation en facteurs neurotrophiques se traduit par une mort programmée (apoptose) des neurones.

Au cours du processus de mort neuronale impliqué dans les différentes pathologies du système nerveux central, c'est cette intégrité structurale qui semble être endommagée, accompagnée d'une diminution des facteurs neurotrophiques. C'est pourquoi, l'utilisation des facteurs neurotrophiques comme outil thérapeutique dans les neuropathies dégénératives a été envisagée par plusieurs équipes de recherche au cours de ces dernières décennies.

## 1. Les facteurs neurotrophiques naturels

Les facteurs neurotrophiques naturels<sup>[69]</sup> sont des protéines endogènes de haut poids moléculaire (13 à 24 kDa). Comme précisé plus haut, les principaux rôles de ces protéines sont la croissance neuronale normale, le maintien des capacités de stimulation ou de réponse des neurones et très probablement l'inhibition de l'apoptose. Ils sont également impliqués dans le développement du système nerveux et sont essentiels au maintien des fonctions cérébrales nerveuses ainsi qu'aux phénomènes de plasticité adaptative qui sont diminués au cours du temps, mais persistent néanmoins chez l'adulte.

Toutes ces caractéristiques font des facteurs neurotrophiques, des agents thérapeutiques très prometteurs.

Chaque maladie neurodégénérative est caractérisée par l'affection d'une catégorie spécifique de neurones. La maladie d'Alzheimer affecte les neurones cholinergiques alors que dans la maladie de Parkinson ce sont les neurones dopaminergiques qui sont touchés. Des facteurs neurotrophiques spécifiques comme le **NGF** (Nerve Growth Factor) pour la maladie d'Alzheimer et **GDNF** (Glial-cell Derived Neurotrophic Factor) dans le cas de la maladie de Parkinson, permettent de protéger et de régénérer les populations neuronales et gliales touchées. Des études *in vivo* sur des modèles animaux de neurodégénérescence ont montré une bonne activité.<sup>[70]</sup>

Cependant les résultats obtenus en phases cliniques se sont avérés décevants. En effet, l'utilisation des facteurs neurotrophiques en thérapeutique est fortement limitée de par des problèmes liés au mode d'administration. Ces polypeptides ont un temps de demi-vie court rendant une administration systémique difficile et entraînent des effets secondaires importants. Par ailleurs, comme ce sont des protéines de haut poids moléculaire leur passage au travers des différentes barrières biologiques s'avère difficile, et notamment celui de la barrière hémato-encéphalique qui constitue la dernière barrière physiologique avant d'atteindre les cellules nerveuses.

Différentes approches ont cependant été envisagées afin de permettre aux facteurs neurotrophiques d'atteindre le cerveau :

- injections intracrâniennes
- stockage dans des liposomes ou polymères biodégradables qui sont ensuite implantés dans le cerveau de façon chirurgicale
- utilisation de pompes à perfusion continue reliées par cathéter à la zone cible
- injection d'une solution hyper-osmotique permettant "l'ouverture" de la barrière hémato-encéphalique et ainsi l'entrée d'un plus grand nombre de composés dans le cerveau

- utilisation de la thérapie génique : introduction d'un gène codant pour la synthèse d'un facteur neurotrophique précis dans la cellule nerveuse.

Les contraintes d'utilisation de ces facteurs neurotrophiques, surtout sur le plan du mode d'administration, étant importantes, l'utilisation de composés lipidiques exogènes capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'induire la synthèse des facteurs neurotrophiques ou de mimer leur action semble plus prometteuse.

## 2. Les facteurs neurotrophiques de substitution

Pour qu'un composé puisse être assimilé à un facteur neurotrophique, il faut qu'il remplisse certaines conditions :

- *in vitro*, il doit promouvoir la croissance, la différenciation et la survie des neurones dans les conditions physiologiques
- *in vivo*, il doit protéger voire réparer les dégâts causés aux neurones au cours des maladies neurologiques, de traumatismes ou par des toxines.

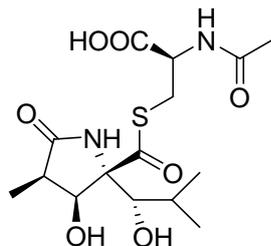
Ces composés exogènes peuvent agir sur les cellules nerveuses selon deux voies distinctes :

- directement sur les récepteurs à tyrosine kinase, mimant ainsi les effets des facteurs neurotrophiques naturels
- indirectement, en stimulant la synthèse de facteurs de croissance endogènes.

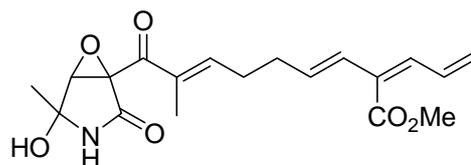
### 2.1 Exemples de la littérature

De nombreux composés non-protéiques ont montré une activité comparable à celles des facteurs neurotrophiques naturels (induction de la croissance et de la différenciation des différents types cellulaires nerveux).

Deux composés bien connus de la littérature sont respectivement la **lactacystine**<sup>[71]</sup> et l'**épolactaène**<sup>[72]</sup> (schéma 9).



Lactacystine



Epolactaène

Schéma 9 : Mimes non-protéiques des facteurs neurotrophiques.

La **lactacystine** a été isolée de microorganismes *Streptomyces* sp. OM-6519. Cette molécule permet d'induire la croissance et la différenciation des neurones (lignée Neuro 2A) à la concentration de 1,56  $\mu\text{M}$  et sa toxicité apparaît à 12,5  $\mu\text{M}$ . Des études de relation structure-activité ont permis de montrer que la liaison thioester ainsi que la fonction  $\gamma$ -lactame étaient essentielles pour l'activité biologique.

L'**épolactaène** a été isolé du microorganisme *Penicillium* sp. BM1689-P. Ce composé induit la différenciation et la croissance de cellules nerveuses de la lignée SH-SY5Y à la concentration de 25  $\mu\text{M}$ . Etant instable à la lumière, différents analogues ont été synthétisés. Ainsi, il a pu être mis en évidence que l'époxyde sur le cycle  $\gamma$ -lactame n'était pas nécessaire à l'activité biologique mais, que la fonction carbonyle ainsi que la longue chaîne saturée en position 3 sont indispensables.

Le **FK506** est un immunosuppresseur utilisé dans la prévention des rejets d'organes transplantés (schéma 10).<sup>[73]</sup> *In vitro*, ce composé ainsi que des dérivés **N-Glyoxyl** augmentent la croissance neuritique des neurones dopaminergiques. *In vivo*, ils sont capables de stimuler la croissance axonale et de rétablir les fonctions neurales après une lésion dans un modèle animal de la maladie de Parkinson.

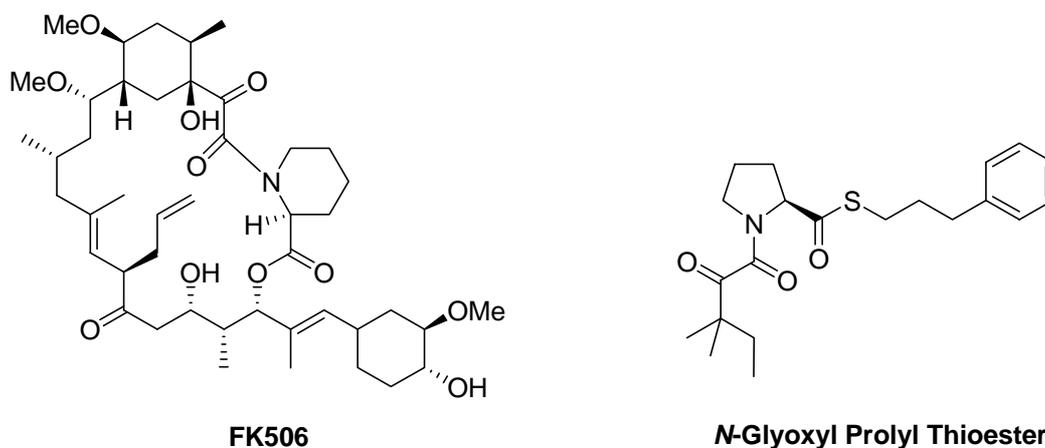
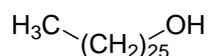


Schéma 10 : Immunosuppresseurs neurotrophiques.

## 2.2 Les alcools à longue chaîne hydrocarbonée

Une des thématiques de notre laboratoire est l'étude de plantes issues de la **pharmacopée chinoise**. Notre équipe s'est alors focalisée sur des plantes aux **vertus cicatrisantes** puisqu'il est connu que dans certaines conditions physiologiques, il existe une relation entre les facteurs neurotrophiques et la cicatrisation cutanée.<sup>[74]</sup> Plusieurs extraits ont pu être isolés d'une plante à activité cicatrisante, *Hygrophila erecta* (famille des Acanthacées d'origine du sud-est asiatique). Certains d'entre eux sont capables de promouvoir la survie et la différenciation des

neurones. Le composé extrait le plus actif est le **n-hexacosanol** (schéma 11), un alcool primaire à longue chaîne hydrocarbonée contenant 26 atomes de carbone.<sup>[74]</sup>



**Schéma 11** : n-hexacosanol.

Une étude de relation structure-activité a permis de montrer que la fonction hydroxyle en bout de chaîne était indispensable à l'activité biologique. De même, la longueur de la chaîne hydrocarbonée est cruciale pour cette activité puisque l'octacosanol (28 atomes de carbone) n'est que faiblement actif alors que le tétracosanol (24 atomes de carbone) est dépourvu d'activité neurotrophique.

Le n-hexacosanol présente plusieurs des propriétés biologiques des facteurs neurotrophiques :

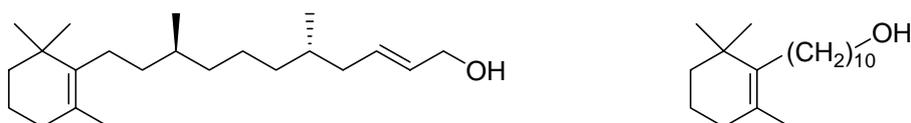
- *in vitro*, il permet d'augmenter la survie des neurones et de promouvoir la différenciation et la maturation des neurones à la concentration de  $10^{-7}\text{M}$
- *in vivo*, il est capable de favoriser (stimuler) la survie des neurones cholinergiques après section de la *fimbria fornix*.

Ce composé semble être un candidat potentiel prometteur pour le traitement des maladies neurodégénératives. Cependant, sa faible solubilité aussi bien dans les milieux aqueux qu'organiques pose des problèmes de reproductibilité des expériences biologiques réalisées et donc restreint les possibilités d'investigation thérapeutique.

Afin de pallier ces désagréments, la recherche de composés contenant le motif longue chaîne  $\omega$ -hydroxylée et pourvus d'activité neurotrophique tout en présentant une meilleure solubilité a été envisagée.

### 2.3 Les alcools gras cyclohexéniques

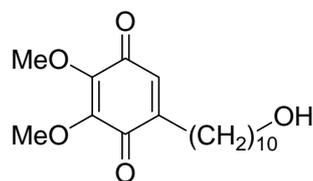
Différentes études de structure-activité ont permis de démontrer les activités neurotrophiques des **analogues du rétinol et du perhydrorétinol** (schéma 12).<sup>[75]</sup>



**Schéma 12** : Analogues du rétinol.

Certains dérivés quinoniques (**Idébénone**) (schéma 13) comportant un alcool gras sont capables de stimuler la synthèse du **Nerve Growth Factor (NGF)**, induisant de façon indirecte la croissance, la survie et la différenciation des neurones.<sup>[76]</sup>

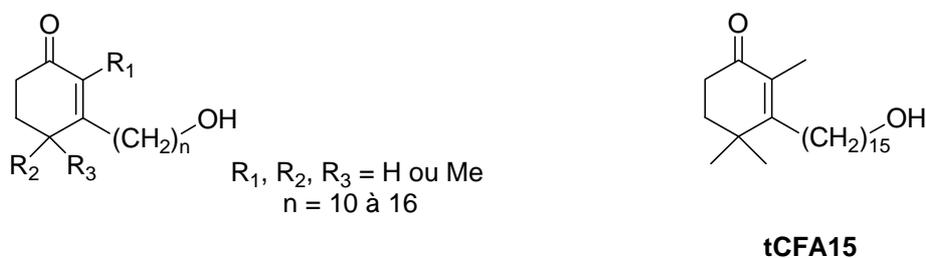
Il a été démontré que la présence du noyau oxygéné ainsi que la chaîne  $\omega$ -hydroxylée, étaient nécessaires à l'activité biologique.



**Schéma 13** : L'idébénone, un alcool gras quinolique.

Tenant compte de ces observations, notre équipe a entrepris la synthèse d'**alcools gras cyclohexénoniques** avec différentes longueurs de chaîne ( $n = 10$  à  $16$ ) (schéma 14) afin d'évaluer l'effet d'un cycle de type « énone » sur l'activité neurotrophique.<sup>[77]</sup>

Les résultats obtenus pour cette série de dérivés ont montré que le composé le plus actif était le **tCFA15** (**trimethyl Cyclohexenonic Fatty Alcohol**), une cyclohexénone triméthylée portant 15 atomes de carbone sur la chaîne latérale. Le tCFA15 est capable de promouvoir la différenciation des neurosphères (culture d'agrégats de cellules souches neurales) à la concentration de  $10^{-7}$ M.<sup>[78]</sup> Ce composé agit non seulement sur la maturation cellulaire, mais également sur le déterminisme, en favorisant la production de neurones au détriment des astrocytes par action potentielle sur la voie de signalisation Notch.



**Schéma 14** : Alcools gras cyclohexénoniques.

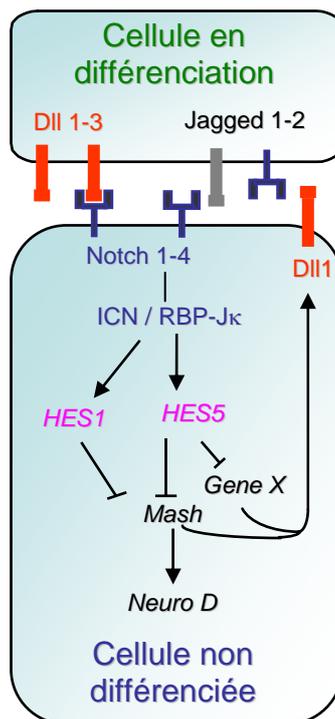
Les études du mode d'action de ce composé ont en effet permis de confirmer que le tCFA15 agit sur la voie de signalisation Notch. Cette dernière est impliquée dans de nombreux processus développementaux du cerveau et notamment dans la création de la diversité cellulaire.<sup>[79]</sup> Dans le cerveau adulte, la voie Notch est importante pour la plasticité neuronale, la maintenance des neurites et leur croissance ainsi que pour la différenciation des cellules gliales.

Le tCFA15 mime l'effet des facteurs neurotrophiques ce qui lui confère un potentiel intéressant pour le traitement des neuropathies dégénératives.

## V. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch se définit comme un mécanisme d'interactions cellulaires s'exerçant essentiellement entre cellules voisines. Elle contrôle de nombreux processus développementaux, tels le choix de l'identité cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose.<sup>[79]</sup>

Le mécanisme moléculaire<sup>[80]</sup> mis en jeu repose sur un récepteur transmembranaire, **Notch** (Notch 1 à Notch 4), activé par liaison avec un ligand également transmembranaire, le **ligand Delta** (Dll 1, Dll 3) ou **Jagged** (Jagged 1, Jagged 2) présent sur une cellule voisine (schéma 15). Une fois le récepteur Notch activé, son domaine intracellulaire est clivé, ce qui permet sa translocation dans le noyau et son association à la protéine RBP-Jk. Le complexe ainsi formé dans le noyau va activer la transcription des gènes HES (facteur de transcription de type bHLH). Les protéines **HES** (HES1, HES5) exprimées agissent en tant que facteurs de transcription réprimant entre autre Mash1, gène pro-neural intervenant dans la neurogenèse.



**Schéma 15** : Mécanisme moléculaire de la voie de signalisation Notch.

Chez les vertébrés, la voie Notch peut être activée par les quatre gènes **Notch** codant pour les récepteurs Notch et par deux familles de ligands, Delta et Jagged. Cette activation déclenche toute une cascade de signalisations visant principalement à contrôler le choix de l'identité cellulaire et de la différenciation.

Dans le cerveau adulte, la voie de signalisation Notch joue un rôle important dans le maintien de la plasticité neuronale, des neurites et de leur croissance ainsi que dans la différenciation des cellules gliales. En effet, la plupart des études menées chez les mammifères montrent que l'inhibition de la voie Notch stimule la neurogenèse.<sup>[81]</sup> Au contraire, lorsque la voie Notch est activée, elle stimule la gliogenèse (formation des cellules gliales).<sup>[82]</sup>

Des anomalies de la voie de signalisation Notch sont associées à de nombreux troubles développementaux, à des maladies neurodégénératives ainsi qu'à des cancers.<sup>[83]</sup> Les différents processus enzymatiques impliqués dans cette voie et notamment leur régulation ainsi que les interactions ligands-récepteurs, sont des axes de recherche thérapeutiques très prometteurs.

## **VI. La neuroprotection, un outil thérapeutique complémentaire essentiel**

### **A. Implication de la glie dans les processus inflammatoires et immunitaires**

Les différentes maladies neurologiques sont souvent accompagnées de réactions immunitaires et inflammatoires. Leur rôle précis n'est pas encore clairement établi mais il est incontestable qu'elles jouent un rôle néfaste dans l'évolution de ces maladies.

Aussi, il paraît essentiel de protéger les différentes cellules du système nerveux des phénomènes inflammatoires et/ou immunitaires.

#### **1. Généralités**

##### **1.1 Microgliocytes et astrocytes**

Comme décrit précédemment, le système nerveux central est composé principalement de neurones et de cellules gliales. Ces dernières se divisent en quatre types. Parmi elles, les microgliocytes, et également les astrocytes mais dans une moindre mesure, participent aux réponses immunitaires et inflammatoires au sein du système nerveux.

## 1.2 Le système immunitaire

Le système immunitaire des organismes pluricellulaires est un ensemble de cellules, de tissus et d'organes chargés de défendre l'organisme contre l'attaque d'un agent pathogène quelconque, appelé antigène. Les différentes composantes du système immunitaire interagissent pour produire une réponse immunitaire efficace. Cette réponse est principalement orchestrée par des cellules spécialisées, les lymphocytes T et B, ainsi que par les macrophages.

Les lymphocytes B se lient directement à l'antigène et s'en suit la production d'anticorps. Par contre, les cellules T ne reconnaissent l'antigène qu'après association avec les protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de cellules appelées cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les macrophages reconnaissent l'antigène, soit directement, soit en association avec les CPA puis l'éliminent par phagocytose (capacité de capturer et de digérer des fragments ou des cellules entières).

## 1.3 Notion de neuroimmunologie

L'ensemble des particularités qui contrôlent l'accès du système immunitaire et son fonctionnement au niveau du système nerveux (moelle épinière, œil et cerveau) font de ces organes des sites *immuns privilégiés*. La réponse immunitaire générale qui pourrait être délétère pour ces organes particulièrement fragiles, est ralentie par rapport au reste de l'organisme. Le *privilège immunitaire* se caractérise principalement par trois aspects :

- la présence de la barrière hémato-encéphalique, dernière barrière biologique avant d'atteindre le cerveau. Elle est constituée de cellules endothéliales tapissant les parois des capillaires sanguins irriguant le système nerveux, formant ainsi des jonctions serrées. Ces jonctions rendent impossible le passage des anticorps et des cellules immunitaires non activées du flux sanguin vers le cerveau. Son rôle est de protéger le système nerveux central des invasions de pathogènes ou de toxines microbiennes
- la présence quasi inexistante de cellules présentatrices d'antigène spécialisées au sein du système nerveux
- l'absence d'un drainage lymphatique au sein même du système nerveux.

Le cerveau possède en quelque sorte un système immunitaire indépendant, c'est-à-dire sans connexion avec le reste de l'organisme. Il est essentiellement représenté par les microgliocytes formant la microglie.

## **2. La microglie**

Les microgliocytes sont de petites cellules réparties dans tout le système nerveux central. Leur présence dans le cerveau n'est pas originelle. En effet, au cours du développement embryonnaire, elles quittent la moelle pour infiltrer progressivement le cerveau.

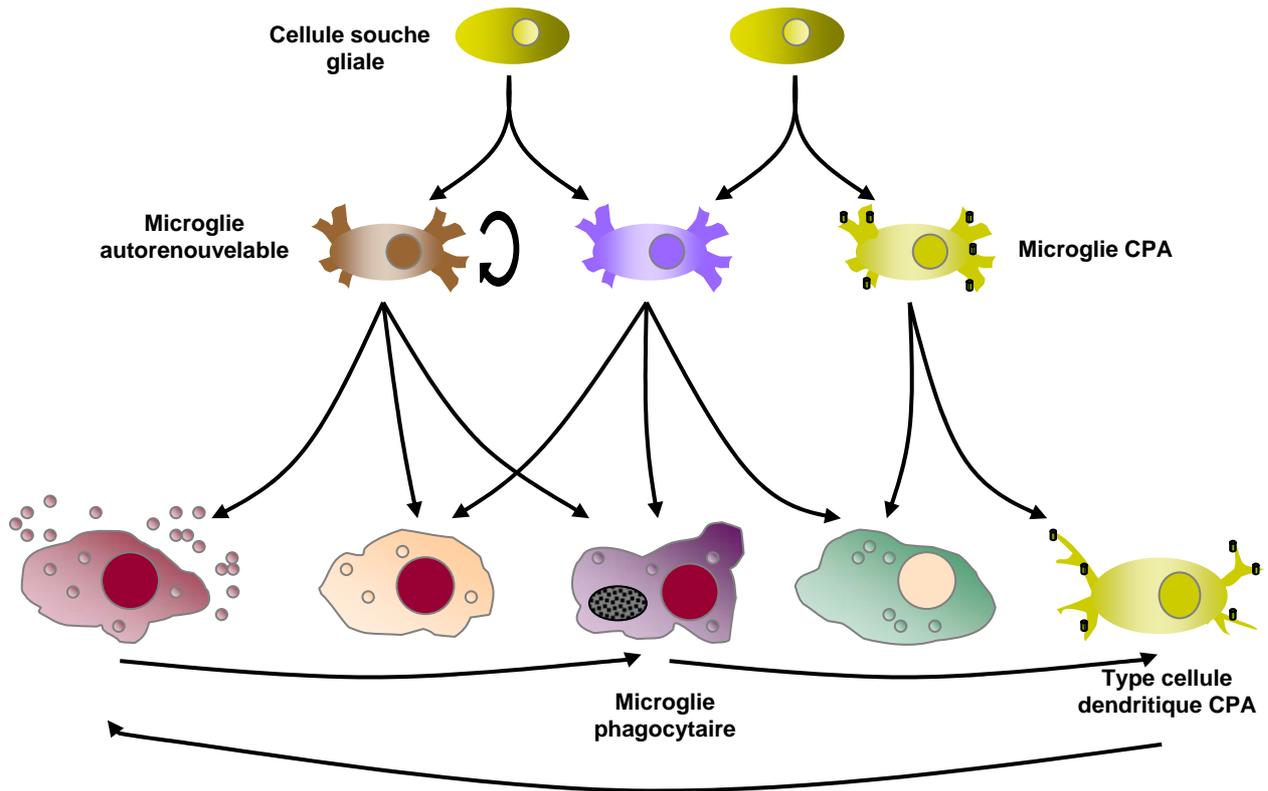
Les microgliocytes possèdent les caractéristiques morphologiques, immunologiques et fonctionnelles qui permettent de les apparenter à la lignée des monocytes-macrophages. Elles sont par conséquent capables de faire de la phagocytose. La microglie, formée par les microgliocytes, joue donc un rôle dans la régulation des phénomènes inflammatoires non spécifiques et dans les réponses immunitaires spécifiques.<sup>[84]</sup>

### **2.1 Activation de la microglie**

Une infection de l'organisme est détectée grâce à la reconnaissance d'éléments spécifiques produits par les micro-organismes. Ces éléments, appelés **PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns)**, sont reconnus par les cellules immuno-compétentes et activent ainsi différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire, comme la voie du NF- $\kappa$ B. Une autre voie également susceptible d'intervenir dans les processus inflammatoires est la **voie de signalisation Notch**. En effet, celle-ci pourrait être impliquée dans le processus d'activation des lymphocytes et des macrophages. La voie Notch intervient dans de nombreux processus développementaux, notamment dans la création de la diversité cellulaire.<sup>[79]</sup> Il semble que la réactivation de cette voie puisse inhiber la neurogenèse au cours de certaines maladies dégénératives du SNC comme la sclérose en plaques.<sup>[85]</sup>

Dans un système nerveux sain, seules très peu de cellules présentatrices d'antigène du CMH de classe I ou II sont exprimées. En effet, les neurones abaissent l'expression des molécules de classe I et II sur les cellules gliales environnantes.<sup>[86]</sup> Cependant, au cours de pathologies du système nerveux, la mort neuronale va inhiber cette répression. Aussi, la glie environnante, plus particulièrement la microglie, va exprimer des molécules présentatrices d'antigènes du CMH de classe II ainsi que des molécules d'adhésion.

Cette activation microgliale se traduit par des changements morphologiques et fonctionnels (schéma 16).



**Schéma 16** : Développement et activation de la microglie.

Les cellules microgliales activées sont caractérisées par un gonflement de leur corps cellulaire et le rétrécissement de leurs prolongements. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des prostaglandines qui contrôlent la prolifération des lymphocytes, et par conséquent permettent l'installation d'une réponse immunitaire normale.

## 2.2 Production de cytokines

Comme précisé précédemment, l'activation de la microglie se traduit en partie par une production de diverses cytokines et l'expression de leurs récepteurs correspondants ainsi que d'agents microbicides.<sup>[87]</sup>

Les cytokines sont des protéines impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires et, par conséquent, des phénomènes inflammatoires. Elles représentent le stimulus majeur permettant de contrôler la migration des microgliocytes vers le site de lésion. Parmi ces protéines figurent la famille des interleukines (IL) ainsi que des facteurs de nécrose comme le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ).<sup>[88]</sup> Ces protéines sont capables de stimuler la prolifération des cellules microgliales et d'anticorps ainsi que l'activation des macrophages. Par ailleurs, certaines d'entre elles, comme le TNF- $\alpha$  permettent la nécrose (mort non naturelle d'une cellule) de certains types cellulaires, les cellules tumorales par exemple.

### 2.3 Production de monoxyde d'azote

La microglie activée sécrète également une certaine quantité d'agents microbicides, le plus souvent des métabolites réactifs de l'oxygène qui peuvent provoquer un stress oxydant. Ces métabolites peuvent initier ou amplifier une réaction inflammatoire ou immunitaire. L'activation microgliale s'accompagne d'une production massive de monoxyde d'azote (NO $\cdot$ ), des anions superoxyde (O $_2^{\cdot-}$ ) et de peroxynitrite (ONOO $\cdot^-$ ) toxiques pour les cellules voisines et intervenant dans le processus de phagocytose. Le monoxyde d'azote, à faibles concentrations, joue un rôle physiologique primordial dans la régulation de la pression sanguine mais également dans la communication neuronale ainsi que dans la réponse immunitaire non-spécifique.<sup>[89]</sup>

Chez les mammifères, le NO est exclusivement synthétisé par les *Nitric Oxide Synthases* (NOS). Les NOS sont des monooxygénases existant sous trois isoformes.<sup>[90]</sup> Deux sont dites constitutives, la NOS neuronale (nNOS ou NOS I) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III). Elles sont calcium-dépendantes et produisent du NO en petites quantités. Dans le cas du système nerveux elles sont essentiellement impliquées dans la communication intercellulaire. La troisième forme est la NOS inductible (iNOS ou NOS II). Généralement, elle est induite par le biais de cytokines dans des cellules immuno-compétentes. La microglie activée peut exprimer la NOS II et ainsi produire du NO en grande quantité. La production massive de NO est un mécanisme de défense qui est en grande partie responsable des activités antivirales et antimicrobiennes des macrophages. Cependant, cette surproduction de NO peut être néfaste pour les cellules saines voisines puisqu'elle peut entraîner leur mort par apoptose (mort programmée). Il a été mis en évidence que la cascade du monoxyde d'azote est fortement impliquée dans le processus de mort neuronale au cours des réactions inflammatoires du système nerveux.<sup>[91, 92]</sup>

### 2.4 Interaction avec le système immunitaire

Malgré la présence des différents mécanismes de défense du système nerveux central empêchant une infiltration massive de lymphocytes et de macrophages, une réponse immunitaire peut prendre place dans le cerveau infecté. Cependant cette réponse n'est pas suffisante dans la mesure où cette infiltration reste limitée et que les cellules gliales ne sont pas d'efficaces cellules présentatrices d'antigène. Aussi, la réponse immune ne permettra pas une disparition complète de l'infection. Cette absence de contrôle de l'infection peut aboutir à une infection chronique ou latente.

A l'inverse, au cours de certaines maladies ou infections, le *privilège immun* dont bénéficie le cerveau peut disparaître. Il s'agit d'infections rares relarguant des antigènes viraux dans le liquide céphalo-rachidien ou infectant les méninges.

### 3. Les astrocytes

#### 3.1 Fonctions

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus répandues dans le système nerveux central.<sup>[93]</sup> Ils constituent le seul lieu de stockage de glucose dans le cerveau et représentent ainsi l'unique source énergétique des neurones. Les astrocytes sont reliés les uns aux autres par des jonctions serrées communicantes de type *gap*. Ils peuvent ainsi avoir des échanges simultanés avec plusieurs neurones et synchroniser l'activité synaptique de ces derniers.

Ils sont également impliqués dans la neurogenèse et participent au contrôle de l'environnement du système nerveux en réagissant, au même titre que la microglie, à l'infiltration des lymphocytes et des macrophages dans le cerveau.<sup>[29]</sup>

Les astrocytes jouent un rôle certain dans les phénomènes inflammatoires et immunitaires. Ainsi, leur implication au cours des différentes neuropathies dégénératives est fortement probable.

#### 3.2 La gliose réactionnelle

Toute lésion au sein du système nerveux s'accompagne d'une prolifération des cellules gliales, mais essentiellement d'astrocytes, au niveau du site de lésion. Ce phénomène, connu sous le nom de gliose réactionnelle ou encore cicatrice gliale, a pour but de préserver ou de restituer l'homéostasie du cerveau.<sup>[29]</sup> L'activation des astrocytes se traduit par un élargissement et une augmentation du volume du noyau accompagnés d'une accumulation de chromatine (association de protéines histones et d'ADN). Les astrocytes ainsi activés entourent le site de lésion pour former une sorte de cicatrice, la cicatrice gliale. Elle est constituée de prolongements entremêlés d'astrocytes, reliés les uns aux autres par des jonctions serrées formant ainsi un véritable tissu cicatriciel ferme et dense.

La gliose réactionnelle est accompagnée d'une réaction inflammatoire et d'une réponse immunitaire. Aussi, la gliose réactionnelle peut devenir dangereuse dans la mesure où les astrocytes activés produisent des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres ainsi que des dérivés de l'acide arachidonique entraînant des effets neurotoxiques.

#### **4. Importance de l'inflammation dans les neuropathies dégénératives**

La réponse inflammatoire est une défense normale et essentielle de l'organisme suite à l'agression par des agents pathogènes. Cependant, lorsque cette réponse est excessive ou inappropriée, elle peut devenir la cause de bon nombre de maladies.

Comme précisé précédemment, le système de défense du cerveau est représenté par la microglie. Suite à une agression, la microglie va être activée. Une fois activée, elle secrète de nombreuses chimiokines et cytokines pro-inflammatoires. Ces composés vont générer une réaction inflammatoire excessive et donc néfaste pour le cerveau.

La sclérose en plaques est l'affection neurologique à composante inflammatoire la plus répandue. L'invasion du système nerveux central par des lymphocytes T et les macrophages va endommager les gaines de myéline entourant les axones des neurones, ce qui va se traduire par une perte des fonctions neurales suivie de la mort neuronale. Des études ont révélé, que chez des patients atteints de sclérose en plaques, la quantité des médiateurs de l'inflammation, comme le TNF- $\alpha$ , la iNOS, l'IL-1 était largement supérieure à la normale.

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ont toujours été considérées exclusivement comme des maladies dégénératives du système nerveux central. Récemment, des études ont montré une contribution des phénomènes inflammatoires au cours de ces maladies.<sup>[5, 94]</sup> Cette inflammation est caractérisée par la présence de microglie activée respectivement, autour des plaques séniles et autour des neurones dopaminergiques dégénérés.

A ce jour, le rôle exact joué par les processus inflammatoires au cours des neuropathies dégénératives n'est pas clair, mais il est certain qu'ils contribuent à l'évolution néfaste de ces maladies.

#### **B. Le stress oxydant**

Depuis plusieurs années les scientifiques s'intéressent au phénomène de **stress oxydant**, c'est-à-dire le processus par lequel la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Ce phénomène semble être impliqué dans de nombreuses pathologies humaines.

## 1. Définition

Chez les mammifères, la chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle primordial dans la cellule, elle permet notamment la réduction de l'oxygène en molécules d'eau. Cette réaction est cruciale puisqu'elle permet l'apport d'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Au cours de ce processus une faible quantité d'oxygène (environ 2%) est convertie en espèces oxygénées actives (EOA), comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) ou le monoxyde d'azote. Notre organisme produit donc en permanence ces EOA. Ces espèces ont des rôles physiologiques importants pour la cellule lorsqu'elles sont produites en faible quantité. Cette production physiologique peut être maîtrisée par des systèmes de défense composés principalement d'enzymes (superoxyde dismutases, glutathion peroxydase, ...) <sup>[95]</sup> et de molécules anti-oxydantes de petite taille (glutathion, vitamines A, C, E, ubiquinone, flavonoïdes, ...) <sup>[96]</sup>. Mais si elles sont produites en trop grande quantité comme au cours de désordres inflammatoires, les mécanismes de régulation ne seront plus suffisants. Il y a alors un déséquilibre de la balance pro-oxydants/anti-oxydants. Ce déséquilibre représente le **stress oxydant**.

Le stress oxydant peut avoir des effets néfastes. Il peut induire un phénomène apoptotique des cellules saines en activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires, des ruptures au sein de l'ADN ou altérer la membrane cellulaire via le phénomène de peroxydation lipidique.

## 2. Pathologies du système nerveux et stress oxydant

Le système nerveux central est particulièrement vulnérable au stress oxydant dans la mesure où il consomme un tiers de l'oxygène.

Stress oxydant et phénomènes inflammatoires sont étroitement liés. <sup>[97]</sup> Le stress oxydant est très souvent impliqué dans le développement d'un grand nombre de physiopathologies, notamment les maladies à composantes inflammatoires. La production de radicaux libres par les cellules du système immunitaire permet de lutter contre les agents pathogènes. La microglie, une fois activée, synthétise du monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ), des anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) et du peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ) qui peuvent entraîner la mort des cellules saines avoisinantes par apoptose. La contribution de ces radicaux dans la mort neurale au cours des pathologies dégénératives du SNC semble considérable.

La formation des dépôts d'amyloïde- $\beta$  au cours de la maladie d'Alzheimer semble étroitement liée au stress oxydant subi par les cellules du système nerveux. Une déficience en vitamine E, anti-oxydant puissant, a été observée chez des personnes atteintes d'Alzheimer. Par ailleurs, il a pu être démontré que le taux d'oxydation était plus important dans le cerveau de sujets porteurs de la maladie que dans le cerveau de sujets âgés sains. Les radicaux libres provenant de l'oxydation lipidique, due à une déficience en vitamine E, favoriseraient la formation et la toxicité des plaques séniles d'amyloïde- $\beta$ .

Des travaux menés par Grimes<sup>[98]</sup> en 1988 suggèrent une contribution significative des radicaux libres quant à la dégénérescence des cellules nerveuses observée dans la maladie de Parkinson.

Le stress oxydant est souvent accompagné de la formation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines qui sont généralement sécrétées au cours d'un processus inflammatoire et/ou immunitaire. Aussi, il a été démontré qu'une concentration trop élevée en EOA était également corrélée à la survenue et au développement de maladies à composantes inflammatoires comme la sclérose en plaques.

### **3. Lutte contre le stress oxydant**

Le stress oxydant étant à l'origine de nombreuses maladies, notamment du système nerveux, il semble évident de chercher à le supprimer ou au moins de le réduire.

Une manière de lutter contre ce phénomène est l'utilisation d'antioxydants au sens large, c'est-à-dire l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces oxygénées actives. Leur action peut se faire soit en réduisant ou dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable soit en générant du glutathion.

Ces antioxydants peuvent être fournis par l'alimentation ou par des molécules anti-oxydantes naturelles ou de synthèse.

- L'alimentation, et plus particulièrement les fruits et légumes, contient un grand nombre d'anti-oxydants, parmi eux les vitamines (E, C, Q,  $\beta$ -carotène), les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse) mais également plus de 4000 sortes de polyphénols et flavonoïdes (contenus dans les choux, le thé, le vin, ...), des alcaloïdes et bien d'autres encore.

Une consommation régulière en anti-oxydants pourrait avoir un effet bénéfique, mais essentiellement préventif.

- Les anti-oxydants non nutritionnels comprennent des produits naturels extraits de plantes, utilisés tels quels ou modifiés chimiquement, d'animaux terrestres ou marins et des produits

de synthèse imitant l'activité de certaines enzymes, piégeant les radicaux ou encore chélatant certains métaux.

Les dérivés végétaux sont les plus utilisés dans les domaines des suppléments et des produits cosmétologiques anti-vieillessement. La famille comportant le plus grand nombre de molécules actives est celle des polyphénols. Les plus utilisées sont la quercétine, chef de file des flavonoïdes et le resvératrol, extrait de la peau du raisin.

L'utilisation des enzymes s'est avérée peu efficace et limitée par le risque de contamination accrue suite à l'apparition de la protéine du prion. Cependant, les chimistes ont synthétisé de nombreuses molécules ayant des propriétés des superoxyde dismutases, dites « SOD likes » basées sur des complexes de cuivre, de fer ou de manganèse. Mais leur efficacité *in vivo* est principalement dépendante des facteurs suivants : être stable et non toxique, avoir une longue demi-vie, et être capable de traverser les membranes cellulaires et ainsi atteindre des sites hydrophiles et hydrophobes.

Des piègeurs de radicaux chimiques appartenant aux familles des dérivés phénoliques, stéroïdiens, soufrés ou encore hydroxylés sont également des sources prometteuses.

Toutefois, une vigilance quant à l'utilisation d'anti-oxydants s'impose, car administrés à forte dose ils peuvent devenir des pro-oxydants.

A l'heure actuelle, les seuls anti-oxydants efficaces et utilisables dont dispose la médecine sont des composés luttant contre les radicaux superoxydes (peu toxiques) et hydroxyles (difficiles à atteindre car réagissant instantanément). Aussi, il est indispensable de trouver de nouvelles molécules capables de neutraliser les EOA comme le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le monoxyde d'azote et surtout le peroxyde d'azote qui sont beaucoup plus toxiques.

## VII. Approche thérapeutique innovante

Ces dernières années, de nombreux travaux ont été effectués afin de combattre la source des diverses neuropathies dégénératives : la dégénérescence neurale. Cette voie de recherche s'est développée avec la découverte de la présence de cellules souches dans le cerveau adulte permettant de régénérer les cellules nerveuses. Une nouvelle approche thérapeutique consistant à combattre la dégénérescence nerveuse tout en régénérant les différents types cellulaires du système nerveux central à partir de cellules souches neurales est actuellement à l'étude.

Cependant, il ne s'agit pas uniquement de régénérer les cellules nerveuses lésées ou mortes au cours de ces différentes pathologies, mais de les protéger des phénomènes inflammatoires et

immunitaires ainsi que du stress oxydant présents lors du développement des différentes pathologies neurologiques.

Les aspects de régénération nerveuse et de neuroprotection semblent complémentaires et indissociables. Aussi, une approche thérapeutique innovante consisterait à développer des composés cumulant ces deux aspects.

## VIII. Les polyphénols naturels

### A. Généralités

Les polyphénols représentent une grande famille avec pas moins de 5000 composés différents. Ils sont présents dans de nombreux fruits et légumes, des fruits et légumes secs mais également dans le thé, le café et le vin rouge.

D'un point de vue structural, les polyphénols se caractérisent par la présence de fonctions hydroxyles (libres, estérifiées ou étherifiées) sur des noyaux aromatiques. Ils sont principalement répartis en deux grandes classes issues de voies biogénétiques légèrement différentes :

- les flavonoïdes (les plus abondants), avec un squelette de base à 15 carbones en C6-C3-C6 (schéma 17 : la quercétine)

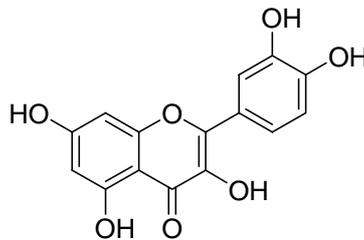


Schéma 17 : Structure de la quercétine.

- les stilbénoloïdes, avec un squelette de base à 14 carbones en C6-C2-C6 (schéma 18 : le resvératrol).

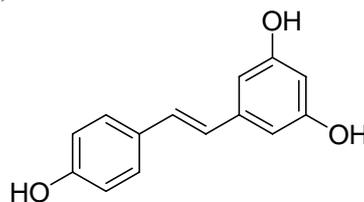


Schéma 18 : Structure du resvératrol.

Les polyphénols naturels sont des métabolites dits « secondaires », ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction.

Ils participent aux mécanismes de défense de la plante (protection contre les attaques fongiques, contre le rayonnement UV, ...). Ce sont aussi les pigments de la plupart des fleurs et des fruits rouges ou bleus et de ce fait ils contribuent à l'attraction des insectes pollinisateurs et à la dissémination des graines.

Les polyphénols sont classés dans les anti-oxydants naturels. Leurs propriétés antioxydantes, mais aussi antibactériennes, antifongiques, antivirales, ..., ont été démontrées *in vitro*<sup>[99,100]</sup>.

Cette dernière décennie a vu une augmentation des études biologiques de ces composés. Cet intérêt est lié aux résultats de diverses études épidémiologiques ayant établi une relation entre la consommation de fruits et légumes, de thé ou de vin, aliments contenant des polyphénols, et la moindre incidence de certaines pathologies comme les affections cardiovasculaires, microbiennes, inflammatoires, l'ostéoporose et les cancers.<sup>[100]</sup>

## **B. Le resvératrol : un polyphénol aux vertus thérapeutiques variées et intéressantes**

### **1. Généralités**

La principale source de resvératrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene) (schéma 18) chez l'homme est le raisin. Il est également présent en petites quantités dans diverses plantes telles que l'eucalyptus et dans certains aliments comme les arachides, les mûres ou encore la rhubarbe.

Le resvératrol est une phytoalexine,<sup>[101]</sup> substance produite par la plante pour lutter contre des agressions fongiques ou microbiennes. Il est présent dans toutes les parties de la vigne, avec les concentrations les plus élevées dans la peau des raisins. Il existe sous deux formes d'isomères, le *cis* et le *trans*. Ce dernier peut être simplement transformé en isomère *cis* par irradiation aux UV.

Les principales activités biologiques de ce polyphénol sont attribuées à l'isomère *trans* dans la mesure où le *cis* n'est pas disponible commercialement. Les rares études effectuées sur le dérivé *cis* semblent montrer une activité comparable.

## 2. Les activités biologiques du resvératrol

L'engouement pour cette molécule provient d'une étude révélant que, malgré une alimentation riche en graisses saturées, les Français, grands consommateurs de vins, présentent un risque nettement plus faible de mortalité par maladies cardio-vasculaires ou cancers et sont moins touchés par les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Ce concept est appelé « *French Paradox* ». <sup>[102]</sup>

### *Activités anti-oxydantes*

De nombreuses pathologies, à savoir les maladies cardiovasculaires, les cancers, les processus inflammatoires ou encore les maladies neurologiques, sont associées au stress oxydant. <sup>[103]</sup>

Les principales activités biologiques attribuées au resvératrol sont essentiellement dues à son activité anti-oxydante. <sup>[104]</sup> Cette capacité anti-oxydante peut être évaluée *in vitro* aussi bien par piégeage des radicaux libres que par chélation des métaux largement connus pour être impliqués dans les réactions radicalaires. Le resvératrol permet de piéger l'anion superoxyde qui est une espèce souvent à l'origine des dégâts oxydatifs. Aussi, il permet, à des concentrations micromolaires, d'inhiber l'oxydation des vésicules lipidiques ou des lipoprotéines de faible densité (LDL). <sup>[105, 106]</sup>

A ce jour, les principales activités biologiques du resvératrol répertoriées sont :

- **le domaine cardiovasculaire** : le resvératrol inhibe l'agrégation plaquettaire en inhibant la production de médiateurs conduisant à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes lors de la formation d'un caillot dans les événements thrombotiques.

De même, en inhibant l'oxydation lipidique, il réduit les dépôts de cholestérol dans les artères et diminue ainsi les accidents cardio-vasculaires. <sup>[105]</sup>

- **l'activité anticancéreuse** : c'est dans ce domaine que les travaux effectués ont été les plus nombreux. Ces études ont montré des effets antiprolifératifs du resvératrol sur des cellules tumorales en culture ainsi qu'une réduction de la taille et du nombre de tumeurs. L'action du resvératrol semble aller au-delà de son activité anti-oxydante. En effet, des études récentes ont révélé que l'effet du resvératrol pourrait s'expliquer par des actions au niveau de l'expression de différentes protéines médiatrices (facteurs de transcription, oxygénases, ...). <sup>[107, 108]</sup>

- **L'activité anti-inflammatoire** : *in vivo*, le resvératrol est un inhibiteur efficace de la cyclooxygénase 2 (COX2).<sup>[109]</sup> Les cyclooxygénases sont des enzymes essentiels à la production de médiateurs pro-inflammatoires. Aussi des inhibiteurs de ces enzymes sont donc des anti-inflammatoires potentiels. Tout phénomène inflammatoire se traduit par la production d'une multitude de composés, le monoxyde d'azote, des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1(IL-1) ou encore des espèces oxygénées actives, aux effets dangereux pour l'organisme. Des études ont montré que le resvératrol permet de réduire, voire d'inhiber la production d'un certain nombre de ces molécules.<sup>[110, 111]</sup>

- **L'activité neuroprotectrice** : des études *in vivo* menées chez le rat ont montré un effet neuroprotecteur du resvératrol. Des rats prétraités avec du resvératrol, après induction d'une attaque cérébrale, présentaient des dommages neuronaux deux fois plus faibles que chez des rats non traités.<sup>[112]</sup>

Des travaux réalisés par Marambaud et coll.<sup>[113]</sup> ont révélé que le resvératrol permettait d'induire la dégradation du peptide A $\beta$ , constituant majeur des plaques séniles formées au cours de la maladie d'Alzheimer par un mécanisme impliquant le protéasome.

Ces multiples activités biologiques du resvératrol font de ce composé un outil thérapeutique très prometteur pour le traitement des différentes maladies du système nerveux central à composantes dégénératives et inflammatoires.<sup>[114]</sup>

## IX. Cadre du travail

### A. Approche thérapeutique innovante des neuropathologies

La caractéristique première des neuropathies dégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques, est la perte fonctionnelle d'une partie des cellules du système nerveux central.

Les aspects de régénération nerveuse et de neuroprotection semblent complémentaires et indissociables. Aussi, une nouvelle approche thérapeutique consiste à combiner ces deux aspects. L'utilisation de composés mimant les activités des facteurs neurotrophiques, réduisant les phénomènes inflammatoires (modulation de l'activation microgliale) et réduisant le stress oxydant, semble très prometteuse pour le traitement des diverses neuropathologies dégénératives.

## B. Travaux effectués au laboratoire

### 1. Les alcools à longue chaîne hydrocarbonée

Des travaux effectués au laboratoire ont permis de démontrer l'activité neurotrophique de certains alcools à longue chaîne hydrocarbonée. Le plus actif est l'alcool gras comportant une chaîne hydrocarbonée de 26 atomes de carbone et une fonction  $\omega$ -hydroxyle, l'*hexacosanol* (schéma 19).<sup>[74]</sup>

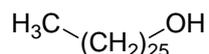


Schéma 19 : n-hexacosanol.

La longueur de la chaîne aliphatique hydrocarbonée ainsi que la fonction hydroxyle en bout de chaîne, se sont avérées primordiales pour l'activité biologique.

### 2. Molécules hybrides

Notre laboratoire a déjà synthétisé plusieurs séries de molécules hybrides combinant l'activité neurotrophique d'une chaîne  $\omega$ -alcanol et un noyau de type neuroprotecteur. Les alcools gras indoliques (5MIFA18) et tocophéroliques (TFA12) (schéma 20) comportant respectivement 18 et 12 atomes de carbones sur la chaîne latérale, sont capables de mimer l'effet des facteurs neurotrophiques tout en protégeant les cellules contre le stress oxydant.<sup>[115, 116]</sup> En combinant ces deux effets nous avons développé un outil thérapeutique très prometteur pour le traitement des maladies neurodégénératives et inflammatoires du système nerveux.



Schéma 20 : Molécules hybrides.

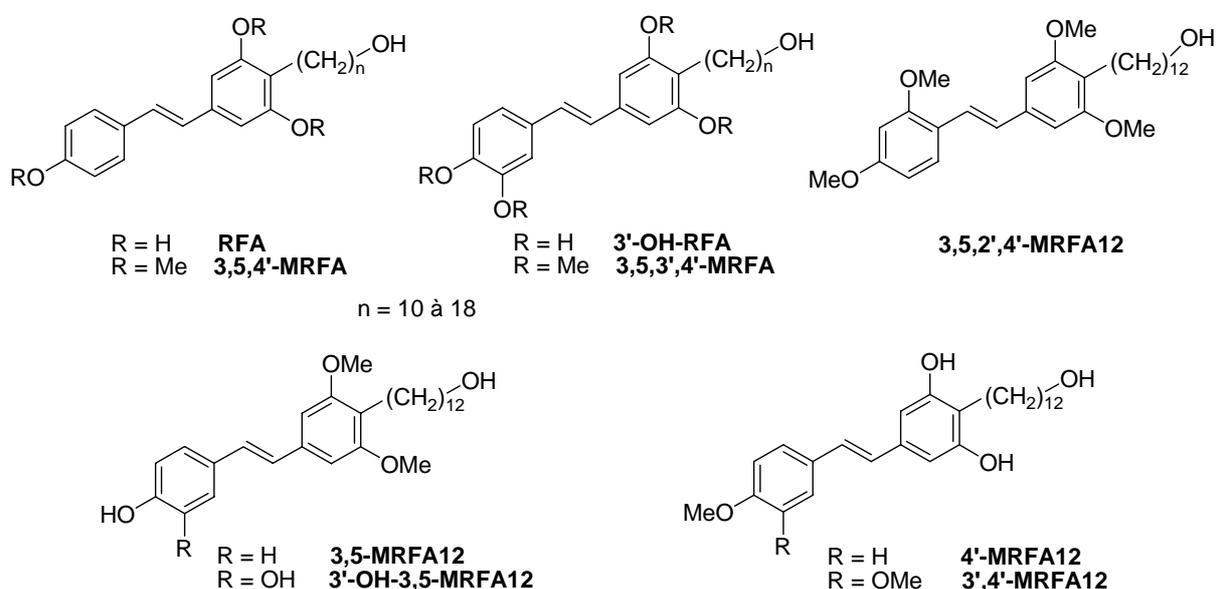
## C. Projet d'étude

Dans l'optique de combiner les aspects de régénération nerveuse et de neuroprotection, la synthèse de composés hybrides resvératrol/ $\omega$ -alcanols, les *Resveratrol Fatty Alcohols (RFA)*, a été envisagée.

Le resvératrol est connu pour ses propriétés antioxydantes et ses activités biologiques diverses et intéressantes. Il semble jouer un rôle favorable dans les processus inflammatoires et immunitaires du système nerveux. [109, 110, 111]

Parallèlement, des alcools gras avec des longueurs de chaînes appropriées se sont avérés être des promoteurs de la survie et de la différenciation des cellules nerveuses, et de ce fait sont des mimes des facteurs neurotrophiques.

Les différents **RFA** (schéma 21) ainsi formés, devraient être capables de moduler l'activation microgliale tout en protégeant les cellules nerveuses contre le stress oxydant. Ils devraient également être capables de générer des cellules nerveuses fonctionnelles à partir de cellules souches neurales adultes.



**Schéma 21** : Nomenclature des différents alcools gras resvératroliques, les RFA.

Afin de vérifier ces hypothèses, la synthèse des différents RFA a été entreprise. Des tests physico-chimiques, basés sur la neutralisation des radicaux, ont permis d'évaluer la capacité antioxydante de nos composés.

Les études de régénération nerveuse ont été effectuées sur un modèle *in vitro* de cellules souches neurales, les neurosphères.

Finalement, une collaboration avec le Laboratoire de NeuroBiologie de l'Université du Luxembourg, sous la direction du Prof. Paul Heuschling, a permis de tester nos composés sur des modèles *in vitro* d'inflammation des tissus nerveux et de gliose réactionnelle. La capacité de nos molécules à agir sur la sécrétion de protéines pro-inflammatoires, telles le TNF- $\alpha$ , et la production du monoxyde d'azote a été évaluée sur des cultures cellulaires microgliales immortalisées, les MMTG-12.

Les résultats obtenus, aussi bien sur le plan de la régénération nerveuse que sur celui de la modulation de l'activation microgliale, ont permis de postuler en faveur d'une implication de nos composés au cours de l'activité de la voie de signalisation Notch.

## Références bibliographiques

- [1] Braak, H.; Braak, E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease., *J. Neural. Transm. Suppl.*, **1998**. 53, 127-140.
- [2] Verbeek, M. M.; Ruiters, D. J.; de Waal, R. M. The role of amyloid in the pathogenesis of Alzheimer's disease., *Biol. Chem.*, **1997**. 378, 937-955.
- [3] Hardy, J.; Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics., *Science*, **2002**. 297, 353-356.
- [4] Imahori, K.; Hoshi, M.; Ishiguro, K.; Uchida, T. Possible role of protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease., *Neurobiol. Aging*, **1998**. 19,93-98.
- [5] Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Cannady, S. B.; Lehman, T. M.; Landreth, G. E. Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of  $\beta$ -amyloid and prion proteins., *J. Neurosci.*, **1999**. 19, 928-939.
- [6] Sastre, M.; Klockgether, T.; Heneka, M. T. Contribution of inflammatory process to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Devl. Neuroscience*, **2006**. 24, 167-176.
- [7] Lucas, S.-M.; Rothwell, N. J.; Gibson, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease., *Brit. J. Pharmacol.*, **2006**. 147, S232-S240.
- [8] Tan, J.; Town, T.; Paris, Mori, T.; Suo, Z.; Crawford, F.; Mattson, M. P.; Flavell, R. A.; Mullan, M. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after  $\beta$ -amyloid., *Science*, **1999**. 286, 2352-2355.
- [9] Kim, H. J.; Antel, J. P.; Seguin, R.; Duddy, M.; Lapierre, Y. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis., *J. Immunol.*, **2004**. 7144-7153.
- [10] Sheng, J. G.; Griffin, W. S.; Royston, M. C.; Mrak, R. E. Distribution of interleukin-1-immunoreactive microglia in cerebral cortical layers: implications for neuritic plaque formation in Alzheimer's disease., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **1998**. 24, 278-283.
- [11] Rogers, J.; Leiter, L. M.; McPhee, J.; Cahill, C. M.; Zhan, S. S.; Potter, H. Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences., *J. Biol. Chem.*, **1999**. 274, 6421-6431.

- [12] Perry, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease., *Brain Behavior and Immunity*, **2004**. 18, 407-413.
- [13] Crismon, M. L. Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease., *Ann. Pharmacother.*, **1994**. 6, 744-751.
- [14] Summers, W. K. Tacrine and Alzheimer's treatments., *J. Alzheimers Dis.*, **2006**. 9, 439-445.
- [15] Bryson, H. M.; Benfield, P. Donezepil., *Drugs Aging*, **1997**. 10, 234-239.
- [16] Earl-Slater, A.; Walley, T. Donezepil and Alzheimer's dementia., *Clin. Perform. Qual. Health Care*, **2000**. 8, 47-51.
- [17] Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H.; Gmelin, G.; Malanowski, J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease., *Prog. Brain Res.*, **1993**. 98, 431-438.
- [18] Hirsch, C. Galantamine was effective in mild-to-moderate Alzheimer disease., *ACP J. Club*, **2006**. 145, 50.
- [19] Haass, C.; Capell, A.; Citron, M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein., *J. Biol. Chem.*, **1995**. 270, 6186-6192.
- [20] Dovey, H. F.; John, V.; Anderson, J. P.; Chen, L. Z.; Miller, F. D.; Audia, J. E. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain., *J. Neurochem.*, **2001**. 76, 173-181.
- [21] Aisen, P. S.; Davis, K. L.; Berg, J. D.; Grundman, M. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease., *Neurology*, **2000**. 54, 588-592.
- [22] Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandevent, C.; Walker, S.; Woqulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse., *Nature*, **1999**. 400, 173-177.
- [23] DeMattos, R. B.; Bales, K. R.; Cummins, D. J.; Dodart, J. C.; Paul, S. M.; Holtzman, D. M. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**. 98, 8850-8855.
- [24] Gilman, S.; Koller, M.; Black, R. S.; Jenkins, L.; Griffith, S. G.; Fox, N. C.; Eisner, L.; Kirby, L.; Rovira, M. B.; Forette, F.; Orgogozo, J. M. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in a interrupted trial., *Neurology*, **2005**, 64, 1553-1562.

- [25] Dutta, R.; Trapp, B. D. Pathology and definition of multiple sclerosis., *Rev. Prat.*, **2006**. 56, 1293-1298.
- [26] Trapp, B. D. Pathogenesis of multiple sclerosis: the eyes only see what the mind is prepared to comprehend., *Ann. Neurol.*, **2004**. 55, 455-457.
- [27] Diestel, A.; Aktas, O.; Hackel, D.; Zipp, F.; Ullrich, O. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage., *J. Exp. Med.*, **2003**. 198, 1729-1740.
- [28] Poser, C. M.; Brinar, V. V. The nature of multiple sclerosis., *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **2004**. 106, 159-171.
- [29] Morga, E.; Faber, C.; Heuschling, P. Stimulation of endothelin B receptor modulates the inflammatory activation of rat astrocytes., *J. Neurochem.*, **2000**. 74, 603-612.
- [30] Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS., *Trends Neurosci.*, **1996**. 19, 312-318.
- [31] John, G. R.; Shankar, S. L.; Shafit-Zagardo, B.; Massimi, A.; Lee, S. C.; Raine, C. S.; Brosnan, C. S. Multiple sclerosis : re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation., *Nat. Med.*, **2002**. 10, 1075-1076.
- [32] Morrow, S. A.; Stoian, C. A.; Dmitrovic, J.; Chan, S. C.; Metz, L. M. The bioavailability of IV methylprednisolone and oral prednisone in multiple sclerosis., *Neurology*, **2004**. 63, 1079-1080.
- [33] Oishi, C.; Sakuta, M. Steroid therapy for multiple sclerosis., *Nippon Rinsho.*, **2003**. 61, 1361-1366.
- [34] Calabresi, P. A. Considerations in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis., *Neurology*, **2002**. 58, 10-22.
- [35] Westarp, M. E. Medical rehabilitation of chronic progressive disseminated encephalomyelitis (MS)., *Neurology*, **2000**. 6, 176-178.
- [36] Pal, E.; Gömöri, E.; Gati, I. Neurofibromatosis and glioblastoma in a case of multiple sclerosis., *Eur. J. Neurol.*, **2001**. 8, 717-719.
- [37] Fainardi, E.; Rizzo, R.; Granieri, E.; Baricordi, O. R. Beneficial effect of interferon- $\beta$  1b treatment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with increase in serum levels of soluble HLA-I molecules during the first 3 months of therapy., *J. Neuroimm.*, **2004**. 148, 206-211.
- [38] Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW; International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis., *N. Engl. J. Med.*, **2003**. 348, 15-23.
- [39] Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA,

- Sandrock AW; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis., *N. Engl. J. Med.*, **2006**. 354, 899-910.
- [40] McKay, R. Stem cells-hype and hope., *Nature*, **2000**. 406, 361-364.
- [41] Martino, G.; Pluchino, S. The therapeutic potential of neural stem cells., *Nature*, **2006**. 7, 395-406.
- [42] Miller, R. H. The promise of stem cells for neural repair., *Brain Res.*, **2006**. 26, 258-264.
- [43] Gage, F. H. Mammalian neural stem cells., *Science*, **2000**. 287, 1433-1438.
- [44] Johansson, C. B.; Momma, S. Clarke, D. L.; Risling, M.; Lendahl, U.; Frisen, J. Identification of neural stem cells in the adult mammalian central nervous system., *Cell*, **1999**. 96, 25-34.
- [45] Doherty, M. J.; Ashton, B. A.; Walsh, S.; Beresford, J. N.; Grant, M. E.; Canfield, A. E. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo., *J. Bone Miner Res.*, **1998**. 13, 828-838.
- [46] Trueta J. Role of the vessels in osteogenesis., *J. Bone and Joint Surgery*, **1963**. 45 B, 402-418.
- [47] Huss, R.; Hong, D. S.; McSweeney, P. A.; Hoy, C. A.; Deeg, H. J. Differentiation of canine marrow cells with hematopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**. 92, 748-752.
- [48] De Angelis, L.; Berghella, L.; Coletta, M.; Lattanzi, L.; Zanchi, M.; Cusella-De Angelis, M. G.; Cossu, G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration., *J. Cell Biol.*, **1999**. 147, 869-878.
- [49] Fleming, W. H.; Mulcahy, J. M.; Montfort, M. J. Transplantation of adult vascular tissue protects mice from lethal irradiation., *ISEH '99*, 28<sup>th</sup> annual scientific meeting, July 10-14, **1999**. Monte Carlo, Monaco.
- [50] Bianco, P.; Cossu, G. *Uno, nessuno e centomila*: Searching for the identity of mesodermal progenitors., *Exp. Cell Res.*, **1999**. 251, 257-263.
- [51] Rietze, R.; Poulin, P.; Weiss, S. Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus., *J. Comp. Neurol.*, **2000**. 424, 397-408.
- [52] Taupin, P.; Gage, F. H. Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells of the Central Nervous System in Mammals., *J. Neurosci. Res.*, **2002**. 69, 745-749.
- [53] Reynolds, B. A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system., *Science*, **1992**. 255, 1707-1710.
- [54] Morshead, C. M.; Reynolds, B. A.; Craig, C. G, *et al.* Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells., *Neuron*, **1994**. 13, 1071-1082.

- [55] Gould, E.; Reeves, A. J.; Graziano, M. S.; Gross, C. G. Neurogenesis in the neocortex of adult primates., *Science*, **1999**. 286, 548-552.
- [56] Doetsch, F.; Caille, I.; Lim, D. A.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain., *Cell*, **1999**. 97, 703-716
- [57] Lois, C.; Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain., *Science*, **1994**. 264, 1145-1148.
- [58] Taupin, P.; Ray, J.; Fischer, W. H.; Suhr, S.T.; Hakansson, K.; Grubb, A.; Gage, F. H. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor., *Neuron*, **2000**. 28, 385-397.
- [59] Tropepe, V.; Craig, C. G.; Morshead, C. M.; van der Kooy, D. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma., *J. Neurosci.*, **1997**. 17, 7850-7859.
- [60] Kuhn, H. G.; Winkler, J.; Kempermann, G.; Thal, L. J.; Gage, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain., *J. Neurosci.*, **1997**. 17, 5820-5829.
- [61] Gould, E.; Tanapat, P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat., *Neuroscience*, **1997**. 80, 427-436.
- [62] Jin, K.; Peel, A. L.; Mao, X. O. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**. 101, 343-347.
- [63] Cao, Q.; Benton, R. L.; Whittemore, S. R. Stem cell repair of central nervous system injury., *J. Neurosci. Res.*, **2002**. 68, 501-510.
- [64] Bjorklund, L. M.; Sanchez-Pernaute, R.; Chung, S.; Andersson, T.; Chen, I. Y.; McNaught, K. S.; Brownell, A. L.; Jenkins, B. G.; Wahlestedt, C.; Kim, K. S.; Isacson, O.; Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**. 99, 2344-2349.
- [65] Pluchino, S.; Quattrini, A.; Brambilla, E.; Gritti, A.; Comi, G.; Vescovi, A. L.; Martino, G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis., *Nature*, **2003**. 422, 688-694.
- [66] Cameron, H. A.; Hazel, T. G.; McKay, R. D. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters., *J. Neurobiol.*, **1998**. 36, 287-306.
- [67] Caldwell, M. A.; He, X.; Wilkie, N.; Pollack, S.; Marshall, G.; Wafford, K. A.; Svendsen, C. N. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres., *Nat. Biotechnol.*, **2001**. 19, 475-479.
- [68] Calza, L.; Giuliani, A.; Fernandez, M.; Pirondi, S.; D'Intino, G.; Aloe, L.; Giardino, L. Neural stem cells and cholinergic neurons: regulation by immunolesion and treatment

- with mitogens, retinoic acid, and nerve growth factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**. 100, 7325-7330.
- [69] Connor, B.; Dragunow, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain., *Brain. Res. Rev.*, **1998**. 27, 1-39.
- [70] Thoenen, H.; Sendtner, M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches., *Nat. Neurosci.*, **2002**. 5 Suppl., 1046-1050.
- [71] Omura, S.; Fujimoto, T.; Ootoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H.; Sasaki, Y. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuriteogenesis of neuroblastoma cells., *J. Antibiot.*, **1991**. 44, 113-116.
- [72] Kakeya, H.; Onozawa, C.; Sato, M.; Arai, K.; Osada, H. Neuriteogenic effect of epolactaene derivatives on human neuroblastoma cells which lack high-affinity nerve growth factor receptors., *J. Med. Chem.*, **1997**. 40, 391-394.
- [73] Avramut, M.; Zeevi, A.; Achim, C. L. The immunosuppressant drug FK506 is a potent trophic agent for human fetal neurons., *Brain Res. Dev.*, **2001**. 132, 151-157.
- [74] Borg, J.; Toazara, J.; Hietter, H.; Henry, M.; Schmitt, G.; Luu, B. Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons., *FEBS Lett.*, **1987**. 213, 406-410.
- [75] Keyling-Bilger, F.; Schmitt, G.; Beck, A.; Luu, B. Synthesis of optically active diastereomers of a nonproteic neurotrophic mimetic., *Tetrahedron*, **1996**. 52, 14891-14904.
- [76] Takeuchi, R.; Murase, K.; Furukawa, Y.; Furukawa, S.; Hayashi, K. Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1,4-benzoquinone and its derivatives in cultured mouse astroglial cells., *FEBS Lett.*, **1990**. 261, 63-66.
- [77] Girlanda-Junges, C.; Keyling-Bilger, F.; Schmitt, G.; Luu, B. Effect of cyclohexenonic long chain fatty alcohols on neurite outgrowth. Study on structure-activity relationship., *Tetrahedron*, **1998**. 54, 7735-7748.
- [78] Gonzalez de Aguilar, J. L.; Girlanda-Junges, C.; Coowar, D.; Duportail, G.; Loeffler, J. P.; Luu, B. Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons., *Brain Res.*, **2001**. 920, 65-73.
- [79] Artavanis-Tsakonas, S.; Rand, M. D.; Lake, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development., *Science*, **1999**. 284, 770-776.
- [80] Egan, S. E.; St-Pierre, B.; Leow, C. C. Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions., *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **1998**. 228, 273-324.
- [81] Yoon, K.; Gaiano, N. Notch signalling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants., *Nat. Neurosci.*, **2005**. 8, 709-715.

- [82] Tanigaki, K.; Nogaki, F.; Takahashi, J.; Tashiro, K.; Kurooka, H.; Honjo, T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate., *Neuron*, **2001**. 29, 45-55.
- [83] Le Caignec, C.; Lefevre, M.; Schott, J. J. ; Chaventre, A. ; Gayet, M. ; Calais, C. ; Moisan, J. P. Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first epidermal-growth-factor-like domain of jagged 1., *Am. J. Hum. Genet.*, **2002**. 71, 180-186.
- [84] Aloisi, F. Immune function of microglia., *Glia*, **2001**. 36, 165-179.
- [85] Lasky, J. L. ; Wu, H. Notch signaling, Brain Development, and Human Disease., *Pediatric Res.*, **2005**. 57, 104R-109R.
- [86] Corriveau, R. A. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity., *Neuron*, **1998**. 21, 505-520.
- [87] Uppender, M. B.; Naegele, J. R. Activation of microglia during developmentally regulated cell death in the cerebral cortex., *Dev. Neurosci.*, **1999**. 21, 491-505.
- [88] Hemmer, K.; Fransen, L.; Vanderstichele, H.; Vanmechelen, E.; Heuschling, P. An in vitro model for the study of microglia-induced neurodegeneration: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ ., *Neurochem. Int.*, **2001**. 38, 557-565.
- [89] Mirzoeva S.; Sawkar, A.; Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Discovery of a 3-amino-6-phenyl-pyridazine derivative as a new synthetic antineuroinflammatory compound., *J. Med. Chem.*, **2002**. 45, 563-566.
- [90] Rosen, G. M.; Tsai, P.; Pou, S. Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase., *Chem. Rev.*, **2002**. 102, 1191-1199.
- [91] Linden, D. R.; El-Fakahany, E. E. Microglial derived nitric oxide decreases serotonin content in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells., *Eur. J. Pharmacol.*, **2002**. 436, 53-56.
- [92] Moro, M. A.; Cardenas, A.; Hurtado, O.; Leza, J. C.; Lizasoain, I. Role of nitric acid after brain ischaemia., *Cell Calcium*, **2004**. 36, 265-275.
- [93] Morga, E.; Faber, C.; Heuschling, P. Regional heterogeneity of the astroglial immunoreactive phenotype: effect of lipopolysaccharide., *J. Neurosci. Res.*, **1999**. 57, 941-952.
- [94] Wüllner, U.; Klockgether, T. Inflammation in Parkinson's disease., *J. Neurol.*, **2003**. 250, 35-38.
- [95] Diplock, A. T. Antioxidants and disease prevention., *Food Chem. Tox.*, **1996**. 34, 1013-1023.
- [96] Pocernich, C. B.; La Fontaine, M.; Butterfield, D. A. In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain., *Neurochem. Int.*, **2000**. 36, 185-191.

- [97] Godbout, J. P.; Berg, B. M.; Kelly, K. W.; Johnson, R. W.  $\alpha$ -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain., *J. Neuroim.*, **2004**. 149, 101-109.
- [98] Grimes, J. D. ; Hassan, M. N. ; Thakar, J. H. Prevention of progression of Parkinson's disease with antioxidative therapy., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **1988**. 12, 165-172.
- [99] Rodrigo, R.; Bosco, C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review., *Comp. Biochem. And Physiol.*, **2006**. Part C, 142, 317-327.
- [100] Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents., *Med. Res. Rev.*, **2003**. 23, 519-534.
- [101] Langcake, P.; Pryce, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury., *Physiol. Plant Pathol.*, **1976**. 9, 77-86.
- [102] Richard, J. L. Coronary risk factors. The French paradox., *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, **1987**. 80, 17-21.
- [103] Zhang, L.; Jope, R. S. Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells., *Neurobiol. Aging*, **1999**. 20, 271-278.
- [104] Orallo, F. Comparative Studies of the Antioxidant Effects of *Cis*- and *Trans*-Resveratrol., *Curr. Med. Chem.*, **2006**. 13, 87-98.
- [105] Holvoet, P. Oxidized LDL and coronary heart disease., *Acta Cardiol.*, **2004**. 59, 479-484.
- [106] Manna, S. K.; Mukhopadhyay, A.; Aggarwal, B. B. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription NF- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid peroxidation., *J. Immunol.*, **2000**. 164, 6509-6519.
- [107] Jang, M. Cancer Chemoprotective activity of resveratrol, a natural product derived from grapes., *Science*, **1997**. 275, 218-220.
- [108] Martinez, M. E. Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**. 100, 7859-7864.
- [109] Alarcon de la Lastra, C.; Villegas, I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**. 49, 405-430.
- [110] Marier, J.-F.; Chen, K.; Prince, P.; Scott, G.; del Castillo, J. R. E.; Vachon, P. Production of ex-vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$ ,

- interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependant manner., *The Canadian J. Vet. Res.*, **2005**. 69, 151-154.
- [111] Bi, X. L.; Yang, J. Y.; Dong, Y. X.; Wang, J. M.; Cui, Y. H.; Ikeshima, T.; Zhao, Y. Q.; Wu, C. F. Resveratrol inhibits nitric oxid and TNF- $\alpha$  production by lipopolysaccharide-activated micrghia., *Int. Pharmacol.*, **2005**. 5, 185-193.
- [112] Lu, K. T.; Chiou, R. Y. Y.; Chen, L. G.; Chen, M. H.; Tseng, W. T.; Hsieh, H. T.; Yang, Y. L. Neuroprotective Effects of Resveratrol on Cerebral Ischemia-Induced Neuron Loss Mediated by Free Radical Scavenging and Cerebral Blood Flow Elevation., *J. Agric. Food Chem.*, **2006**. 54, 3126-3131.
- [113] Marambaud, P.; Zhao, H.; Davies, P. Resveratrol promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptides., *J. Biol. Chem.*, **2005**. 280, 37377-37382.
- [114] Baur, J. A.; Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol; the *in vivo* evidence., *Nature*, **2006**. 5, 493-506.
- [115] Coowar, D.; Bouissac, J.; Hanbali, M.; Paschaki, M.; Mohier, E.; Luu, B. Effects of indole fatty alcohols on the differentiation of neural stem cell derived neurospheres., *J. Med. Chem.*, **2004**. 47, 6270-6282.
- [116] Muller, T.; Grandbarbe, L.; Morga, E.; Heuschling, P.; Luu, B. Tocopherol long chain fatty alcohols decrease the production of TNF- $\alpha$  and NO radicals by activated mcrogial cells., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**. 14, 6023-6026.

---

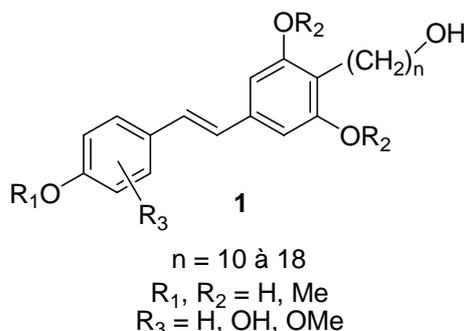
*Chapitre I*

**Synthèse des alcools  
gras resvératroliques  
(RFA)**

---

## I. Introduction

L'objectif de ce travail consiste à synthétiser des alcools gras resvératroliques, les **Resveratrol Fatty Alcohols 1 (RFA)** (schéma 1). Ces composés sont des molécules hybrides contenant le noyau du resvératrol et une longue chaîne  $\omega$ -hydroxylée.



**Schéma 1 : Resveratrol Fatty Alcohols (RFA).**

Des études antérieures ont permis de mettre en évidence que selon la nature du noyau anti-oxydant, l'activité biologique était optimale pour des chaînes variant de 12 à 18 atomes de carbone. Des RFA comportant une chaîne  $\omega$ -hydroxylée de 10, 12, 14, 16 et 18 atomes de carbone ont ainsi été synthétisés afin de déterminer la longueur optimale permettant d'obtenir une activité biologique maximale.

La cible de nos composés est le système nerveux central. Ils doivent donc être assez lipophiles pour pouvoir traverser les différentes barrières biologiques. Ainsi, dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de différentes séries de RFA méthoxylés : les RFA triméthoxylés ( $R_1 = R_2 = \text{Me}$  et  $R_3 = \text{H}$ ) et les RFA tétraméthoxylés ( $R_1 = R_2 = \text{Me}$  et  $R_3 = \text{OMe}$ ).

L'activité anti-oxydante du resvératrol est essentiellement due à la présence des fonctions hydroxyles et plus particulièrement à celle en position *para* (4').<sup>[1]</sup> Cette propriété du resvératrol nous a amenés à envisager la synthèse de RFA ne contenant qu'une ou deux fonctions hydroxyles sur un seul des cycles aromatiques ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{Me}$  et  $R_3 = \text{H}$  ou  $\text{OH}$ ). Ces molécules présenteraient ainsi toujours une lipophilie accrue tout en gardant une capacité anti-oxydante suffisante.

Dans ce chapitre, nous discuterons de la démarche que nous avons adoptée afin de synthétiser ces différents alcools gras resvératroliques. La stratégie de synthèse comportera deux étapes clé, à savoir, d'une part la formation de la double liaison carbone-carbone de configuration *trans* du noyau resvératrol et d'autre part le greffage de la chaîne latérale.

## II. Formation de la double liaison *trans* du resvératrol : Rappels bibliographiques

Afin de synthétiser les RFA, nous nous sommes tout d'abord inspirés des méthodes décrites dans la littérature pour la formation de double liaison carbone-carbone de configuration *trans*. Notre intérêt s'est plus particulièrement tourné vers celles permettant d'obtenir une stéréosélectivité totale ou quasi-totale.

### A. Couplage de Wadsworth-Emmons

Le couplage de Wadsworth-Emmons<sup>[2, 3, 4]</sup> est une des réactions les plus anciennes permettant de former une oléfine de configuration exclusivement *trans*.

Ce couplage est une variante de la réaction de Wittig bien qu'il ne mette pas en jeu un ylure de phosphonium. La réaction de Wadsworth-Emmons est une réaction de condensation entre un phosphonate et un aldéhyde (schéma 2) en milieu basique. Il se forme alors, un alcoolate qui cyclise pour former un oxaphosphétane de configuration *trans*. Finalement, la dissociation de cet hétérocycle conduit à l'oléfine souhaitée et à la formation d'un produit secondaire, l'anion du dialkylester d'acide phosphorique, qui après hydrolyse est soluble dans l'eau.

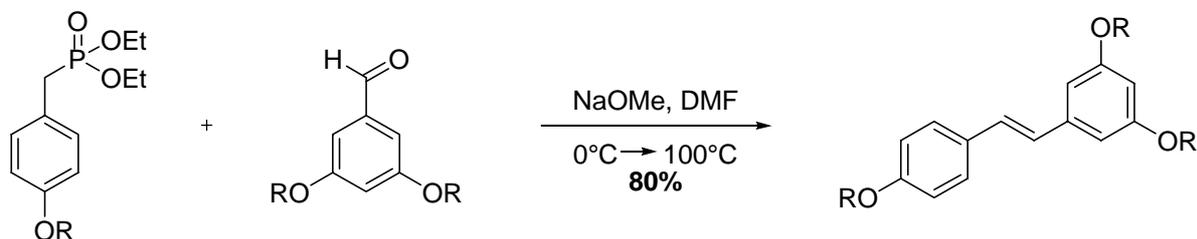


Schéma 2 : Couplage de Wadsworth-Emmons.

La réaction de Wadsworth-Emmons est la réaction la plus rencontrée en ce qui concerne la synthèse du resvératrol et de ses dérivés. Le phosphonate benzylique est généralement généré *in situ* par la réaction d'Arbuzov à partir de l'alcool benzylique correspondant en présence de triéthylphosphite à reflux.

Les conditions classiques de cette réaction utilisent, le méthylate de sodium comme base et le diméthylformamide comme solvant.<sup>[4]</sup> De nombreuses variantes sont décrites dans la littérature, changeant aussi bien la base (NaH<sup>[5]</sup>, tBuOK<sup>[6]</sup>, KOH<sup>[7]</sup>, ...), que le solvant (THF<sup>[5, 6]</sup>, DME<sup>[8]</sup>, ...).

Quel que soit les conditions réactionnelles utilisées, les rendements obtenus sont similaires et très satisfaisants (75 à 85%).

Ce couplage permet une grande souplesse quant à la nature des groupements protecteurs des fonctions hydroxyles (R = Me<sup>[4, 5]</sup>, TBDMS<sup>[9]</sup>, MOM<sup>[10, 11]</sup>, ...).

## B. Condensation lithiatrice

La formation de la double liaison *trans* du noyau des stilbènes peut également être obtenue par la déshydratation d'un alcool généré au cours d'une condensation lithiatrice.<sup>[12]</sup> La réaction de condensation entre l'éther silylé et le 4-méthoxy- ou 3,5-diméthoxybenzaldéhyde en présence de poudre de lithium et de naphthalène, permet de former les alcools correspondants avec des rendements modérés. La déshydratation dans le DMSO à reflux, conduit aux oléfines souhaitées (schéma 3).

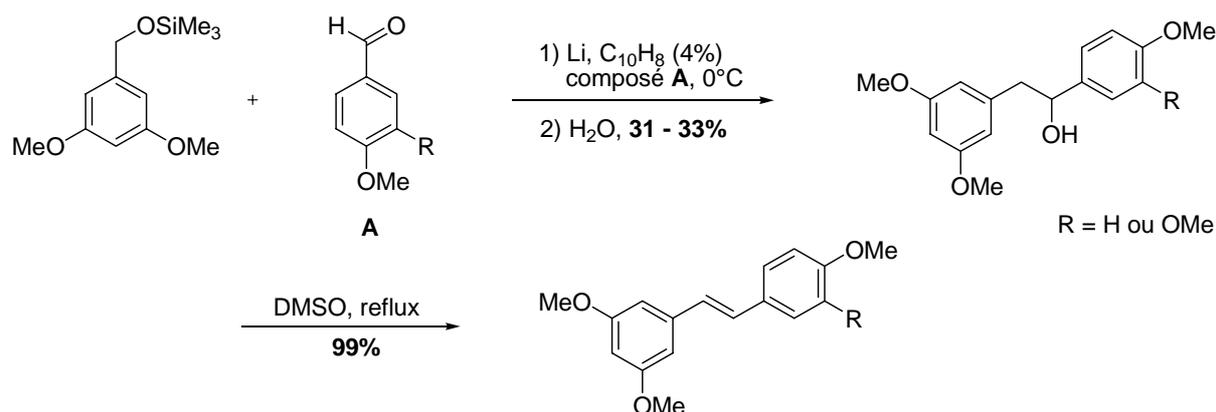


Schéma 3 : Préparation de différents stilbènes.

## C. Couplages au palladium

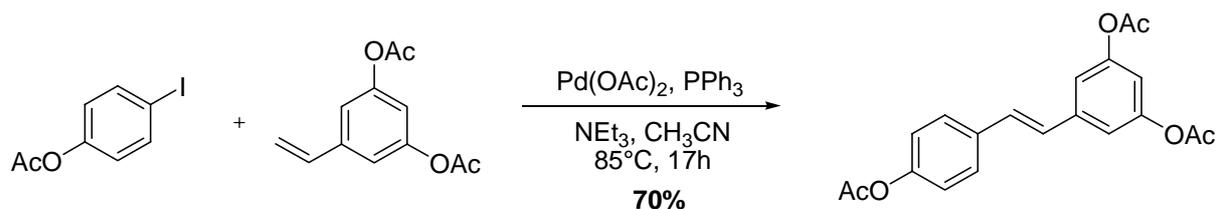
Avec le développement de la chimie organique assistée par les métaux de transition, de nombreuses approches catalytiques ont été envisagées pour la formation des composés de la famille des stilbènes,<sup>[13]</sup> comme le resvératrol.

Les stratégies les plus développées et les plus utilisées, sont celles basées sur la chimie du palladium. Les couplages au palladium principalement rencontrés sont : le couplage de Heck<sup>[14, 15]</sup> et le couplage de Suzuki.<sup>[16]</sup>

### 1. Couplage de Heck

Ces dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées à la formation du noyau du resvératrol au travers de la réaction de Heck.

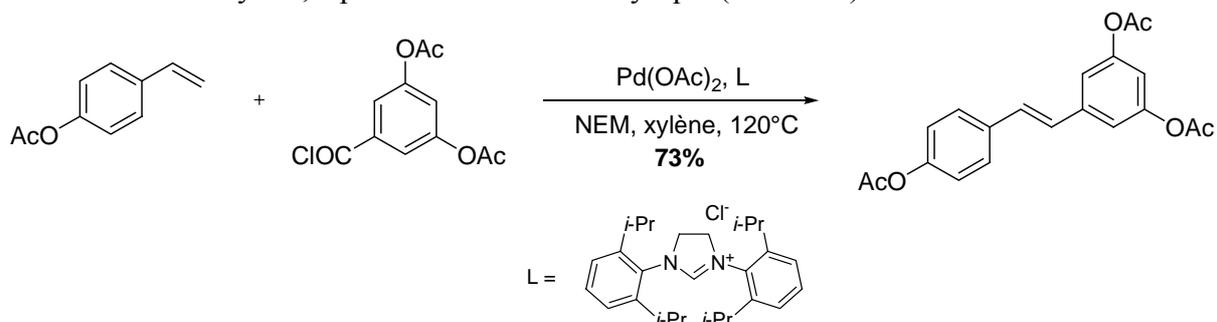
- En 2002, Guiso et al.<sup>[14]</sup> ont développé une nouvelle méthode de synthèse du resvératrol basée sur un couplage de Heck. Il met en jeu un iodure aromatique et un styrène en présence d'acétate de palladium, de triéthylphosphine et de triéthylamine (schéma 4).



**Schéma 4** : Couplage de Heck.

Le produit de couplage est obtenu de façon stéréosélective avec un rendement de 70%. Finalement, une déprotection des groupements acétates en milieu basique permet de générer le resvératrol.

- Plus récemment, Andrus et al.<sup>[17]</sup> ont décrit une synthèse faisant intervenir un couplage de Heck décarbonylant, à partir de l'acide résorcylique (schéma 5).



**Schéma 5** : Couplage de Heck décarbonylant.

Ce couplage a lieu entre un styrène et un chlorure d'acide benzylique. Il est dit décarbonylant car la double liaison carbone-carbone est formée après élimination d'une molécule de monoxyde de carbone.

La base utilisée, la *N*-éthylmorpholine (NEM), est une amine non-coordinante. Ainsi, la coordination de l'amine au palladium ne peut se faire, ce qui favorise l'élimination de monoxyde de carbone nécessaire à la formation du stilbène.

L'avantage de cette méthode réside dans la nature des réactifs utilisés. Le styrène est commercial. Quant au chlorure d'acide, il est obtenu en deux étapes à partir de l'acide résorcylique peu coûteux.

## 2. Couplage de Suzuki

La combretastatine A-4, stilbène d'origine naturelle, existe sous deux formes, les isomères *cis* et *trans*. Elle entraîne la mort des cellules tumorales par nécrose hémorragique et représente un outil prometteur dans le traitement des cancers.

Aussi, la synthèse de ces deux isomères est largement décrite dans la littérature.<sup>[16, 18, 19]</sup> L'obtention de l'isomère *trans* par une réaction de Suzuki a été décrite par Gaukroger et al.<sup>[16]</sup> (schéma 6).

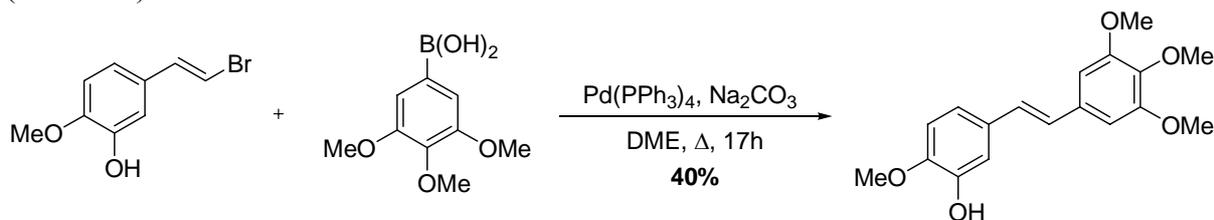


Schéma 6 : Couplage de Suzuki.

Le couplage entre le bromure vinylique et l'acide boronique se fait en présence de Pd(0), de carbonate de sodium et de diméthoxyéthane à reflux. Cette méthode ne permet d'obtenir ce stilbène qu'avec un rendement moyen de 40%.

## D. Métathèse croisée

La chimie du ruthénium s'est avérée être un outil puissant pour la formation de doubles liaisons carbone-carbone.<sup>[20, 21]</sup> La métathèse croisée représente ainsi un accès simple aux stilbénoides (schéma 7).

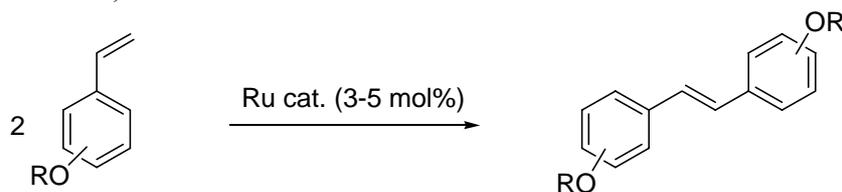
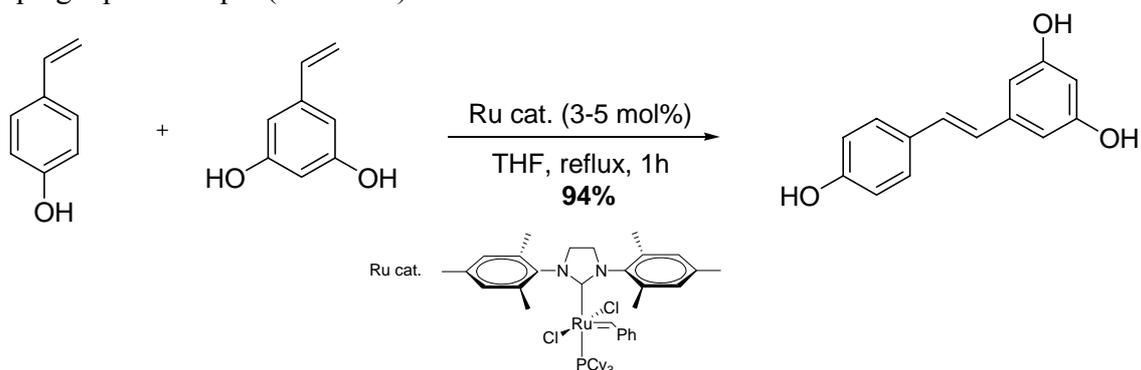


Schéma 7 : Métathèse croisée.

La synthèse de stilbènes comme le resvératrol ou le piceannol nécessite l'utilisation de deux styrènes différents. Or, au cours d'une réaction de métathèse mettant en jeu deux styrènes différents, la formation de trois composés est observée. Deux produits issus des homocouplages respectifs et un produit de couplage entre les deux styrènes.

Noels et al.<sup>[22]</sup> ont décrit une synthèse permettant d'obtenir le resvératrol comme produit de couplage quasi unique (schéma 8).



**Schéma 8** : Formation du resvératrol par métathèse croisée.

Le resvératrol représente 95% de la conversion alors qu'un seul produit d'homocouplage, le (*E*)-3,3',5,5'-tétrahydroxystilbène, se forme (5%). Cette sélectivité a pu être obtenue en utilisant dix équivalents de *p*-hydroxystyrène pour un équivalent de 3,5-dihydroxystyrène. Cette réaction est très intéressante dans la mesure où elle peut se faire en présence de fonctions hydroxyles libres.

### III. Couplage d'une chaîne carbonée sur un noyau aromatique : Rappels bibliographiques

Le but de ce travail consiste à synthétiser des dérivés du resvératrol comportant une longue chaîne  $\omega$ -hydroxylée. Nous allons donc décrire brièvement les outils dont nous disposons, afin de greffer cette chaîne latérale.

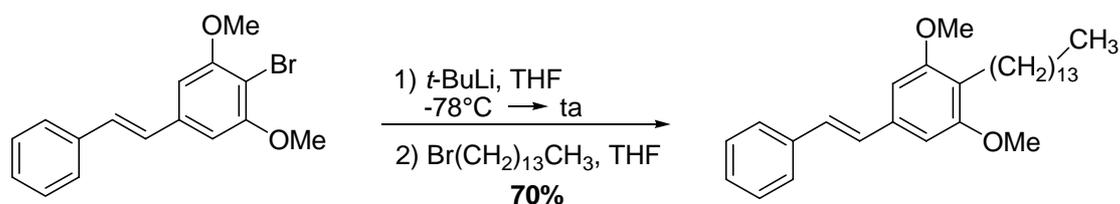
#### A. Alkylations de dérivés du resvératrol

Dans la littérature, peu de synthèses de dérivés du resvératrol portant une chaîne latérale carbonée sont décrites. Les rares exemples<sup>[15]</sup> décrivent la synthèse de stilbènes naturels. Leurs synthèses font essentiellement appel à l'addition d'un halogénure d'alkyle sur un aromatique fonctionnalisé par un métal.

## 1. Addition d'halogénures d'alkyles

- *Echange halogène-métal*

L'échange halogène-métal par une base lithiée suivi de l'addition d'un halogénure d'alkyle est une des méthodes les plus anciennes permettant de former une liaison carbone-carbone.<sup>[15]</sup>



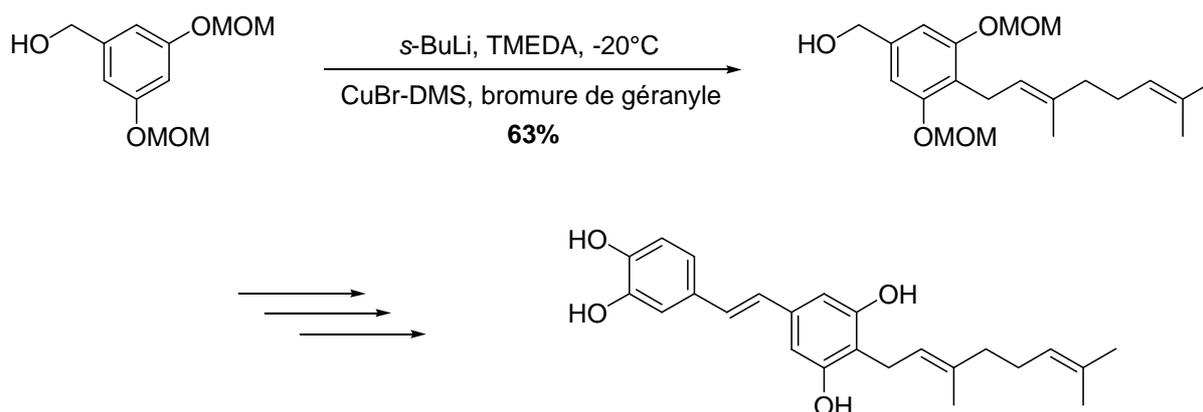
**Schéma 9** : Alkylation d'un dérivé du resvératrol bromé.

L'alkylation de ce dérivé du resvératrol se fait avec un rendement correct de 70% (schéma 9). Cette méthode est très efficace pour des halogénures d'alkyles non substitués, comme dans notre exemple.

- *Ortho métallation*

Récemment, une nouvelle voie de synthèse de la pawhuskine C, un stilbène naturel portant une chaîne géranyle, a été décrite.<sup>[23]</sup>

Cette synthèse repose sur une réaction d'*ortho*-métallation suivie de la formation d'un cuprate (schéma 10).



**Schéma 10** : Formation de la pawhuskine C.

Le greffage de la chaîne géranyle s'effectue avec un rendement correct de 63%.

## 2. Friedel-Crafts

Le groupement isopropyle est greffé sur le cycle aromatique par une réaction de type Friedel-Crafts en présence de trichlorure d'aluminium et de bromure d'isopropyle (schéma 11).<sup>[5]</sup>

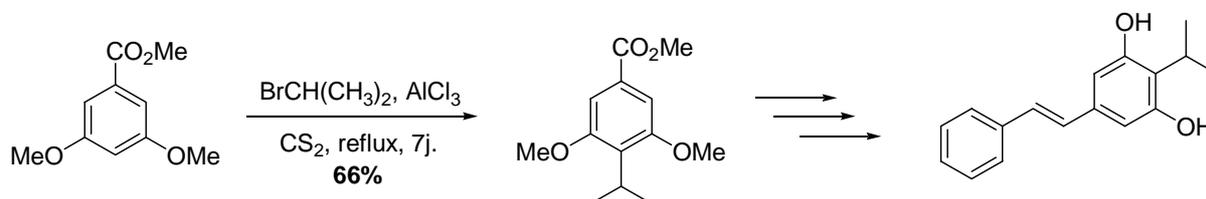


Schéma 11 : Réaction de type Friedel-Crafts.

Malgré un temps de réaction très long (7 jours), le produit de couplage souhaité n'est obtenu qu'avec un rendement de 66%.

## B. Réaction de Wittig

Au laboratoire, des travaux concernant la synthèse de dérivés de l' $\alpha$ -tocophérol comportant une chaîne  $\omega$ -hydroxylée, les TFA, ont été effectués (schéma 12).<sup>[24]</sup> Le couplage, entre le noyau chromane de l' $\alpha$ -tocophérol et la chaîne  $\omega$ -hydroxylée, a été réalisé par une réaction de Wittig. Cette réaction est largement décrite dans la littérature pour la synthèse des différents tocophérols.<sup>[25]</sup>

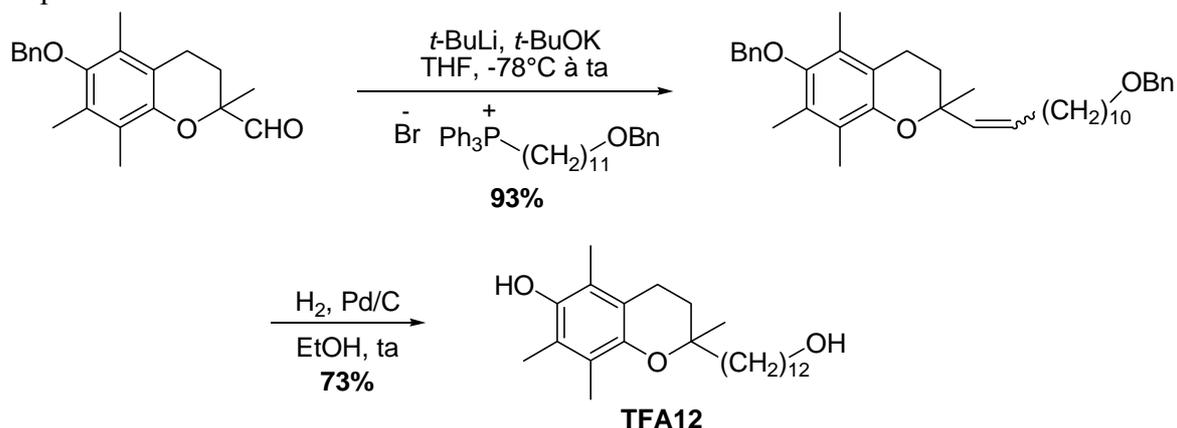


Schéma 12 : Synthèse du TFA12.

La réaction de Wittig effectuée dans les conditions de Schlosser permet de greffer le sel de phosphonium à l'aldéhyde. Le couplage s'effectue avec un rendement de 93%. L'hydrogénation catalytique sur Pd/C permet d'obtenir le TFA12.

## C. Utilisation de la chimie du palladium

Dans la littérature, le couplage entre différents groupements alkyles et des aromatiques méthoxylés et polyméthoxylés *via* la chimie des métaux de transition, et plus particulièrement la chimie du palladium, est largement représentée. Les couplages au palladium les plus classiques tels que les couplages de Heck, Sonogashira et Suzuki sont les plus rencontrés.

### 1. Couplage de Heck

Yadav et al.<sup>[26]</sup> ont décrit une synthèse de dérivés quinoliques portant des chaînes  $\omega$ -hydroxylées (schéma 13).

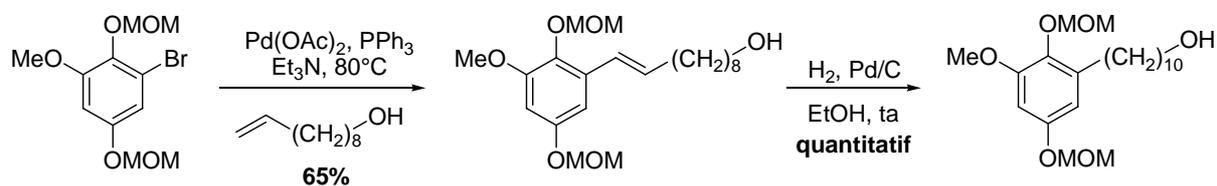


Schéma 13 : Couplage de Heck.

Le couplage entre le bromure d'aryle et l'alcène terminal s'effectue en présence de palladium (II) avec un rendement satisfaisant de 65%. La chaîne  $\omega$ -alcanol est obtenue après simple hydrogénation catalytique.

### 2. Couplage de Suzuki

- La  $\beta$ -alkylation de Suzuki-Miyaura permet de coupler un alkyle borane sur un halogénure aromatique.

Fürstner et Konetzki<sup>[27]</sup> ont décrit la synthèse totale de la caloporoside, métabolite naturel aux activités antimicrobiennes et antifongiques. Ce composé contient une longue chaîne alkyle, greffée par une réaction de Suzuki-Miyaura (schéma 14).

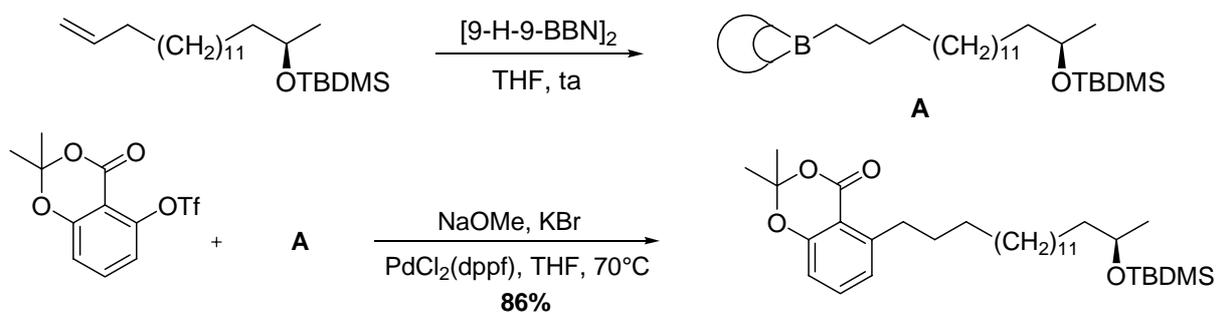
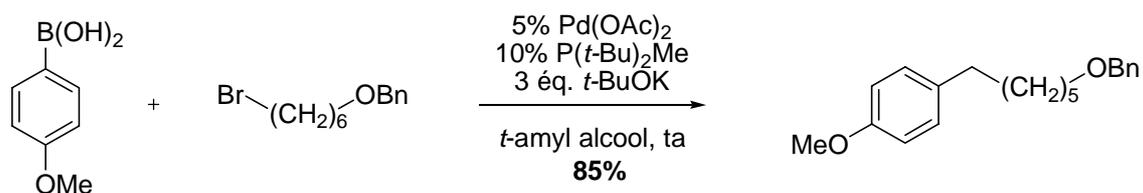


Schéma 14 : Couplage de Suzuki-Miyaura.

Le borane **A**, obtenu par hydroboration à l'aide du dimère 9-H-9-BBN, réagit avec le méthalonate de sodium pour donner un complexe de borate, stabilisé par le bromure de potassium. Le complexe ainsi formé, va réagir avec le triflate en présence de palladium (0) pour aboutir au produit de couplage avec un rendement de 86%.

- Récemment, Fu et coll.<sup>[28]</sup> ont démontré l'efficacité d'un couplage de Suzuki entre des acides arylboroniques et des bromures d'alkyles en présence de Pd(II) et de diverses phosphines (schéma 15). Avant ces travaux, les couplages d'acides boroniques sur des halogénures ou des triflates portés par un carbone  $sp^3$  étaient rares.



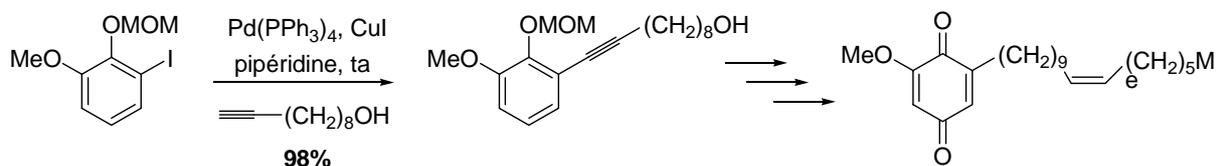
**Schéma 15** : Couplage de Suzuki sur des bromures d'alkyles.

Les rendements de la réaction sont dépendants de la quantité et de la nature de la phosphine.

### 3. Couplage de Sonogashira

La réaction de Sonogashira est le couplage le plus utilisé pour greffer une chaîne alkyle, sous forme d'alcyne vrai, sur des halogénures aromatiques méthoxylés ou polyméthoxylés.

- Hadfield et al.<sup>[29]</sup> ont décrit une synthèse de l'irisquinone, substance naturelle ayant des activités anti-tumorales, dont une des étapes clé, est un couplage de Sonogashira (schéma 16).



**Schéma 16** : Couplage de Sonogashira.

Les conditions réactionnelles utilisées sont celles décrites par Alami.<sup>[30]</sup> Elles permettent d'obtenir le produit de couplage avec un rendement quasi quantitatif de 98%.

• Brimble et al.<sup>[31]</sup> ont décrit la synthèse d'aryldihydropyranes basée en partie, sur un couplage de Sonogashira (schéma 17).

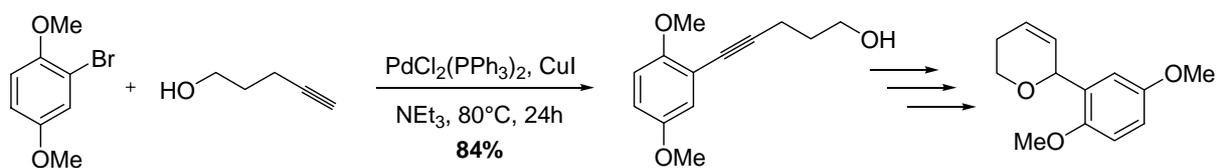


Schéma 17 : Couplage de Sonogashira.

Le couplage entre le bromure aromatique et l'alcyne vrai ω-hydroxylée s'effectue dans les conditions classiques, à savoir l'utilisation de PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et de CuI permettant de générer du Pd(0) et de triéthylamine comme solvant et réactif. Le produit de couplage désiré est formé avec un rendement satisfaisant de 84%.

Le couplage de Stille a été volontairement omis de par la forte toxicité des dérivés stanniques utilisés dans ce couplage.

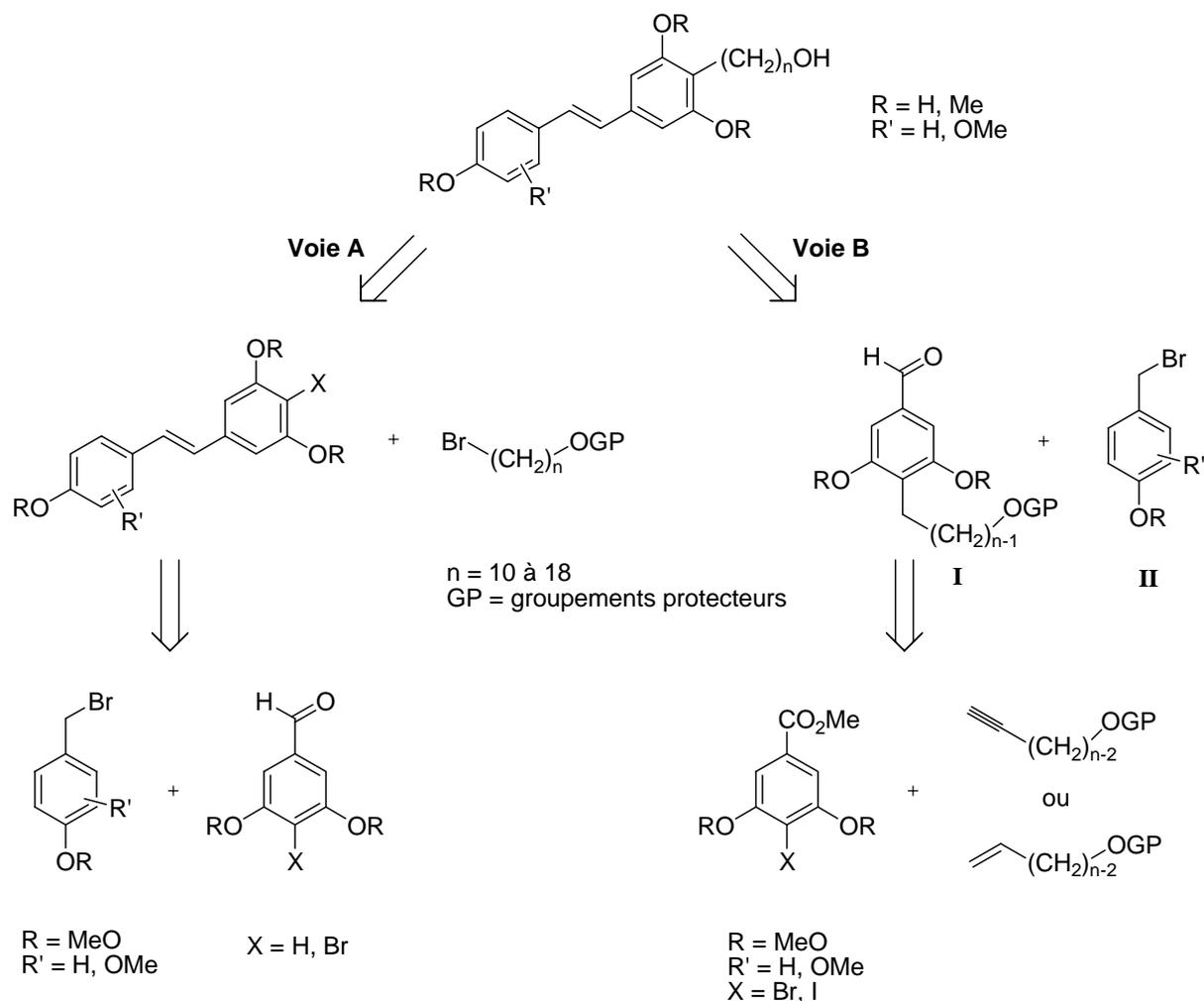
#### IV. Voie de synthèse choisie

La synthèse des différents RFA doit se faire par une méthode simple, efficace, reproductible et, à plus long terme, applicable à grande échelle.

D'un point de vue rétrosynthétique, deux voies de synthèse s'offrent à nous afin de former les différents alcools gras resvératroliques, les RFA (schéma 18).

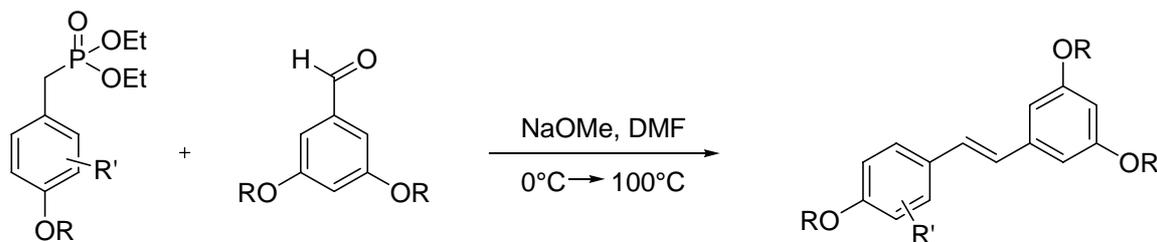
• La **voie A** consiste à former dans un premier temps la double liaison carbone-carbone du noyau du resvératrol par la réaction de Wadsworth-Emmons et dans un second temps, le greffage de la chaîne ω-hydroxylée.

• La **voie B** à l'inverse, consiste à greffer d'abord la chaîne latérale puis à former la double liaison carbone-carbone pour aboutir au noyau du resvératrol.



**Schéma 18** : Rétrosynthèses envisagées des RFA.

• Afin de former la double liaison carbone-carbone *trans* du noyau du resvératrol, notre choix s'est porté sur l'utilisation du couplage de Wadsworth-Emmons (schéma 19). Cette réaction est largement décrite dans la littérature pour la formation des stilbènes.<sup>[3-8]</sup> Par ailleurs, elle est applicable à un grand nombre de substituants, nous permettant ainsi d'obtenir différentes séries de composés.



**Schéma 19** : Couplage de Wadsworth-Emmons.

## A. La voie de synthèse A

Dans cette voie de synthèse, l'utilisation d'une méthode de couplage permettant de greffer la chaîne directement sous forme alkyle est impérative. En effet, étant donné que la double liaison du stilbène sera déjà formée, des réactions faisant intervenir la chaîne latérale sous forme d'alcène ou d'alcyne sont à proscrire. Les réactions de Wittig, de Heck ou encore de Sonogashira sont donc inutilisables.

Nous pouvons donc envisager de coupler la chaîne par alkylation directe d'un halogénure d'alkyle  $\omega$ -hydroxylé sur un aromatique soit par échange halogène-métal, soit par *ortho*-métallation, mais également par un couplage de Suzuki-Miyaura.

### 1. Echange halogène-métal / *Ortho*-métallation

Cette réaction est uniquement décrite dans la littérature<sup>[5]</sup> pour des halogénures d'alkyles non hydroxylés (schéma 20).

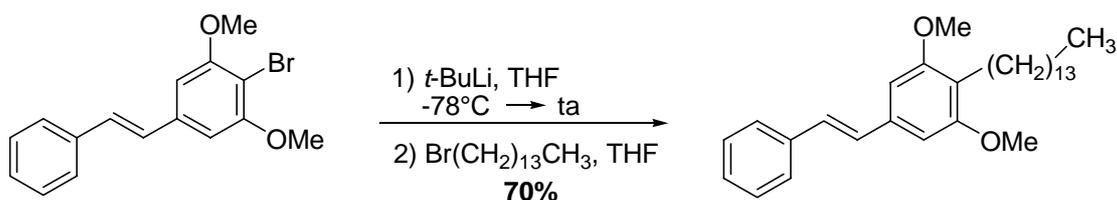


Schéma 20 : Alkylation par un échange halogène-métal.

Au laboratoire, de nombreux travaux ont permis de montrer que ce couplage, entre différents halogénures aromatiques et différents bromoalcools protégés, ne permettait de former les produits de couplage qu'avec de très faibles rendements.

Les mêmes résultats ont été observés dans le cas d'une *ortho*-métallation<sup>[32]</sup> (schéma 21).

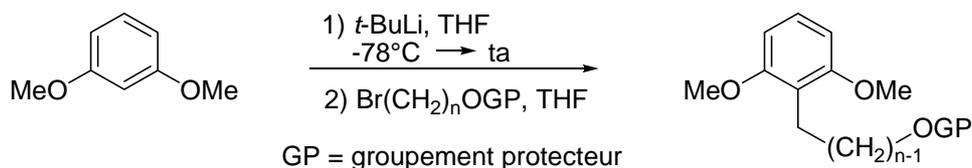
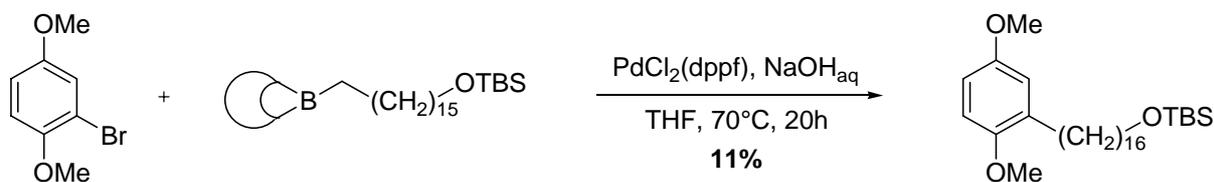


Schéma 21 : Alkylation par *ortho*-métallation.

## 2. Couplage de Suzuki

Des essais ont été effectués au laboratoire en ce qui concerne la réaction de Suzuki, entre un bromure d'alkyle et un acide boronique aromatique, décrite par Fu.<sup>[28]</sup> Les résultats obtenus sont très décevants, puisque aucun produit de couplage n'a été observé. Le seul produit formé est le phénol du bromure correspondant.

Nous avons donc envisagé un couplage de Suzuki-Miyaura.<sup>[33]</sup> Une réaction test entre le 2-bromo-1,4-diméthoxybenzène et le (16-(9-bora-bicyclo[3.3.1]nonan-9-yl)hexadécyloxy)(*tert*-butyl)diméthylsilyle n'a pas donné les résultats escomptés (schéma 22).



**Schéma 22** : Couplage de Suzuki-Miyaura.

Le greffage d'une chaîne  $\omega$ -hydroxylée sur un aromatique sous forme d'halogénure d'alkyle s'est avéré inefficace. Aussi, nous avons abandonné la **voie A** pour synthétiser les différents alcools gras resvératroliques.

Notre stratégie de synthèse va donc s'articuler autour de la **voie B**.

Cette dernière semble en outre plus intéressante dans la mesure où elle va nous permettre de réaliser une synthèse convergente. En effet, les différentes longueurs de chaîne seront greffées au premier cycle aromatique pour former le chaînon **I**. Finalement, ce dernier sera couplé au chaînon **II** diversement substitué pour former les différents RFA souhaités (schéma 18).

### B. La voie de synthèse B

Comme décrit précédemment dans les rappels bibliographiques, les couplages de Heck<sup>[26]</sup> et de Sonogashira<sup>[31]</sup> permettent également de greffer une chaîne carbonée plus ou moins longue sur un cycle aromatique.

Cette chaîne est couplée respectivement, sous forme d'alcyne vrai et sous forme d'alcène terminal dans les réactions de Sonogashira et de Heck sur un halogénure aromatique (schéma 23). Une simple hydrogénation catalytique permettra d'obtenir le produit de couplage saturé.

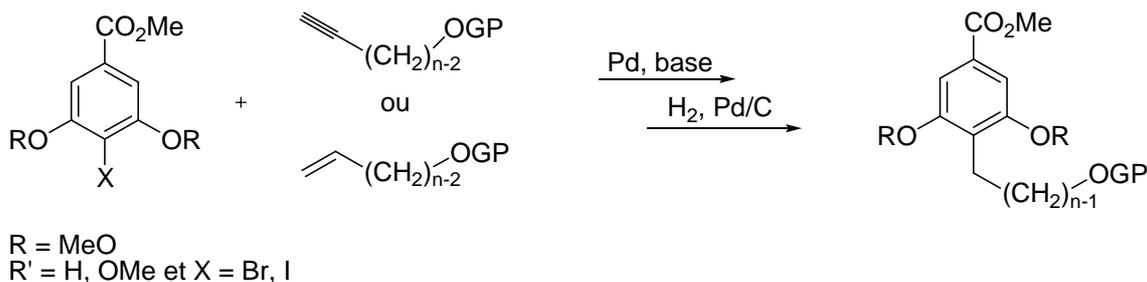


Schéma 23 : Couplage de Sonogashira ou de Heck.

D'un point de vue synthétique, l'alcyne terminal est obtenu plus facilement et plus rapidement que l'alcène. Aussi, nous nous sommes orientés vers le couplage de Sonogashira.

### Couplage de Sonogashira

En premier lieu, nous avons testé les conditions réactionnelles décrites par Alami,<sup>[30]</sup> à savoir l'utilisation de Pd(0) et de CuI en quantités catalytiques dans la pipéridine. Elles permettent le couplage entre un alcyne vrai  $\omega$ -hydroxylé et un iodure aromatique méthoxylé avec un rendement quasi quantitatif.<sup>[30]</sup>

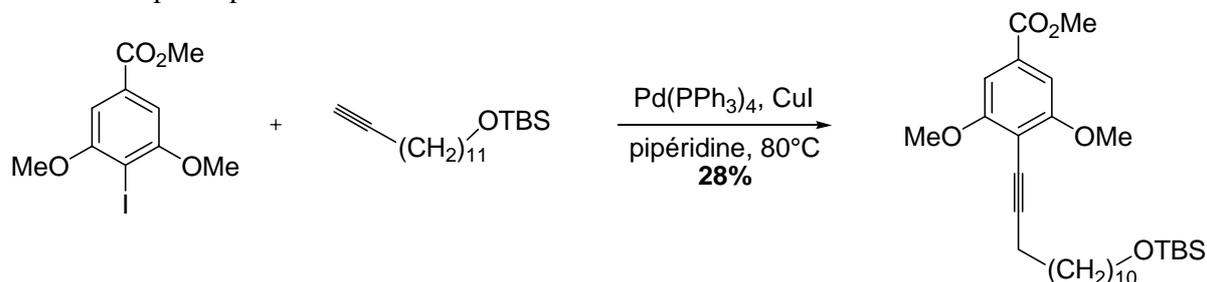


Schéma 24 : Couplage de Sonogashira dans les conditions d'Alami.

Dans notre cas, le produit de couplage a été obtenu avec un rendement de 28%, largement inférieur à celui décrit dans la littérature (schéma 24).

Alami et coll.<sup>[30]</sup> ont également démontré que dans certains cas, la présence de CuI n'était pas nécessaire. Aussi, nous avons réitéré le même couplage, mais en absence de CuI. A nouveau, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants (schéma 25).

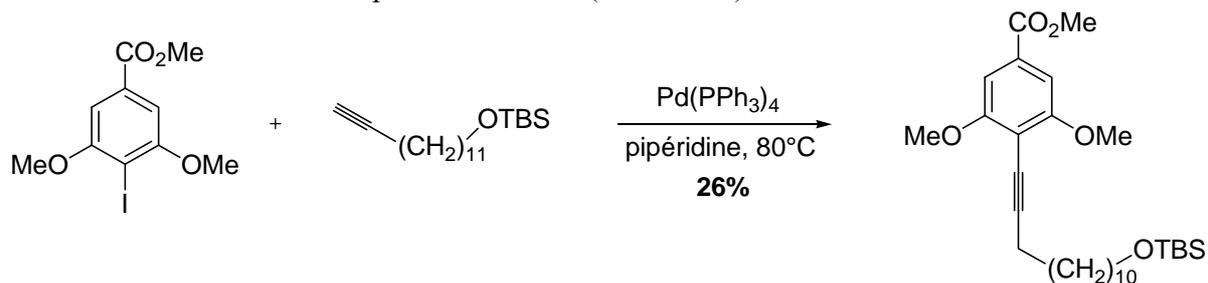


Schéma 25 : Couplage de Sonogashira sans CuI.

Nous avons donc envisagé la réaction de Sonogashira dans les conditions classiques<sup>[34]</sup>, à savoir l'utilisation de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$  et de  $\text{CuI}$  comme source de  $\text{Pd}(0)$ , et de triéthylamine comme solvant et réactif (schéma 26).

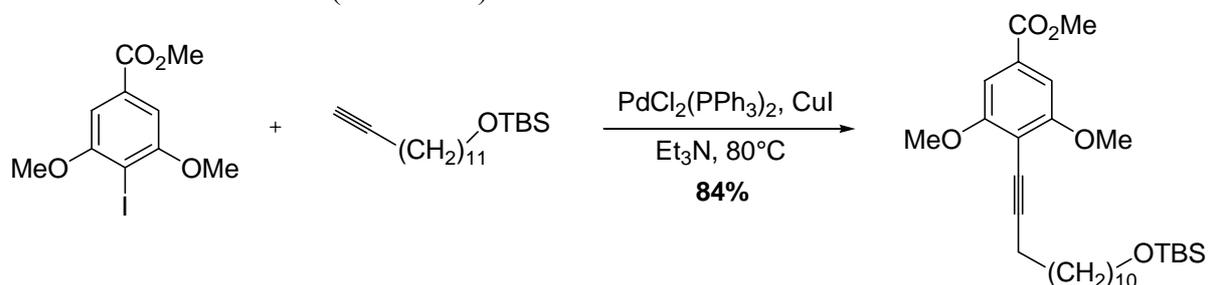


Schéma 26 : Couplage de Sonogashira dans les conditions classiques.

Dans ce cas, la réaction est très efficace puisque nous obtenons le produit de couplage avec un rendement de 84%. Ce sont donc ces conditions réactionnelles que nous avons retenues.

### C. Récapitulatif

Afin de synthétiser les différents RFA, nous avons suivi le schéma rétrosynthétique ci-dessous (schéma 27).

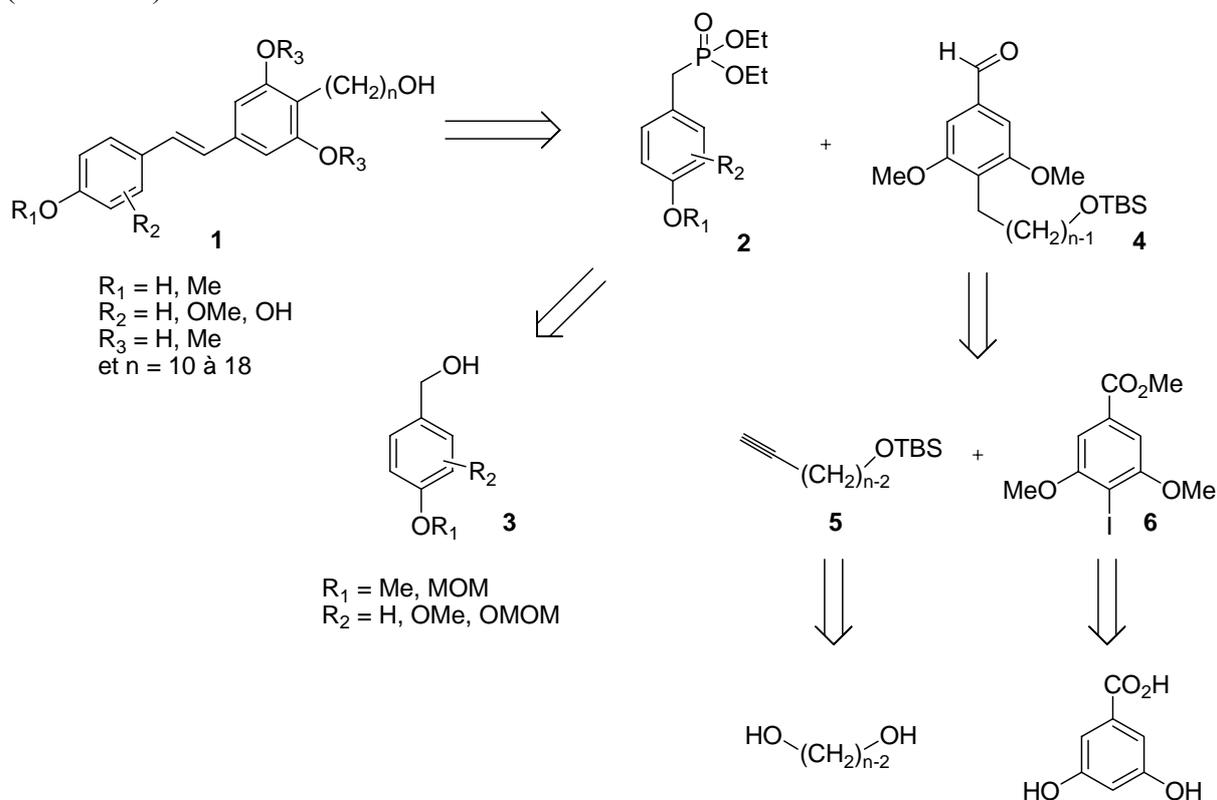


Schéma 27 : Rétrosynthèse des RFA.

Cette synthèse repose principalement sur deux étapes clé, un couplage de Wadsworth-Emmons permettant de former la double liaison carbone-carbone de configuration *trans* du noyau du resvératrol et un couplage de Sonogashira permettant de greffer la chaîne latérale.

Le couplage de Wadsworth-Emmons s'effectue entre des phosphonates **2** diversement substitués, provenant des alcools benzyliques **3** correspondants, et des aldéhydes portant différentes longueurs de chaîne **4**. Ces derniers sont obtenus par couplage de Sonogashira entre l'iodure aromatique **6**, issu de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque commercial et des différents alcynes vrais silylés **5**. Les alcynes sont formés à partir des diols correspondants.

La protection de la fonction  $\omega$ -hydroxyle de la chaîne est nécessaire au bon déroulement de la synthèse. Le choix du groupement protecteur, le *tert*-butyl-diméthylsilyle, est compatible avec les différentes étapes de cette synthèse dans la mesure où il est stable aux différentes conditions utilisées.

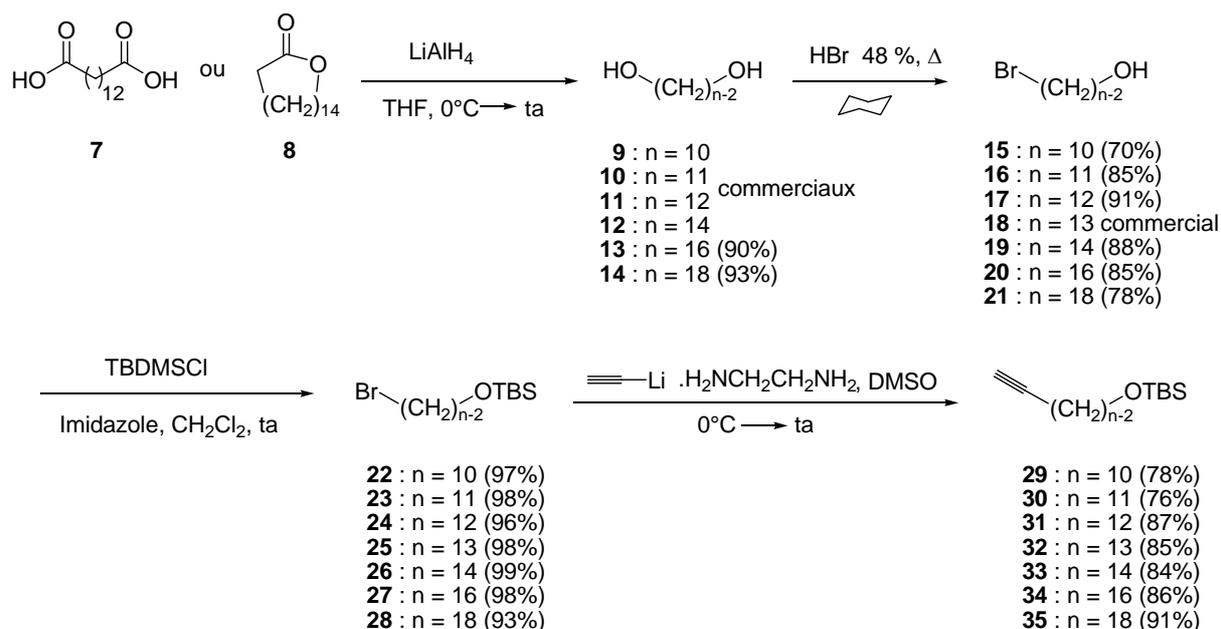
## V. Synthèse des différents RFA

Comme décrit précédemment, la première étape clé de cette synthèse est un couplage de Sonogashira, permettant de greffer la chaîne  $\omega$ -alcanol, sous forme d'alcyne, au premier cycle aromatique.

### A. Greffage de la chaîne latérale : Couplage de Sonogashira

#### 1. Synthèse des alcynes vrais *O*-silylés

Afin de synthétiser les différentes longueurs de chaînes nécessaires au couplage de Sonogashira, nous avons suivi le schéma réactionnel suivant (schéma 28) :

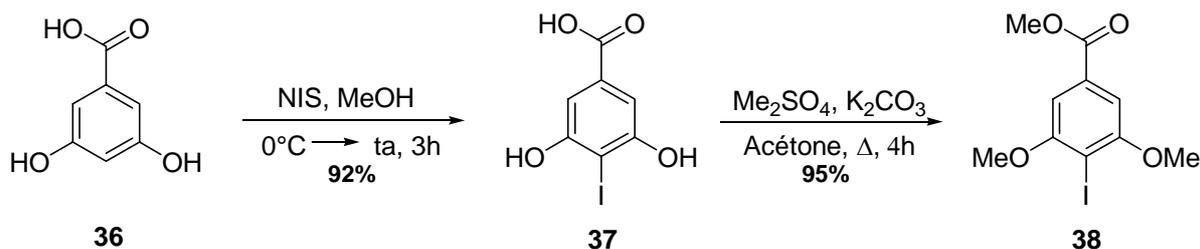


**Schéma 28** : Synthèse des alcynes vrais *O*-silylés.

Après réduction du diacide **7** ou de la lactone **8** à l'aide de l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium, on obtient les diols correspondants **13** et **14** correspondants aux longueurs de chaîne n=16 et 18. Pour les autres longueurs de chaîne, les diols ou bromoalcools sont commerciaux. La réaction de monobromation est réalisée dans un mélange hétérogène d'acide bromhydrique et de cyclohexane afin d'obtenir les bromoalcools (**15** à **21**). La fonction hydroxyle de ces derniers est protégée par le groupement *tert*-butyl-diméthylsilyle pour former les bromoalcools silylés correspondants **22** à **28**, qui par réaction avec le complexe d'acétylure de lithium<sup>[35]</sup> permettent d'obtenir les alcynes vrais souhaités **29** à **35** avec des rendements globaux satisfaisants.

## 2. Synthèse de l'iodure aromatique

L'iodure aromatique **38**, le 4-iodo-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle, nécessaire au couplage de Sonogashira, est obtenu en deux étapes avec un rendement très satisfaisant de 87% (schéma 29).



**Schéma 29** : Synthèse de l'iodure aromatique.

L'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **36** est iodé à l'aide de *N*-iodosuccinimide<sup>[36]</sup> dans le méthanol pour former le composé **37**. Finalement, une méthylation<sup>[37]</sup> en présence de diméthylsulfate et de carbonate de potassium permet d'obtenir l'iodure aromatique **38** souhaité.

### 3. Couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira entre l'iodure **38** et les différents alcynes vrais *O*-silylés **29** à **35** s'effectue dans les conditions classiques, à savoir en présence de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  et de  $\text{CuI}$  permettant de générer le  $\text{Pd}(0)$  et de la triéthylamine comme solvant et réactif (schéma 30).<sup>[34]</sup>

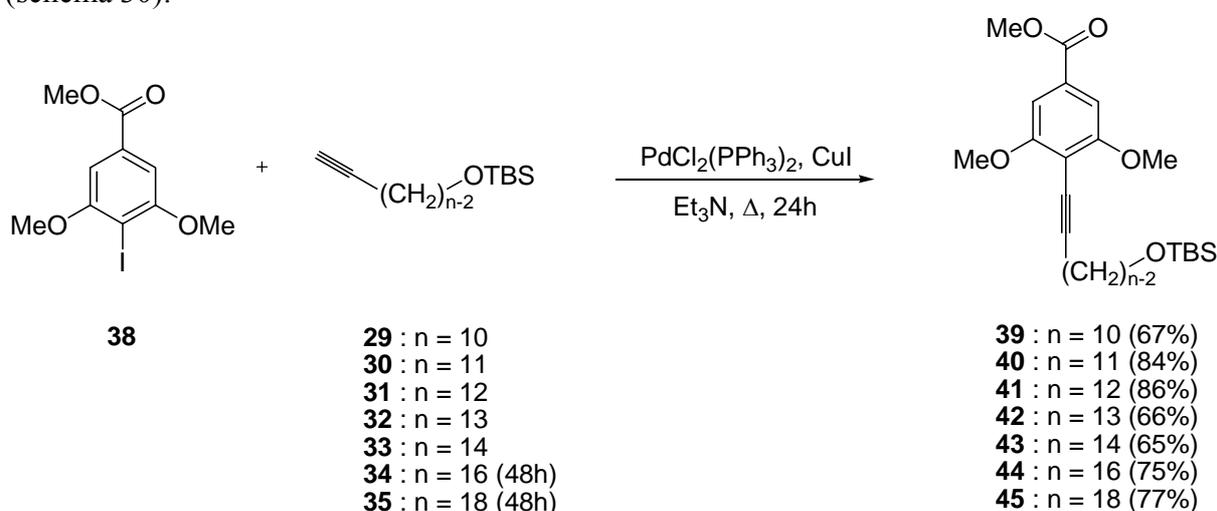


Schéma 30 : Couplage de Sonogashira.

Les différents produits de couplage (**39** à **45**) sont obtenus avec des rendements très corrects (65-86%). Nous pouvons remarquer que le temps de réaction est fonction de la longueur de la chaîne. En effet, le temps de réaction passe de 24 à 48 heures pour les chaînes à 16 et 18 atomes de carbone, sans perte de rendement.

A partir de ces différents produits de couplage, les aldéhydes correspondants, nécessaires au couplage de Wadsworth-Emmons, vont être synthétisés.

## B. Formation du noyau du resvératrol : Couplage de Wadsworth-Emmons

La réaction de Wadsworth-Emmons va nous permettre de former plusieurs séries de RFA diversement substitués.

### 1. Synthèse des aldéhydes

Les aldéhydes portant différentes longueurs de chaîne sont obtenus en quatre étapes à partir des produits de couplage issus de la réaction de Sonogashira (schéma 31).

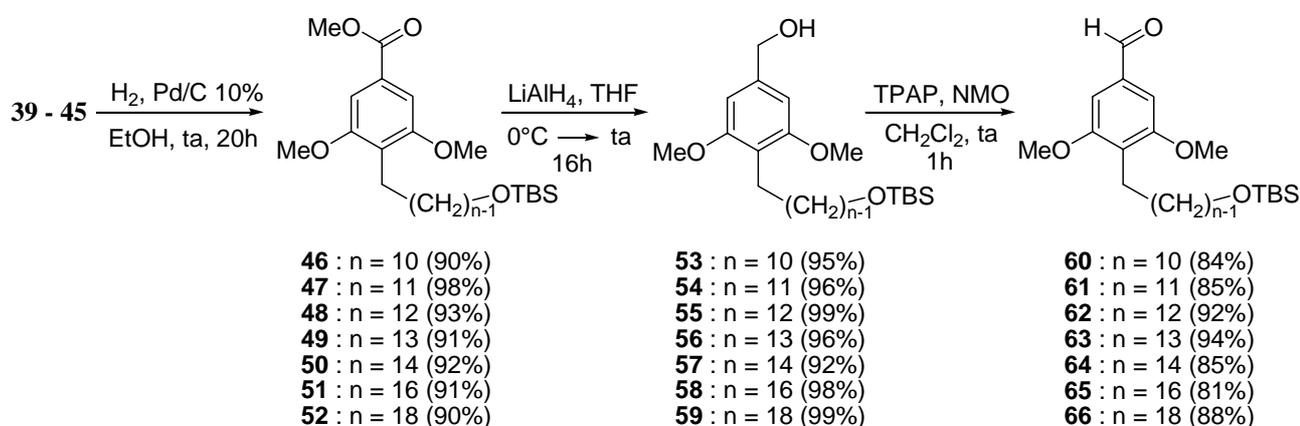


Schéma 31 : Formation des différents aldéhydes.

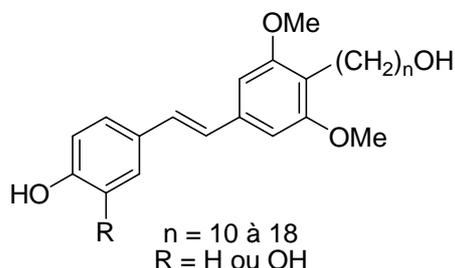
Les composés **39** à **45** sont dans un premier temps soumis à une hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon 10%. Les produits ainsi formés sont réduits à l'aide de l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium pour former les alcools benzyliques correspondants **53** à **59** de façon quasi quantitative. Pour finir, une oxydation de Ley<sup>[38]</sup> permet d'aboutir aux différents aldéhydes souhaités **60** à **66** avec des rendements variants de 71 à 85% sur quatre étapes.

### 2. Synthèse des différents phosphonates

Des phosphonates diversement substitués ont été synthétisés afin d'obtenir plusieurs séries de RFA.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de phosphonates méthoxylés et polyméthoxylés. Les RFA formés à partir de ces derniers seront, soit testés biologiquement sous forme méthoxylée, soit entièrement déprotégés puis testés.

Dans un second temps, nous avons entrepris la synthèse de phosphonates substitués par d'autres groupements protecteurs, afin d'aboutir à des RFA méthoxylés sur un cycle et hydroxylés sur l'autre après déprotection (schéma 32).

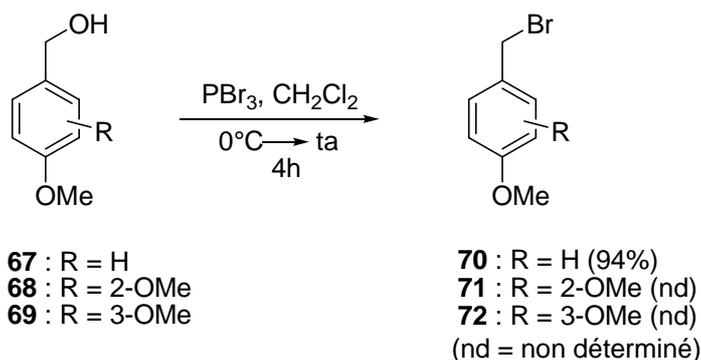


**Schéma 32** : RFA hydroxylé(s) et méthoxylé(s).

## 2.1 Phosphonates mono- et diméthoxylés

### 2.1.1 A partir du bromure benzylique

En premier lieu, les phosphonates mono- et diméthoxylés ont été formés *in situ*, au cours de la réaction de Wadsworth-Emmons, à partir des bromures benzyliques correspondants dans le triéthylphosphite à reflux. Ces derniers sont obtenus par réaction du tribromure de phosphore<sup>[4]</sup> sur les alcools benzyliques correspondants commerciaux en solution dans le dichlorométhane (schéma 33).

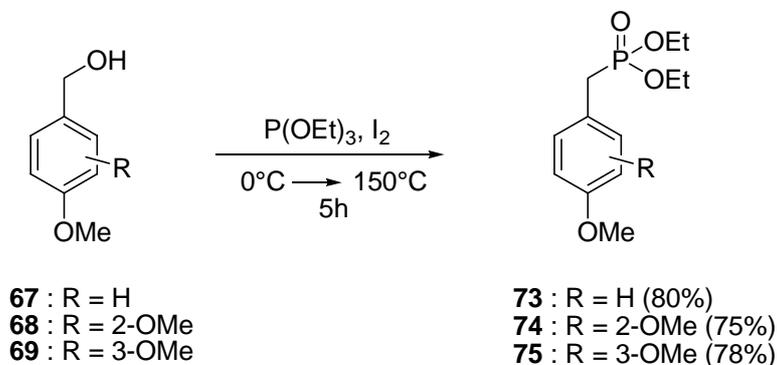


**Schéma 33** : Formation des bromures benzyliques mono- et diméthoxylés.

Le bromure 4-méthoxybenzylique **70** est obtenu avec un rendement très satisfaisant de 94%. Les bromures 2,4-diméthoxybenzylique **71** et 3,4-diméthoxybenzylique **72** n'ont pas pu être isolés dans la mesure où ils sont très réactifs et par conséquent, rapidement dégradés. Aussi, nous avons envisagé une nouvelle stratégie de synthèse.

### 2.1.2 A partir de l'alcool benzylique en une étape

Cette nouvelle stratégie consiste à former les différents phosphonates mono- et diméthoxylés, en une seule étape, toujours à partir des alcools benzyliques correspondants (schéma 34).<sup>[39]</sup>

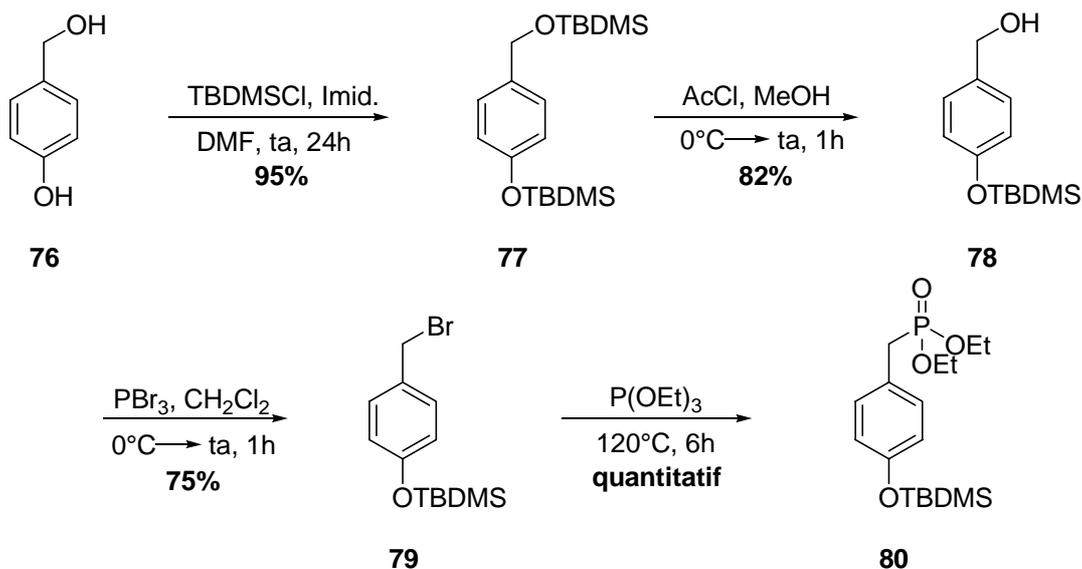


**Schéma 34** : Formation des phosphonates méthoxylés en une étape.

Les alcools benzyliques méthoxylés **67** à **69** sont mis en présence d'iode et de triéthylphosphite à 150°C pour former les phosphonates souhaités (**73** à **75**) avec des rendements avoisinants les 80%.

### 2.2 Phosphonates silylés

Le phosphonate silylé **80** est obtenu en quatre étapes à partir de l'alcool 4-hydroxybenzylique commercial **76** (schéma 35).



**Schéma 35** : Formation du phosphonate silylé.

L'alcool 4-hydroxybenzylique est silylé à l'aide de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle<sup>[40]</sup> et d'imidazole dans le diméthylformamide, puis déprotégé sélectivement en présence de chlorure d'acétyle<sup>[41]</sup> dans le méthanol pour former l'alcool benzylique **78**. La bromination<sup>[9]</sup> de ce dernier avec PBr<sub>3</sub>, suivie de la phosphonation conduisent au phosphonate silylé **80** souhaité avec un rendement global de 56%.

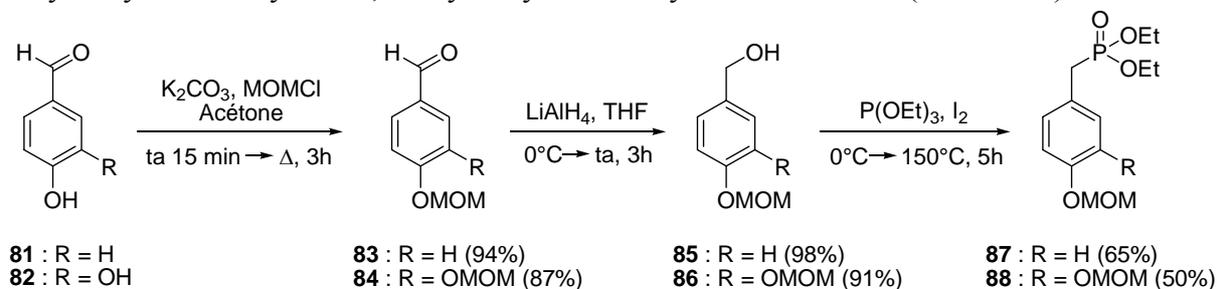
La formation du phosphonate (voir § 2.1) en une étape à partir de l'alcool benzylique **78** en présence de triéthylphosphite et de diiode n'a pas abouti.

Le couplage de Wadsworth-Emmons avec le phosphonate silylé **80** n'a pas été concluant. Ces résultats seront discutés dans le paragraphe suivant (§ 3). Nous avons donc synthétisé des phosphonates portant un groupement protecteur différent.

### 2.3 Phosphonates méthoxyméthyl étherés

Notre choix s'est donc porté sur la synthèse de phosphonates méthoxyméthyl étherés, dans la mesure où ce groupement protecteur semble stable dans les conditions utilisées lors du couplage de Wadsworth-Emmons, à savoir des conditions basiques.

Les phosphonates mono- et diméthoxyméthyl étherés sont formés respectivement à partir des 4-hydroxybenzaldéhyde et 3,4-dihydroxybenzaldéhyde commerciaux (schéma 36).

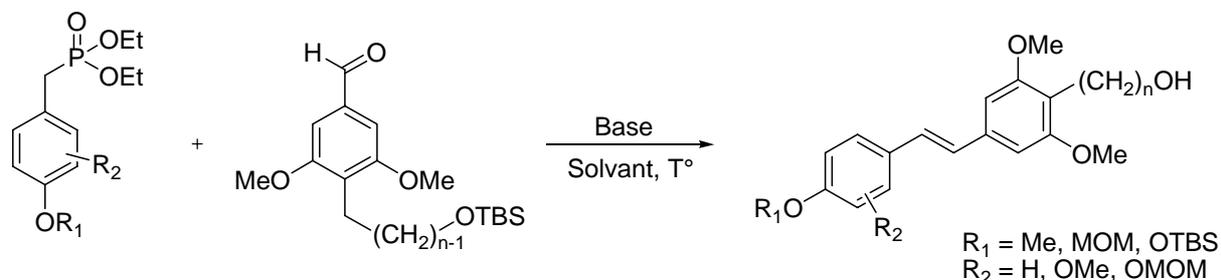


**Schéma 36** : Formation des phosphonates méthoxyméthyl étherés.

La ou les fonctions hydroxyles des benzaldéhydes sont protégées à l'aide de chlorure de méthoxyméthyl éther en présence de carbonate de potassium dans l'acétone à reflux.<sup>[42]</sup> Après réduction des aldéhydes **83** et **84** avec de l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium, la phosphonation des composés **85** et **86**, en présence de diiode et de triéthylphosphite<sup>[39]</sup> permet d'obtenir les phosphonates **87** et **88** souhaités avec des rendements globaux satisfaisants de 60 et 40% respectivement.

### 3. Couplage de Wadsworth-Emmons

Une réaction de Wadsworth-Emmons entre les différents phosphonates et aldéhydes, portant la chaîne  $\omega$ -hydroxylée, précédemment synthétisés, va permettre de former les différents RFA souhaités (schéma 37).



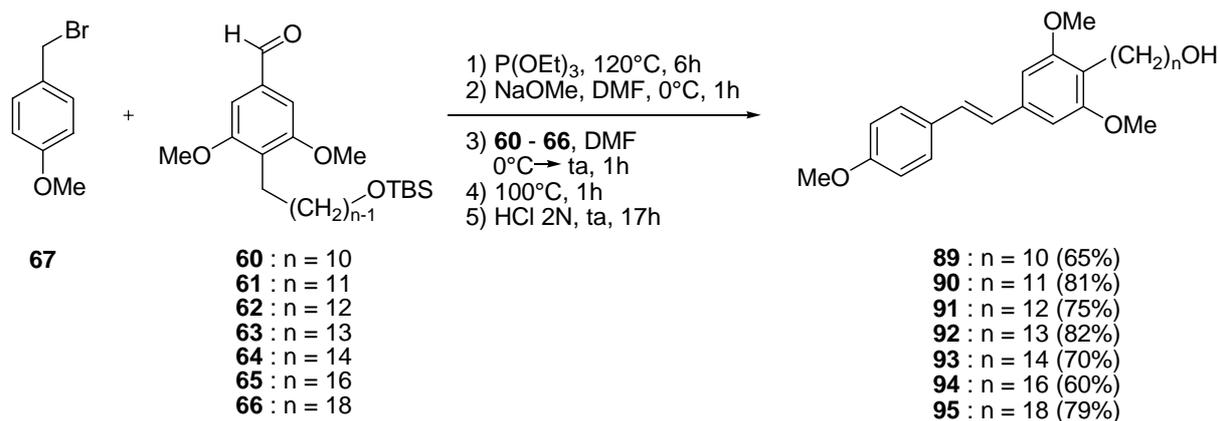
**Schéma 37** : Formation des différents RFA par réaction de Wadsworth-Emmons.

Pour effectuer ce couplage de Wadsworth-Emmons, les conditions classiques ont été utilisées, à savoir, le méthylate de sodium comme base et le diméthylformamide comme solvant.<sup>[4]</sup>

#### 3.1 Formation des RFA méthoxylés

- **RFA triméthoxylés**

Dans le cas des RFA triméthoxylés, le phosphonate, nécessaire au couplage de Wadsworth-Emmons, est formé *in situ*, en présence de triéthylphosphite à reflux, à partir du bromure 4-méthoxybenzylique **67** (schéma 38). Le phosphonate ainsi formé réagit avec le méthylate de sodium pour donner l'ylure correspondant qui va réagir avec les différents aldéhydes (**60** à **66**). Il se forme alors un intermédiaire réactionnel, un oxaphosphénate, qui par élimination de l'oxyde de triéthylphosphite conduit à la formation du produit de couplage. Finalement une désilylation de l'alcool primaire *in situ* en présence de HCl à 2M permet d'obtenir les RFA triméthoxylés **89** à **95** désirés avec des rendements satisfaisants.



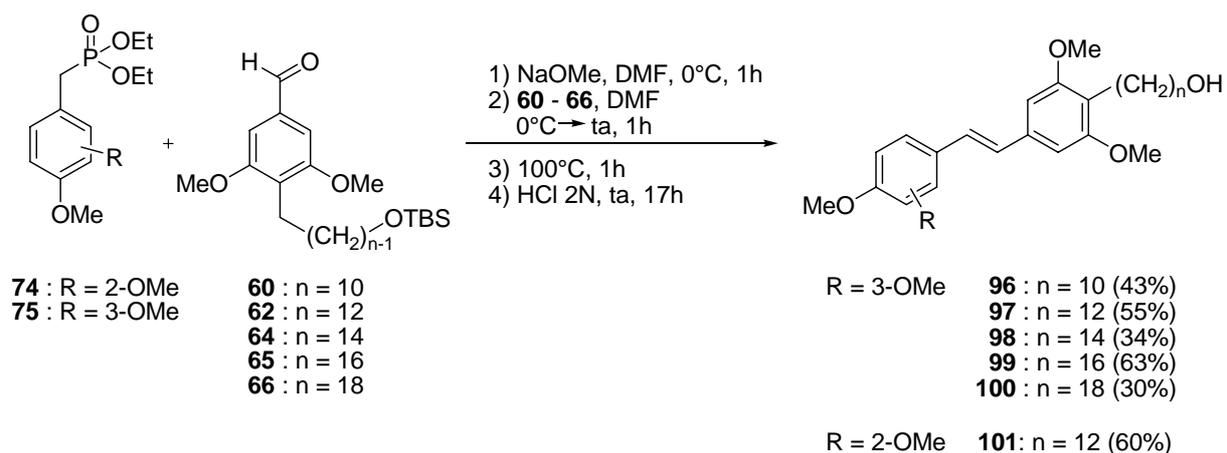
**Schéma 38** : Formation des RFA triméthoxylés.

Les variations de rendements observées, sont essentiellement dues à une dégradation du bromure benzylique **67**, sensible, au cours du temps.

Les rendements obtenus en utilisant directement le phosphonate **73** avoisinent également les 80% pour toutes les longueurs de chaîne.

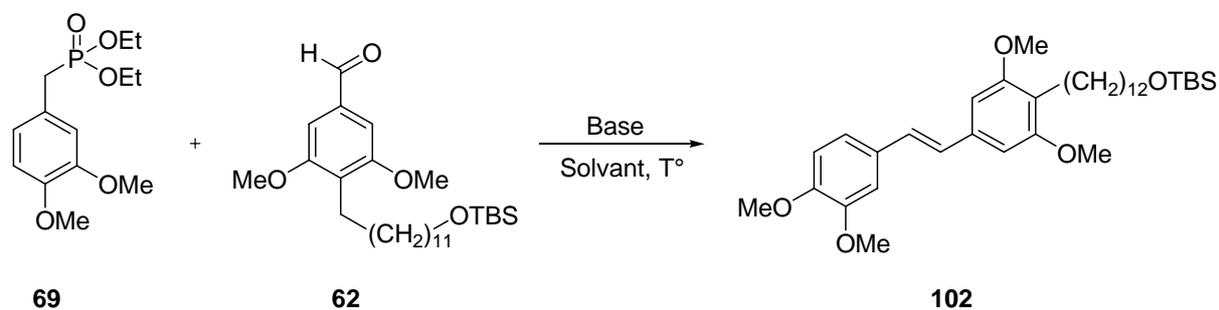
• **RFA tétraméthoxylés**

Les RFA tétraméthoxylés sont obtenus à partir des phosphonates diméthoxylés **74** et **75** et des différents aldéhydes (**60** à **66**) (schéma 39). Les conditions réactionnelles sont identiques à celles précédemment utilisées pour la synthèse des RFA triméthoxylés.



**Schéma 39** : Formation des RFA tétraméthoxylés.

Les différents RFA tétraméthoxylés **96** à **101** sont obtenus avec des rendements variables (30 à 63%). Nous avons donc tenté d'optimiser cette réaction et ce, en modifiant les conditions réactionnelles, et plus particulièrement la nature de la base (schéma 40).



**Schéma 40** : Optimisation du couplage de Wadsworth-Emmons.

Nous avons testé deux bases différentes, le *tert*-butanolate de potassium<sup>[6]</sup> et l'hydrure de sodium<sup>[5]</sup> (tableau 1).

| Entrée | Base           | Solvant | Température (°C) / temps (h) | Produit <b>102</b> (%) |
|--------|----------------|---------|------------------------------|------------------------|
| 1      | <i>t</i> -BuOK | THF     | 67°C / 24h                   | non formé              |
| 2      | NaH            | THF     | 50°C / 6h                    | 70%                    |

**Tableau 1** : Conditions réactionnelles employées.

En présence de *tert*-butanolate de potassium dans le THF à reflux pendant 24h, aucun produit de couplage **102** n'est observé. L'aldéhyde de départ est entièrement récupéré.

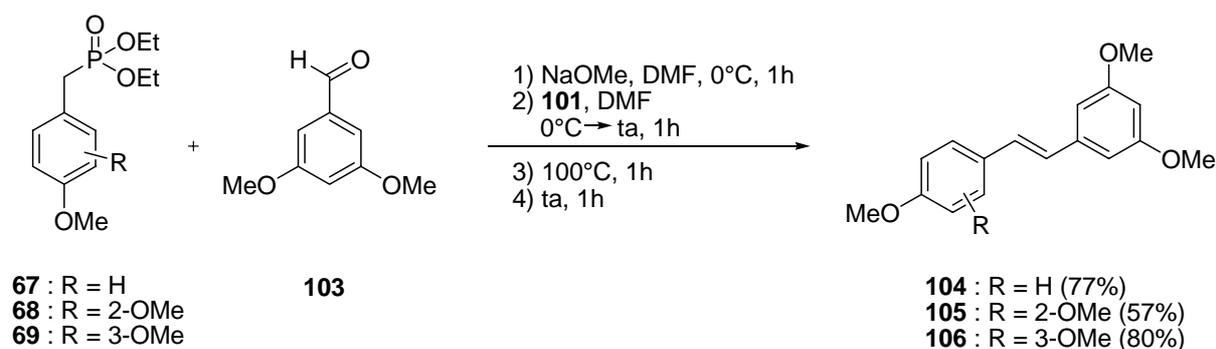
Par contre, avec de l'hydrure de sodium, qui est une base plus forte, après 6h de réaction à 50°C, le composé désiré est formé avec un rendement de 70%.

Une étape supplémentaire de déprotection à l'aide de fluorure de tétrabutylammonium est nécessaire afin d'obtenir le RFA12 tétraméthoxylé souhaité.

En ce qui concerne la synthèse des RFA triméthoxylés, les rendements obtenus sont comparables à ceux obtenus avec le méthanolate de sodium comme base et le diméthylformamide comme solvant.

### 3.2 Formation des dérivés méthoxylés du resvératrol

Les dérivés méthoxylés du resvératrol ont également été synthétisés (schéma 41). Ces dérivés serviront de contrôle au cours des différents tests biologiques. Ils seront soumis aux mêmes tests que les différents RFA méthoxylés synthétisés et permettront ainsi d'évaluer la réelle efficacité de la chaîne  $\omega$ -hydroxylée présente sur nos composés.



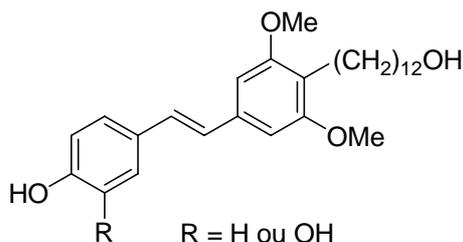
**Schéma 41** : Formation des dérivés méthoxylés du resvératrol.

Les composés **104** à **106** ont été obtenus avec des rendements satisfaisants, à partir du 3,5-diméthoxybenzaldéhyde commercial **103** et des différents phosphonates précédemment synthétisés.<sup>[4]</sup>

Nous pouvons remarquer que la formation du dérivé tétraméthoxylé du resvératrol **106**, en présence de méthanolate de sodium, s'effectue efficacement en comparaison aux dérivés tétraméthoxylés **96** à **100** portant une chaîne  $\omega$ -alcanol. Ces observations tendent donc en faveur d'une instabilité relative des composés **96** à **100** formés, dans le milieu réactionnel.

### 3.3 Autres dérivés des RFA

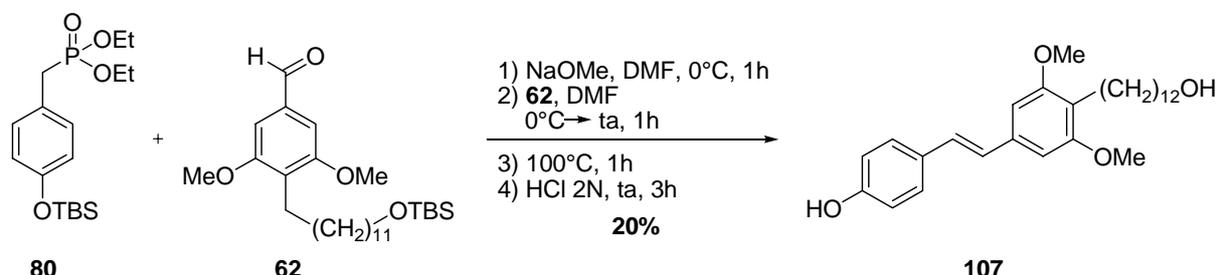
La série de RFA, hydroxylée(s) sur un des cycles aromatiques et méthoxylée(s) sur l'autre (schéma 42), a été synthétisée avec une seule longueur de chaîne, à savoir celle à douze atomes de carbone. Les premiers résultats biologiques ont en effet, montré une activité plus importante pour cette dernière.



**Schéma 42** : RFA hydroxylé(s) et méthoxylé(s).

• **RFA méthoxylés et silylés**

La réaction de couplage entre le benzaldéhyde **62** et le phosphonate silylé **80** n'a pas donné les résultats escomptés (schéma 43).



**Schéma 43** : Couplage de Wadsworth-Emmons avec le phosphonate silylé.

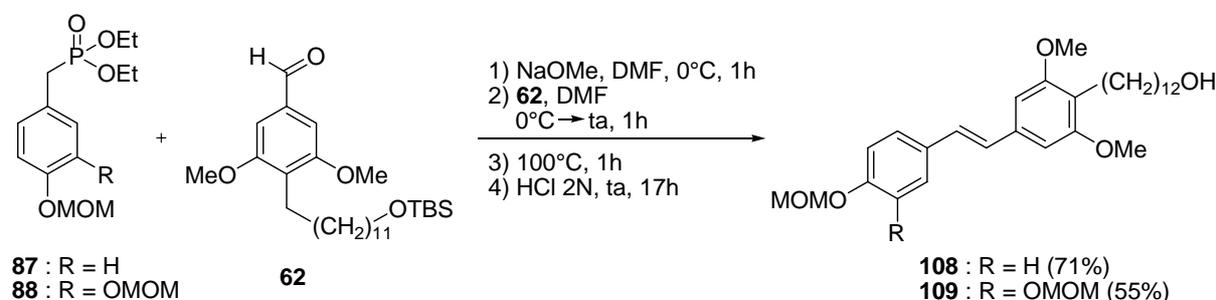
Le produit de couplage **107** est obtenu avec seulement 20% de rendement. Avant hydrolyse acide, le benzaldéhyde **62** de départ que nous pensions entièrement consommé, a tout simplement été déprotégé (80%).

Lorsque le méthanolate de sodium est remplacé par l'hydrure de sodium, les rendements obtenus ne sont guère plus satisfaisants (32%).

Une grande partie du phosphonate doit être déprotégée par la base et la forte température, engendrant ainsi sa dégradation et par conséquent rendant le couplage impossible.

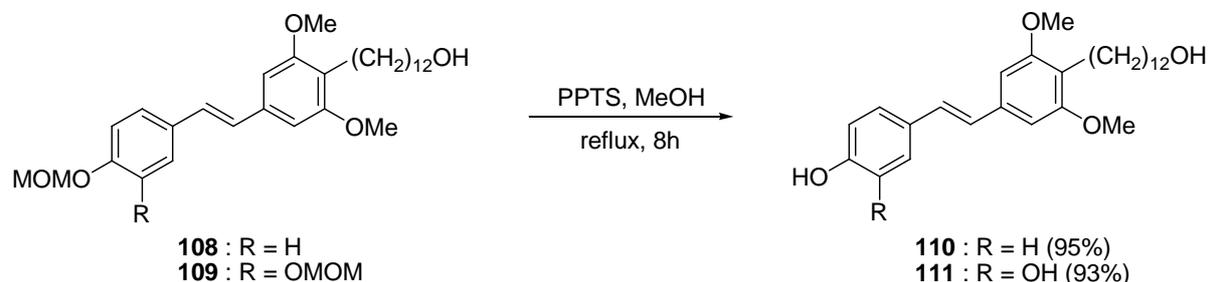
• **RFA méthoxylés et méthoxyméthyl éthers**

Le couplage de Wadsworth-Emmons entre les phosphonates méthoxyméthyl éthers **87** et **88** et l'aldéhyde portant douze atomes de carbone sur la chaîne latérale **62** est effectué comme précédemment (schéma 44).



**Schéma 44** : Couplage de Wadsworth-Emmons avec les phosphonates méthoxyméthyl éthers.

Les composés **108** et **109** sont obtenus avec des rendements corrects. Une simple étape de déprotection en présence de *para*-toluènesulfonate de pyridinium<sup>[11]</sup> dans le méthanol à reflux pendant 8h permet de former, de façon quantitative, les RFA **110** et **111** désirés (schéma 45).



**Schéma 45** : Déprotection des RFA méthoxyméthyl éthers.

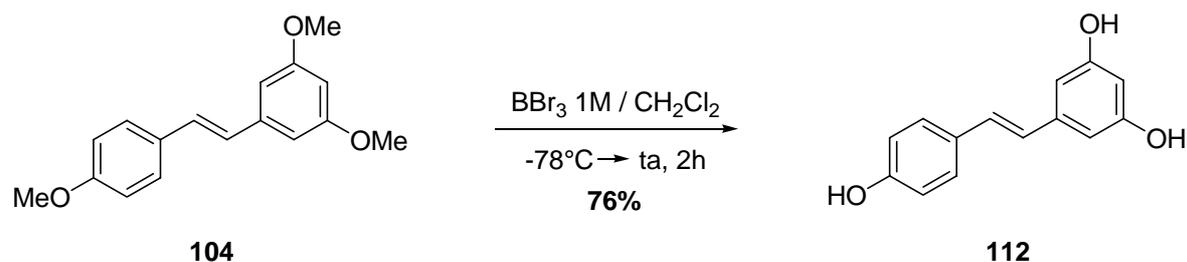
#### 4. Déprotection des différents RFA méthoxylés

Les RFA triméthoxylés et tétraméthoxylés ont été synthétisés afin de disposer de composés plus lipophiles et donc plus susceptibles d'atteindre le cerveau. Cependant, le potentiel de nos composés entièrement déprotégés, avec la structure originelle du resvératrol (fonctions hydroxyles libres), sera également évalué. Par ailleurs, afin de déterminer la capacité anti-oxydante de nos composés, la présence des groupements hydroxyles libres semble indispensable.

Dans la littérature<sup>[4, 5, 9]</sup> le resvératrol est généralement obtenu par déprotection du resvératrol méthoxylé à l'aide de tribromure de bore ( $\text{BBr}_3$ ) dans le dichlorométhane. Ainsi, nous avons choisi ce réactif pour effectuer la déprotection de nos composés.

##### 4.1 Déprotection des RFA triméthoxylés

En premier lieu, nous avons réalisé la déprotection du resvératrol méthoxylé **102** afin d'obtenir le resvératrol (**112**) (schéma 46).



**Schéma 46** : Formation du resvératrol.

Pour ce faire, nous avons utilisé une solution commerciale de tribromure de bore à 1M dans le dichlorométhane. Au bout de deux heures de réaction à température ambiante le resvératrol est obtenu avec 76% de rendement.

Aussi, afin de déprotéger les RFA triméthoxylés, nous avons tout d'abord utilisé une solution commerciale de tribromure de bore à 1M dans le dichlorométhane. Cependant, malgré différentes tentatives, nous avons toujours obtenu un mélange de produits partiellement ou entièrement déprotégés difficilement séparable.

Les différences observées entre les RFA triméthoxylés et le resvératrol méthoxylé suggèrent que la présence de la chaîne  $\omega$ -alcanol influe sur la réactivité.

Nous avons donc remplacé la solution de tribromure de bore par du tribromure de bore pur. Différentes conditions réactionnelles ont été testées avant de trouver des conditions optimales (schéma 47).

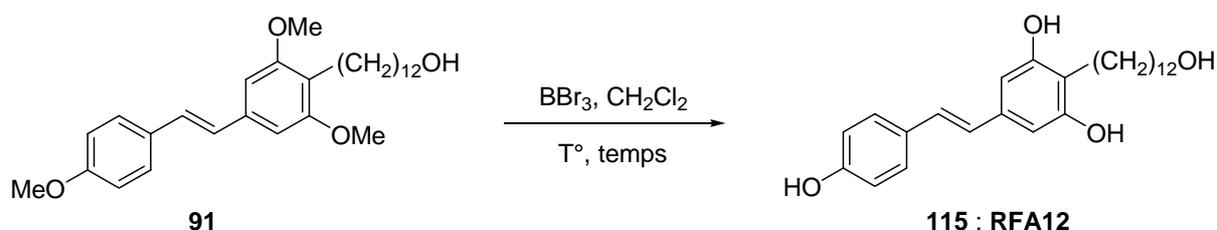


Schéma 47 : Déprotection du RFA12 triméthoxylé.

Cette réaction a été effectuée dans diverses conditions réactionnelles représentées dans le tableau ci-dessous (tableau 2).

| Entrée   | Equivalents de BBr <sub>3</sub> | Température     | Temps de réaction | Observations                            |
|----------|---------------------------------|-----------------|-------------------|---|
| <b>1</b> | 6 éq.                           | de -78°C à t.a. | 3h                | Produit de départ + 4 produits          |
| <b>2</b> | 9 éq.                           | de -78°C à t.a. | 3h                | 4 produits                              |
| <b>3</b> | 15 éq.                          | de -78°C à t.a. | 2h                | <b>115</b> + dimère                     |
| <b>4</b> | 15éq.                           | De -78°C à 0°C  | 2h                | Produit de départ + <b>115</b> + dimère |

Tableau 2 : Conditions réactionnelles utilisées.

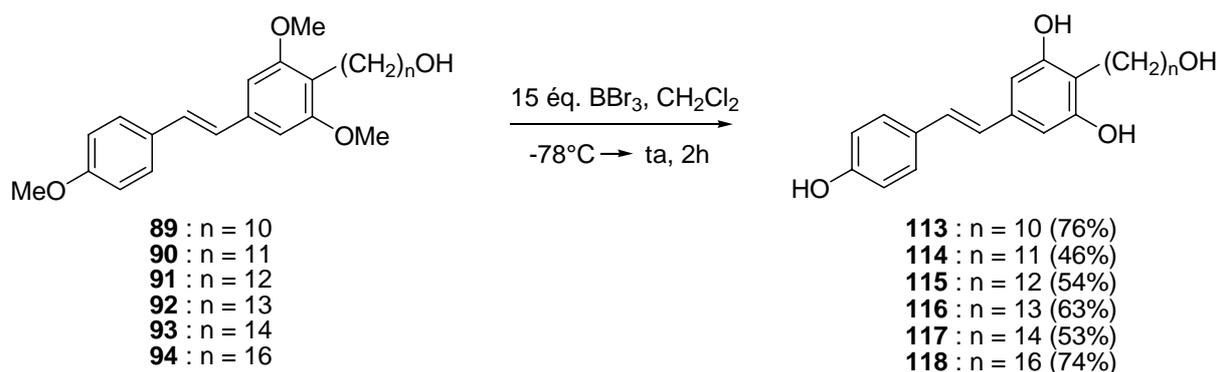
Dans un premier temps, nous avons utilisé six équivalents de tribromure de bore (entrée 1). Au bout de trois heures de réaction à température ambiante, il reste du produit de départ et il y a formation de quatre produits plus polaires que le produit de départ. Le composé le plus polaire a été isolé et correspond à la formation d'un dimère. Les trois autres composés,

recupérés sous forme de mélanges, correspondent aux composés comportant respectivement deux, un et aucun (RFA) groupements méthoxy.

En augmentant le nombre d'équivalents de tribromure de bore à neuf (entrée 2), tout le produit de départ est consommé. Cependant, nous obtenons toujours un mélange de produits. Cependant avec quinze équivalents et deux heures de réaction (entrée 3), nous n'observons plus que la formation du produit souhaité, le RFA12 **115** ainsi que du dimère, dans un rapport 1 : 1. Nous avons remarqué, qu'en réalisant cette même réaction en milieu plus dilué nous pouvions atteindre un rapport RFA/dimère de l'ordre de 9 : 4.

Afin de limiter, voire d'empêcher la formation du dimère, nous avons abaissé la température à 0°C (entrée 4). Dans ces conditions, tout le produit de départ n'est pas encore consommé alors que le dimère est déjà formé.

Les différents RFA triméthoxylés sont donc déprotégés selon les conditions réactionnelles décrites entrée 3 (schéma 48).



**Schéma 48** : Formation des RFA.

Les RFA **113** à **118** sont obtenus avec des rendements variables de 46% à 76%. Par ailleurs, afin d'obtenir les RFA avec une pureté satisfaisante, plusieurs purifications successives sur gel de silice sont nécessaires.

La purification par recristallisation n'a pu être envisagée dans la mesure où nous avons travaillé avec des quantités de l'ordre de la dizaine de milligramme. A plus grande échelle cette possibilité pourrait être envisageable.

## 4.2 Déprotection des RFA tétraméthoxylés

Les conditions de déprotection, mises au point pour les RFA triméthoxylés, ont été utilisées pour les dérivés tétraméthoxylés (schéma 49).

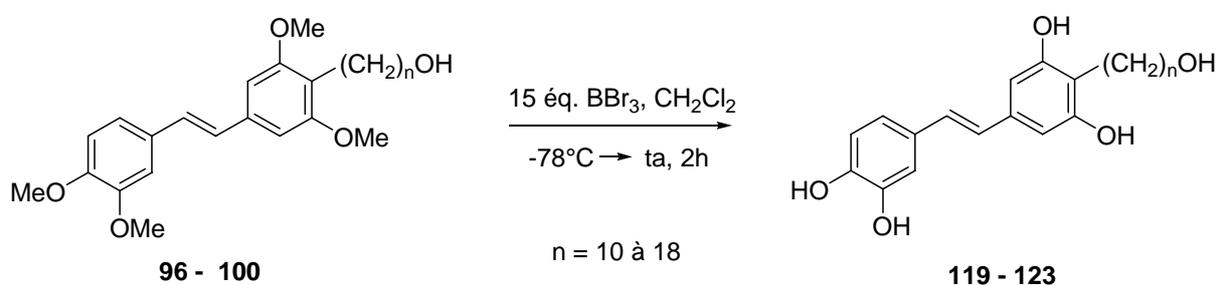


Schéma 49 : Déprotection des RFA tétraméthoxylés.

Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à obtenir les composés **119** à **123** souhaités. La chromatographie sur couche mince révélait une tâche très diffuse. Lors du dépôt du brut sur colonne de silice, toute la colonne se colore en orange, ce qui nous laisse penser à une dégradation. Après purification sur gel de silice, nous obtenons un mélange de composés, partiellement déprotégés et totalement déprotégés, inséparables.

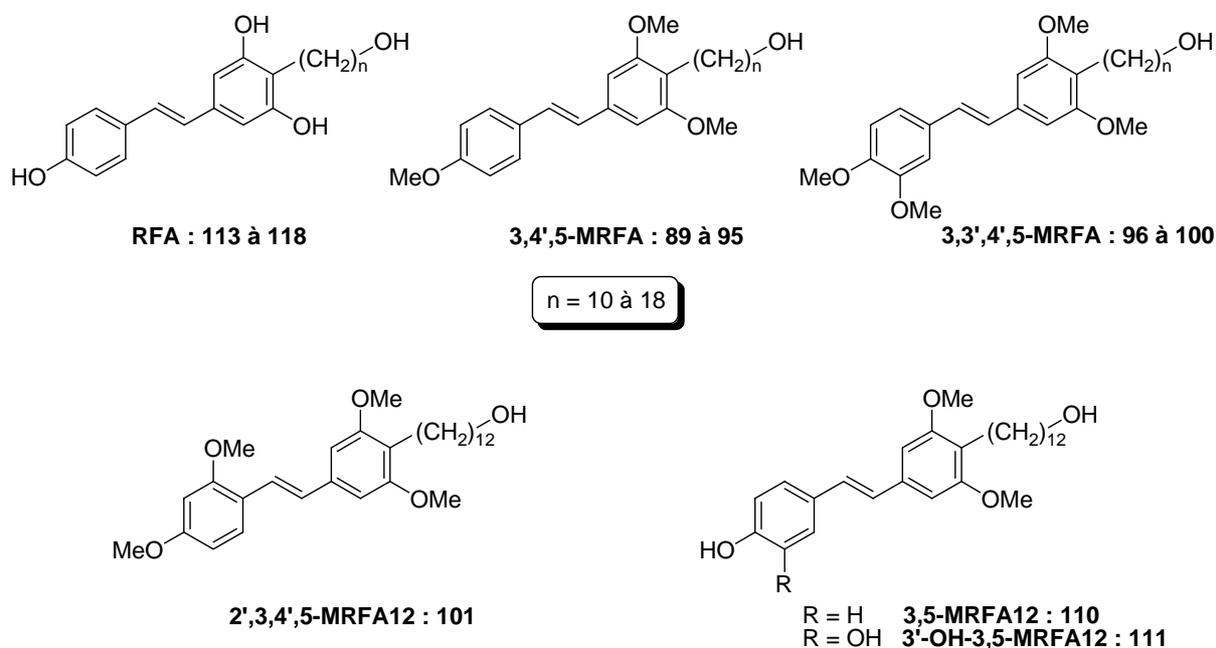
Nous avons donc envisagé d'utiliser de l'iodure de triméthylsilyle<sup>[43]</sup> (TMSI), connu pour être un très bon agent de clivage des liaisons éthers. A nouveau, la réaction n'a pas abouti, que ce soit en utilisant directement de l'iodure de triméthylsilyle ou en le formant *in situ* à partir de chlorure de triméthylsilyle et d'iodure de sodium.<sup>[44]</sup>

Une façon de pallier ce problème, serait l'utilisation d'un groupement protecteur de la fonction hydroxyle se clivant par un autre réactif que le tribromure de bore et de préférence dans des conditions relativement douces. Cette alternative sera développée dans le chapitre suivant.

Par ailleurs, l'organisme humain regorge d'enzymes, des déméthylases, notamment capables de déméthyliser des composés. Une déprotection naturelle de nos produits après administration pourrait donc être envisagée.

## VI. Récapitulatif

Nous avons synthétisé cinq séries d'alcools gras resvératroliques diversement substitués par plusieurs groupements méthoxy et différentes longueurs de chaîne  $\omega$ -alcanol (schéma 50).



**Schéma 50** : Structure des différents RFA synthétisés.

Les différentes longueurs de chaîne ont été greffées de manière efficace par un couplage de Sonogashira. La formation de la double liaison de configuration exclusivement *trans*, permettant d'accéder au noyau du resvératrol, quant à elle, a été obtenue par la réaction de Wadsworth-Emmons. Les RFA diversement méthoxylés ont été obtenus avec des rendements globaux satisfaisants variant de 27 à 48% sur 9 étapes.

La déprotection des RFA triméthoxylés permettant d'aboutir aux RFA **113** à **118** s'effectue avec des rendements très variables (46 à 76%). Par ailleurs, leur purification est relativement laborieuse. En ce qui concerne la formation des RFA tétrahydroxylés, leur isolement s'est avéré impossible jusqu'à présent. Une façon de contourner cette difficulté serait l'utilisation d'autres groupements protecteurs de la fonction hydroxyle, se clivant dans des conditions réactionnelles douces et ne nécessitant pas l'emploi de tribromure de bore.

## Références bibliographiques

- [1] Stojanović, S.; Brede, O. Elementary reactions of the antioxidant action of *trans*-stilbene derivatives: resveratrol, pinosylvin and 4-hydroxystilbene., *Phys. Chem. Phys. Chem.*, **2002**. 4, 757-764.
- [2] Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. The Utility of Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis., *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**. 83, 1733-1738.
- [3] Wang, M.; Jin, Y.; Ho, C.-T. Evaluation of Resveratrol Derivatives as Potential Antioxydants and Identification of a Reaction Product of Resveratrol and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical., *J. Agric. Food. Chem.*, **1999**. 47, 3974-3977.
- [4] Shen, Z. L.; Zhuo, G. L.; Jiang, X. Z. A practical synthesis of *trans*-resveratrol., *Indian J. Chem. Sect. B: Organic Chem*, **2002**. 41B, 2395-2398.
- [5] Chen, G.; Webster, J. M.; Li, J.; Hu, K.; Zhu, J. Anti-inflammatory and psoriasis treatment and protein kinase inhibition by hydroxystilbenes and novel stilbene derivatives and analogues., *PCT Int.*, **2001**. WO0142231.
- [6] Diez-Barra, E.; Garcia-Martinez, J. C.; Rodriguez-Lopez, J. A Horner-Wadsworth-Emmons Approach to Dipolar and Non-Dipolar Poly(phenylenevinylene)dendrimers., *Tetrahedron. Lett.*, **1999**. 40, 8181-8184.
- [7] Bellucci, G.; Chiappe, C.; Lo Moro, G. Crown Ether Catalyzed Stereospecific Synthesis of Z- and E-Stilbenes by Wittig Reaction in a Solid-Liquid Two-Phases System., *Tetrahedron Lett.*, **1996**. 37, 4225-4228.
- [8] Dudek, S. P.; Sikes, H. D.; Chidsey, C. E. D. Synthesis of Ferrocenethiols Containing Oligo(phenylenevinylene) Bridges and Their Characterization on Gold Electrodes., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**. 123, 8033-8038.
- [9] Pettit, G. R.; Grealish, M. P.; Jung, M. K.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Chapuis, J.-C.; Schmidt, J. M. Antineoplastic Agents. 465. Structural Modification of Resveratrol: Sodium Resverastatin Phosphate., *J. Med. Chem.*, **2002**. 45, 2534-2542.
- [10] Treadwell, E. M.; Cermak, S. C.; Wiemer, D. F. Synthesis of Schweinfurthin C, a Geranylated Stilbene from *Macaranga schweinfurthii*., *J. Org. Chem.*, **1999**. 64, 8718-8723.
- [11] Lion, C. J.; Matthews, C. S.; Stevens, M. F. G.; Westwell, A. D. Synthesis, Antitumor Evaluation, and Apoptosis-Inducing Activity of Hydroxylated (*E*)-Stilbenes., *J. Med. Chem.*, **2005**. 48, 1292-1295.
- [12] Alonso, E.; Ramon, D. J.; Yus, M. Simple Synthesis of 5-Substituted Resorcinols: A Revisited Family of Interesting Bioactive Molecules., *J. Org. Chem.*, **1997**. 62, 417-421.

- [13] Ferré-Filmon, K.; Delaude, L.; Demonceau, A.; Noels, A. F. Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins., *Coord. Chem. Rev.*, **2004**. 248, 2323-2336.
- [14] Guiso, M.; Marra, C.; Farina, A. A new efficient resveratrol synthesis., *Tetrahedron Lett.*, **2002**. 43, 597-598.
- [15] Jeffery, T.; Ferber, B. One-pot palladium-catalyzed highly chemo-, regio-, and stereoselective synthesis of *trans*-stilbene derivatives. A concise and convenient synthesis of resveratrol., *Tetrahedron. Lett.*, **2003**. 44, 193-197.
- [16] Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. Novel Synthesis of Cis and Trans Isomers of Combrestatin A-4., *J. Org. Chem.*, **2001**. 66, 8135-8138.
- [17] Andrus, M. B.; Liu, J.; Meredith, E. L.; Nartey, E. Synthesis of resveratrol using a direct decarbonylative Heck approach from resorcylic acid., *Tetrahedron Lett.*, **2003**. 44, 4819-4822.
- [18] Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A.T Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.*, **2006**. 49, 3033-3044.
- [19] Kaffy, J.; Pontikis, R.; Florent, J. C.; Monneret, C. Synthesis and biological evaluation of vinylogous combretastatin A-4 derivatives., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**. 3, 2657-2669.
- [20] Chang, S.; Na, Y.; Shin, H. Y.; Choi, E.; Jeong, L; S. A short and efficient synthetic approach to hydroxy (*E*)-stilbenoids via solid-phase cross metathesis., *Tetrahedron Lett.*, **2002**. 43, 7445-7448.
- [21] Chatterjee, A. K.; Choi, T. L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**. 125, 11360-11370.
- [22] Ferré-Filmon, K.; Delaude, L.; Demonceau, A.; Noels, A. F. Stereoselective Synthesis of (*E*)-Hydroxystilbenoids by Ruthenium-Catalyzed Cross-Metathesis., *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**. 15, 3319-3325.
- [23] Neighbors, J. D.; Salnikova, M. S.; Wiemer, D. F. Total synthesis of pawhuskin C: a directed *ortho* metalation approach., *Tetrahedron Lett.*, **2005**. 46, 1321-1324.
- [24] Muller, T.; Coowar, D.; Hanbali, M.; Grandbarbe, L.; Morga, E.; Heuschling, P.; Luu, B., Improved synthesis of Tocopherol Fatty Alcohols and analogs: Microglial activation modulators., soumis.
- [25] Lei, H.; Atkinson, J. Synthesis of Phytyl- and Chroman-Derivatized Photoaffinity Labels Based on  $\alpha$ -Tocopherol., *J. Org. Chem.*, **2000**. 65, 2560-2567.
- [26] Yadav, J. S.; Upender, V.; Rama Rao, A. V. A Practical Preparation of Functionalized Alkylbenzoquinones: Synthesis of Maesanin and Irisquinone., *J. Org. Chem.*, **1992**. 57, 3242-3245.

- [27] Fürstner, A.; Konetzki, I. Total Synthesis of Caloporoside., *J. Org. Chem.*, **1998**. 63, 3072-3080.
- [28] Kirchhoff, J. H.; Netherton, M. R.; Hills, I. D.; Fu, G. C. Boronic Acids: New Coupling Partners in Room-Temperature Suzuki Reactions of Alkyl Bromides. Crystallographic Characterization of an Oxidative –Addition Adduct Generated under Remarkably Mild Conditions., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**. 124, 13662-13663.
- [29] Hadfield, J. A.; McGown, A. T.; Butler, J. A High-Yielding Synthesis of the Naturally Occuring Antitumor Agent Irisquinone., *Molecules*, **2000**. 5, 82-88.
- [30] Alami, M.; Ferri, F.; Linstrumelle, G. An Efficient Palladium-Catalyzed Reaction of Vinyl and Aryl Halides or Triflates with Terminal Alkynes., *Tetrahedron Lett.*, **1993**. 34, 6403-6406.
- [31] Brimble, M. A.; Pavia, G. S.; Stevenson, R. J. A facile synthesis of aryldihydropyrans using a Sonogashira-selenoetherification strategy., *Tetrahedron Lett.*, **2002**. 43, 1735-1738.
- [32] Marshall, W.; Sigmund, S.; Whitesitt, C. A. Process for leukotriene antagonists., *PCT Int.*, **1998**. US4777299.
- [33] Miyaura, N.; Ishiyama, T.; Sasaki, H.; Ishikawa, M.; Satoh, M.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Inter- and Intramolecular Cross-Coupling Reactions of *B*-Alkyl-9-borabicyclo[3.3.1]nonane Derivatives with 1-Halo-1-alkenes or Haloarenes. Syntheses of Functionalized Alkenes, Arenes, and Cycloalkenes via a Hydroboration-Coupling Sequence., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**. 111, 314-321.
- [34] Yasuhara, A.; Kanamori, Y.; Kaneko, T.; Numata, A.; Kondo, Y.; Sakamoto, T. Convenient synthesis of 2-substituted indoles from 2-ethynyl-anilines with tetrabutylammonium fluoride., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**. 529-534.
- [35] Hofman, S.; De Baecke, G.; Kenda, B.; De Clerq, P. J. Studies directed towards the total synthesis of (+)-Himbancine., *Synthesis*, **1998**. 479-489.
- [36] Guerry, P.; Mohr, P.; Muller, M.; Mueller, W.; Pflieger, P. Sustituted 5-benzyl-2,4-diaminopyrimidines., *PCT Int.*, **2001**. WO0132633.
- [37] Fougèrouse, A.; Raul, F.; Schneider, Y.; Brouillard, R.; Chabert, P. Synthesis of (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene, and use thereof., *PCT Int.*, **2003**. WO 03/031381.
- [38] Griffith, W. P.; Ley, S. V. TPAP: Tetra-*n*-propylammonium Perruthenate, A Mild and Convenient Oxidant for Alcohols., *Aldrichimica Acta*, **1990**. 23, 13-19.
- [39] Zheng, S.; Barlow, S.; Parker, T. C.; Marder, S. R. A convenient method for the synthesis of electron-rich phosphonates., *Tetrahedron Lett.*, **2003**. 44, 7989-7992.
- [40] Paladino, J.; Guyard, C.; Thurieau, C.; Fauchère, J.-L. Enantioselective Synthesis of (2*S*)-2-Amino-3-(4-hydroxy-3-phosphonophenyl)propionic Acid (= 3'-Phosphono-L-Tyrosine) and Its Incorporation into Peptides., *Helv. Chimica Acta*, **1993**. 76, 2465-2472.

- [41] Khan, A. T.; Mondal, E. A Highly and Useful Synthetic Protocol for the Cleavage of *tert*-Butyldimethylsilyl (TBS) Ether Using a Catalytic Amount of Acetyl Chloride in Dry Methanol., *Synlett*, **2003**. 5, 694-698.
- [42] Fruit, C.; Turck, A.; Plé, N.; Mojovic, L.; Quéguiner, G. A new route to Septorin via controlled metalations of pyrazines. Diazines XXX., *Tetrahedron*, **2001**. 57, 9429-9435.
- [43] Kraft, P.; Eichenberger, W. Conception, Characterization and Correlation of New Marine Odorants., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**. 3735-3743.
- [44] Frigoli, M.; Moustrou, C.; Samat, A.; Guglielmetti, R. Synthesis of New Thiophene-Substituted 3,3-Diphenyl-3*H*-naphthol[2,1-*b*]pyrans by Cross-Coupling Reactions, Precursors of Photomodulated Materials., *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**. 2799-2812.

---

*Chapitre II*

**Nouvelle voie  
de synthèse des RFA**

---

## I. Introduction

Les tests biologiques ont permis de montrer que les composés les plus actifs comportaient une longue chaîne hydrocarbonée de 10 et 12 atomes de carbone ainsi que des fonctions hydroxyles libres. En effet, les molécules **113** et **115** (schéma 1), permettent d'induire la différenciation des cellules souches neurales tout en modulant l'activation microgliale. Les analogues triméthoxylés des RFA présentent une activité largement plus faible avec cependant une activité plus importante pour le dérivé **89** comportant 12 atomes de carbone sur la chaîne latérale. Ces résultats confirment que la longueur de la chaîne  $\omega$ -alcanol est déterminante pour l'activité biologique. Ils seront discutés dans le chapitre suivant (chapitre III).

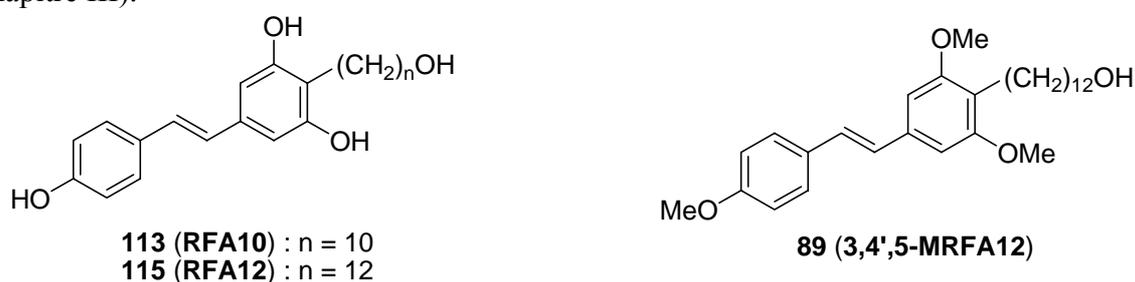


Schéma 1 : Composés trisubstitués.

Par ailleurs, les dérivés tétraméthoxylés des RFA sont plus actifs que leurs homologues triméthoxylés. A nouveau l'activité maximale au sein de cette série est retrouvée pour les longueurs de chaîne à 10 et 12 atomes de carbone (schéma 2).

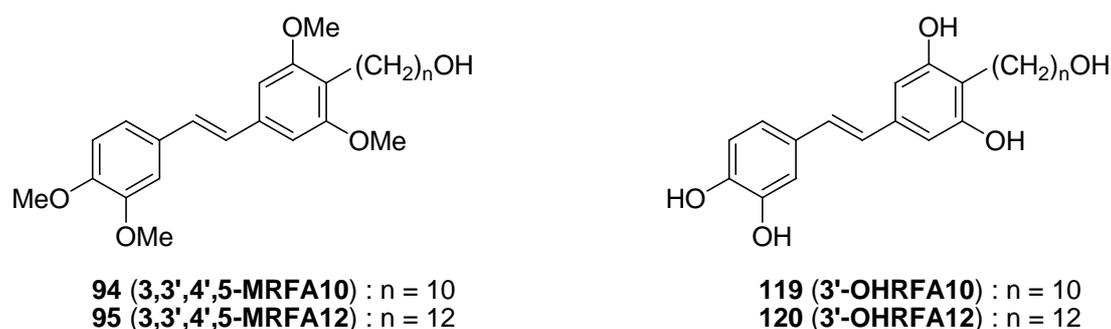


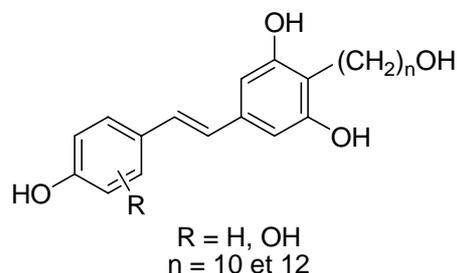
Schéma 2 : Composés tétrasubstitués.

Le potentiel des molécules tétrahydroxylées **119** et **120** n'a pu être évalué dans la mesure où nous n'avons pas réussi à les isoler. Les résultats biologiques très intéressants obtenus avec les RFA10 et RFA12 (trihydroxylés), nous laissent penser que leurs analogues tétrahydroxylés pourraient avoir des activités biologiques aussi, voire plus prometteuses.

Aussi, l'élaboration d'une nouvelle stratégie de synthèse, permettant d'accéder aux dérivés entièrement hydroxylés des RFA, semble essentielle.

## II. Objectifs

Cette nouvelle voie de synthèse doit nous permettre d'obtenir les différents RFA polyhydroxylés (schéma 3).



**Schéma 3** : Structure des RFA polyhydroxylés.

L'étape limitante de la première voie de synthèse est la déméthylation des RFA méthoxylés, et plus particulièrement des RFA tétraméthoxylés. Ainsi, notre approche va s'articuler autour de l'utilisation d'un groupement protecteur différent des fonctions hydroxyles. Celui-ci doit être facilement clivable et ce, dans des conditions réactionnelles relativement douces afin d'éviter toute réaction secondaire parasite.

Notre choix s'est ainsi porté sur la fonction acétate, qui est aisément clivée en milieu basique.<sup>[1]</sup> Cependant, la présence des groupements acétates nous contraint à utiliser une autre méthode de formation de la double liaison carbone-carbone de configuration *trans*. En effet, le groupement acétate n'est pas compatible avec les conditions réactionnelles, notamment basiques, du couplage de Wadsworth-Emmons.

Un autre moyen efficace de former la double liaison *trans* des stilbènes comme le resvératrol, est le couplage de Heck.<sup>[2, 3]</sup> En outre, il a été démontré que la réaction était favorisée en présence de fonctions acétates.<sup>[4]</sup>

Nous avons donc opté pour le couplage de Heck afin de former la double liaison. Le greffage de la chaîne latérale s'effectuera comme précédemment, par le couplage de Sonogashira.

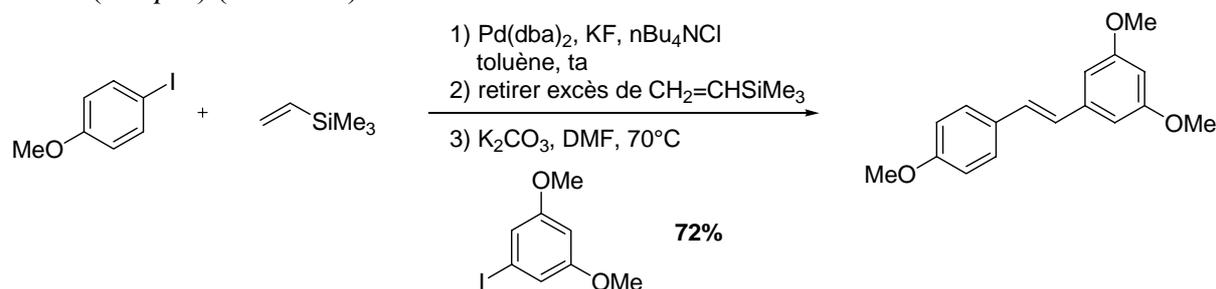
A la vue des résultats biologiques, cette nouvelle synthèse ne sera effectuée que pour les composés portant une chaîne à 10 et 12 atomes de carbone.

### III. Voie de synthèse choisie

#### A. Rappels bibliographiques

Au cours de cette dernière décennie, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées au couplage de Heck<sup>[1, 2, 5]</sup> pour la formation de différents stilbènes naturels et notamment du resvératrol.

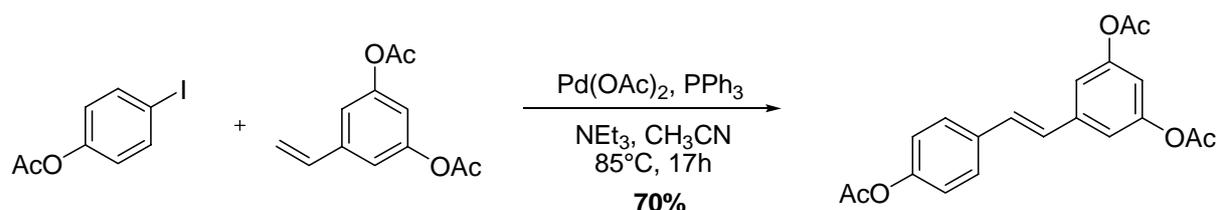
- Jeffery et al.<sup>[2]</sup> ont décrit la synthèse du resvératrol par deux couplages successifs de Heck (*one pot*) (schéma 4).



**Schéma 4** : Deux couplages de Heck successifs.

Le premier couplage entre l'iodure de 4-méthoxybenzène et le triméthylsilyle vinylique s'effectue en présence de fluorure de potassium, de chlorure de tétrabutylammonium et d'une quantité catalytique de palladium bis(dibenzylidèneacétone) pour former le 4-méthoxystyrène. L'excès de triméthylsilyle vinylique est éliminé avant de procéder au second couplage de Heck entre le styrène formé précédemment et le 3,5-diméthoxy-iodobenzène pour aboutir au stilbène triméthoxylé avec 72% de rendement. Le système catalytique de ce deuxième couplage est constitué par le complexe de palladium et le chlorure de tétrabutylammonium initialement présent dans le milieu réactionnel et par l'ajout d'une base, le carbonate de potassium.

- En 2002, Guiso et al.<sup>[1]</sup> ont décrit la synthèse du resvératrol acétylé à l'aide d'un couplage de Heck. Il s'effectue entre le 4-iodophénylacétate et le 3,5-diacétoxystyrène en présence d'acétate de palladium, de triphénylphosphine et de triéthylamine (schéma 5).

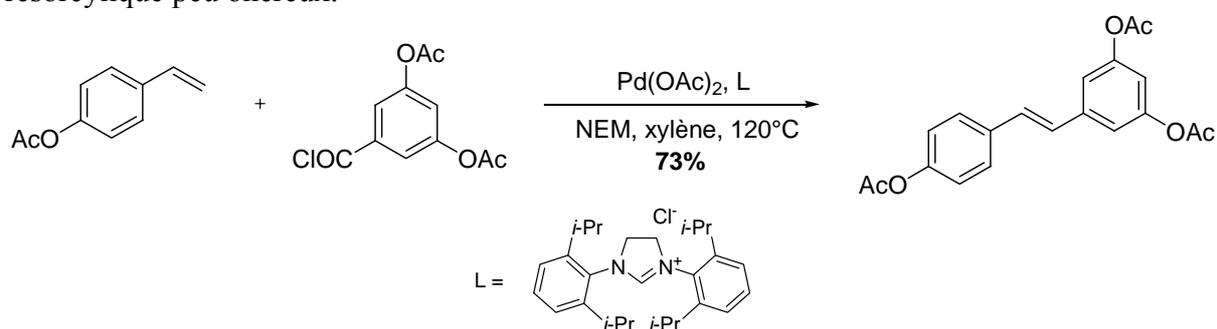


**Schéma 5** : Couplage de Heck.

Le produit de couplage est obtenu de façon stéréosélective avec un rendement de 70%. Finalement, une simple déprotection des groupements acétates en milieu basique permet de générer le resvératrol de façon quantitative.

- Andrus et al<sup>[5]</sup> ont utilisé un couplage de Heck décarbonylant afin de synthétiser le resvératrol (schéma 6). La formation de la double liaison carbone-carbone a lieu après élimination d'une molécule de monoxyde de carbone.

Notre choix se portera sur ce couplage dans la mesure où il s'opère entre le 4-acétoxystyrène commercial et le chlorure d'acide 3,5-diacétoxybenzoïque, obtenu aisément à partir de l'acide résorcylique peu onéreux.

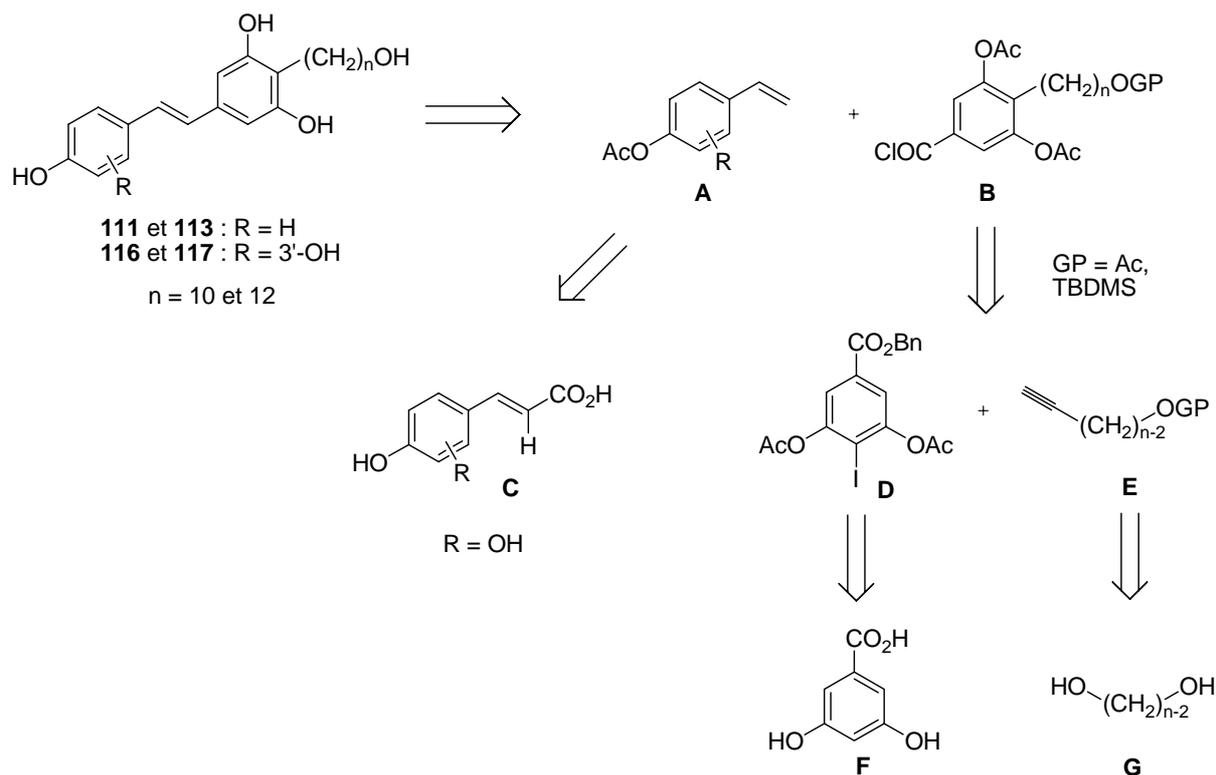


**Schéma 6** : Couplage de Heck décarbonylant.

La réaction s'effectue en présence d'acétate de palladium, d'un ligand, le chlorure de *N,N*-bis-(2,6-diisopropyl)dihydroimidazolium et de *N*-éthylmorpholine (NEM) comme base dans le xylène à reflux. Le resvératrol acétylé est obtenu avec un rendement de 73%. Une déprotection en milieu basique permet d'obtenir le resvératrol souhaité.

## B. Voie de synthèse

La stratégie employée afin de synthétiser les alcools gras resvératroliques entièrement hydroxylés repose sur deux étapes clé. D'une part, un couplage de Sonogashira, comme dans la première voie de synthèse, permettant de greffer efficacement la chaîne  $\omega$ -hydroxylée protégée. D'autre part, un couplage de Heck décarbonylant formant la double liaison carbone-carbone de configuration *trans*, donnant accès au noyau du resvératrol (schéma 7).



**Schéma 7** : Rétrosynthèse des RFA polyhydroxylés.

Le couplage de Heck s'effectue entre les différents acétoxystyrènes **A** et les chlorures d'acides benzoïques acétylés **B** portant différentes longueurs de chaîne ( $n = 10$  et  $12$ ). Le 4-acétoxystyrène ( $R = H$ ) est commercial. Les styrènes disubstitués sont obtenus en une seule étape à partir des acides vinyliques hydroxylés correspondants **C**. Les chlorures d'acides benzoïques sont obtenus par un couplage de Sonogashira<sup>[6]</sup> entre l'iodure aromatique **D**, issu de l'acide résorcylique **F** commercial, et les alcynes vrais  $\omega$ -hydroxylés protégés **E** provenant des diols correspondants **G**.

#### IV. Synthèse du RFA10 et du RFA12

La nouvelle stratégie de synthèse est basée principalement sur deux étapes. La première consiste à greffer la chaîne latérale sur un des cycles aromatiques par le biais d'un couplage de Sonogashira. La deuxième étape, quant à elle permet la formation de la double liaison carbone-carbone du resvératrol par une réaction de Heck.<sup>[5]</sup>

En premier lieu, nous allons détailler la synthèse des alcynes vrais *O*-protégés et celle de l'iodure aromatique nécessaires au couplage de Sonogashira.

## A. Couplage de Sonogashira

### 1. Synthèse des alcynes vrais *O*-protégés

La synthèse des alcynes vrais *O*-silylés, décrite précédemment (Chapitre I, §V, A, 1), ne nous a pas permis d'obtenir l'alcyne *O*-acétylé désiré **125** (schéma 8).

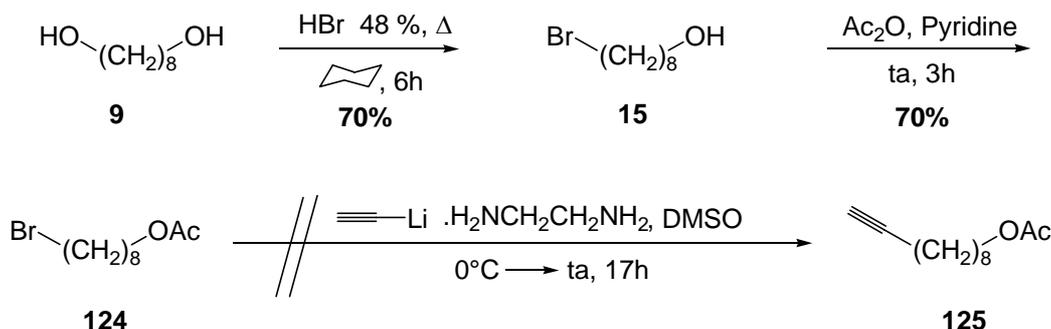


Schéma 8 : Formation de l'alcyne *O*-acétylé **125**.

Nous avons donc envisagé de le synthétiser à partir de son homologue silylé **29**, malgré deux étapes supplémentaires de protection-déprotection (schéma 9). La déprotection de l'alcyne *O*-silylé **29** à l'aide d'une solution de fluorure de tétra-butylammonium à 1M dans le THF, suivie de l'acétylation en présence de pyridine, permet d'obtenir l'alcyne **125** souhaité.

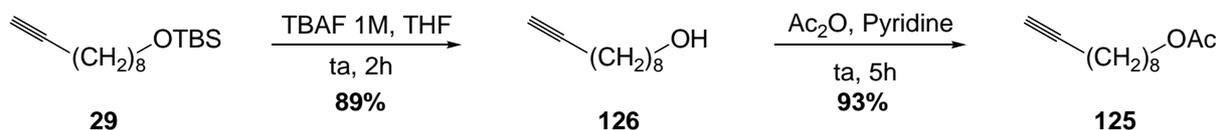


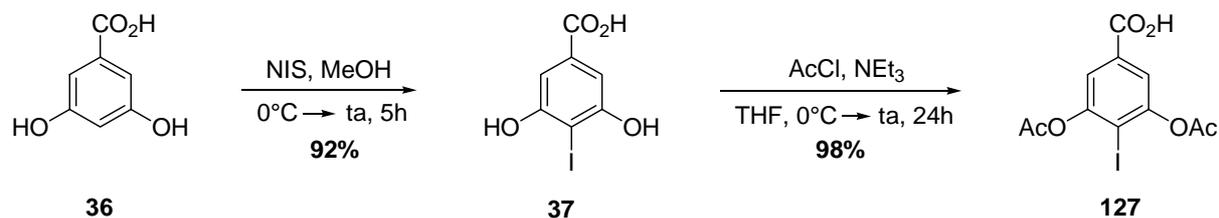
Schéma 9 : Formation de l'alcyne *O*-acétylé **125**.

Malgré une étape supplémentaire de déprotection impliquée due à l'utilisation de l'alcyne vrai silylé, nous avons poursuivi la synthèse avec les deux types d'alcynes.

### 2. Synthèse de l'iodure aromatique

Dans un premier temps, nous avons tenté le couplage avec l'iodure comportant la fonction acide libre. En effet, il serait plus intéressant de conserver la fonction acide libre, puisqu'elle est nécessaire à l'obtention du chlorure d'acide benzylique impliqué dans le couplage de Heck décarbonylant.<sup>[5]</sup>

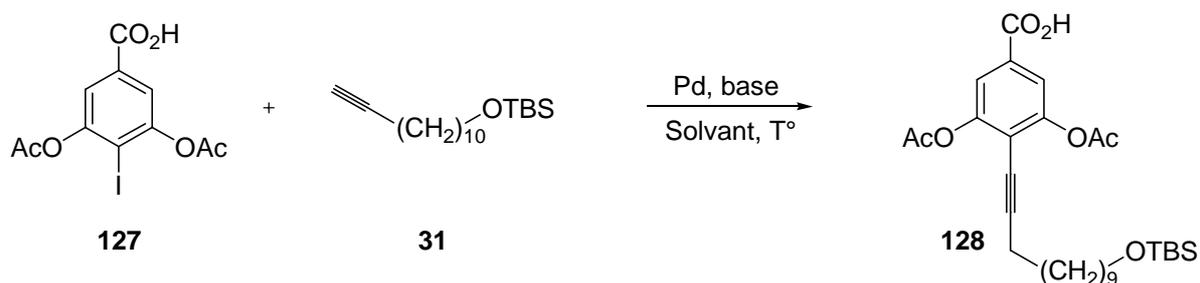
L'iodure aromatique **127** est obtenu en deux étapes à partir de l'acide résorcylique commercial **36** (schéma 10).



**Schéma 10** : Formation de l'iodure aromatique **127**.

L'iodation de l'acide résorcylique **36** en présence de *N*-iodosuccinimide<sup>[7]</sup> dans le méthanol, suivie de l'acétylation des deux fonctions phénols à l'aide de chlorure d'acétyle et de triéthylamine<sup>[8]</sup>, permettent d'obtenir l'iodure **127** souhaité avec un rendement global de 90%.

Le couplage de Sonogashira, entre l'iodure ainsi formé et l'alcyne vrai **31**, a été effectué dans différentes conditions réactionnelles (schéma 11).



**Schéma 11** : Couplage de Sonogashira.

Les conditions réactionnelles testées sont représentées dans le tableau ci-dessous (tableau 1) :

| Entrée                   | Complexe de palladium, ± CuI                             | Base             | Solvant                        | Température (°C) / Temps | Produit <b>128</b> (%)         |
|--------------------------|--|------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| <b>1</b> <sup>[6]</sup>  | PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , CuI | NEt <sub>3</sub> | NEt <sub>3</sub>               | 80°C / 24h               | Produit de départ +dégradation |
| <b>2</b> <sup>[9]</sup>  | Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , CuI                 | NEt <sub>3</sub> | NEt <sub>3</sub>               | 80°C / 44h               | Produit de départ +dégradation |
| <b>3</b> <sup>[10]</sup> | Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>                       | Pipéridine       | Pipéridine                     | 80°C / 48h               | Produit de départ +dégradation |
| <b>4</b> <sup>[8]</sup>  | PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , CuI | NEt <sub>3</sub> | NEt <sub>3</sub> : THF / 1 : 1 | 65°C / 24h               | Produit de départ +dégradation |

**Tableau 1** : Conditions réactionnelles testées.

Les différentes méthodes de couplage utilisées n'ont pas abouti. En effet, dans chacun des cas la majorité du produit de départ n'a pas réagi et la chaîne est dégradée.

Nous avons donc décidé de protéger la fonction acide par un groupement benzyle (schéma 12). Ce dernier pourra être déprotégé au cours de la réaction d'hydrogénation nécessaire pour aboutir à la chaîne  $\omega$ -hydroxylée entièrement saturée.

L'iodure aromatique **130** nécessaire au couplage de Sonogashira est donc obtenu en trois étapes à partir de l'acide résorcylique commercial **36**.

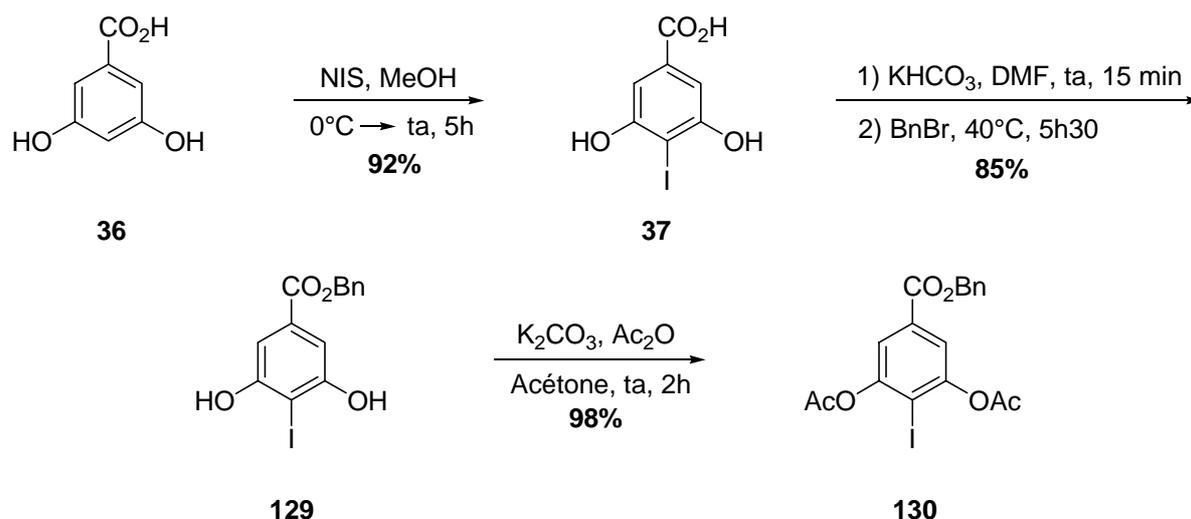


Schéma 12 : Formation de l'iodure aromatique.

Ce dernier est iodé en présence de *N*-iodosuccinimide<sup>[7]</sup> dans le méthanol. La fonction acide de l'iodure **37** ainsi formé est benzylé à l'aide d'hydrogénocarbonate de potassium et de bromure de benzyle.<sup>[11]</sup> Finalement, l'acétylation des fonctions hydroxyles, par de l'anhydride acétique en présence de carbonate de potassium dans l'acétone<sup>[12]</sup>, permet d'aboutir à l'iodure aromatique **130** avec un rendement global satisfaisant de 77%.

### 3. Couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira entre l'iodure aromatique benzylé **130** et les alcynes vrais *O*-protégés **31** et **125** a été réalisé dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre précédent (schéma 13).<sup>[6]</sup>

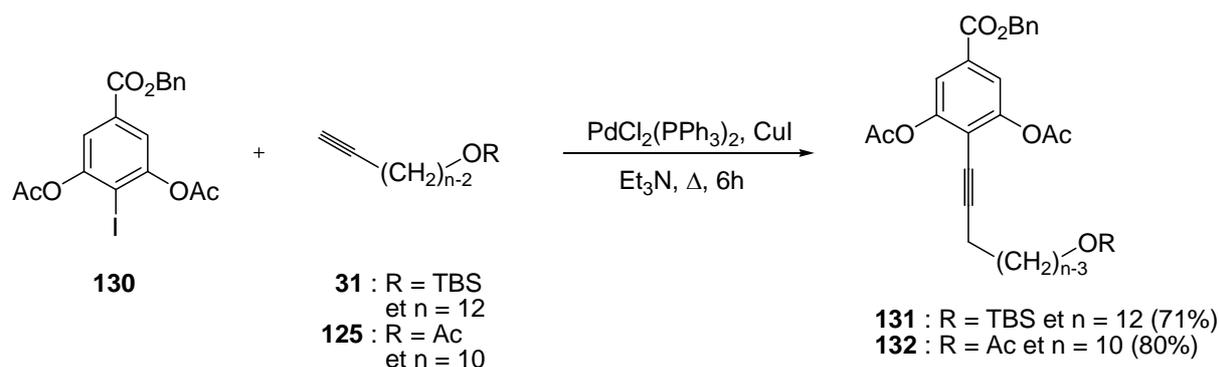


Schéma 13 : Couplage de Sonogashira.

Au bout de six heures de réaction, les produits de couplages **131** et **132** sont obtenus avec des rendements très satisfaisants. Cette réaction a également été effectuée avec l'iodure aromatique portant un ester méthylique au lieu du benzylique. Dans ces conditions, la réaction n'aboutit qu'à un rendement de 55% au bout de 24 heures. Il semblerait donc, que la présence de l'ester benzylique favorise la réaction de couplage.

## B. Couplage de Heck

Le couplage de Heck décarbonylant<sup>[5]</sup> va nous permettre de former la double liaison carbone-carbone de configuration *trans* afin d'aboutir au stilbène désiré, le resvératrol. Pour ce faire, il nous faut préalablement synthétiser les chlorures d'acides ainsi que les styrènes, nécessaires au couplage.

### 1. Synthèse des chlorures d'acides

Les chlorures d'acides utilisés pour le couplage de Heck sont obtenus selon le schéma réactionnel suivant (schéma 14) :

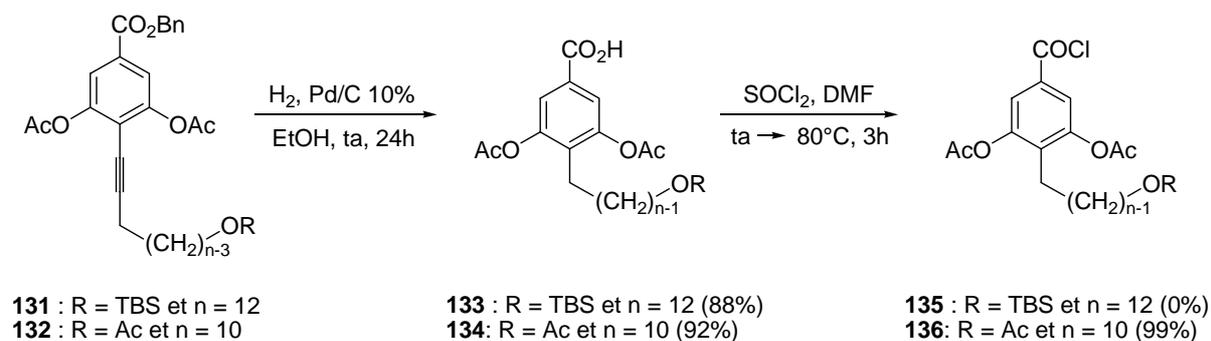
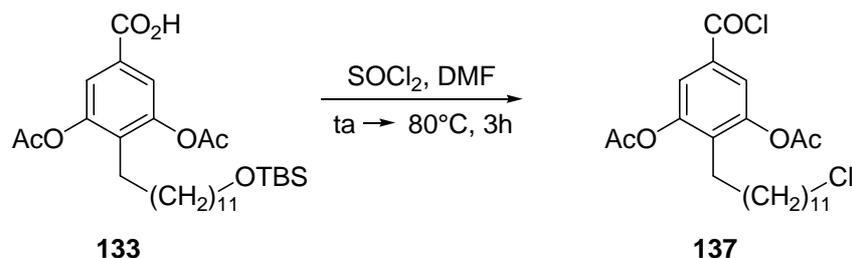


Schéma 14 : Formation des chlorures d'acides.

L'hydrogénation catalytique des produits de couplages **131** et **132** en présence de palladium sur charbon à 10%<sup>[13]</sup>, permet l'obtention des composés **133** et **134** de manière très satisfaisante. La chloration de la fonction acide à l'aide de chlorure de thionyle<sup>[14]</sup> s'effectue de façon quantitative dans le cas où le groupement R est un acétate (**136**). En revanche, le chlorure d'acide **135** (R = TBS) n'a pas été obtenu. Cependant, nous avons observé la formation du composé **137**, due à la labilité du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle dans les conditions réactionnelles utilisées, avec un rendement de 90% (schéma 15).

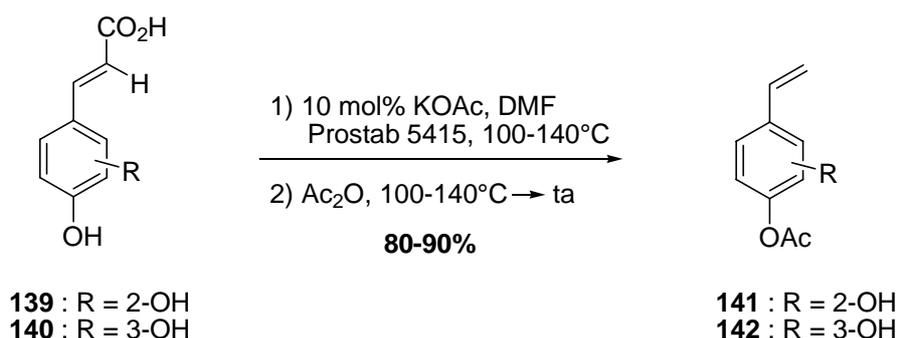


**Schéma 15** : Formation du dérivé chloré **137**.

## 2. Formation des styrènes disubstitués

Le 4-acétoxystyrène **138**, nécessaire à la formation du noyau du resvératrol est disponible commercialement.

La synthèse des styrènes diacétylés **141** et **142** a été décrite par Kunitsky et coll.<sup>[15]</sup> à partir des acides hydroxycinnamiques correspondants **139** et **140** en une seule étape selon le schéma réactionnel suivant (schéma 16) :



**Schéma 16** : Formation des styrènes disubstitués.

Les acides hydroxy-cinnamiques **139** et **140** sont en premier lieu décarboxylés en présence d'une quantité catalytique d'acétate de potassium et de Prostab® 5415, un inhibiteur de polymérisation, dans le diméthylformamide. Les styrènes correspondants ainsi formés sont acétylés *in situ* à l'aide d'anhydride acétique pour former les acétoxystyrènes **141** et **142** souhaités.

Pour l'obtention des RFA tétrahydroxylés nous utiliserons cette méthode afin de synthétiser les styrènes diacétylés nécessaires au couplage de Heck.

### 3. Couplage de Heck décarbonylant

Avant d'effectuer la réaction de Heck pour aboutir aux RFA, nous avons effectué une réaction test entre le chlorure d'acide **144** et le 4-acétoxystyrène **134** (schéma 17).

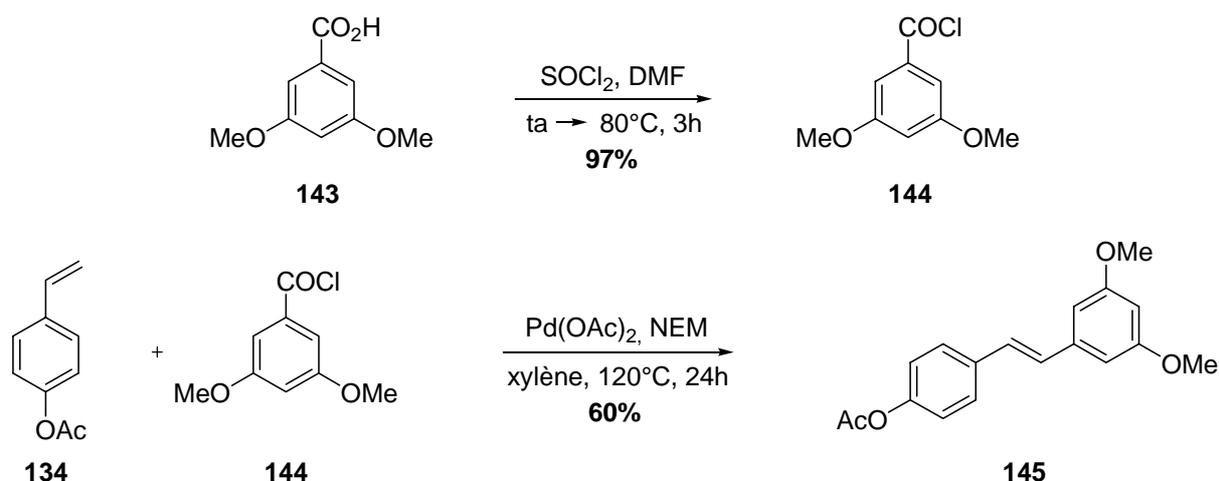


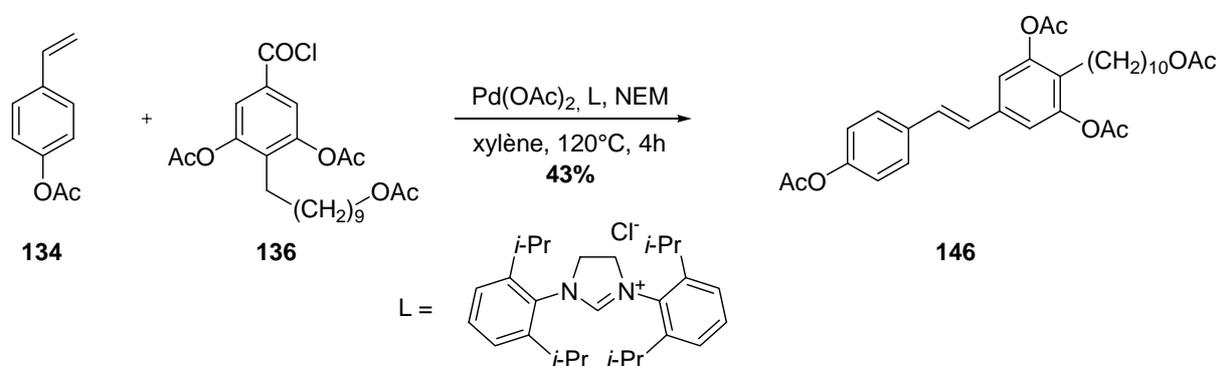
Schéma 17 : Couplage de Heck décarbonylant test.

Après obtention du chlorure d'acide **144** par réaction de chlorure de thionyle avec l'acide 3,5-diméthoxybenzoïque **143**, le couplage entre le 4-acétoxystyrène **134** et le chlorure d'acide ainsi formé s'effectue en présence d'acétate de palladium et de *N*-éthylmorpholine comme base dans le xylène à reflux. Le produit de couplage **145** est obtenu avec un rendement de 60% proche de celui de la littérature (75% au bout de dix-huit heures).

Andrus et al<sup>[5]</sup> ont montré qu'en remplaçant les groupements méthoxy présents sur le chlorure d'acide par des acétates, le temps de réaction passait de dix-huit à quatre heures, mais avec un rendement légèrement inférieur, de 63%.

Par ailleurs, ils ont récemment démontré<sup>[16]</sup> que l'utilisation de ligands de type carbène avec l'acétate de palladium, comme le chlorure de *N,N*-bis-(2,6-diisopropyl)dihydroimidazolium (L), permettait d'augmenter l'efficacité de réactions de couplage comme la réaction de Heck ou encore de Suzuki. En effet, l'utilisation de ce ligand (L) permet d'obtenir le produit de couplage avec un rendement de 73% au bout de quatre heures de réaction.

Ainsi, afin de former le RFA10 acétylé nous avons utilisé les mêmes conditions de couplage que celles décrites précédemment, à savoir de l'acétate de palladium (II) et de la *N*-éthylmorpholine dans le xylène. La seule différence réside dans l'utilisation du ligand L, le chlorure de *N,N*-bis-(2,6-diisopropyl)dihydroimidazolium (schéma 18).



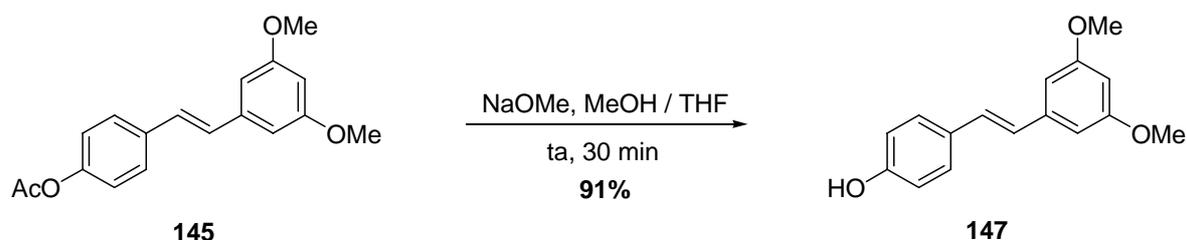
**Schéma 18** : Couplage de Heck décarbonylant

Au bout de quatre heures de réaction, le produit de couplage désiré **146** est obtenu avec un rendement de 43%. Ce résultat peut s'expliquer par une appréciation erronée de la quantité de chlorure d'acide restante dans le milieu réactionnel. Cependant, ce premier résultat est encourageant et suggère, qu'avec un temps de réaction plus long et une optimisation des conditions réactionnelles, une amélioration significative du rendement pourrait être obtenue.

#### 4. Déprotection des dérivés acétylés

Nous avons opté pour des conditions réactionnelles relativement douces afin de limiter les risques de dégradation.

Ainsi, notre choix s'est porté sur l'utilisation de méthanolate de sodium dans un mélange MeOH / THF : 1 / 1 à température ambiante (schéma 19).<sup>[1]</sup>



**Schéma 19** : Déprotection du composé **145**.

La déprotection du RFA10 acétylé **146** a été effectuée selon le même mode opératoire que celui décrit plus haut (schéma 20).

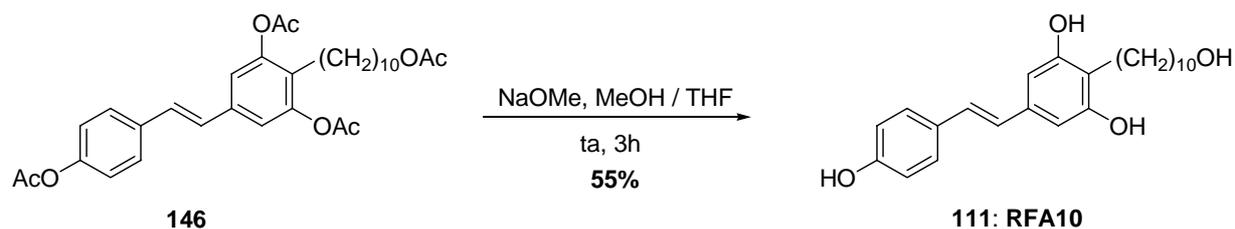


Schéma 20 : Formation du RFA10.

Le RFA10 **111** est formé avec un rendement de 55% après trois heures de réaction. Ce rendement moyen peut s'expliquer par un temps de réaction trop long, engendrant des phénomènes de dégradation. Ce temps semblait justifié dans la mesure où le suivi de la réaction par CCM indiquait, au bout d'une heure de réaction, la présence de deux composés, le RFA10 souhaité et un intermédiaire réactionnel partiellement déprotégé. Cependant, après trois heures, ce composé est toujours présent et un troisième produit apparaît. Après purification, nous nous sommes rendus compte que ce composé n'était pas un RFA partiellement déprotégé comme nous le pensions, mais un produit de dégradation, représentant environ 5%. Le troisième produit quant à lui est un dimère, également formé au cours de la déprotection des RFA méthoxylés.

Ces résultats nous laissent penser qu'un temps de réaction plus court est suffisant pour aboutir aux RFA avec des rendements largement supérieurs.

## V. Conclusion

Cette voie de synthèse des RFA, entièrement hydroxylés, (schéma 21) est caractérisée par deux étapes clés.

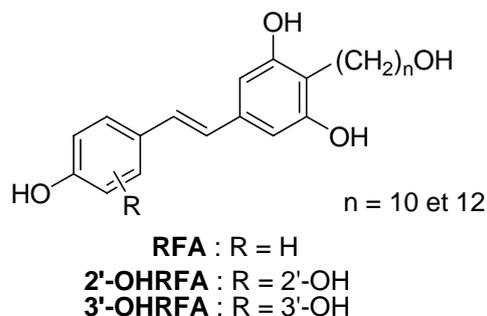


Schéma 21 : Structure des RFA entièrement hydroxylés.

La première étape consiste à greffer la chaîne  $\omega$ -alcanol par le couplage de Sonogashira et la seconde à former la double liaison carbone-carbone de configuration *trans* par un couplage de Heck décarbonylant, permettant l'obtention du noyau des stilbènes.

L'avantage de cette synthèse par rapport à la précédente décrite dans le chapitre I, est qu'elle comporte deux étapes en moins.

A ce jour, cette synthèse a pu être optimisée jusqu'à l'obtention du chlorure d'acide portant la chaîne  $\omega$ -hydroxylée protégée, nécessaire au couplage de Heck. Celui-ci a été obtenu avec un rendement de 56% sur six étapes. Les conditions réactionnelles optimales pour les deux dernières étapes de cette nouvelle voie de synthèse, à savoir le couplage de Heck et la déprotection, n'ont pas encore été déterminées par manque de temps.

Ces résultats préliminaires ont permis d'obtenir le RFA10 **111** avec un rendement de 13% sur huit étapes. Par la première voie de synthèse le RFA10 a été obtenu avec un rendement de 20% sur dix étapes. L'optimisation des deux dernières étapes devrait nous permettre d'augmenter ce rendement de façon significative et par la suite nous donner accès aux dérivés tétrahydroxylés que nous n'avons pas réussi à obtenir par la première stratégie de synthèse. Les RFA tétrahydroxylé, 2'-OHRFA et 3'-OHRFA (schéma 21) sont susceptibles de présenter une activité biologique aussi, voire plus intéressante, que celle observée pour les RFA.

## Références bibliographiques

- [1] Guiso, M.; Marra, C.; Farina, A. A new efficient resveratrol synthesis., *Tetrahedron Lett.*, **2002**. 43, 597-598.
- [2] Jeffery, T.; Ferber, B. One pot-catalyzed highly chemo-, regio-, and stereoselective synthesis of *trans*-stilbene derivatives. A concise and convenient synthesis of resveratrol., *Tetrahedron Lett.*, **2003**. 44, 193-197.
- [3] Yamada, Y. M. A.; Takeda, K.; Takahashi, H.; Ikegami, S. Assembled catalyst of palladium and non-cross-linked amphiphilic polymer ligand for the efficient heterogeneous Heck reaction., *Tetrahedron*, **2004**. 60, 4097-4105.
- [4] Ziegler, C. B.; Heck, R. F. Palladium-catalyzed vinylic substitution with highly activated aryl halides., *J. Org. Chem.*, **1978**. 43, 2941-2946.
- [5] Andrus, M. B.; Liu, J.; Meredith, E. L.; Nartey, E. Synthesis of resveratrol using a direct decarbonylative Heck approach from resorcylic acid., *Tetrahedron Lett.*, **2003**. 44, 4819-4822.

- [6] Yasuhara, A.; Kanamori, Y.; Kaneko, T.; Numata, A.; Kondo, Y.; Sakamoto, T. Convenient synthesis of 2-substituted indoles from 2-ethynyl-anilines with tetrabutylammonium fluoride., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**. 529-534.
- [7] Guerry, P.; Mohr, P.; Muller, M.; Mueller, W.; Pflieger, P. Substituted 5-benzyl-2,4-diaminopyrimidines., *PCT Int.*, **2001**. WO0132633.
- [8] Liao, Y.; Fathi, R.; Yang, Z. Convergent Solid-Phase Synthesis of Symmetrical Benzo[*b*]furan's Dimerizer., *J. Combinatorial Chem.*, **2003**. 5, 79-81.
- [9] Singh, R.; Just, G. Rates and Regioselectivities of the Palladium-Catalyzed Ethynylation of Substituted Bromo- and Dibromobenzenes., *J. Org. Chem.*, **1989**. 54, 4453-4457.
- [10] Hadfield, J. A.; McGown, A. T.; Butler, J. A High-Yielding Synthesis of the Naturally Occurring Antitumor Agent Irisquinone., *Molecules*, **2000**. 5, 82-88.
- [11] Guo, W.; Li, J.; Fan, N.; Wu, W.; Zhou, P.; Xia, C. A Simple and Effective Method for Chemoselective Esterification of Phenolic Acids., *Syn. Comm.s*, **2005**. 35, 145-152.
- [12] ten Brink, H. T.; Rijkers, D. T. S.; Kemmink, J.; Hilbers, H. W.; Liskamp, R. M. J. Ring-closing metathesis for the synthesis of side chain knotted pentapeptides inspired by vancomycin., *Org. Biomol. Chem.*, **2004**. 2, 2658-2663.
- [13] Young, D. J. Convenient Syntheses of [<sup>18</sup>O]Benzyl Alcohol and [<sup>13</sup>C-carboxy, <sup>18</sup>O<sub>1</sub>]Benzoic Acid of High Isotopic Purity., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, **2000**. 43, 121-126.
- [14] Pickaert, G.; Cesario, M.; Ziessel, R. A Convenient Protocol for the Synthesis of Ligands from a 4-Methyl-3,5-diacylaminophenyl Platform., *J. Org. Chem.*, **2004**. 69, 5335-5341.
- [15] Kunitsky, K.; Shah, M. C.; Shuey, S. W.; Trost, B. M.; Wagman, M. E. Method for preparing hydroxystyrenes and acetylated derivatives thereof., *PCT Int.*, **2005**. US 2005/0228191.
- [16] Andrus, M. B.; Song, C.; Zhang, J. Palladium-Imidazolium Carbene Catalyzed Mizoroki-Heck Coupling with Aryl Diazonium Ions., *Org. Lett.*, **2002**. 4, 2079-2082.

---

*Chapitre III*

**Etudes biologiques**

---

## I. Introduction

Les maladies du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques, sont principalement caractérisées par la perte fonctionnelle d'un type cellulaire nerveux donné.

Ces dernières années, une approche thérapeutique consistant à combattre directement cette dégénérescence neurale s'est développée avec la découverte de la présence de cellules souches dans le cerveau adulte, les cellules souches neurales. Ces cellules sont capables de régénérer les différents types cellulaires du système nerveux central. Les facteurs neurotrophiques, des protéines endogènes, permettent d'induire la différenciation des cellules souches neurales en cellules nerveuses (neurones, astrocytes, oligodendrocytes).

Par ailleurs, les maladies neurologiques sont très souvent accompagnées de phénomènes immunitaires et inflammatoires. Ainsi, il paraît également essentiel de protéger les différentes cellules du système nerveux de ces phénomènes.

Le système immunitaire du cerveau est en partie représenté par les microgliocytes formant la microglie. Les microgliocytes possèdent les caractéristiques morphologiques, immunologiques et fonctionnelles qui permettent de les apparenter à la lignée des monocytes-macrophages. Elles sont par conséquent capables de phagocyter. La microglie joue donc un rôle dans la régulation des processus inflammatoires non spécifiques et dans les réponses immunitaires spécifiques du SNC.<sup>ref</sup>

Les phénomènes inflammatoires sont également étroitement liés au stress oxydant que peuvent subir les cellules.

Aussi, une approche thérapeutique intéressante et innovante consiste à combiner les aspects de régénération nerveuse et de neuroprotection. L'utilisation de composés mimant les activités des facteurs neurotrophiques tout en réduisant les phénomènes inflammatoires en modulant l'activation microgliale et en réduisant le stress oxydant serait innovante et semble très prometteuse pour le traitement des diverses neuropathologies dégénératives.

Nous avons ainsi synthétisé plusieurs séries de molécules hybrides, les **Resveratrol Fatty Alcohols (RFA)** combinant l'activité neurotrophique d'une chaîne  $\omega$ -alcanol et l'effet neuroprotecteur d'un noyau de type resvératrol.

La capacité des différents **RFA** à moduler l'activation microgliale tout en protégeant les cellules nerveuses contre le stress oxydant ainsi que leur capacité à générer des cellules nerveuses fonctionnelles à partir de cellules souches neurales adultes, seront discutées dans cette partie.

## II. Projet d'étude

L'étude biologique de nos composés s'articule principalement autour de quatre axes :

### A. Etudes des capacités anti-oxydantes des RFA

Les maladies du système nerveux central sont étroitement liées au stress oxydant. Le stress oxydant est défini comme une surproduction d'espèces oxygénées actives (EOA) telles que les radicaux hydroxyle, monoxyde d'azote et peroxydite. Ces espèces sont constamment produites dans l'ensemble de l'organisme. Leur production peut être contrôlée par des systèmes de défense composés principalement d'enzymes (glutathion peroxydase,...) et de molécules anti-oxydantes (vitamines, flavonoïdes, ...). Les EOA se sont avérées être impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire et des processus inflammatoires observés au cours des neuropathies dégénératives.

L'implication du stress oxydant dans les différentes pathologies dégénératives du cerveau nous a conduit à synthétiser les RFA contenant le noyau du resvératrol connu pour son activité anti-oxydante et anti-inflammatoire.

Les tests d'anti-oxydation mis en œuvre ont permis de mettre en évidence un pouvoir neuroprotecteur potentiel des différents RFA *in vivo*.

### B. Effets des différents RFA au cours de l'activation microgliale

Les différentes séries de RFA synthétisées seront testées afin de déterminer leurs effets sur l'activation microgliale ainsi que leur potentiel anti-inflammatoire.

Les études biologiques *in vivo* sur la microglie sont difficiles à mettre en œuvre du fait de la complexité cellulaire du tissu nerveux empêchant le contrôle des différentes conditions expérimentales. Les travaux effectués au sein du Laboratoire de NeuroBiologie de l'Université du Luxembourg, sont réalisés sur des modèles *in vitro*, à l'aide desquels il est possible d'étudier les réactions inflammatoires du système nerveux central. Les différentes expériences sont ainsi réalisées sur des cellules MMGT-12, une lignée de cellules microgliales immortalisées par transfection.<sup>[1]</sup> Lorsque ces cellules sont mises en présence d'activateurs comme du lipopolysaccharide (LPS), de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou de Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), elles présentent des profils d'activation similaires à la microglie primaire.<sup>[2]</sup>

Les premières séries d'expériences consisteront à évaluer la capacité des différents RFA à diminuer, voire à inhiber la production de différentes cytokines et chimiokines, comme le monoxyde d'azote ou encore le TNF- $\alpha$ , dans la microglie activée. Nous évaluerons également la capacité de nos composés à induire de la phagocytose (digérer des petits bouts de membranes cellulaires ou des cellules entières).

### **C. Effets neurotrophiques des RFA : Différenciation des cellules souches neurales**

La découverte de la présence de cellules souches dans le cerveau adulte<sup>[3, 4]</sup> ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement des diverses neuropathologies dégénératives. En effet, les cellules souches sont capables de donner naissance aux deux principaux types cellulaires nerveux, les neurones et les cellules gliales. Ainsi leur utilisation permettrait de remplacer les cellules mortes ou lésées.

Les différentes séries de RFA seront testées sur le modèle des neurosphères afin d'évaluer leur aptitude à induire la différenciation des cellules souches neurales.

Les neurosphères sont obtenues à partir de cellules provenant du télencéphale d'embryons de souris cultivés en milieu défini contenant de l'EGF (Epidermal Growth Factor), un facteur de croissance. En présence de ce dernier les cellules souches neurales survivent et prolifèrent pour former des agrégats de cellules indifférenciées flottant dans le milieu de culture : les neurosphères.<sup>[5]</sup>

### **D. Implication de la voie de signalisation Notch**

La voie de signalisation Notch intervient dans de nombreux processus développementaux, tels le choix de l'identité cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose.<sup>[6]</sup>

Au cours du développement du système nerveux central (SNC), la voie Notch est impliquée dans le devenir cellulaire, c'est-à-dire la spécialisation en neurone ou en cellules gliales.

Dans le cerveau adulte, la voie de signalisation Notch joue un rôle important dans le maintien de la plasticité neuronale, des neurites et de leur croissance ainsi que dans la différenciation des cellules gliales. En effet, les études menées chez les mammifères montrent que l'inhibition de la voie Notch stimule la neurogenèse.<sup>[7]</sup> Au contraire, lorsque la voie Notch est activée, elle stimule la gliogenèse (formation des cellules gliales).<sup>[8]</sup>

Il a été démontré que la voie Notch module l'activité de la microglie.<sup>[9]</sup> En effet, lorsque la voie Notch est activée, une diminution de l'activation de la microglie est observée.

Nous discuterons ainsi de l'implication probable des RFA dans la modulation de la voie de signalisation Notch.

### III. Capacité anti-oxydante des différents RFA

Le test le plus fréquemment rencontré dans la littérature, pour déterminer l'activité anti-oxydante d'un composé et notamment celle du resvératrol, est le test au DPPH (2,2'-di(4-*tert*-octylphényl)-1-picrylhydrazyl).<sup>[10]</sup> Un autre test de référence est le test à l'ABTS ([2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]).<sup>[11]</sup> Ces deux méthodes sont basées sur la neutralisation de radicaux.

Afin de déterminer la capacité anti-oxydante des différents RFA nous avons fait appel à ces deux tests de référence.

#### A. Test au DPPH

##### 1. Principe du test

Le 2,2'-di(4-*tert*-octylphényl)-1-picrylhydrazyl (DPPH)<sup>[10]</sup> (schéma 1) est un radical stabilisé qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517 nm. La forme réduite du radical n'absorbe plus dans la gamme des longueurs d'ondes du visible.

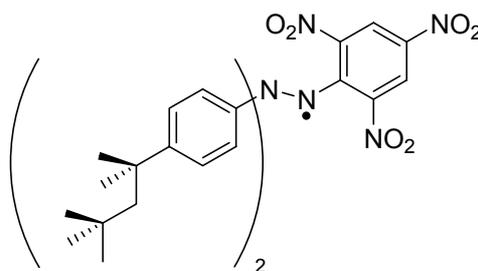
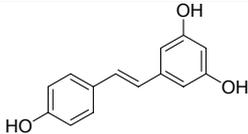
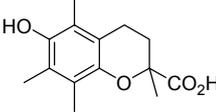
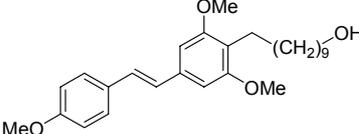
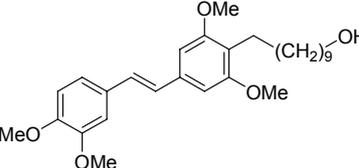
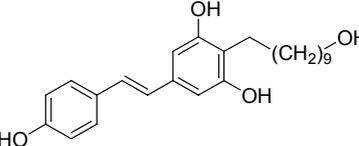
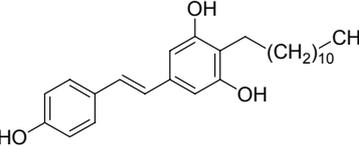


Schéma 1 : 2,2'-di(4-*tert*-octylphényl)-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Le test au DPPH consiste à mettre le radical DPPH en présence de molécules dites « anti-oxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH. La forme réduite n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde. Le résultat est donné par une mesure de la densité optique à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## 2. Résultats – Discussion

La capacité anti-oxydante de nos différents composés a été déterminée à partir des  $CI_{50}$ , les concentrations inhibitrices 50, c'est-à-dire la concentration en produit nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les  $CI_{50}$  ont été déterminées pour tous les composés et à des temps différents (30 min, 45 min, 1h et 2h). Les fluctuations observées pour un même composé avec différentes longueurs de chaîne sont minimes. En outre, nous avons observé une corrélation entre la capacité anti-oxydante et le temps. Pour certains composés il faut un temps minimum de 1 heure pour pouvoir déterminer une  $CI_{50}$ . Ainsi, pour l'analyse des résultats nous nous sommes limités à un temps donné (1 heure) et à une longueur de chaîne pour chaque série (tableau 1).

| Entrée | Composé            | Structure  | $CI_{50}$ (mM) | Incertitude |
|--------|--------------------|--|----------------|-------------|
| 1      | Resvératrol        |    | 4,4            | ± 0,02      |
| 2      | Trolox®            |   | 0,23           | ± 0,01      |
| 3      | 3,4',5MRFA10 87    |  | non atteinte*  | -           |
| 4      | 3,3',4',5MRFA10 94 |  | non atteinte*  | -           |
| 5      | RFA10 111          |  | 9,5            | ± 0,5       |
| 6      | RFC12** 148        |  | non atteinte*  |             |

**Tableau 1** :  $CI_{50}$  (mM) des différents RFA après 1h en présence de DPPH. Chaque valeur est moyennée sur trois manipulations indépendantes. \* : activité anti-oxydante détectée mais n'atteignant pas la  $CI_{50}$ . \*\* RFC12 : Composé synthétisé selon le même procédé que les autres RFA.

Le resvératrol (entrée 1) et le Trolox<sup>®</sup> (entrée 2) sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes et sont donc utilisés comme contrôles positifs. L'activité anti-oxydante des RFA méthoxylés **87** (entrée 3) et **94** (entrée 4) a été détectée mais la réduction de 50% du radical DPPH n'a pas été atteinte (CI<sub>50</sub>). Par contre, les dérivés entièrement déméthylés comme le RFA10 **111** (entrée 5) présentent une capacité anti-oxydante comparable à celle du resvératrol. Ces résultats confirment que les fonctions hydroxyles libres sont indispensables à l'activité.

Le composé **148**, le RFC12 (entrée 6), a été synthétisé afin d'évaluer le rôle de la fonction ω-alcool sur le pouvoir anti-oxydant. Le test au DPPH ne nous a pas permis de déterminer une CI<sub>50</sub> pour ce composé. Ce résultat montre que l'alcool primaire en bout de chaîne participe à l'activité anti-oxydante.

Ces résultats intéressants nous ont amenés à évaluer l'activité anti-oxydante de nos composés par un test similaire mais plus sensible. Bien que le test au DPPH soit largement appliqué dans la littérature, celui-ci n'est pas très représentatif du stress oxydant au sein du SNC dans la mesure où il est basé sur l'utilisation d'un radical très encombré. Or, l'utilisation de radicaux peu ou pas encombrés serait plus proche de la réalité. Aussi, nous nous sommes proposés d'utiliser le test à l'ABTS basé sur la neutralisation des radicaux hydroxyles ·OH. Par ailleurs, le test au DPPH est effectué dans l'éthanol alors que le test à l'ABTS est réalisé dans un milieu hétérogène eau/éthanol, conditions plus proches des conditions physiologiques.

## B. Test à l'ABTS

### 1. Principe du test

La molécule d'ABTS ([2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)])<sup>[111]</sup> (schéma 2) est capable de réagir avec des radicaux, tels que les radicaux hydroxyles.

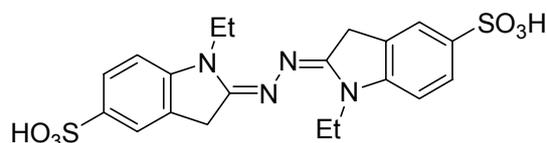


Schéma 2 : [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS)

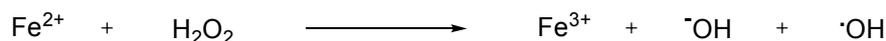
Ce test est basé sur une propriété intrinsèque de la molécule d'ABTS. En effet, en présence de radicaux hydroxyles l'ABTS est oxydé en un radical ABTS<sup>·+</sup> absorbant à 405 nm (coloration verte) (schéma 3).



**Schéma 3** : Génération du radical cation ABTS<sup>·+</sup>.

Ainsi, si l'on met en présence une molécule dite anti-oxydante, donc capable de neutraliser les radicaux hydroxyles, il s'établit une compétition entre l'ABTS et la molécule anti-oxydante pour les radicaux hydroxyles qui va se traduire par une diminution de l'absorbance à 405 nm.

Les radicaux hydroxyles  $\cdot\text{OH}$  sont générés *in situ* par la réaction de Fenton (schéma 4).



**Schéma 4** : Réaction de Fenton.

Après deux heures d'incubation, le résultat est donné par une mesure de la densité optique à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## 2. Résultats – Discussion

Les résultats sont indiqués sous forme de  $\text{CI}_{50}$  comme précédemment et représentés dans le tableau 2.

Les  $\text{CI}_{50}$  obtenues sont de manière générale beaucoup plus faibles que lors du test au DPPH. Ces valeurs confirment la plus grande sensibilité du test à l'ABTS.

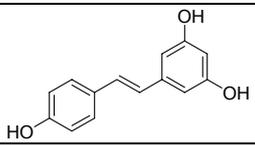
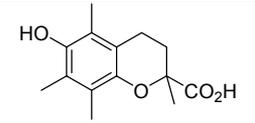
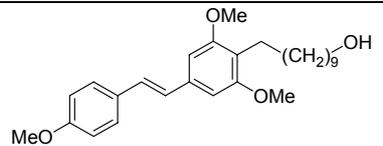
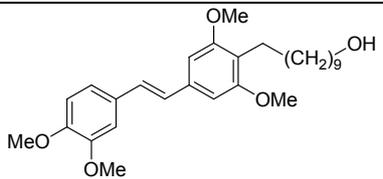
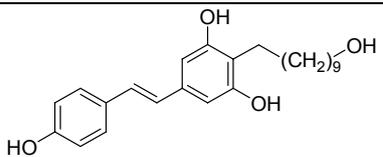
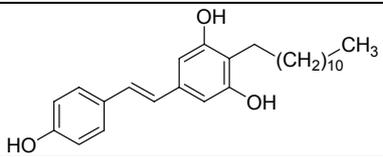
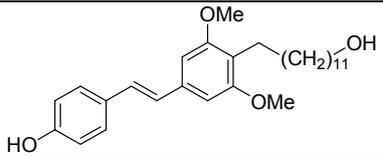
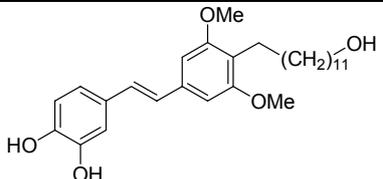
Cependant, en ce qui concerne les dérivés méthoxylés (entrée 3 et 4), la  $\text{CI}_{50}$  n'a toujours pas pu être atteinte bien que l'activité anti-oxydante soit détectée de façon plus nette que précédemment. Ces résultats confirment bien que les fonctions hydroxyles sont nécessaires au pouvoir anti-oxydant.

Le RFA10 (entrée 5) présente, comme précédemment, une activité anti-oxydante du même ordre de grandeur que le resvératrol. La nécessité de la présence de l'alcool terminal a également à nouveau été démontrée (entrée 6).

La légère différence entre le resvératrol et les RFA, et notamment le RFA10, peut principalement s'expliquer par une solubilité plus faible des RFA dans le milieu eau/éthanol par rapport au resvératrol, due à la longue chaîne hydrocarbonée.

Dans la littérature<sup>[12]</sup>, il a été démontré que l'activité anti-oxydante des dérivés du resvératrol est principalement due à la fonction hydroxyle en position 4'. Ainsi, nous avons synthétisé le dérivé **108** afin d'évaluer son pouvoir anti-oxydant. La capacité anti-oxydante de ce dernier

(entrée 7) est intéressante mais plus faible que le RFA10 comportant trois fonctions hydroxyles (entrée 5).

| Entrée | Composé             | Structure  | CI <sub>50</sub> (mM) | Incertitude |
|--------|---------------------|--|-----------------------|-------------|
| 1      | Resvératrol         |    | 0,03                  | ± 0,008     |
| 2      | Trolox®             |    | 0,6                   | ± 0,04      |
| 3      | 3,4',5MRFA10 87     |    | non atteinte*         | -           |
| 4      | 3,3',4',5MRFA10 94  |   | non atteinte*         | -           |
| 5      | RFA10 111           |  | 0,047                 | ± 0,008     |
| 6      | RFC12* 148          |  | 0,23                  | ± 0,01      |
| 7      | 3,5MRFA12 108       |  | 0,75                  | ± 0,015     |
| 8      | 3'-OH-3,5MRFA12 109 |  | non atteinte**        | -           |

**Tableau 2** : CI<sub>50</sub> (mM) des différents RFA après 2h en présence d'ABTS. Chaque valeur est moyennée sur trois manipulations indépendantes. \* : activité anti-oxydante détectée mais n'atteignant pas la CI<sub>50</sub>. \*\* La CI<sub>50</sub> n'a pu être déterminée en raison d'une coloration rose parasite.

L'activité anti-oxydante du composé **109** (entrée 8) a été détectée mais nous n'avons pas pu déterminer de  $CI_{50}$ . Nous aurions dû observer une capacité anti-oxydante similaire, voir plus importante que celle obtenue pour le dérivé **108** puisque la seule différence entre les deux composés est une fonction hydroxyle supplémentaire. Lors du test, du composé **109**, nous n'avons pas observé une disparition de la coloration verte, donc une disparition du radical cation  $ABTS^+$ , mais une coloration rose. Cette dernière est probablement due à la formation de la diquinone qui absorbe dans cette même plage et donc fausse le résultat. Le composé **109** présente une activité anti-oxydante, mais elle ne peut être établie par un test basé sur la colorimétrie.

### C. Conclusion

Cette étude physicochimique a permis de montrer la capacité anti-oxydante de certains de nos composés comparable à celle du resvératrol, un anti-oxydant puissant. Nous avons montré que les dérivés méthoxylés n'ont pas de pouvoir anti-oxydant. Ce résultat confirme que les fonctions hydroxyles « libres » sont primordiales pour l'activité.

Par ailleurs, nous avons pu remarquer que l'alcool terminal sur la chaîne hydrocarbonée participe à l'activité anti-oxydante.

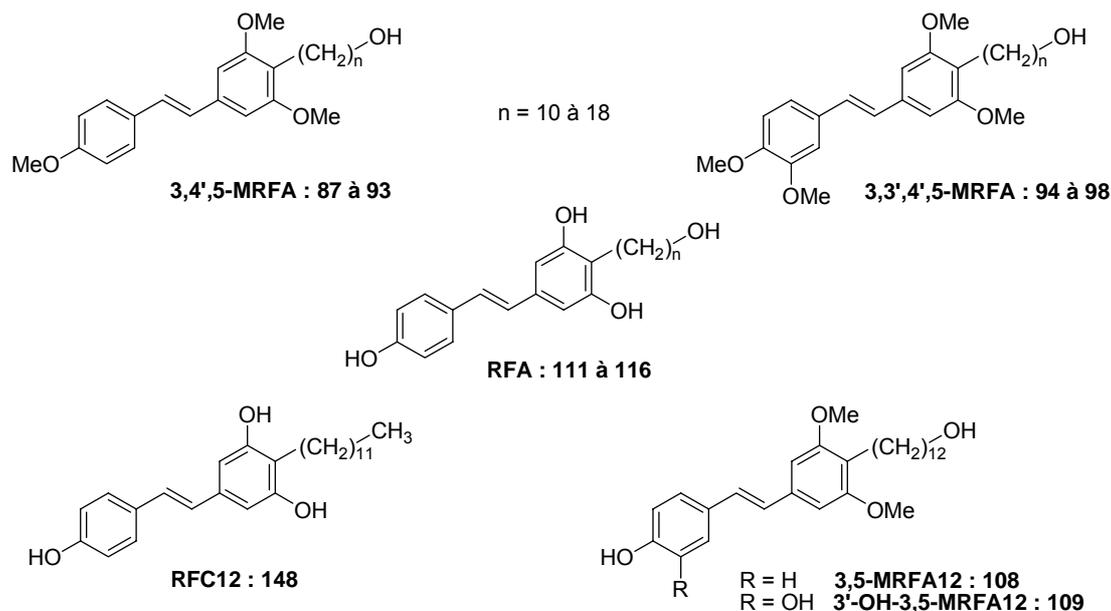
## IV. Modulation de l'activation microgliale

Les tests effectués, afin de déterminer la capacité des différents RFA à moduler l'activation microgliale, ont été réalisés sur des cellules MMGT-12, une lignée de cellules microgliales immortalisées par transfection.<sup>[1]</sup>

Ces travaux ont été effectués au sein du Laboratoire de NeuroBiologie de Luxembourg avec la participation du doctorant Alessandro Michelucci et du Dr. Eleonora Morga.

### A. Tests de toxicité : Test au MTT

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de toxicité adéquats afin de nous assurer qu'aucune mort ou prolifération cellulaire ne fausse les résultats. Les structures des différents alcools gras resvératroliques testés sont les suivantes (schéma 5) :



**Schéma 5** : Structure des différents RFA testés.

## 1. Principe du test

Afin de voir si nos composés présentent une certaine toxicité, un test au MTT basé sur la réduction du bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par la déshydrogénase mitochondriale dans les cellules vivantes est réalisé. Le MTT qui est jaune au départ est clivé par la déshydrogénase en cristaux bleu formazan. La lecture de l'absorbance (DO) est effectuée à 540 nm.

## 2. Résultats – Discussion

Les tests de toxicité ont été réalisés aux concentrations de  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  et  $5 \cdot 10^{-6}$  M (les résultats graphiques ne sont pas représentés).

### *Dérivés méthoxylés*

- *Dérivés triméthoxylés (3,4',5MRFA)* : Les 3,4',5MRFA10 et 3,4',5MRFA12 ne présentent aucune toxicité aux concentrations testées. En revanche, pour les homologues à 14, 16 et 18 atomes de carbone une toxicité plus ou moins importante apparaît à  $10^{-6}$  M.

- *Dérivés tétraméthoxylés (3,3',4',5MRFA)* : les résultats obtenus sont identiques à ceux de la série triméthoxylée. En effet, les 3,3',4',5MRFA10 et 3,3',4',5MRFA12 ne sont pas

toxiques aux concentrations utilisées. Les dérivés à 14, 16 et 18 carbones sont toxiques dès la concentration de  $10^{-6}$ M.

Ces résultats montrent, que l'augmentation de la longueur de la chaîne induit l'apparition d'une toxicité plus ou moins importante à partir de  $10^{-6}$ M.

#### ***Dérivés partiellement et entièrement déméthylés***

- *Dérivés partiellement déméthylés (3,5MRFA12 et 3'-OH-3,5MRFA12)* : Le 3,5MRFA12 ne présente aucune toxicité aux différentes concentrations testées. Cependant, le 3'-OH-3,5MRFA12 comportant une fonction hydroxyle supplémentaire est toxique dès  $10^{-6}$ M.

- *Dérivés entièrement déméthylés (RFA et RFC12)* : Les différents RFA **111** à **116** ne sont pas toxiques quelque soit la longueur de la chaîne  $\omega$ -hydroxylée testée. Le composé analogue aux RFA, mais sans la fonction  $\omega$ -alcanol, le RFC12 n'est pas toxique non plus aux concentrations testées.

### **3. Conclusion**

Ces tests préliminaires de survie ont permis de montrer que pour les séries méthoxylées la toxicité apparaissait avec l'augmentation de la longueur de la chaîne  $\omega$ -hydroxylée. En outre, les RFA, les dérivés totalement déméthylés ne présentent aucune toxicité quelque soit la longueur de cette chaîne. La toxicité proviendrait donc des groupements méthoxy présents sur le noyau stilbène.

## **B. Monoxyde d'azote**

L'activité de l'enzyme NO-synthase de type II (NOS II) ou NOS inductible (iNOS) représente un des paramètres classiques pour définir l'activation microgliale et de façon plus générale les différents processus inflammatoires. Cet enzyme est responsable de la synthèse du radical monoxyde d'azote NO $\cdot$  en grande quantité au cours de l'activation inflammatoire.

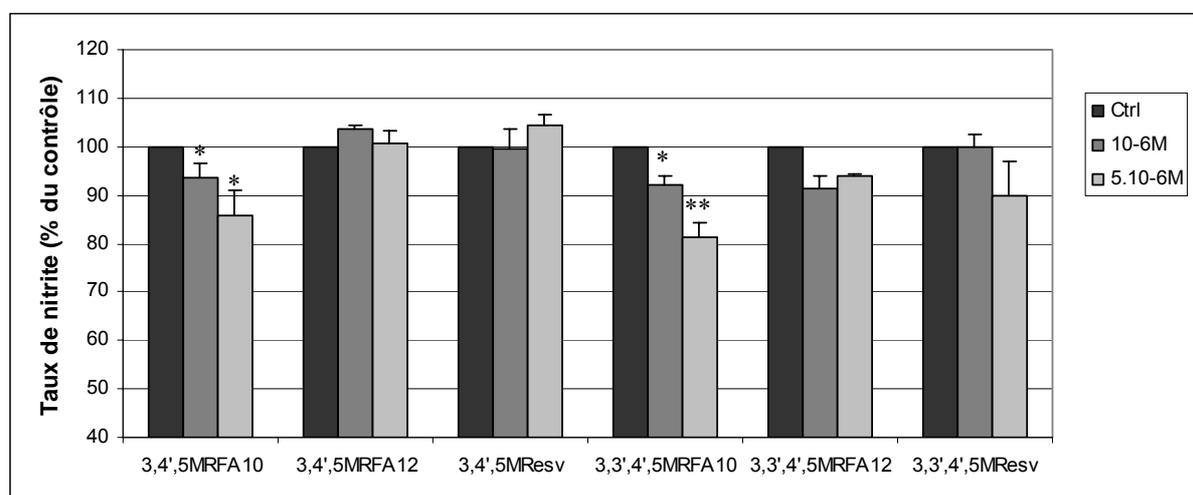
Une activation de 24 à 48 heures par du Lipopolysaccharides (LPS) ou de l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), entraîne une forte augmentation de l'expression de ce radical. Ce dernier se dégrade rapidement en culture pour former l'ion nitrite.

## 1. Mesure du taux de NO

Un dosage par colorimétrie du nitrite, le test de Griess, permet de déterminer de façon indirecte des taux de NO dans les milieux de cultures.

Dans les expériences réalisées, les cellules MMGT-12 ont été prétraitées avec les différents RFA à  $5 \cdot 10^{-6}$  et  $10^{-6}$ M. Après une heure, les cultures ont été activées par l'ajout de LPS (figure 1).

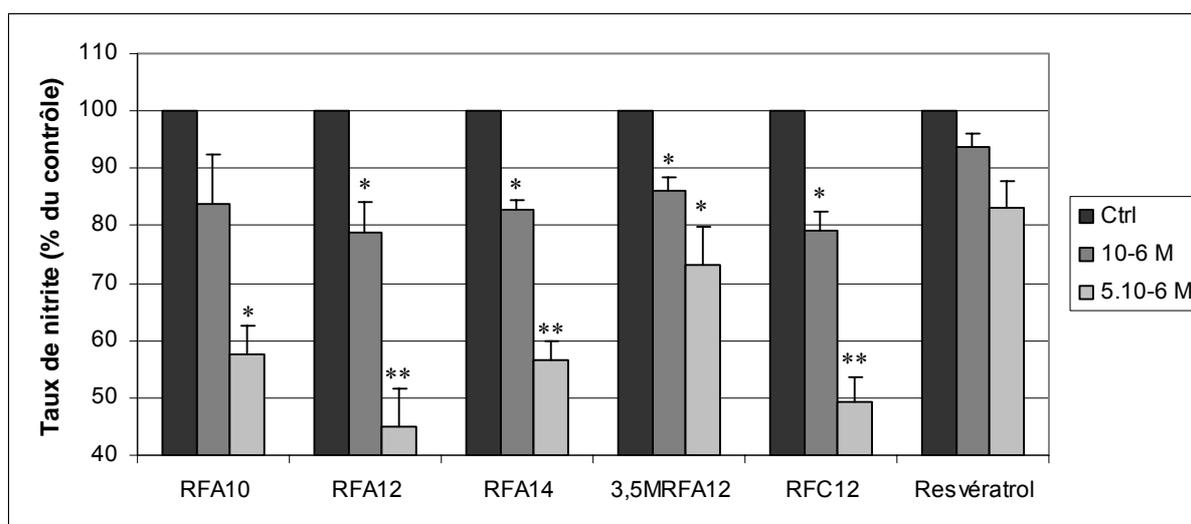
Dans un premier temps nous avons prétraité les cellules MMGT-12 avec les deux séries de RFA méthoxylés, les 3,4',5MRFA et les 3,3',4',5MRFA à  $5 \cdot 10^{-6}$  et  $10^{-6}$ M. Les concentrations en nitrite après 48 heures d'activation sont représentées en pourcent par rapport au contrôle (100% = 15,02 nmol/mL de  $\text{NO}_2^-$ ).



**Figure 1** : Effet des 3,4',5MRFA10 et 3,4',5MRFA12, 3,3',4',5MRFA10 et 3,3',4',5MRFA12 et des analogues tri- et tétraméthoxylés du resvératrol (3,4',5MRResv et 3,3',4',5MRResv) sur la production de  $\text{NO}_2^-$  dans les cellules MMGT-12 en présence de LPS (0,01  $\mu\text{g/mL}$ ). Les surnageants sont récupérés après 48h d'incubation à 37°C. L'accumulation de  $\text{NO}_2^-$  est exprimée en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes (n = 3). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (0,01  $\mu\text{g/mL}$  LPS ; 100% = 15,02 nmol/mL de  $\text{NO}_2^-$ ). \* p < 0,05 et \*\* p < 0,01 les taux de  $\text{NO}_2^-$  sont significativement différents du contrôle (test de Student).

A la concentration de  $10^{-6}$ M, seuls les 3,4',5MRFA10 et 3,3',4',5MRFA10 induisent une légère baisse d'environ 10% du taux de monoxyde d'azote. A  $5 \cdot 10^{-6}$ M, ce sont ces deux composés qui sont toujours les plus actifs avec respectivement des baisses de 10 et 20%. De manière générale les composés tétraméthoxylés sont plus actifs que les dérivés triméthoxylés.

Les résultats obtenus pour la série des dérivés partiellement ou entièrement déméthoxylés, les 3,5MRFA12, RFA10, RFA12, RFA14 et RFC12, sont représentés comme précédemment en pourcent par rapport au contrôle (100% = 5,57 nmol/mL de  $\text{NO}_2^-$ ) du taux de nitrite (figure 2). Tous les composés testés sont plus actifs que le resvératrol. Dans la série des RFA, le RFA12 induit la plus forte baisse (50%) du taux de  $\text{NO}_2^-$  à  $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ . Le 3,5MRFA12 ne comportant qu'une seule fonction hydroxyle libre n'induit qu'une baisse de l'ordre de 20% à cette concentration. Finalement, le RFC12, composé analogue au RFA12 mais sans la fonction  $\omega$ -alcool, se comporte comme le RFA12 (diminution de 50% environ).



**Figure 2** : Effet des RFA10 à RFA14, du 3,5MRFA12, du RFC12 et du resvératrol sur la production de  $\text{NO}_2^-$  dans les cellules MMGT-12 en présence de LPS (0,01  $\mu\text{g/mL}$ ). Les surnageants sont récupérés après 48h d'incubation à 37°C. L'accumulation de  $\text{NO}_2^-$  est exprimée en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes ( $n = 3$ ). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (0,01  $\mu\text{g/mL}$  LPS ; 100% = 5,57 nmol/mL de  $\text{NO}_2^-$ ). \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ , les taux de  $\text{NO}_2^-$  sont significativement différents du contrôle (test de Student).

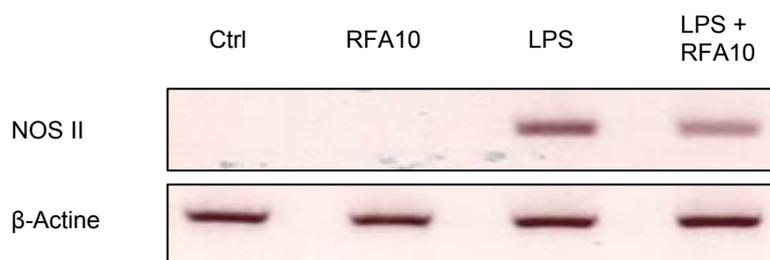
Ces tests ont permis de montrer qu'au sein d'une même série de composés l'activité était dépendante de la longueur de la chaîne  $\omega$ -hydroxylée. En effet, en ce qui concerne les RFA triméthoxylés, le composé le plus actif est celui comportant 12 atomes de carbone sur la chaîne latérale, le 3,4',5MRFA12. Le même résultat a été observé pour la série des RFA puisque le composé le plus actif est le RFA12. Par ailleurs, la présence des fonctions hydroxyles semble nécessaire pour induire une diminution du taux de nitrite importante. En effet, les RFA permettent une baisse plus importante (50%) que leurs analogues triméthoxylés (20%).

De plus, l'alcool  $\omega$ -hydroxylé à 12 atomes de carbone, le 1-dodécanol, n'a aucun effet sur la production de NO. Le resvératrol quant à lui présente moins d'effet que nos molécules

hybrides. Ces résultats montrent que la combinaison de la chaîne et du noyau du resvératrol est importante afin d'obtenir une activité plus forte.

## 2. Dosage de l'ARN<sub>m</sub> de la NOS II (iNOS)

Le mode d'action de nos composés et notamment du RFA10, un des composés les plus actifs, sur la diminution du taux de NO au sein de la microglie activée, a été étudié par un dosage de l'ARN<sub>m</sub> de la NOS II (iNOS). Des estimations par RT-PCR du taux de transcription du gène de la NOS II ont été effectuées à partir de cultures de cellules MMGT-12 prétraitées par du RFA10 à la concentration de  $5 \cdot 10^{-6}$ M. Après une heure, les cultures ont été activées par l'ajout de 0,01 µg/mL de LPS. L'expression de l'ARN<sub>m</sub> de la NOS II a été évaluée 6 heures après activation.



**Figure 3** : Effet du RFA10 sur l'expression du taux de transcription de l'ARN<sub>m</sub> de la NOS II par RT-PCR dans les cellules MMGT-12 après 6 heures d'incubation en absence ou présence de LPS (0,01 µg/mL). Le nombre de cycle de PCR est de 30 pour la NOS II et de 25 pour la β-actine.

La microglie non activée (Ctrl) n'exprime pas le gène codant pour la NOS II mais une activation par le LPS induit une forte expression de ce gène (figure 3). En présence de RFA10, le taux de transcription de l'ARN<sub>m</sub> de la NOS II dans la microglie activée est diminué.

Ainsi, nous pouvons conclure que le RFA10 agit au niveau de la transcription du gène codant pour la NOS II.

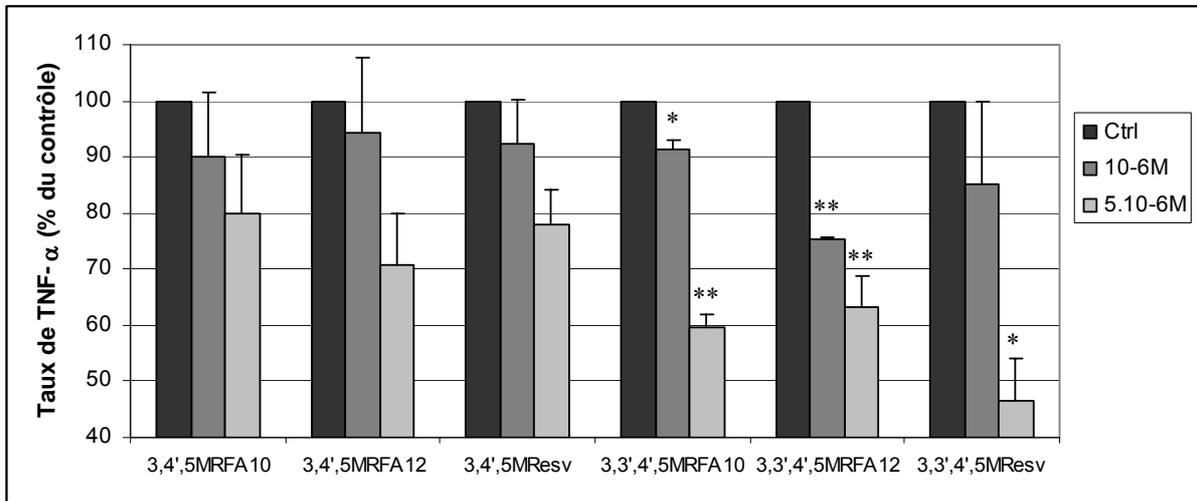
## C. Protéine TNF-α

La production de TNF-α est également un des paramètres caractérisant l'activation microgliale et les processus inflammatoires.<sup>[2]</sup> En effet, la microglie au repos n'exprime pas cette cytokine. Cependant, une activation par du LPS engendre une synthèse importante de cette protéine.

### 1. Mesure du taux de TNF- $\alpha$

Dans les expériences effectuées, les cellules MMGT-12 ont été prétraitées avec respectivement du 3,4',5MRFA10, 3,4',5MRFA12, 3,4',5MResvératrol, 3,3',4',5MRFA10, 3,3',4',5MRFA12 et du 3,3',4',5MResvératrol à  $10^{-6}$ M et  $5.10^{-6}$ M. Après une heure d'incubation, les cultures cellulaires ont été activées par l'ajout de 0,01  $\mu$ g/mL de LPS. Les concentrations en protéine TNF- $\alpha$  ont été déterminées après 24 heures d'activation par un test ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (100% = 208,05 pg/mL de TNF- $\alpha$ ) (figure 4).

Le Test ELISA est un test immunologique destiné à doser une protéine donnée dans un liquide.

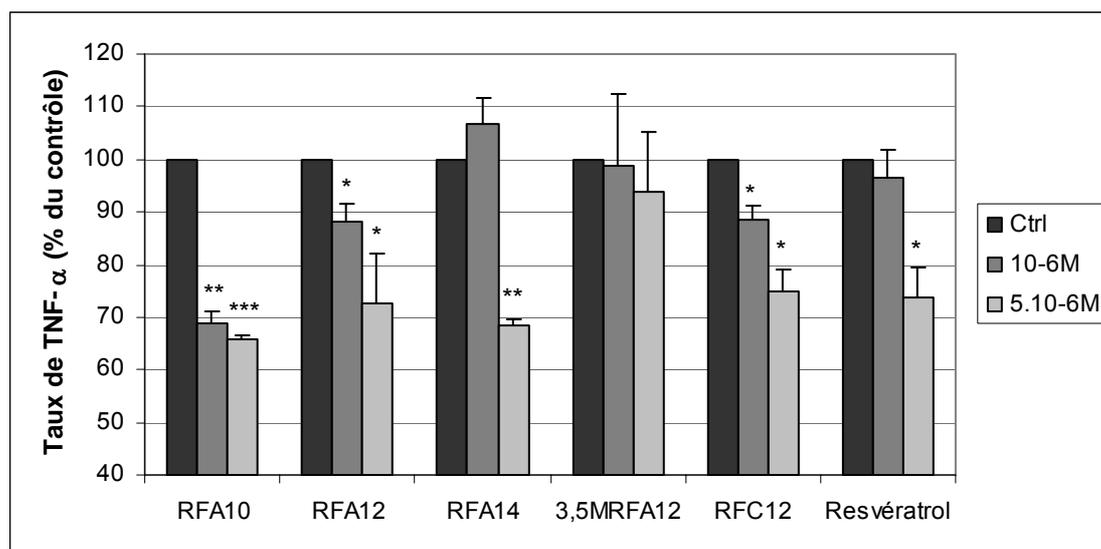


**Figure 4** : Effet des 3,4',5MRFA10 et 3,4',5MRFA12, des 3,3',4',5MRFA10 et 3,3',4',5MRFA12 et des analogues tri- et tétraméthoxylés du resvératrol (3,4',5MResv et 3,3',4',5Mresv) sur la production de TNF- $\alpha$  dans les cellules MMGT-12 en présence de LPS (0,01  $\mu$ g/mL). Les surnageants sont récupérés après 24h d'incubation à 37°C. L'accumulation de TNF- $\alpha$  est exprimée en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes (n = 3). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (0,01  $\mu$ g/mL LPS ; 100% = 208,05 pg/mL de TNF- $\alpha$ ). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 et \*\*\* p < 0,001, les taux de TNF- $\alpha$  sont très significativement différents du contrôle (test de Student).

A la concentration de  $10^{-6}$ M, seul le 3,3',4',5MRFA12 permet d'induire une diminution significative (25%) du taux de TNF- $\alpha$ . En outre, à  $5.10^{-6}$ M la plupart des composés induisent une baisse plus ou moins significative. En effet, dans la série des triméthoxylés, le 3,4',5MRFA12 est le plus actif (diminution de 20%) à cette concentration. En revanche, pour la série des tétraméthoxylés, le resvératrol tétraméthoxylé (3,3',4',5Mresv) induit la plus forte baisse (45%). Les 3,3',4',5MRFA10 et 3,3',4',5MRFA12 ont une activité comparable (environ 35%).

La substitution en groupements méthoxy ainsi que la longueur de la chaîne semblent être déterminantes pour l'activité biologique.

Dans cette seconde série d'expériences, les cellules MMGT-12 ont également été prétraitées avec du RFA10, RFA12, RFA14, 3,5MRFA12, RFC12 ou du resvératrol à  $10^{-6}$ M et  $5.10^{-6}$ M. Après une heure d'incubation, les cultures cellulaires ont été activées par l'ajout de LPS (0,01  $\mu$ g/mL). Les concentrations en protéine TNF- $\alpha$  ont été déterminées après 24 heures d'activation par un test ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (100% = 74,61 pg/mL de TNF-  $\alpha$ ) (figure 5).



**Figure 5** : Effet des RFA10 à RFA14, du 3,5MRFA12, du RFC12 et du resvératrol sur la production de TNF- $\alpha$  dans les cellules MMGT-12 en présence de LPS (0,01  $\mu$ g/mL). Les surnageants sont récupérés après 24h d'incubation à 37°C. L'accumulation de TNF- $\alpha$  est exprimée en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes (n = 3). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (0,01  $\mu$ g/mL LPS ; 100% = 74,61 pg/mL de TNF-  $\alpha$ ). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 et \*\*\* p < 0,001 les taux de TNF- $\alpha$  sont très significativement différents du contrôle (test de Student).

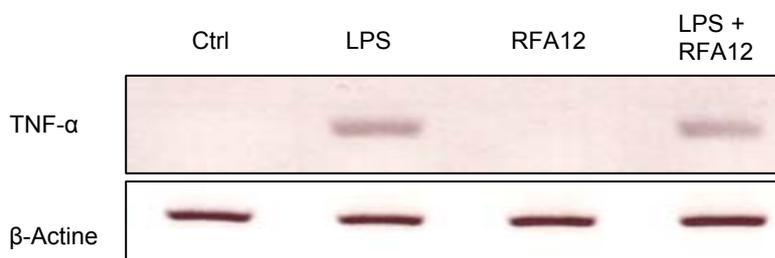
Le 3,5MRFA12 n'a aucun effet sur le taux de TNF- $\alpha$  aux concentrations testées. Dès  $10^{-6}$ M seul le RFA10 induit une diminution considérable (30%) du taux de TNF- $\alpha$ . A  $5.10^{-6}$ M, les RFA10, RFA12, RFA14, RFC12 ont un effet (20 à 35%) comparable au resvératrol (20%). Le composé le plus actif est le RFA10.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence que l'activité biologique est corrélée à la longueur de la chaîne  $\omega$ -alcanol. En effet, les molécules comportant 10 et 12 atomes de carbones se sont avérées être les plus actives sur la diminution du taux de TNF- $\alpha$ . Par ailleurs, les RFA, le RFA10 et le RFA12 sont plus actifs que leurs homologues triméthoxylés. En revanche, les dérivés tétraméthoxylés (3,3',4',5MRFA) sont légèrement plus efficaces que les

RFA. La substitution par des groupements méthoxy semble donc directement liée à l'activité. Aussi, il sera intéressant d'évaluer la capacité des composés tétrahydroxylés sur la modulation du taux de TNF- $\alpha$ .

## 2. Dosage de l'ARN<sub>m</sub> du TNF- $\alpha$

Les estimations par RT-PCR du taux de transcription du gène codant pour le TNF- $\alpha$  ont été effectuées à partir de cultures de MMGT-12 prétraitées par du RFA12 à  $5.10^{-6}$ M. Après une heure d'incubation à 37°C, les cultures ont été activées par du LPS (0,01  $\mu$ g/mL). L'expression de l'ARN<sub>m</sub> du TNF- $\alpha$  a été évaluée 6 heures après activation (figure 6).



**Figure 6** : Effet du RFA12 sur l'expression du taux de transcription de l'ARN<sub>m</sub> du TNF- $\alpha$  par RT-PCR dans les cellules MMGT-12 après 6 heures d'incubation en absence ou présence de LPS (0,01  $\mu$ g/mL). Le nombre de cycle de PCR est de 32 pour le TNF- $\alpha$  et de 25 pour la  $\beta$ -actine.

Le RFA12 réduit légèrement la transcription du gène codant pour le TNF- $\alpha$  dans la microglie activée par du LPS.

Nous avons choisi de représenter l'effet du RFA12 sur le taux de transcription du gène codant pour le TNF- $\alpha$ , mais le RFA10 induit également une diminution de ce taux de transcription.

## D. Capacité phagocytaire

La phagocytose permet d'éliminer les débris cellulaires et maintient l'homéostasie du cerveau.

Quand la microglie est fortement activée, elle secrète de nombreuses cytokines (TNF- $\alpha$ , Interleukine-1, ...) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, ...) associées aux processus inflammatoires. Lorsque cette activation microgliale est trop importante, la microglie phagocyte moins. Aussi, nous allons évaluer l'effet de nos composés à favoriser la phagocytose par la microglie activée.

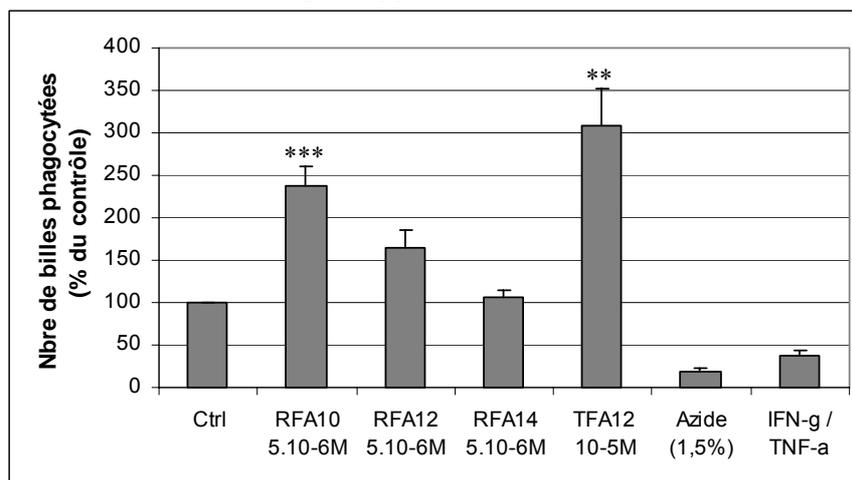
## 1. Principe du test

Dans cette étude, nous avons évalué le potentiel de nos composés sur la capacité des MMGT-12 à faire de la phagocytose. Notre étude s'est restreinte aux composés les plus actifs ayant induit les plus fortes diminutions des taux de NO et de TNF- $\alpha$ , à savoir les RFA10, RFA12 et RFA14.

Afin d'évaluer la capacité phagocytaire de ces molécules, nous avons utilisé un test de fluorescence-luminescence. L'utilisation de billes fluorescentes<sup>[13]</sup> permet de déterminer la quantité de cellules capables de phagocyter par mesure de la fluorescence émise. En effet, si les cellules MMGT-12 sont en mesure de phagocyter, elles vont incorporer les billes fluorescentes. Les surnageants sont éliminés, ainsi la fluorescence mesurée est exclusivement due aux billes contenues dans les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (figure 7).

## 2. Résultats – Discussion

Dans les expériences réalisées, le TFA12 sert de contrôle positif. L'azoture de sodium (1,5%) quant à lui est un contrôle négatif dans la mesure où il est toxique. Comme les cellules mortes n'ont aucune activité phagocytaire, une diminution nette de la fluorescence est observée. De même en présence d'interféron- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , mimant une microglie activée, l'activité phagocytaire est diminuée de moitié par rapport au contrôle.



**Figure 7** : Effet des RFA10, RFA12 et RFA14, du TFA12, de l'azoture de sodium (1,5%) et de l'Interféron- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  sur la capacité phagocytaire des MMGT-12 après 24h d'incubation à 37°C. La capacité à phagocyter est déterminée par la quantité de fluorescence émise et est exprimée en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes (n = 3). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 et \*\*\* p < 0,001 la fluorescence émise est très significativement différente du contrôle (test de Student).

Les RFA10 et RFA12 augmentent la capacité phagocytaire des MMGT-12 de 230 et 170% respectivement. En revanche, le RFA14 n'induit pas d'augmentation de la phagocytose. A nouveau, il semble que l'activité phagocytaire de nos composés soit reliée à la longueur de la chaîne  $\omega$ -alcanol. En effet, les molécules les plus actives sont celles comportant 10 (RFA10) et 12 (RFA12) atomes de carbone sur la chaîne, comme cela avait déjà été observé dans les tests biologiques précédents.

Ces résultats ne sont que préliminaires. Différentes séries de tests sont encore nécessaires afin d'évaluer le réel potentiel des RFA sur la capacité phagocytaire de la microglie.

## E. Conclusion

Les différentes études menées ont permis de mettre en évidence l'existence d'une relation de type structure-activité entre les différents RFA et la modulation de l'activation microgliale.

En effet, les RFA tétraméthoxylés se sont avérés plus actifs que leurs analogues triméthoxylés. Par ailleurs, dans ces deux séries les composés induisant les plus fortes baisses des taux de NO et de TNF- $\alpha$  sont ceux comportant une chaîne  $\omega$ -hydroxylée de 10 et 12 atomes de carbone.

Les composés les plus actifs sont les RFA entièrement déméthylés et plus particulièrement les RFA10 et RFA12. Ils permettent une diminution du taux de NO de 40 et 50% respectivement ainsi qu'une diminution du taux de TNF- $\alpha$  de 30 et 20% respectivement. Par ailleurs, les RFA10 et RFA12 sont nettement plus actifs que le resvératrol, ce qui montre que la présence de la chaîne  $\omega$ -alcanol est primordiale pour l'activité. Les tests de phagocytose ont révélé que le RFA10 augmente la capacité phagocytaire des MMGT-12 de 200% environ.

Cette étude a permis de montrer que le RFA10 et le RFA12 sont des modulateurs de l'activation microgliale et sont de ce fait des composés ayant un fort potentiel anti-inflammatoire.

Dans le paragraphe VI nous discuterons des mécanismes moléculaires susceptibles d'être impliqués dans l'activité de nos composés au cours de la modulation de l'activation microgliale. Nous tenterons de déterminer si la modulation de l'activation microgliale induite par le RFA12 passe par la voie de signalisation Notch.

## V. Différenciation des cellules souches neurales

Le système nerveux central (SNC) est principalement constitué de deux types cellulaires, les neurones et les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes). Ces deux populations sont séquentiellement produites au cours de la vie fœtale ainsi qu'après la naissance. Elles dérivent d'un précurseur commun multipotent, la cellule souche neurale. Les cellules souches neurales sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, de prolifération quasi infinie et leur capacité à générer les différents types cellulaires du système nerveux central.

### A. Les neurosphères

Les cellules souches neurales sont issues du télencéphale d'embryons de souris. Elles peuvent être cultivées grâce à l'action sélective de facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). En présence d'EGF ou de bFGF les cellules souches neurales survivent et prolifèrent en formant des agrégats de cellules indifférenciées flottant dans le milieu de culture, les neurosphères.<sup>[5]</sup>

Les neurosphères représentent la descendance clonale d'une cellule souche neurale et sont constituées de :

- cellules souches neurales (5 à 10% des cellules de la sphère) capables de s'auto-reproduire et grâce auxquelles les neurosphères peuvent être maintenues en culture pendant une longue période par dissociation et prolifération successives
- précurseurs multipotents.

La fixation des neurosphères sur un support de poly-ornithine va permettre leur adhésion et leur différenciation en neurones, astrocytes et oligodendrocytes dans des proportions définies, caractéristiques des lignées cellulaires et des conditions de culture utilisées.<sup>[14]</sup>

### B. Les RFA, inducteurs de différenciation cellulaire?

Dans le cadre de cette étude, nous avons dans un premier temps été amenés à déterminer le potentiel neuroprotecteur et anti-inflammatoire de nos composés. Nous allons maintenant évaluer leur effet neurorégénérateur. Pour ce faire, nous avons évalué l'effet des différents RFA sur la différenciation des neurosphères ainsi que leur capacité à induire la différenciation préférentielle d'un type cellulaire donné.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur les RFA10, RFA12, RFA14 et RFC12, composés ayant montré les activités les plus intéressantes sur la modulation de l'activation microgliale (figure 8).

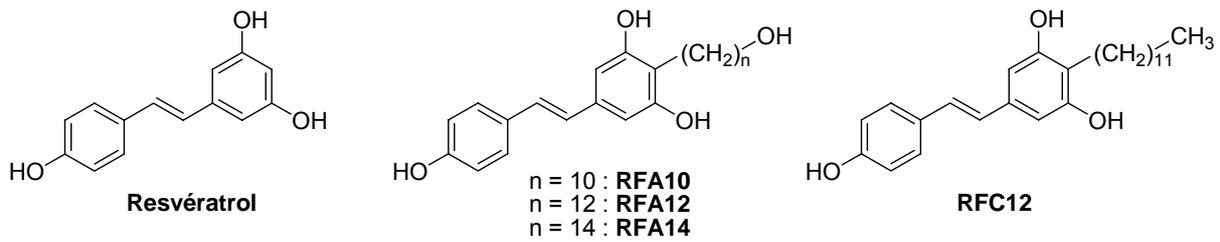


Figure 8 : Structure des composés testés.

Ces tests biologiques ont été effectués par le doctorant Jiawei Liu, effectuant sa thèse au sein de notre laboratoire au Centre de Neurochimie.

### 1. Protocole expérimental

Les neurosphères sont obtenues à partir de cellules provenant du télencéphale d'embryons de souris cultivés en milieu défini contenant 20 ng/mL d'EGF. Après dissociation, les sphères prolifèrent pendant 3 jours en présence d'EGF (20 ng/mL) durant la phase dite de prolifération (schéma 1).<sup>[14]</sup>

Ensuite elles sont collectées et déposées sur un support de poly-ornithine dans un milieu défini, en présence d'EGF 2 ng/mL. Dans ces conditions, les sphères adhèrent au support et se différencient. Les composés à tester, le RFA12 et ses analogues, préalablement dissous dans l'éthanol, sont ajoutés immédiatement après le dépôt des neurosphères à différentes concentrations s'échelonnant de  $10^{-5}$  à  $10^{-9}$  M. Les cultures témoins sont traitées par un contrôle négatif (éthanol) et un contrôle positif (acide rétinoïque).

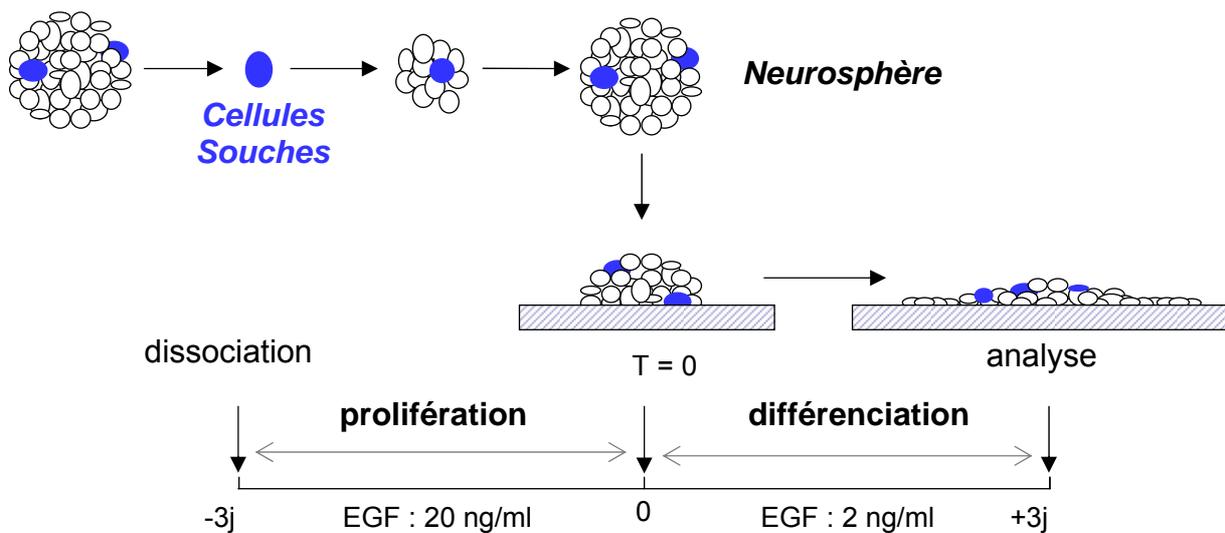


Schéma 1 : Schématisation du protocole expérimental.

Après 3 jours de culture (phase de différenciation) les cellules sont fixées et les différents types cellulaires sont révélés par immunocytochimie. Pour le criblage de nos composés nous avons effectué un double marquage à savoir celui des neurones et des astrocytes.

Les anticorps primaires utilisés sont :

- anticorps anti-MAP(2a+2b) (Microtubule Associated Protein), marqueur de neurones précoces (mitotiques)
- anticorps TUJ1 (anti Béta (III) Tubuline), marqueur de neurones (post-mitotiques)
- anticorps anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), marqueur des astrocytes.

Les anticorps anti-MAP(2a+2b) et TUJ1 sont révélés par des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome cyanine, le Cy-3 (rouge). Pour la détection des astrocytes, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dérivé de la rhodamine, l'Alexa488 (vert) a été utilisé.

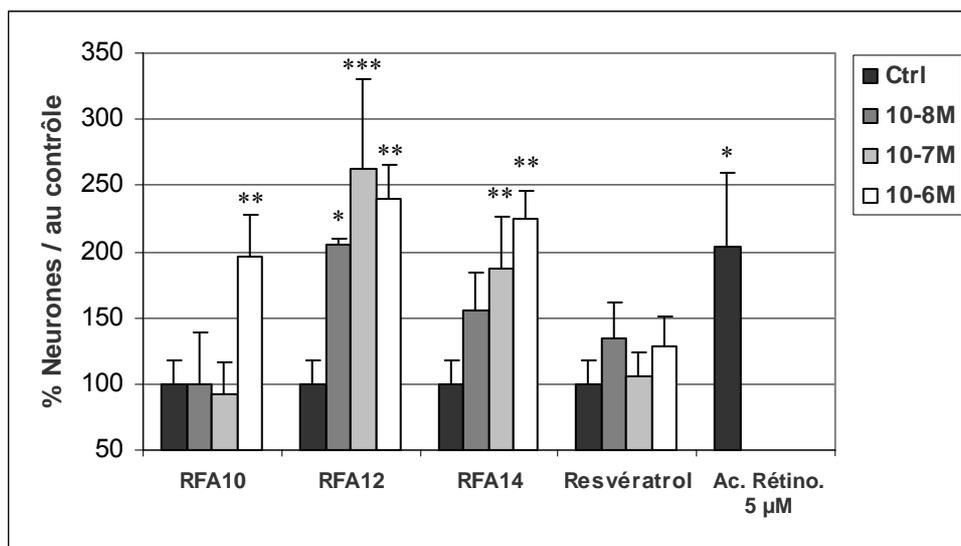
Afin de pouvoir quantifier les résultats, les noyaux sont marqués par un agent intercalant, le TO-PRO (bleu). Les cultures sont ensuite observées au microscope confocal.

## **2. Résultats - Discussion**

Une première série d'expériences a été réalisée sur les RFA tri- et tétraméthoxylés. Leur effet sur la différenciation des cellules souches neurales est faible. Par ailleurs, les composés présentant la meilleure activité sont ceux portant une chaîne latérale de 12 atomes de carbone.

En revanche, les RFA (entièrement déméthylés) augmentent la population neuronale de façon significative. Aussi, l'effet des différents RFA sur le nombre de cellules produites, à savoir les neurones et les astrocytes a été estimé de façon quantitative (MAP(2a+2b) et GFAP positives respectivement) et qualitative (aspect morphologique).

Les RFA10, RFA12 et RFA14 ont un effet maximal à la concentration de  $10^{-6}$ M. Aux concentrations inférieures et supérieures, les RFA sont respectivement toxiques et moins efficaces (figure 9).

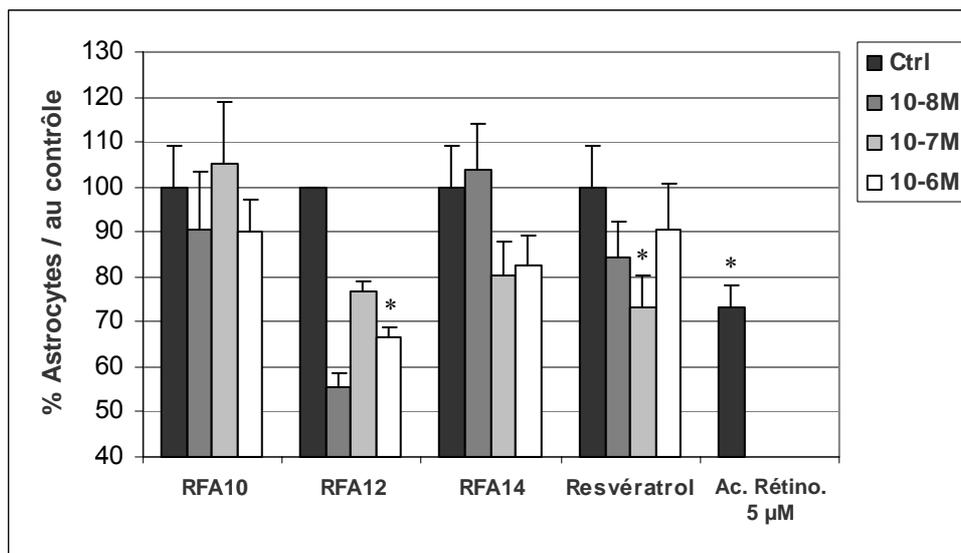


**Figure 9** : Effet quantitatif des RFA10, RFA12, RFA14 et du resvératrol sur le nombre de neurones. Le nombre de neurones est exprimé en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes ( $n = 3$ ). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (EtOH). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  le nombre de neurones est très significativement différent du contrôle (test de Student).

A la concentration de  $10^{-6}$ M les différents RFA testés sont tous plus actifs que le resvératrol. En ce qui concerne le RFA sans la fonction  $\omega$ -alcanol, le RFC12 est toxique dès  $10^{-6}$ M et n'a pas d'effet aux concentrations inférieures. Ce résultat montre que la présence de la fonction  $\omega$ -hydroxylée sur la chaîne latérale est cruciale pour l'effet neurotrophique.

Par ailleurs, nous pouvons remarquer que les RFA12 et RFA14 induisent les plus fortes augmentations du nombre de neurones (+160%) dans les neurosphères à  $10^{-7}$ M. Nous pouvons en conclure que l'activité biologique est dépendante de la longueur de la chaîne latérale.

L'induction de la différenciation des neurosphères en neurones après traitement avec du RFA12 ou du RFA14 s'accompagne d'une diminution du nombre d'astrocytes de l'ordre de 10% (figure 10).



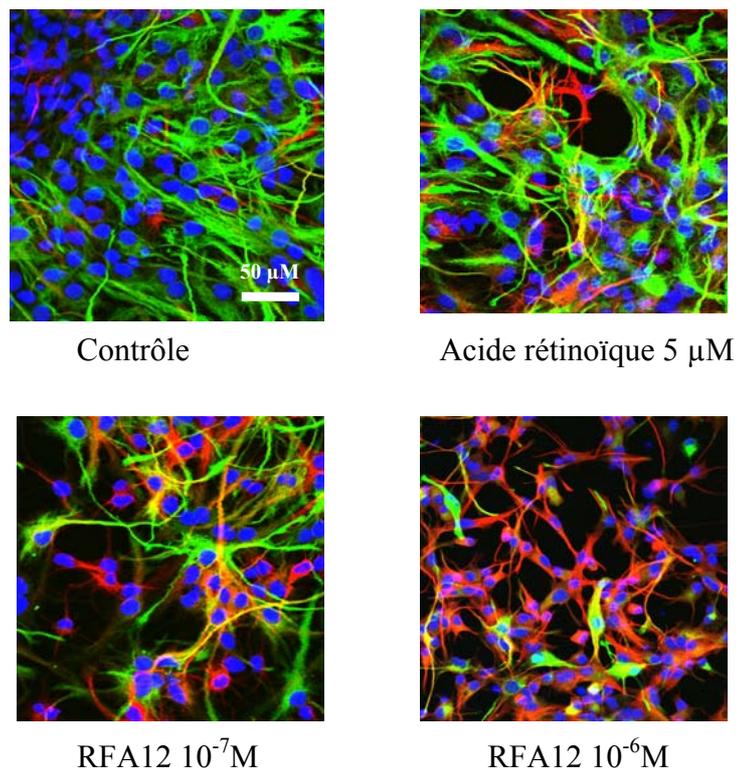
**Figure 10** : Effet quantitatif des RFA10, RFA12, RFA14 et du resvératrol sur le nombre d'astrocytes. Le nombre d'astrocytes est exprimé en valeurs  $\pm$  SEM (barres) obtenues à partir de trois expériences indépendantes ( $n = 3$ ). Les résultats sont exprimés en pourcent par rapport au contrôle (EtOH). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$  le nombre d'astrocytes est très significativement différent du contrôle (test de Student).

Ces résultats montrent que le RFA12 et le RFA14 induisent la différenciation des neurosphères en neurones au détriment des astrocytes.

L'observation des neurosphères au microscope confocal après traitement avec du RFA12 nous permet d'estimer le nombre de neurones et d'astrocytes, mais également de juger de l'état de différenciation de par leurs aspects morphologiques (figure 11).

Ainsi, nous pouvons remarquer que les neurones présentent une morphologie plus développée que dans le contrôle, avec des prolongements plus longs, ce qui témoigne d'un état de différenciation plus avancé. En présence de RFA12 à  $10^{-6}$ M, la différenciation des neurosphères en neurones est nettement plus importante qu'en présence d'acide rétinoïque ( $5 \mu\text{M}$ ), un produit à effets multiples qui est connu pour induire la différenciation cellulaire avec cependant de nombreux effets secondaires.

Les images obtenues au microscope confocal, montrent clairement qu'en présence de RFA12 à  $10^{-6}$ M, le nombre de neurones est plus important que dans le contrôle et que le nombre d'astrocytes est plus faible.



**Figure 11** : Observation au microscope confocal de l'effet de l'acide rétinoïque (5 µM) et du RFA12 à  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ M sur la différenciation cellulaire des neurosphères. Les neurones sont marqués en rouge (MAP2ab) et les astrocytes en vert (GFAP).

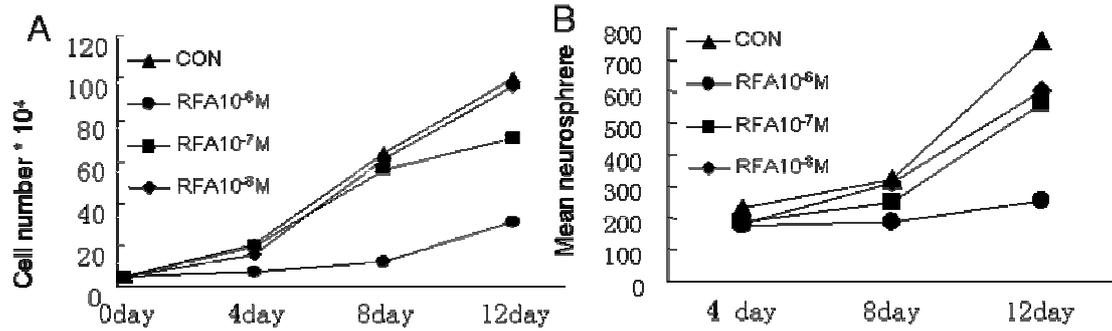
### 3. Etudes de prolifération

Nous avons pu démontrer que les RFA12 et RFA14 permettent d'augmenter le nombre de neurones dans les neurosphères et d'aboutir à des neurones plus différenciés et ce de façon concentration-dépendante.

Dans les cellules en différenciation, les phases de prolifération et de différenciation sont opposées. Aussi, si nos produits induisent une augmentation de la différenciation, celle-ci devrait s'accompagner d'une inhibition de la prolifération.

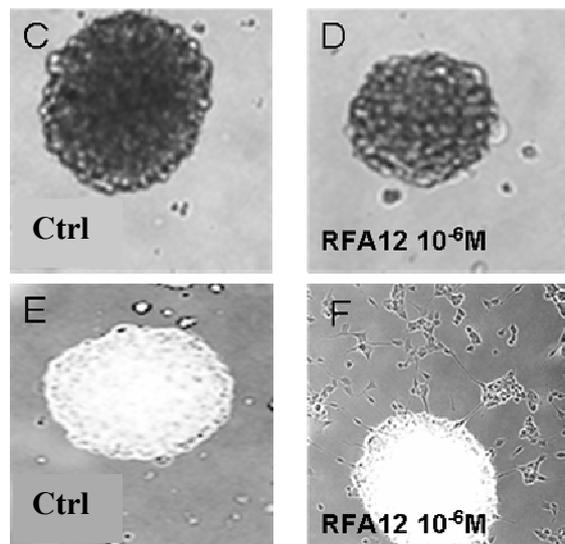
Au vu des résultats précédemment obtenus, nous allons vérifier si nos composés, plus particulièrement le RFA12, inhibe la prolifération des neurosphères.

Les cellules souches neurales prolifèrent pendant 3 jours en présence d'EGF (20 ng/mL : conditions standards) ainsi qu'en absence ou présence de RFA12 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ M). Les résultats obtenus sont représentés sous forme de courbes (figure 12).



**Figure 12** : Effet du RFA12 sur la prolifération des neurosphères. Les courbes représentent le nombre de cellules (A) et de neurosphères (B) présentes en absence ou en présence de RFA12 dans les conditions de prolifération (EGF = 20 ng/mL).

Le RFA12 inhibe la prolifération des sphères de façon concentration-dépendante, comme attendu. L'observation au microscope montre bien l'inhibition de la prolifération par le RFA12 (D), puisque la sphère est plus petite et les cellules moins nombreuses par rapport au contrôle (C) (figure 13).



**Figure 13** : Observation d'une neurosphère durant la phase de prolifération (EGF = 20 ng/mL) en absence (C et D) ou en présence de RFA12 à 10<sup>-6</sup>M (D et F).

Par ailleurs, en présence de RFA12 (F) les cellules migrent en dehors de la neurosphère et semblent avoir un état de différenciation plus avancé que dans le contrôle (E) où la neurosphère est plus large et contient plus des cellules indifférenciées.

#### 4. Conclusion

Nous avons pu établir que les RFA12 et RFA14 présentent une activité neurotrophique intéressante dans la mesure où ils permettent d'induire la différenciation des neurosphères en neurones préférentiellement aux astrocytes. Nous avons mis en évidence que la longueur de la chaîne hydrocarbonée est déterminante pour l'activité neurotrophique. De même, la présence de la fonction  $\omega$ -alcanol est également cruciale pour l'activité.

Notre prochain objectif est d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette spécification neuronale. La voie de signalisation Notch est impliquée dans le déterminisme et la maturation cellulaire,<sup>[7]</sup> et notamment pour le *tCFA15*.<sup>[15]</sup> Par ailleurs, la modulation de l'activation microgliale est également reliée à la voie de signalisation Notch. Aussi, nous allons étudier une éventuelle implication des RFA dans cette voie de signalisation.

## VI. Implication du RFA12 dans la voie de signalisation Notch

Comme décrit précédemment, la voie de signalisation Notch intervient dans de nombreux processus développementaux, comme la création de la diversité cellulaire.<sup>[6]</sup> Cette voie est définie comme un mécanisme d'interactions cellulaires s'exerçant essentiellement entre cellules voisines.

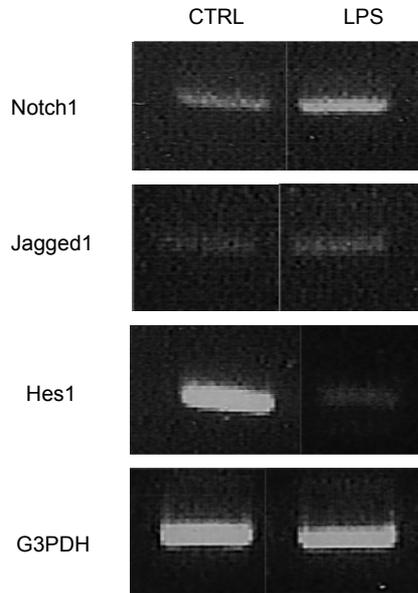
L'activation de la voie Notch due à l'interaction entre un récepteur **Notch** d'une cellule et un ligand (**delta** ou **jagged**) porté par la cellule voisine, déclenche une cascade de signalisation (activation de facteurs de transcription, comme les protéines **Hes**) contrôlant le choix de l'identité cellulaire et la différenciation. Une activation de la voie Notch va réprimer la neurogenèse (formation de neurones)<sup>[8]</sup> et par voie de conséquence va induire la différenciation des cellules gliales. De même, une inhibition de la voie Notch stimule la neurogenèse et réprime la différenciation des astrocytes.<sup>[7]</sup>

### A. La voie Notch dans les cellules MMGT-12

#### 1. Expression de la voie Notch dans les cellules MMGT-12

Des études réalisées au sein du Laboratoire de NeuroBiologie à Luxembourg ont permis de mettre en évidence que la voie Notch est bien fonctionnelle au sein des cellules MMGT-12 et que son expression est modifiée au cours de l'activation par du LPS.<sup>[9]</sup>

Une analyse par RT-PCR a montré des changements au niveau des gènes codant pour le récepteur **Notch1**, le ligand **Jagged1** et le facteur de transcription **Hes1** dans des cultures de MMGT-12 activées par du LPS (0,01 µg/mL) (figure 14).



**Figure 14** : Analyse de l'expression de RT-PCR de Notch1, Jagged1 et Hes1 dans les cellules MMGT-12 après 24h d'incubation en présence ou absence de LPS (0,01 µg/mL). Le nombre de cycle de PCR est de 30 pour Notch1 et Jagged1, 36 pour Hes1 et 25 pour G3PDH.

Une augmentation de l'expression des gènes codant pour Notch1 et Jagged1 ainsi qu'une diminution de ceux codant pour Hes1 ont été observées après 24 heures d'activation. Ces résultats démontrent que la voie Notch est présente dans les cellules MMGT-12 et qu'une activation par le LPS modifie son expression.

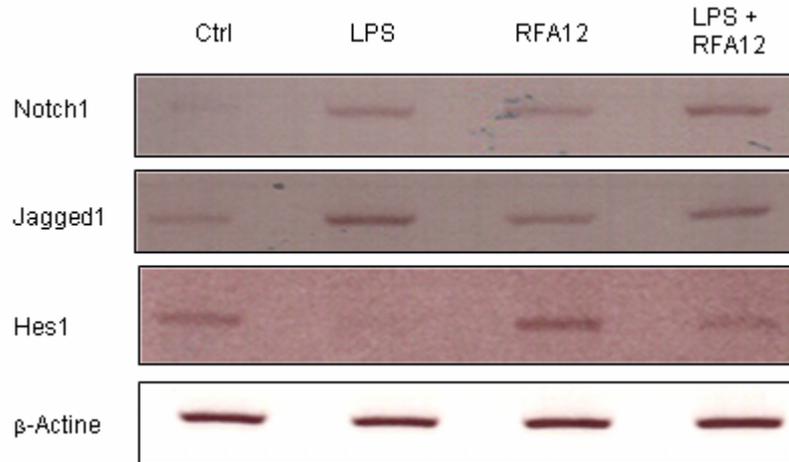
Les effets modulateurs de l'activité de la microglie observés en présence de RFA peuvent être comparés aux effets induits par une modulation de la voie de signalisation Notch. En effet, l'activation de la voie Notch par addition d'un ligand soluble Jagged1 induit une diminution de l'activité de la microglie.<sup>[9]</sup>

## 2. Implication du RFA12

Dans le but de déterminer si la voie de signalisation Notch est impliquée dans la modulation de l'activation microgliale induite par le RF12, différentes expériences ont été réalisées. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux changements pouvant intervenir au niveau des gènes codant pour **Notch1**, **Jagged1** et **Hes1**, intervenant dans la voie de signalisation

Notch, dans les cellules MMGT-12 activées par du LPS (0,01 µg/mL) et prétraitées par du RFA12 à  $5.10^{-6}$ M.

Les analyses par RT-PCR indiquent, après une activation de 24 heures par du LPS, une augmentation de l'expression des gènes codant pour Notch1 et Jagged1 en présence de RFA12 (figure 15). De manière générale, une augmentation de Notch1 et Jagged1 s'accompagne d'une production du facteur de transcription Hes1. En effet, nous observons bien l'augmentation de Hes1 en présence de RFA12.



**Figure 15** : Analyse par RT-PCR de l'effet du RFA12 sur l'expression du taux de transcription de l'ARN<sub>m</sub> de Notch1, Jagged1 et Hes1 dans les cellules MMGT-12 après 24h d'incubation en présence ou absence de LPS (0,01 µg/mL). Le nombre de cycle de PCR est de 30 pour Notch1, de 32 pour Jagged1, de 36 pour Hes1 et de 25 pour la β-actine.

Ces résultats montrent que le RFA12 a un effet sur la voie de signalisation Notch. Ainsi, la modulation de l'activation microgliale observée pour le RFA12 est probablement liée à une augmentation de l'activité de la voie de signalisation Notch.

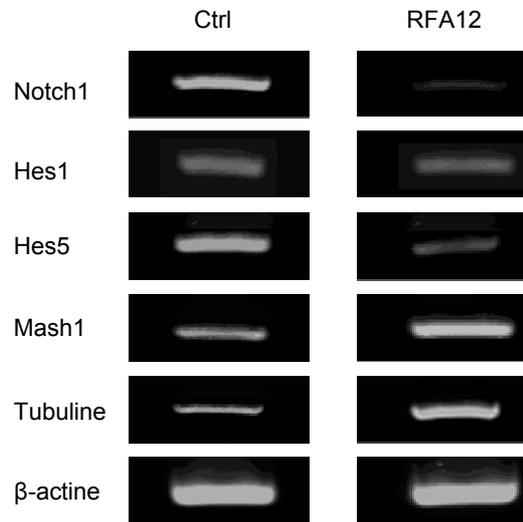
## B. La voie Notch et les neurosphères

L'effet du RFA12 dans les neurosphères est étudié par analyse RT-PCR. Les changements concernant l'expression des gènes codant pour **Notch1**, **Hes1** et **Hes5**, impliqués dans la voie Notch, et **Mash1** (gène pro-neural) et la **β-tubuline** (gène de différenciation) dans les neurosphères traitées avec du RFA12 à  $5.10^{-6}$ M après 48 heures, sont représentés sur la figure suivante (figure 16).

En présence de RFA12, les gènes codant pour le récepteur Notch1 et les facteurs nucléaires de transcription Hes1 et Hes5 sont diminués par rapport au contrôle. Ces diminutions s'accompagnent de l'augmentation des gènes codant pour Mash1 et la β-tubuline.

La diminution du taux de transcription de Notch1 était attendue dans la mesure où l'activation de Notch1 favorise la gliogenèse (formation de cellules gliales). Cette diminution

s'accompagne donc de celle des facteurs de transcription Hes1 et Hes5, puisque ces derniers ne sont activés que lorsque Notch1 est exprimé. Les protéines Hes ont pour rôle de réprimer entre autre le gène pro-neural Mash1 intervenant dans la neurogenèse, ce qui explique l'augmentation observée pour le taux de transcription de Mash1.



**Figure 16** : Analyse par RT-PCR de l'effet du RFA12 sur l'expression du taux de transcription de l'ARN<sub>m</sub> de Notch1, Hes1, Hes5, Mash1 et de la tubuline dans les neurosphères après 48h d'incubation. Le nombre de cycle de PCR est de 30 pour Notch1, de 36 pour Hes1 et Hes5, de 30 pour Mash1, de 28 pour la  $\beta$ -tubuline et de 25 pour la  $\beta$ -actine.

Les résultats obtenus montrent que les augmentations du nombre de neurones et de la différenciation, observées en présence de RFA 12, proviennent d'une diminution d'activité de la voie de signalisation Notch (diminution du récepteur Notch1). Le RFA12 semble rendre la voie Notch moins fonctionnelle. Des études plus poussées permettront d'élucider le mécanisme mis en jeu par nos composés.

## VII. Conclusion

Les différentes études biologiques réalisées ont permis de montrer que certains de nos composés présentent les activités biologiques recherchées, à savoir des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices combinées à des propriétés neurorégénératrices.

Les RFA se sont révélés être des anti-oxydants aussi puissants que le resvératrol. D'autre part, les RFA10 et RFA12 se sont avérés être des modulateurs de l'activation microgliale. Ils permettent de réduire les taux de nitrite et de TNF- $\alpha$  dans les cellules

MMGT-12. Ces deux molécules sont également capables d'augmenter la capacité phagocytaire des MMGT-12.

Par ailleurs, les RFA12 et RFA14 sont capables d'augmenter le nombre de neurones et la différenciation dans les neurosphères à la concentration de  $10^{-6}$ M.

Nous avons donc synthétisé des composés, notamment le RFA12, combinant l'effet neuroprotecteur et neurorégénérateur.

Nous avons également pu mettre en évidence que le mode d'action des RFA, probablement mis en jeu au cours de la modulation de l'activation microgliale ainsi que de la différenciation cellulaire, passait par la voie de signalisation Notch.

## Références bibliographiques

- [1] Biers, T. W.; Desmaretz, C.; Vanmechelen, E., Generation and characterization of mouse microglial cell lines., *J. Neuroimmunol.*, **1994**. 52, 153-164.
- [2] Hemmer, K.; Fransen, L.; Vanderstichele, H.; Vanmechelen, E.; Heuschling, P., An in vitro model for the study of microglia-induced neurodegeneration: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ ., *Neurochem. Int.*, **2001**. 38, 557-565.
- [3] Gage, F. H. Mammalian neural stem cells., *Science*, **2000**. 287, 1433-1438.
- [4] Johansson, C. B.; Momma, S. Clarke, D. L.; Risling, M.; Lendahl, U.; Frisen, J. Identification of neural stem cell in the adult mammalian central nervous system., *Cell*, **1999**. 96, 25-34.
- [5] Reynolds, B. A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system., *Science*, **1992**. 255, 1707-1710.
- [6] Artavanis-Tsakonas, S.; Rand, M. D.; Lake, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **1999**. 284, 770-776.
- [7] Yoon, K.; Gaiano, N. Notch signalling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants., *Nat. Neurosci.*, **2005**. 8, 709-715.
- [8] Tanigaki, K.; Nogaki, F.; Takahashi, J.; Tashiro, K.; Kurooka, H.; Honjo, T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate., *Neuron*, **2001**. 29, 45-55.
- [9] Grandbarbe, L.; Heurtaux, T.; Hemmer, K.; Morga, E.; Heuschling, P. Notch signaling modulates the activation of microglial cells., soumis.
- [10] Lee, S. E.; Hwang, H. J.; Ha, J.-S.; Jeong, H.-S.; Kim, J. H. Screening, of medicinal plant extracts for antioxydant activity., *Life Sciences*, **2003**. 73, 167-179.

- [11] Alonso, A. M.; Dominguez, C.; Guillen, D. A.; Barroso, C. G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content., *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**. 50, 3112-3115.
- [12] Stojanović, S.; Brede, O. Elementary reactions of the antioxidant action of *trans*-stilbene derivatives: resveratrol, pinosylvin and 4-hydroxystilbene., *Phys. Chem. Phys. Chem.*, **2002**. 4, 757-764.
- [13] Kopec, K. K.; Carroll, R. T. Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Peptide 1-42 Induces a Phagocytic Response in Murine Microglia., *J. Neurochem.*, **1988**. 71, 2123-2131.
- [14] Grandbarbe, L.; Bouissac, J.; Rand, M. D.; Hrabe de Angelis, M.; Artavanis-Tsakonas, S.; Mohier, E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process., *Development*, **2003**. 130, 1391-1402.
- [15] Gonzalez de Aguilar, J. L.; Girlanda-Junges, C.; Coowar, D.; Duportail, G.; Loeffler, J. P.; Luu, B. Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons., *Brain Res.*, **2001**. 920, 65-73.

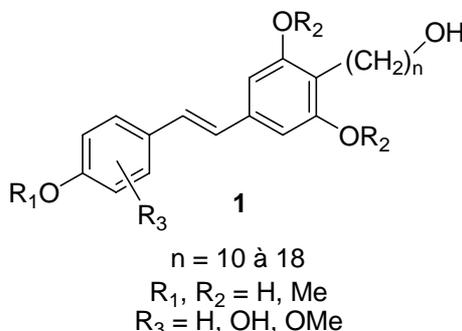
---

*Conclusion générale*  
*et*  
*Perspectives*

---

Les objectifs de ce travail de thèse étaient :

1. de synthétiser une nouvelle classe de molécules : les alcools gras resvératroliques, les RFA (schéma 1). Ce sont des molécules hybrides contenant le noyau du resvératrol et une longue chaîne  $\omega$ -hydroxylée.



**Schéma 1** : Structure des différents RFA.

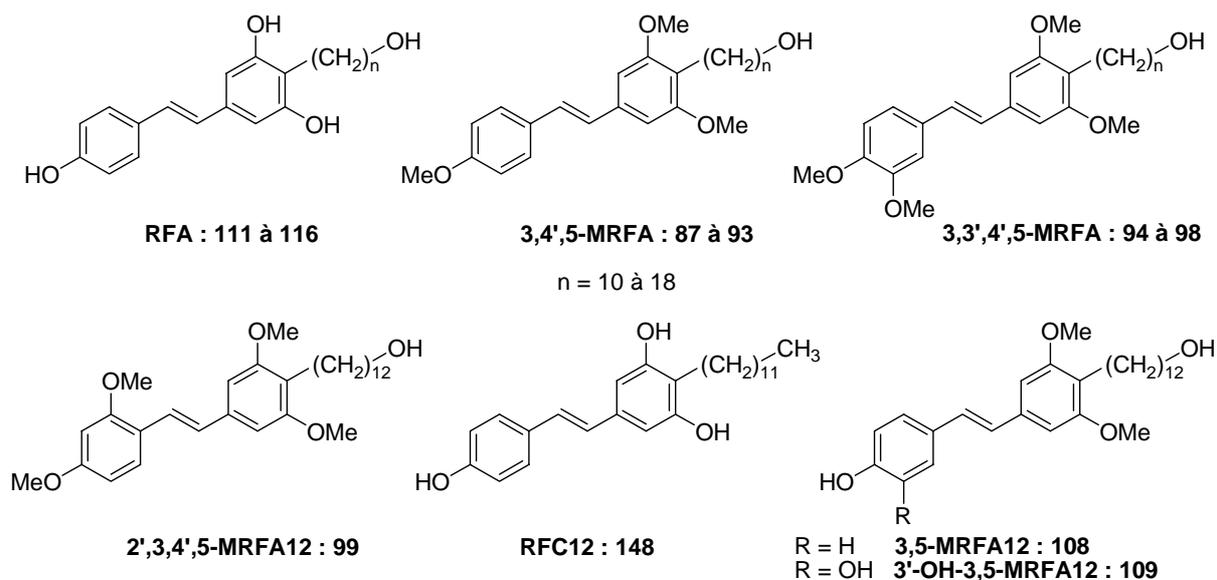
2. d'étudier la capacité anti-oxydante des différents RFA synthétisés
3. d'évaluer le potentiel des différents alcools gras resvératroliques à moduler les processus inflammatoires au sein du système nerveux central
4. de déterminer la capacité de nos composés à générer de nouvelles cellules nerveuses ou d'induire la différenciation de précurseurs cellulaires en cellules nerveuses matures fonctionnelles.

## I. Synthèse organique

Plusieurs séries de RFA ont été synthétisées (schéma 2). Leur synthèse est principalement basée sur deux étapes clé. Un couplage de Sonogashira permettant de greffer la chaîne  $\omega$ -hydroxylée et une réaction de Wadsworth-Emmons formant la double liaison carbone-carbone de configuration *trans* permettant d'accéder à la structure de base des stilbènes comme le resvératrol.

Cette stratégie de synthèse nous a permis d'obtenir cinq séries de RFA diversement méthoxylés avec des rendements globaux satisfaisants variant de 27 à 48% sur 9 étapes.

Les dérivés entièrement déméthylés, à savoir les RFA, ont été obtenus après déprotection des analogues méthoxylés avec des rendements très variables (46 à 76%). Par ailleurs, les RFA tétrahydroxylés n'ont pu être obtenus en raison de leur dégradation au cours de l'étape de déprotection.



**Schéma 2** : Structure des RFA synthétisés.

Nous avons donc développé une nouvelle voie de synthèse nous permettant de contourner les difficultés liées à la déprotection des groupements méthoxy. Nous avons ainsi porté notre choix sur une synthèse compatible avec l'utilisation du groupement acétate pour la protection des fonctions hydroxyles.

Afin de greffer la chaîne  $\omega$ -alcanol, nous avons à nouveau fait appel à la réaction de Sonogashira, dans la mesure où elle s'était avérée très efficace dans la première synthèse. La formation de la double liaison carbone-carbone *trans* est réalisée grâce à un couplage de Heck décarbonylant entre un chlorure d'acide portant la chaîne latérale et un acétoxystyrène diversement substitué. A ce jour, cette synthèse a pu être optimisée jusqu'à l'obtention du chlorure d'acide portant la chaîne  $\omega$ -hydroxylée protégée, nécessaire au couplage de Heck. Celui-ci a été obtenu avec un bon rendement de 56% sur six étapes.

## II. Etudes biologiques

L'évaluation des capacités anti-oxydantes des différents alcools gras resvératroliques a permis de montrer que les dérivés méthoxylés présentent une faible capacité anti-oxydante dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire *in vitro*, alors que les dérivés entièrement déméthylés, les RFA, ont un fort pouvoir anti-oxydant, comparable à celui du resvératrol. Nous avons donc confirmé que les fonctions hydroxyles libres sont nécessaires à l'activité anti-oxydante.

Les études concernant l'activation microgliale, réalisées sur les cellules MGMT-12, ont permis de montrer que les RFA sont capables de moduler l'activation microgliale. En effet, les RFA10 et RFA12 permettent des diminutions des taux de nitrite (40 et 50%) et de TNF- $\alpha$

(30 et 20%) produits par la microglie activée plus importantes que celles observées pour le resvératrol. De plus, ces deux composés augmentent la capacité phagocytaire des cellules MGMT-12.

Ces études nous ont permis de mettre en évidence que les composés synthétisés présentent un fort potentiel anti-inflammatoire. Par ailleurs, nous avons montré que cette activité est directement reliée à la longueur de la chaîne latérale puisque les composés les plus actifs comportent 10 (RFA10) et 12 (RFA12) atomes de carbone.

L'effet neurorégénérateur de nos molécules a été évalué à l'aide du modèle des neurosphères (cultures cellulaires de cellules souches neurales de souris). Nous avons plus particulièrement étudié la capacité de nos composés à induire la différenciation des cellules souches neurales en un type cellulaire nerveux donné. De cette étude est ressorti que les RFA12 et RFA14 sont capables d'augmenter la différenciation des neurosphères en neurones matures à la concentration de  $10^{-7}$  M de 160% par rapport au contrôle. Nous avons également montré que la longueur de la chaîne latérale ainsi que la présence de la fonction  $\omega$ -alcanol, sont cruciales pour l'activité neurotrophique.

L'étude du mode d'action de nos composés, notamment du RFA12, sur la modulation de l'activation microgliale ainsi que sur l'induction de la différenciation cellulaire, nous a permis de postuler en faveur d'une implication de la voie de signalisation Notch.

Nous avons observé que le RFA12 a un effet opposé suivant le type cellulaire. En effet, le comportement du RFA12 dans les cellules MGMT-12 et dans les neurosphères, sur les taux des facteurs de transcription Hes, sont opposés. Cette observation « curieuse » peut être liée à un dialogue différent des voies de signalisation entre ces deux types cellulaires.

Les différentes études biologiques ainsi menées, indiquent que nous avons synthétisé des agents, les RFA, combinant une forte capacité anti-oxydante et anti-inflammatoire, ainsi qu'une activité neurorégénératrice intéressante. Les activités biologiques des RFA et plus particulièrement du RFA12, font de cette nouvelle classe de composés des agents thérapeutiques potentiels pour le traitement des différentes pathologies du système nerveux central.

### **III. Perspectives**

#### **En chimie :**

Nous envisageons de terminer la mise au point de la nouvelle voie de synthèse des alcools gras resvératroliques et plus particulièrement des RFA tétrahydroxylés.

La synthèse d'analogues phosphorylés du RFA12 est également envisagée afin d'apporter une plus grande solubilité dans les solvants polaires, nécessaire à la réalisation de tests biologiques sur des animaux.

#### **En biologie :**

Des études supplémentaires seront effectuées afin d'obtenir de plus amples informations sur le mode d'action des RFA. L'objectif premier est d'élucider la cible de nos composés au niveau cellulaire. Nos études préliminaires nous ont révélé que la voie de signalisation Notch serait impliquée dans le fonctionnement de nos produits. Cette voie de signalisation est fortement impliquée dans le développement du cerveau ainsi que dans plusieurs pathologies humaines telle que le cancer. Il serait intéressant d'élucider les diverses étapes de cette voie de signalisation et de comprendre son fonctionnement.

Il s'agira également d'approfondir les tests liés à la capacité phagocytaire des cellules MMGT-12 en présence des RFA.

A plus long terme, des études des RFA sur un modèle animal de sclérose en plaques sont également envisagées.

---

*Partie Expérimentale*  
*Chimie*

---

## Préparation des solvants et réactifs

Tous les solvants sont distillés sous argon sur un réactif approprié : benzophénone / sodium (THF, éther),  $\text{CaH}_2$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH,  $\text{NEt}_3$ , xylène) ou achetés sur tamis moléculaires (DMF, DMSO). Le THF et l'éther sont toujours distillés avant chaque utilisation, sans que cela ne soit précisé dans les modes opératoires qui suivent.

Toutes les réactions sensibles à l'humidité sont conduites sous argon, dans de la verrerie préalablement séchée à l'étuve (110°C, 2 à 3h) ou flambée sous vide à l'aide d'un bec Bunsen.

Les lithiens d'alkyles en solution dans l'hexane sont dosés avant chaque utilisation par la méthode décrite par Suffert (*J. Org. Chem.* **1989**, 54, 509).

## Purification des produits

Les chromatographies préparatives sur colonne de silice sont effectuées sur gel de silice 0,040-0,063 mm (Merck). Le mélange de produits à séparer est déposé sur colonne soit adsorbé sur une quantité minimale de silice 0,063-0,200 mm (Merck), soit dilué dans un minimum d'éluant puis chromatographié soit sous pression moyenne d'air comprimé (**chromatographie flash**) soit sous pression atmosphérique (**chromatographie gravitationnelle**)

## Caractérisation des produits

### *Point de fusion*

Les points de fusion sont mesurés sur un microscope à plaque chauffante Reichert et ne sont pas corrigés. Les deux valeurs citées correspondent respectivement aux températures de début et de fin de fusion.

### *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur plaques préenduites de gel de silice 60F254 Merck (épaisseur de la couche 0,25 mm). Après élution, les plaques sont révélées en UV (254 nm), à l'iode ou trempées dans une solution de vanilline (1 g/L) dans un

mélange EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95/5, v/v), puis chauffées pendant quelques minutes sur une plaque chauffante (180-200°C).

La rétention frontale (R<sub>f</sub>) est calculée en faisant le rapport entre la hauteur au milieu de la tache et la hauteur du front de l'éluant par rapport à la ligne de base.

### ***Résonance magnétique nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H)***

Les spectres sont enregistrés sur des spectromètres Bruker Advance 300 (300 MHz) avec pour référence interne le résidu non deutérié du solvant utilisé (CDCl<sub>3</sub> : 7,26 ppm, CD<sub>3</sub>OD : 3,34 ppm). Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au signal du TMS. La description des spectres utilise les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), td (triplet dédoublé), q (quadruplet), qn (quintuplet), qnd (quintuplet dédoublé), m (multiplet). J est une constante de couplage exprimée en Hertz (Hz).

### ***Résonance magnétique nucléaire du carbone (RMN <sup>13</sup>C)***

Les spectres sont enregistrés sur des spectromètres Bruker Advance 300 (75 MHz) avec pour référence interne le résidu non deutérié du solvant utilisé (CDCl<sub>3</sub> : 77,4 ppm, CD<sub>3</sub>OD : 49,86 ppm). Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au signal du TMS. La nature des différents carbones (méthyle, méthylène, méthine ou sans proton) est déterminée par des séquences de transfert de polarisation du <sup>13</sup>C vers le <sup>1</sup>H (séquence DEPT). Nous avons attribué les signaux par comparaison avec des composés présentant des analogies structurales. Ce procédé, loin de conduire à une attribution absolue, ne met pas à l'abri d'interprétations erronées.

### ***Résonance magnétique nucléaire du phosphore (RMN <sup>31</sup>P)***

Les spectres sont enregistrés sur des spectromètres Bruker Advance 300 (121,5 MHz) avec pour référence externe l'acide phosphorique. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm.

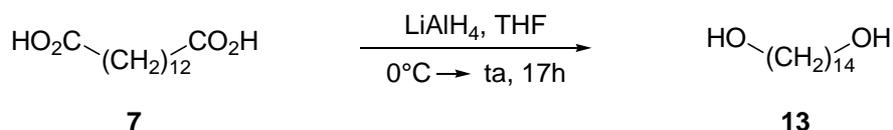
***Infra-rouge (IR)***

Les spectres sont réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer (FT-IR System Spectrum BX laser classe 2 He Ne 633 nm < 0,4 mW) à partir des différents produits sous forme solide. Les différentes absorptions ( $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ) sont déduites de ces spectres.

***Spectrométrie de masse (SM)***

Les spectres de masse sont mesurés sur un spectromètre MicroTOF Daltonics Electrospray et un spectromètre AutoSpecE FAB<sup>+</sup> ou FAB<sup>-</sup> en introduction directe.

Nous indiquons le pic moléculaire ainsi que la masse exacte (HRMS).

**1,14-Tétradécane-1,14-diol 13**

A une solution refroidie à 0°C d'acide 1,12-dodécane-1,12-dioïque **7** (2,5 g ; 9,68 mmol ; 1 éq) dans le THF (150 mL) est ajouté de l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium (0,73 g ; 19,36 mmol ; 2 éq) par petites quantités. Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante. Après 17 heures, le mélange réactionnel est versé dans une solution aqueuse de tartrate de sodium à 5% (150 mL) puis extrait avec de l'éther (3x150 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de NaCl (150 mL), séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées pour donner 2,04 g de cristaux blancs.

**Rendement : 90%**

**Formule brute :** C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>

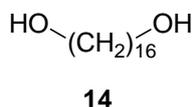
**PM :** 230,39

**CCM :** (heptane-AcOEt : 1-9) R<sub>f</sub> = 0,4

**Point de Fusion :** 86-87°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,28 (s large, 20H, H-3 à H-12) ; 1,56 (qn, J = 6,6 Hz, 4H, H-2 et H-13) ; 3,64 (t, J = 6,6 Hz, 4H, H-1 et H-14).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 26,5 (C-3 et C-12) ; 29,9 (C-4 à C-11) ; 33,7 (C-2 et C-13) ; 62,1 (C-1 et C-14).

**1,16-Hexadécane-1,16-diol 14**

Le composé **14** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **13**.

- Oxacycloheptadécane-2-one **8** (5,7 g ; 22,4 mmol ; 1 éq)
- hydrure mixte de lithium et d'aluminium (0,85 g ; 22,4 mmol ; 1 éq)
- THF (150 mL)

**Rendement : 93%**

**Formule brute :** C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>

**PM :** 258,43

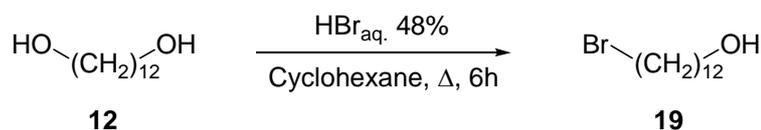
**CCM :** (heptane-AcOEt : 1-9) R<sub>f</sub> = 0,3

**Point de Fusion :** 90-91°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,28 (s large, 24H, H-3 à H-14) ; 1,56 (qn, J = 6,6 Hz, 4H, H-2 et H-15) ; 3,64 (t, J = 6,6 Hz, 4H, H-1 et H-16).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 26,5 (C-3 et C-14) ; 29,9 (C-4 à C-13) ; 33,7 (C-2 et C-15) ; 62,1 (C-1 et C-16).

### 12-Bromododécan-1-ol 19



HBr à 48% dans l'eau (77 mL ; 0,46 mol ; 15 éq.) est additionnée à une solution de 1,12-dodécan-ol **12** (6,15 g ; 30,4 mmol ; 1 éq.) dans du cyclohexane (140 mL). Le mélange hétérogène est chauffé à reflux. Après 6h, la phase aqueuse est extraite avec de l'éther (3x100 mL). Les phases organiques sont successivement réunies, lavées avec une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées et évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : hexane-AcOEt : 6-4) pour donner 7,06 g d'un solide blanc.

**Rendement : 85%**

**Formule brute :** C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>BrO

**PM :** 265,23

**CCM :** (hexane-AcOEt : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,4

**Point de fusion :** 29-30°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,26 (s large, 16H, H-3 à H-10) ; 1,56 (m, 2H, H-2) ; 1,85 (q, J = 6,8 Hz, 2H, H-11) ; 3,40 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H-12) ; 3,63 (t, J = 6,4 Hz, 2H, H-1).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 25,5 (C-3) ; 28,2 (C-11) ; 28,7 (C-10) ; 29,4 (C-4 à C-9) ; 32,8 (C-2) ; 33,8 (C-12) ; 63, (C-1).

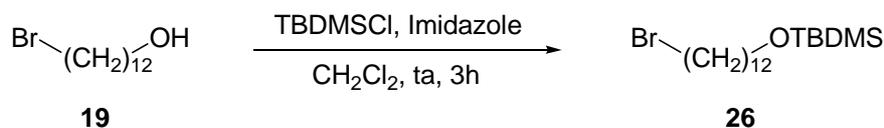
Les molécules **15**, **16**, **17**, **20** et **21**, analogues à **19** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **19**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant (n = nombre d'atomes de carbone de la chaîne) :

| n  | Diol<br>g (1 éq)<br>(mmol)   | HBr<br>mL (15 éq)<br>(mmol) | Hexane<br>mL | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|------------------------------|-----------------------------|--------------|-------------------------------|
| 8  | <b>9</b><br>6,2 g<br>(42,4)  | 105 mL<br>(640)             | 210 mL       | <b>15</b><br>6,2 g<br>(70%)   |
| 9  | <b>10</b><br>5g<br>(22,4)    | 57 mL<br>(336)              | 150 mL       | <b>16</b><br>4,19 g<br>(84%)  |
| 10 | <b>11</b><br>5,2 g<br>(29,8) | 75 mL<br>(450)              | 150 mL       | <b>17</b><br>6,5 g<br>(91%)   |
| 14 | <b>13</b><br>6,5 g<br>(28,2) | 70 mL<br>(420)              | 140 mL       | <b>20</b><br>7,1 g<br>(85%)   |
| 16 | <b>14</b><br>5,4 g<br>(20,9) | 55 mL<br>(313)              | 110 mL       | <b>21</b><br>5,23 g<br>(78%)  |

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **19**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,4 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                          | PM     | Rf * | Point de fusion |
|-------------------|--|--------|------|-----------------|
| <b>15</b><br>(8)  | $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{BrO}$    | 209,12 | 0,2  | -               |
| <b>16</b><br>(9)  | $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{BrO}$    | 223,15 | 0,2  | -               |
| <b>17</b><br>(10) | $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{BrO}$ | 237,18 | 0,2  | -               |
| <b>20</b><br>(14) | $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{BrO}$ | 293,28 | 0,4  | 40-41°C         |
| <b>21</b><br>(16) | $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{BrO}$ | 307,31 | 0,5  | 50-51°C         |

\* éluant pour les CCM : hexane-AcOEt : 7-3

**(12-Bromododécyloxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane 26**

Le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (5,61 g ; 37,3 mmol ; 1,5 éq.) et l'imidazole (2,54 g ; 37,3 mmol ; 1,5 éq.) sont ajoutés à une solution de 12-bromododécane-1-ol **19** (6,6 g ; 24,9 mmol ; 1 éq.) dans du dichlorométhane (60 mL) à température ambiante. Après 4h, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane-AcOEt : 95-5) pour donner 9,17 g d'une huile incolore.

**Rendement : 99%**

**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>39</sub>BrOSi

**PM :** 379,49

**CCM :** (hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 8-2) R<sub>f</sub> = 0,5

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,04 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,89 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 1,27 (s large, 16H, H-3 à H-10) ; 1,39 à 1,53 (m, 2H, H-2) ; 1,85 (qn, J = 6,9 Hz, 2H, H-11) ; 3,40 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H-12) ; 3,59 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 28,2-29,6 (C-2 à C-10) ; 32,9 (C-11) ; 34,0 (C-12) ; 63,4 (C-1).

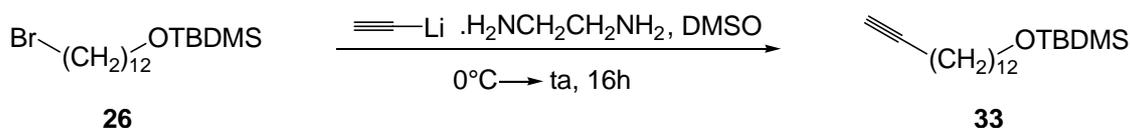
Les molécules **23** à **25**, **27** et **28**, analogues à **26** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **26**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

| n  | Bromoalcool<br>g (1 éq)<br>(mmol) | TBDMSCl<br>g (1,5 éq)<br>(mmol) | Imidazole<br>g (1,5 éq)<br>(mmol) | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub><br>mL | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 8  | <b>15</b><br>3,2 g<br>(15,3)      | 3,45 g<br>(23,0)                | 1,56g<br>(23,0)                   | 50 mL                                 | <b>22</b><br>4,8 g<br>(97%)   |
| 9  | <b>16</b><br>5,72 g<br>(25,6)     | 5,78 g<br>(38,48)               | 2,62 g<br>(38,48)                 | 65 mL                                 | <b>23</b><br>8,46 g<br>(98%)  |
| 10 | <b>17</b><br>6,0 g<br>(25,3)      | 5,70 g<br>(37,90)               | 2,60 g<br>(37,90)                 | 85 mL                                 | <b>24</b><br>8,5 g<br>(96%)   |
| 11 | <b>18</b><br>3,0 g<br>(11,9)      | 2,68 g<br>(17,85)               | 1,21 g<br>(17,85)                 | 30 mL                                 | <b>25</b><br>4,26 g<br>(98%)  |
| 14 | <b>20</b><br>6,7 g<br>(22,84)     | 4,99 g<br>(33,24)               | 2,26 g<br>(33,24)                 | 70 mL                                 | <b>27</b><br>9,17 g<br>(98%)  |
| 16 | <b>21</b><br>4,6 g<br>(14,3)      | 3,30 g<br>(21,50)               | 1,46 g<br>(21,50)                 | 35 mL                                 | <b>28</b><br>5,81 g<br>(93%)  |

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C sont identiques à ceux obtenus pour **26**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,4 ppm correspondant aux CH<sub>2</sub> supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                         | PM     | Rf * |
|-------------------|---------------------------------------|--------|------|
| <b>22</b><br>(8)  | C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> BrOSi | 323,38 | 0,6  |
| <b>23</b><br>(9)  | C <sub>15</sub> H <sub>33</sub> BrOSi | 337,41 | 0,6  |
| <b>24</b><br>(10) | C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> BrOSi | 351,44 | 0,6  |
| <b>25</b><br>(11) | C <sub>17</sub> H <sub>37</sub> BrOSi | 365,46 | 0,6  |
| <b>27</b><br>(14) | C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> BrOSi | 407,54 | 0,7  |
| <b>28</b><br>(16) | C <sub>22</sub> H <sub>47</sub> BrOSi | 435,60 | 0,7  |

\* éluant pour les CCM : hexane-AcOEt : 98-2

**tert-Butyl(tétradéc-13-ynoxy)diméthylsilane 33**

Une solution de (12-bromododécyloxy)(*tert*-butyl)diméthylsilane **26** (5 g ; 13,18 mmol ; 1 éq.) dans le DMSO (5 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'acétylure de lithium (1,82 g ; 19,76 mmol ; 1,5 éq.) dans le DMSO (10 mL) refroidie à 0°C. Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 16h. Le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de KCl (100 mL) puis extrait à l'hexane (3x100 mL). La phase organique est lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 8-2) pour donner 3,61 g d'une huile incolore.

**Rendement : 84%**

**Formule brute :** C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>OSi

**PM :** 324,62

**CCM :** (heptane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 8-2) R<sub>f</sub> = 0,4

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,04 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,90 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 1,27 (s large, 16H, H-3 à H-10) ; 1,38 à 1,59 (m, 4H, H-2 et H-11) ; 1,93 (t, J = 2,6 Hz, 1H, H-14) ; 2,18 (td, J = 2,6 Hz et J = 6,9 Hz, 2H, H-12) ; 3,59 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi et C-12) ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 25,8-29,9 (C-3 à C-11) ; 32,9 (C-2) ; 63,4 (C-1) ; 68,0 (C-14) ; 84,8 (C-13).

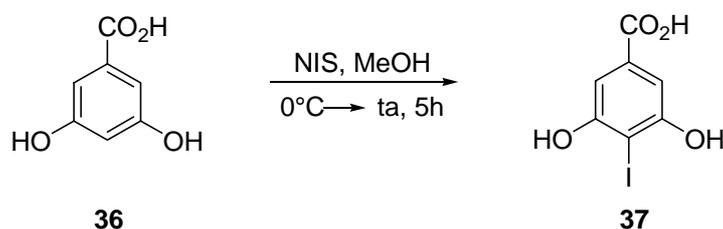
Les molécules **29** à **32**, **34** et **35**, analogues à **33** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **33**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

| n  | Bromoalcool<br>silylé<br>g (1 éq)<br>(mmol) | Acétylure de<br>lithium<br>g (1,5 éq)<br>(mmol) | DMSO<br>mL (total) | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|---|---|--------------------|-------------------------------|
| 8  | <b>22</b><br>4,75 g<br>(14,7)               | 2,03 g<br>(22,0)                                | 16 mL              | <b>29</b><br>3,10 g<br>(78%)  |
| 9  | <b>23</b><br>8,43 g<br>(25,0)               | 3,47 g<br>(37,5)                                | 31 mL              | <b>30</b><br>5,36 g<br>(76%)  |
| 10 | <b>24</b><br>11,99 g<br>(34,1)              | 4,71 g<br>(51,2)                                | 40 mL              | <b>31</b><br>8,76 g<br>(87%)  |
| 11 | <b>25</b><br>4,24 g<br>(11,6)               | 1,61 g<br>(17,4)                                | 15 mL              | <b>32</b><br>3,06 g<br>(85%)  |
| 14 | <b>27</b><br>2,55 g<br>(6,26)               | 0,87 g<br>(9,39)                                | 8 mL               | <b>34</b><br>1,90 g<br>(86%)  |
| 16 | <b>28</b><br>3,48 g<br>(8,00)               | 1,11 g<br>(12,0)                                | 10 mL              | <b>35</b><br>2,76 g<br>(91%)  |

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **33**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,4 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                          | PM     | Rf * |
|-------------------|--|--------|------|
| <b>29</b><br>(8)  | $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{OSi}$ | 268,51 | 0,3  |
| <b>30</b><br>(9)  | $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{OSi}$ | 282,54 | 0,3  |
| <b>31</b><br>(10) | $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{OSi}$ | 296,56 | 0,3  |
| <b>32</b><br>(11) | $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{OSi}$ | 310,59 | 0,4  |
| <b>34</b><br>(14) | $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{OSi}$ | 352,67 | 0,5  |
| <b>35</b><br>(16) | $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{OSi}$ | 380,72 | 0,5  |

\* éluant pour les CCM : heptane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : 9-1

**Acide 3,5-dihydroxy-4-iodobenzoïque 37**

Une solution de *N*-iodosuccinimide (5 g ; 22,2 mmol ; 1,05 éq.) dans le méthanol (15 mL) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **36** (3,26 g ; 21,2 mmol ; 1 éq.) dans le méthanol (13 mL) refroidie à 0°C. Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 3h. Le mélange est ensuite versé dans de l'eau froide (13 mL) puis dans une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> à 5% (20 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée pour donner 5,37 g d'un solide blanc.

**Rendement : 90%**

**Formule brute :** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>IO<sub>4</sub>

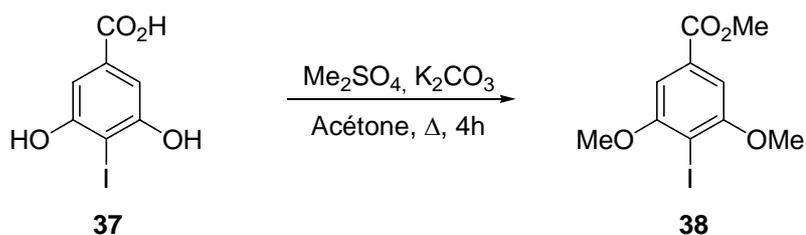
**PM :** 280,02

**CCM :** (AcOEt) R<sub>f</sub> = 0,1

**Point de fusion :** 225-228°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2,67 (s, 1H, H<sub>acide</sub>) ; 4,91 (s, 2H, OH) ; 6,98 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 80,3 (C-4) ; 106,2 (C-2 et C-6) ; 131,8 (C-1) ; 158,0 (C-3 et C-5) ; 168,1 (CO).

**4-Iodo-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle 38**

Du carbonate de potassium (12 g ; 85,8 mmol ; 5,6 éq.) et du diméthylsulfate (12,6 g ; 99,6 mmol ; 6,5 éq.) sont ajoutés à une solution d'acide 3,5-dihydroxy-4-iodobenzoïque **37** (4,3 g ; 15,3 mmol ; 1 éq.) dans l'acétone (48 mL). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 4h. Du méthanol (26 mL) est ajouté et le reflux est maintenu 1h supplémentaire. Le mélange est versé dans une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 6-4) pour donner 4,66 g d'un solide blanc.

**Rendement : 95%**

**Formule brute :** C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>IO<sub>4</sub>

**PM :** 322,10

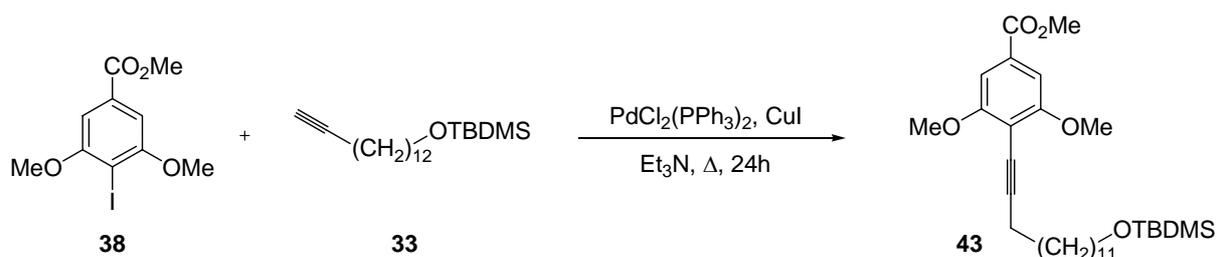
**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,4

**Point de Fusion :** 135 °C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,93 (s, 3H, OMe) ; 3,94 (s, 6H, OMe) ; 7,16 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 52,4 (OMe) ; 56,8 (OMe) ; 84,3 (C-4) ; 104,7 (C-2 et C-6) ; 131,8 (C-1) ; 159,5 (C-3 et C-5) ; 166,6 (CO).

**4-(14-(tert-Butyldiméthylsilyloxy)tétradéc-1-ynyl)-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle 43**



Du PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (200 mg ; 0,28 mmol ; 0,07 éq.) et l'iodure de cuivre (0,055 g ; 0,28 mmol ; 0,07 éq.) sont ajoutés à une solution de 4-iodo-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle **38** (1,3 g ; 4,04 mmol ; 1 éq.) dans la triéthylamine (11 mL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 10 minutes, puis du *tert*-butyl(dodéc-13-ynyloxy)diméthylsilane **33** (1,97 g ; 6,05 mmol ; 1,5 éq.) est ajouté. Après 48h de chauffage à reflux, le mélange est versé dans une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est adsorbé sur silice

(200  $\mu\text{m}$ ) avant d'être purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 9-1) pour donner 1,31 g d'une huile jaune.

**Rendement : 65%**

**Formule brute :**  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5\text{Si}$

**PM :** 518,80

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 8-2)  $R_f = 0,4$

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 0,04 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 0,89 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{C}$ ) ; 1,27 (s large, 16H, H-5' à H-13') ; 1,47 à 1,68 (m, 2H, H-4') ; 2,55 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H, H-3') ; 3,59 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H-14') ; 3,92 (s, 9H, OMe) ; 7,21 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : -5,3 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ) ; 18,4 (CSi) ; 20,3 (C-3') ; 26,0 ( $\text{CH}_3\text{C}$ ) ; 28,8 à 29,5 (C-4' à C-12') ; 32,9 (C-13') ; 52,3 (OMe) ; 56,3 (OMe) ; 63,3 (C-14') ; 72,2 (C-1') ; 102,5 (C-2') ; 104,6 (C-2 et C-6) ; 107,0 (C-4) ; 129,9 (C-1) ; 161,0 (C-3 et C-5) ; 166,7 (C-7).

Les molécules **39** à **42**, **44** et **45**, analogues à **43** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **43**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

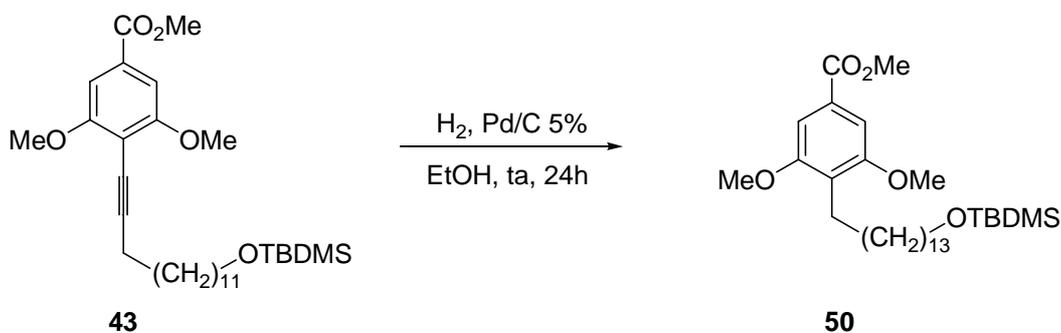
| n  | Iodure d'aryle <b>38</b><br>g (1 éq)<br>(mmol) | Alcyne vrai<br>g (1,7 éq)<br>(mmol) | $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$<br>g (7 mol%)<br>(mmol) | <b>CuI</b><br>g (7 mol%)<br>(mmol) | $\text{Et}_3\text{N}$<br>mL | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|--|-------------------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 8  | 1,00 g<br>(3,10)                               | 1,42 g<br>(5,27)                    | 0,152 g<br>(0,22)                                       | 0,041 g<br>(0,22)                  | 12 mL                       | <b>39</b><br>0,965 g<br>(67%) |
| 9  | 1,00 g<br>(3,10)                               | 1,49 g<br>(5,27)                    | 0,152 g<br>(0,22)                                       | 0,041 g<br>(0,22)                  | 12 mL                       | <b>40</b><br>2,49 g<br>(84%)  |
| 10 | 3,00 g<br>(9,31)                               | 4,70 g<br>(15,8)                    | 0,458 g<br>(0,65)                                       | 0,124 g<br>(0,65)                  | 35 mL                       | <b>41</b><br>3,93 g<br>(86%)  |
| 11 | 1,00 g<br>(3,10)                               | 1,64 g<br>(5,27)                    | 0,152 g<br>(0,22)                                       | 0,041 g<br>(0,22)                  | 12 mL                       | <b>42</b><br>1,04 g<br>(66%)  |
| 14 | 0,900 g<br>(2,79)                              | 1,66 g<br>(4,75)                    | 0,137<br>(0,20)   | 0,038 g<br>(0,20)                  | 11 mL                       | <b>44</b><br>1,14 g<br>(75%)  |
| 16 | 1,00 g<br>(3,10)                               | 2,00 g<br>(5,27)                    | 0,153 g<br>(0,22)                                       | 0,041 g<br>(0,22)                  | 12 mL                       | <b>45</b><br>1,37 g<br>(77%)  |

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **43**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                                   | PM     | Rf * |
|-------------------|---|--------|------|
| <b>39</b><br>(8)  | $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{Si}$ | 462,69 | 0,2  |
| <b>40</b><br>(9)  | $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Si}$ | 476,72 | 0,3  |
| <b>41</b><br>(10) | $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{Si}$ | 490,75 | 0,3  |
| <b>42</b><br>(11) | $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Si}$ | 504,77 | 0,3  |
| <b>44</b><br>(14) | $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_5\text{Si}$ | 546,85 | 0,4  |
| <b>45</b><br>(16) | $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{Si}$ | 574,91 | 0,4  |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 8-2

**4-(14-(*tert*-Butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle 50**



Du palladium sur charbon 5% (0,256 g ; 0,24 mmol ; 0,01 éq.) est ajouté à une solution de 4-(14-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)tétradéc-1-ynyl)-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle **43** (1,28 g ; 2,47 mmol ; 1 éq.) dans l'éthanol (5 mL). Le mélange réactionnel est laissé agiter sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante. Après 24h, le mélange est filtré sur célite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 7-3) pour donner 1,23 g d'une huile jaune.

**Rendement : 95%**

**Formule brute :** C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub>Si

**PM :** 522,83

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,6

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,89 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 1,25 (s large, 20H, H-3' à H-12') ; 1,43 à 1,53 (m, 4H, H-2' et H-13') ; 2,65 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-1') ; 3,59 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-14') ; 3,85 (s, 6H, OMe) ; 3,91 (s, 3H, OMe) ; 7,22 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 23,2 (C-1') ; 25,9 (CH<sub>3</sub>C) ; 28,9 à 29,8 (C-2' à C-12') ; 32,9 (C-13') ; 52,1 (OMe) ; 55,8 (OMe) ; 63,4 (C-14') ; 104,9 (C-2 et C-6) ; 125,4 (C-4) ; 128,4 (C-1) ; 158,0 (C-3 et C-5) ; 167,7 (C-7).

Les molécules **46** à **49**, **51** et **52**, analogues à **50** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **50**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

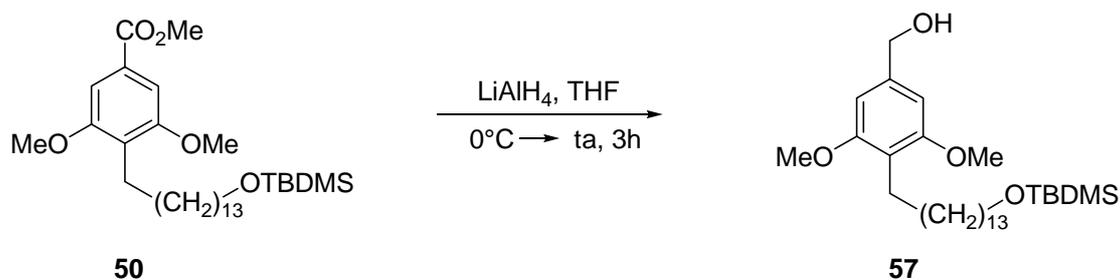
| n  | Produit de couplage<br>g (1 éq)<br>(mmol) | Pd/C 5%<br>g (10% m/m)<br>(mmol) | EtOH<br>mL | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|---|----------------------------------|------------|-------------------------------|
| 10 | <b>39</b><br>0,897 g<br>(1,94)            | 0,090 g<br>(0,042)               | 4 mL       | <b>46</b><br>0,841 g<br>(93%) |
| 11 | <b>40</b><br>2,47 g<br>(5,18)             | 0,250 g<br>(0,117)               | 10 mL      | <b>47</b><br>3,01 g<br>(80%)  |
| 12 | <b>41</b><br>3,72 g<br>(7,59)             | 0,375 g<br>(0,19)                | 16 mL      | <b>48</b><br>3,01 g<br>(80%)  |
| 13 | <b>42</b><br>1,00 g<br>(1,99)             | 0,100 g<br>(0,047)               | 5 mL       | <b>49</b><br>0,847 g<br>(91%) |
| 16 | <b>44</b><br>1,00 g<br>(1,83)             | 0,100 g<br>(0,047)               | 6 mL       | <b>51</b><br>0,865 g<br>(85%) |
| 18 | <b>45</b><br>1,34 g<br>(2,33)             | 0,135 g<br>(0,063)               | 15 mL      | <b>52</b><br>1,21 g<br>(90%)  |

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **50**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                                   | PM     | Rf * |
|-------------------|---|--------|------|
| <b>46</b><br>(10) | $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{Si}$ | 466,72 | 0,3  |
| <b>47</b><br>(11) | $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Si}$ | 480,75 | 0,35 |
| <b>48</b><br>(12) | $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_5\text{Si}$ | 494,78 | 0,4  |
| <b>49</b><br>(13) | $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O}_5\text{Si}$ | 508,81 | 0,4  |
| <b>51</b><br>(16) | $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{Si}$ | 550,89 | 0,5  |
| <b>52</b><br>(18) | $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_5\text{Si}$ | 578,94 | 0,6  |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 8-2

**4-(14-(*tert*-Butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxyphényl)méthanol 57**



De l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium (87 mg ; 2,3 mmol ; 1 éq.) est ajouté par petites portions à une solution de 4-(14-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxybenzoate de méthyle **50** (1,2 g ; 2,3 mmol ; 1 éq.) dans le THF (9 mL) refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante. Après 2h30, le mélange est versé dans une solution aqueuse de tartrate de sodium à 10% (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 7-3) pour donner 1,05 g d'une huile incolore.

**Rendement : 92%**

**Formule brute :** C<sub>29</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>Si

**PM :** 494,82

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,3

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,89 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 1,26 (s large, 20H, H-3' à H-12') ; 1,29 à 1,52 (m, 4H, H-2' et H-13') ; 2,60 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-1') ; 3,59 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-14') ; 3,81 (s, 6H, OMe) ; 4,65 (s, 2H, H-7) ; 5,30 (s, OH) ; 6,55 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 22,8 (C-1') ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 25,8 à 29,8 (C-2' à C-12') ; 32,9 (C-13') ; 55,7 (OMe) ; 63,4 (C-14') ; 65,9 (C-7) ; 102,4 (C-2 et C-6) ; 119,0 (C-4) ; 139,5 (C-1) ; 158,4 (C-3 et C-5).

Les molécules **53** à **56**, **58** et **59**, analogues à **57** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **57**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

| <b>n</b> | <b>Ester</b><br>g (1 éq)<br>(mmol) | <b>LiAlH<sub>4</sub></b><br>g (1 éq)<br>(mmol) | <b>THF</b><br>mL | <b>Produit</b><br>g<br>(Rendement %) |
|----------|------------------------------------|--|------------------|--------------------------------------|
| 10       | <b>46</b><br>0,841 g<br>(1,80)     | 0,068 g<br>(1,80)                              | 6 mL             | <b>53</b><br>0,749 g<br>(95%)        |
| 11       | <b>47</b><br>2,45 g<br>(5,10)      | 0,195 g<br>(5,10)                              | 17 mL            | <b>54</b><br>2,22 g<br>(96%)         |
| 12       | <b>48</b><br>2,99 g<br>(6,04)      | 0,229 g<br>(6,04)                              | 20 mL            | <b>55</b><br>2,71 g<br>(96%)         |
| 13       | <b>49</b><br>0,980 g<br>(1,92)     | 0,070 g<br>(1,92)                              | 6,5 mL           | <b>56</b><br>0,820 g<br>(96%)        |
| 16       | <b>51</b><br>0,855 g<br>(1,55)     | 0,060 g<br>(1,55)                              | 5 mL             | <b>58</b><br>0,797 g<br>(98%)        |
| 18       | <b>52</b><br>0,956 g<br>(1,65)     | 0,063 g<br>(1,65)                              | 7,5 mL           | <b>59</b><br>0,923 g<br>(99%)        |

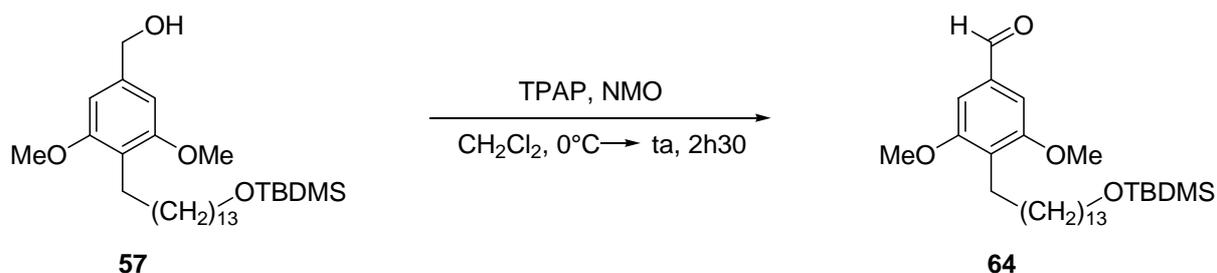
Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **57**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                                   | PM     | Rf    |
|-------------------|---|--------|-------|
| <b>53</b><br>(10) | $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{Si}$ | 438,72 | 0,2** |
| <b>54</b><br>(11) | $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Si}$ | 452,74 | 0,2** |
| <b>55</b><br>(12) | $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Si}$ | 466,77 | 0,4*  |
| <b>56</b><br>(13) | $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{Si}$ | 480,80 | 0,4*  |
| <b>58</b><br>(16) | $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_4\text{Si}$ | 522,88 | 0,3** |
| <b>59</b><br>(18) | $\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_4\text{Si}$ | 550,93 | 0,3** |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 6-4

\*\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 7-3

#### 4-(14-(*tert*-Butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde 64



De la *N*-méthylmorpholine (422 mg ; 3,12 mmol ; 1,5 éq.) est ajoutée à une solution de 4-(14-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxyphényl)méthanol **57** (1,03 g ; 2,08 mmol ; 1 éq.) dans le dichlorométhane (5 mL) en présence de tamis moléculaire 4Å (500 mg/mmol). Du tétra-*n*-propylammonium perruthénate (37 mg ; 0,10 mmol ; 0,05 éq.) est ajouté par petites portions au mélange refroidi à 0°C. Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 2h puis filtré sur célite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 7-3) pour donner 855 mg d'une huile incolore.

**Rendement : 85%**

**Formule brute :** C<sub>29</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>Si

**PM :** 492,81

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,6

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,89 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 1,25 (s large, 20H, H-3' à H-12') ; 1,29 à 1,52 (m, 4H, H-2' et H-13') ; 2,67 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-1') ; 3,59 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-14') ; 3,88 (s, 6H, OMe) ; 7,05 (s, 2H, H-2 et H-6) ; 9,90 (s, 1H, H-7).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 23,5 (C-1') ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 25,8 à 31,6 (C-2' à C-12') ; 32,9 (C-13') ; 55,8 (OMe) ; 63,3 (C-14') ; 104,9 (C-2 et C-6) ; 127,5 (C-4) ; 135,1 (C-1) ; 158,6 (C-3 et C-5) ; 191,9 (C-7).

Les molécules **60** à **63**, **65** et **66**, analogues à **64** mais avec différentes longueurs de chaîne, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **64**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

| n  | Alcool benzylique<br>g (1 éq)<br>(mmol) | TPAP<br>g (0,05 éq)<br>(mmol) | NMO<br>g (1,5 éq)<br>(mmol) | Tamis 4 Å<br>g<br>(500 mg/mL) | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub><br>mL | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|---|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 10 | <b>53</b><br>0,730 g<br>(1,66)          | 0,029 g<br>(0,082)            | 0,337 g<br>(2,50)           | 0,830 g                       | 4,5 mL                                | <b>60</b><br>0,610 g<br>(84%) |
| 11 | <b>54</b><br>2,21 g<br>(4,87)           | 0,086 g<br>(0,24)             | 0,990 g<br>(7,30)           | 2,4 g                         | 12 mL                                 | <b>61</b><br>1,89 g<br>(85%)  |
| 12 | <b>55</b><br>2,58 g<br>(5,53)           | 0,097 g<br>(0,28)             | 1,12 g<br>(8,29)            | 2,77 g                        | 14 mL                                 | <b>62</b><br>2,20 g<br>(86%)  |
| 13 | <b>56</b><br>0,810 g<br>(1,68)          | 0,030 g<br>(0,080)            | 0,340 g                     | 0,840 g                       | 4,2 mL                                | <b>63</b><br>0,750 g<br>(94%) |
| 16 | <b>58</b><br>0,777 g<br>(1,49)          | 0,026 g<br>(0,074)            | 0,301 g<br>(2,23)           | 0,745 g                       | 4 mL                                  | <b>65</b><br>0,625 g<br>(81%) |
| 18 | <b>59</b><br>0,897 g<br>(1,63)          | 0,029 g<br>(0,082)            | 0,330 g<br>(2,44)           | 0,815 g                       | 4 mL                                  | <b>66</b><br>0,791 g<br>(88%) |

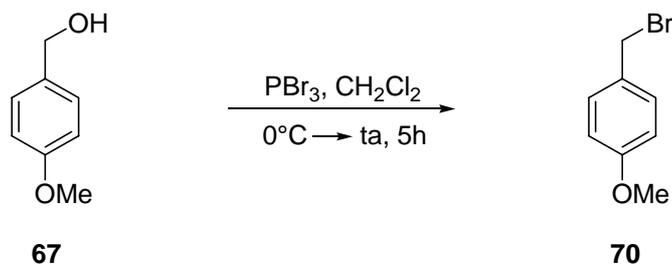
Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **64**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                                   | PM     | Rf    |
|-------------------|---|--------|-------|
| <b>60</b><br>(10) | $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}$ | 436,70 | 0,4*  |
| <b>61</b><br>(11) | $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{Si}$ | 450,73 | 0,4*  |
| <b>62</b><br>(12) | $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Si}$ | 464,75 | 0,4*  |
| <b>63</b><br>(13) | $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Si}$ | 478,78 | 0,5** |
| <b>65</b><br>(16) | $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_4\text{Si}$ | 520,86 | 0,6** |
| <b>66</b><br>(18) | $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_4\text{Si}$ | 548,91 | 0,6** |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 7-3

\*\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 8-2

### Bromure de 4-méthoxybenzyle 70



Du tribromure de phosphore (6,2 g ; 25,0 mmol ; 1,15 éq.) est ajouté à une solution d'alcool 4-méthoxybenzyle **67** (3 g ; 21,7 mmol ; 1 éq.) dans le dichlorométhane (35 mL) refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . Après 5h à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans de l'eau glacée (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée pour obtenir 4,1 g d'une huile incolore.

**Rendement : 94%**

**Formule brute :**  $\text{C}_8\text{H}_9\text{BrO}$

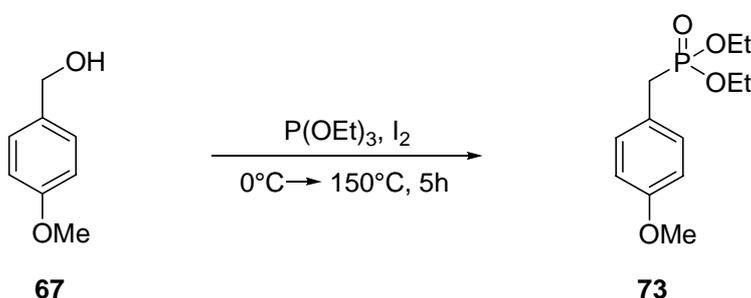
**PM :** 201,06

CCM : (éluant heptane-AcOEt : 7-3) Rf = 0,6

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3,81 (s, 3H, OMe) ; 4,51 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 6,87 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 7,32 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-2 et H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 34,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 55,3 (OMe) ; 114,2 (C-3 et C-5) ; 130,0 (C-1) ; 130,5 (C-2 et C-6) ; 159,7 (C-4).

**(4-Méthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique 73**



Du diiode (6,33 g ; 24,96 mmol ; 1,15 éq) est ajouté par petites portions à une solution de (4-méthoxyphényl)méthanol **67** (3 g ; 21,7 mmol ; 1 éq), dans la triéthylphosphite (21,6 mL ; 125,86 mmol ; 5,8 éq) refroidie à 0°C. Après 5h de reflux, l'excès de triéthylphosphite est éliminé par distillation sous vide. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 2-8 + 0,2% d'acide formique) pour donner 4,5 g d'une huile incolore.

**Rendement : 85%**

**Formule brute :**  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$

**PM :** 258,25

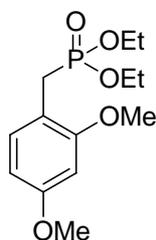
CCM : (éluant heptane-AcOEt : 2-8) Rf = 0,3

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,24 (t, J = 6,9 Hz, 6H,  $-\text{CH}_3$ ) ; 3,05 (d,  $J_{\text{H-P}} = 21$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ) ; 3,74 (s, 3H, OMe) ; 3,96 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2-$ ) ; 6,81 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 7,17 (dd, J = 8,1 Hz,  $J_{\text{H-P}} = 2,7$  Hz, 2H, H-2 et H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 16,3 (d, J = 5,9 Hz,  $-\text{CH}_3$ ) ; 32,7 (d, J = 138 Hz,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ) ; 55,2 (s, OMe) ; 62,1 (d, J = 6,8 Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ) ; 123,3 (d, J = 2,8 Hz, C-3 et C-5) ; 130,6 (d, J = 6,5 Hz, C-2 et C-6) ; 158,5 (d, J = 3,4 Hz, C-4).

RMN  $^{31}\text{P}$  (121,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 28,0 (s)

**(2,4-Diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique 74**



**74**

Le composé **74** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **73**.

- Alcool 2,4-diméthoxybenzylique **68** (0,500 g ; 2,97 mmol ; 1 éq)
- triéthylphosphite ( 2,86 g ; 17,2 mmol ; 5,8 éq)
- $\text{I}_2$  (0,830 g ; 3,27 mmol ; 1,15 éq)

**Rendement : 80%**

**Formule brute :**  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{P}$

**PM :** 288,28

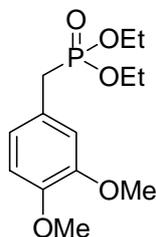
**CCM :** (AcOEt)  $R_f = 0,2$

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,23 (td,  $J = 6,9$  Hz et  $J_{\text{H-P}} = 0,3$  Hz, 6H,  $-\text{CH}_3$ ) ; 3,15 (d,  $J_{\text{H-P}} = 21$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 3,78 (s, 3H, OMe) ; 3,80 (s, 3H, OMe) ; 4,00 (qn,  $J = 6,9$  Hz, 4H,  $-\text{OCH}_2-$ ) ; 6,46 (m, 2H, H-3 et H-6) ; 7,21 (dd,  $J_{\text{H-P}} = 3,0$  Hz et  $J = 9,0$  Hz, H-5).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 16,3 (d,  $J_{\text{C-P}} = 6,2$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ) ; 25,9 (d,  $J_{\text{C-P}} = 139,3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 55,3 (OMe) ; 55,4 (OMe) ; 61,8 (d,  $J_{\text{C-P}} = 6,6$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ) ; 98,5 (d,  $J_{\text{C-P}} = 2,7$  Hz, C-3) ; 104,3 (d,  $J_{\text{C-P}} = 3,0$  Hz, C-5) ; 112,3 (d,  $J_{\text{C-P}} = 9,5$  Hz, C-1) ; 131,4 (d,  $J_{\text{C-P}} = 5,4$  Hz, C-6) ; 158,1 (d,  $J_{\text{C-P}} = 6,5$  Hz, C-4) ; 159,9 (d,  $J_{\text{C-P}} = 3,4$  Hz, C-2).

**RMN  $^{31}\text{P}$**  (121,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 28,7 (s)

**(3,4-Diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique 75**



**75**

Le composé **75** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **73**.

- Alcool 3,4-diméthoxybenzylique **69** (0,524 g ; 3,12 mmol ; 1 éq)
- triéthylphosphite (3,0 g ; 18,1 mmol ; 5,8 éq)
- I<sub>2</sub> (0,870 g ; 3,43 mmol ; 1,15 éq)

**Rendement : 78%**

**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>P

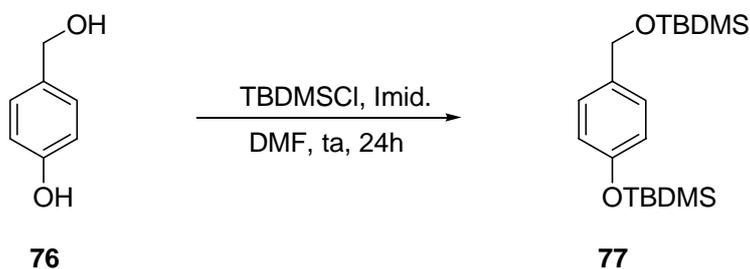
**PM :** 288,28

**CCM :** (AcOEt) R<sub>f</sub> = 0,2

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,24 (t, J = 6,9 Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>) ; 3,10 (d, J<sub>H-P</sub> = 12,9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3,85 (s, 3H, OMe) ; 3,87 (s, 3H, OMe) ; 4,01 (qnd, J = 6,9 Hz et J<sub>H-P</sub> = 2,1 Hz, 4H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 6,82 (m, 3H, H-2, H-5 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 16,4 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,7 Hz, -CH<sub>3</sub>) ; 33,2 (d, J<sub>C-P</sub> = 138,2 Hz, CH<sub>2</sub>Ph) ; 55,9 (OMe) ; 62,1 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,7 Hz, -OCH<sub>2</sub>-) ; 111,5 (d, J<sub>C-P</sub> = 5,7 Hz, C-2) ; 112,9 (d, J<sub>C-P</sub> = 5,7 Hz, C-5) ; 121,9 (d, J<sub>C-P</sub> = 5,7 Hz, C-6) ; 123,8 (d, J<sub>C-P</sub> = 9,3 Hz, C-1) ; 148,0 (d, J<sub>C-P</sub> = 3,6 Hz, C-4) ; 148,8 (d, J<sub>C-P</sub> = 3,0 Hz, C-3).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 28,0 (s)

**1-(*tert*-Butyldiméthylsilyloxy)-4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)méthyl)benzène 77**

De l'imidazole (6,58 g ; 96,7 mmol ; 6 éq) et du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (7,26 g ; 48,3 mmol ; 3 éq) sont ajoutés à température ambiante, à une solution d'alcool 4-méthoxybenzylique **76** (2,00 g ; 16,1 mmol ; 1 éq) dans le diméthylformamide (21 mL). Après 24h à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 8-2) pour donner 5,21 g d'une huile incolore.

**Rendement : 92%**

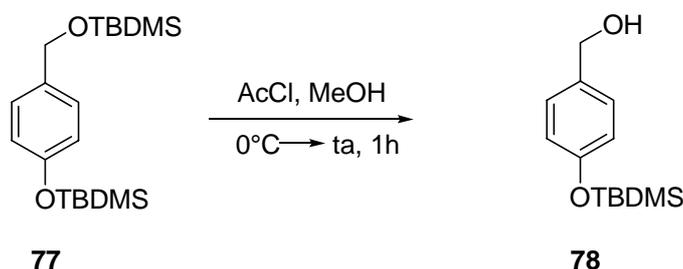
**Formule brute :** C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>

**PM :** 352,66

**CCM :** (heptane-AcOEt : 9-1) R<sub>f</sub> = 0,8

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,09 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,19 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,93 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 0,98 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 4,67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph) ; 6,80 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 7,18 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3 et H-5).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -4,8 (CH<sub>3</sub>Si) ; -4,4 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,2 (CSi) ; 18,4 (CSi) ; 25,7 (CH<sub>3</sub>C) ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 64,8 (CH<sub>2</sub>-Ph) ; 119,8 (C-2 et C-6) ; 127,4 (C-3 et C-5) ; 134,1 (C-4) ; 154,6 (C-1).

**(4-(*tert*-Butyldiméthylsilyloxy)phényl)méthanol 78**

Du chlorure d'acétyle (0,0167 g ; 0,21 mmol ; 0,15 éq) est ajoutée à une solution de 1-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-4-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)méthyl)benzène **77** (0,501 g ; 1,42 mmol ; 1 éq) dans le méthanol (4,3 mL) refroidie à 0°C. Après 1h à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) puis du dichlorométhane (50 mL) est additionné. La phase organique est lavée avec de l'eau (50 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 75-25) pour donner 0,27 g d'une huile incolore.

**Rendement : 80%**

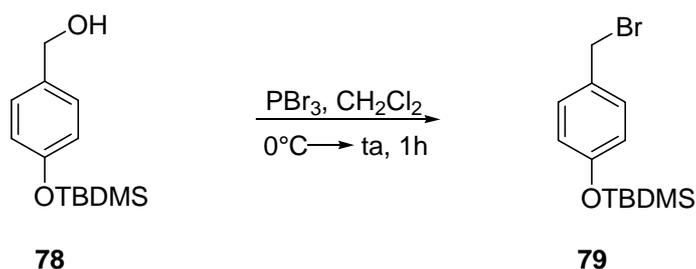
**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>Si

**PM :** 238,40

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,4

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,19 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,98 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 4,61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph) ; 6,82 (d, J = 6,8 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 7,23 (d, J = 6,8 Hz, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -4,4 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,2 (CSi) ; 25,7 (CH<sub>3</sub>C) ; 65,1 (CH<sub>2</sub>-Ph) ; 116,1 (C-3 et C-5) ; 128,5 (C-2 et C-6) ; 133,7 (C-1) ; 155,3 (C-4).

**(4-(Bromométhyl)phénoxy)(*tert*-butyl)diméthylsilyle 79**

Du tribromure de bore (0,363 g ; 1,34 mmol ; 1,1 éq) est ajouté à une solution de (4-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)phényl)méthanol **78** (0,291 g ; 1,22 mmol ; 1 éq) dans le dichlorométhane (8 mL) refroidie à 0°C. Après 1h à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mL) puis extrait avec du dichlorométhane (3x50 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée pour donner 0,275 g d'une huile jaune pâle après séchage.

**Rendement : 75%**

**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>BrOSi

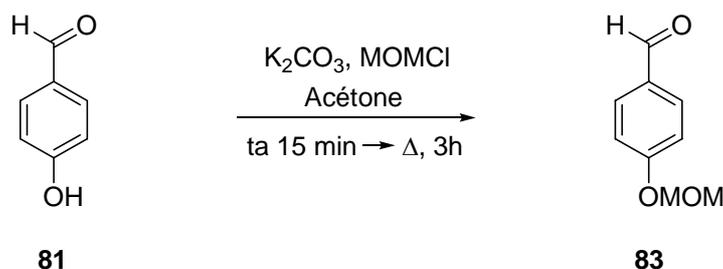
**PM :** 301,29

**CCM :** (heptane-AcOEt : 9-1) R<sub>f</sub> = 0,7

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,20 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,98 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 4,49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph) ; 6,78 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 7,25 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3 et H-5).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -4,4 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,2 (CSi) ; 25,6 (CH<sub>3</sub>C) ; 34,0 (CH<sub>2</sub>-Ph) ; 120,3 (C-2 et C-6) ; 130,4 (C-3 et C-5) ; 130,5 (C-4) ; 155,9 (C-1).

#### 4-(Méthoxyméthoxy)benzaldéhyde **83**



Du carbonate de potassium (4,53 g ; 32,8 mmol ; 2 éq) est ajouté à une solution de 4-hydroxybenzaldéhyde **81** (2 g ; 16,4 mmol ; 1 éq) dans l'acétone (25 mL). Après 15 minutes à température ambiante, le chlorure de méthoxyméthyl éther (1,35 mL ; 22,9 mmol ; 1,4 éq) est additionné goutte à goutte. Après 3h de chauffage à reflux, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 75-25) pour donner 2,57 g d'une huile incolore.

**Rendement : 94%**

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

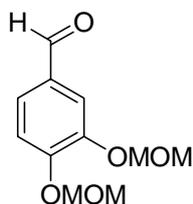
**PM :** 166,17

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,4

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,42 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 5,19 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 7,06 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 7,79 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 9,82 (s, 1H, CHO).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 56,4 (-OCH<sub>3</sub>) ; 94,3 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 116,5 (C-3 et C-5) ; 130,9 (C-1) ; 132,0 (C-2 et C-6) ; 162,4 (C-4) ; 191,0 (CHO).

### 3,4-bis(Méthoxyméthoxy)benzaldéhyde 84



**84**

Le composé **84** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **83**.

- 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **82** (0,5 g ; 3,62 mmol ; 1 éq)
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g ; 14,5 mmol ; 4 éq)
- MOMCl (1,2 mL ; 20,6 mmol ; 4 éq)
- Acétone (6 mL)

**Rendement : 87%**

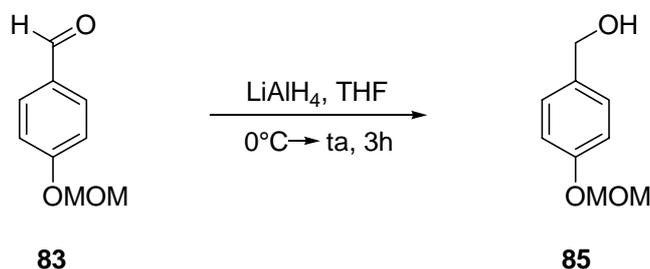
**Formule brute :** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>

**PM :** 226,23

**CCM :** (heptane-AcOEt : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,4

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,51 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,52 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 5,29 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 5,32 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 7,28 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-5) ; 7,51 (dd, J = 1,8 Hz et J = 8,4 Hz, 1H, H-6) ; 7,67 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-2) ; 9,86 (s, 1H, CHO).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 56,4 (-OCH<sub>3</sub>) ; 56,5 (-OCH<sub>3</sub>) ; 94,9 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 95,3 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 115,3 (C-5) ; 115,9 (C-6) ; 126,3 (C-2) ; 131,1 (C-1) ; 147,4 (C-3) ; 152,6 (C-4) ; 190,8 (CHO).

**Alcool 4-méthoxyméthylbenzylique 85**

De l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium (0,863 g ; 22,7 mmol ; 1,5 éq) est ajouté par petites portions à une solution de 4-(méthoxyméthyl)benzaldéhyde **83** (2,52 g ; 15,2 mmol ; 1 éq) dans le THF (50 mL) refroidie à 0°C. Après 3h à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution aqueuse à 10% de tartrate de sodium et de potassium (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 7-3) pour donner 2,51 g d'une huile incolore.

**Rendement : 98%**

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

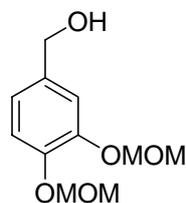
**PM :** 168,19

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,2

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,47 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 4,61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph) ; 5,17 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 7,02 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 7,29 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 56,0 (-OCH<sub>3</sub>) ; 65,0 (CH<sub>2</sub>-Ph) ; 94,4 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 116,3 (C-3 et C-5) ; 128,6 (C-2 et C-6) ; 134,4 (C-1) ; 156,8 (C-4).

**Alcool 3,4-bis(méthoxyméthyl)benzylique 86**



**86**

Le composé **86** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **85**.

- 3,4-bis(méthoxyméthyl)benzaldéhyde **84** (0,691 g ; 3,05 mmol ; 1 éq)
- LiAlH<sub>4</sub> (0,116 g ; 3,05 mmol ; 1 éq)
- THF (10 mL)

**Rendement : 91%**

**Formule brute :** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>

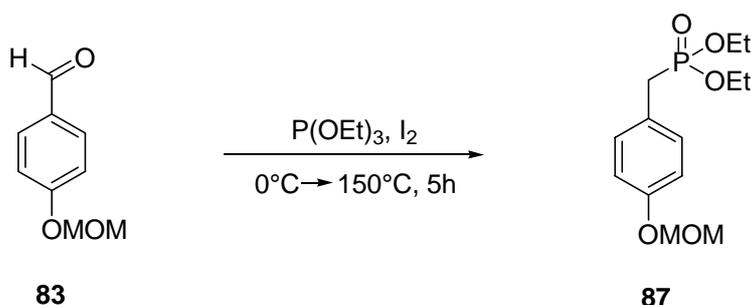
**PM :** 228,24

**CCM :** (heptane-AcOEt : 5-5) R<sub>f</sub> = 0,25

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,51 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,52 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 4,61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 5,22 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 5,23 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 6,96 (dd, J = 1,8 Hz et J = 8,4 Hz, 1H, H-6) ; 7,14 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-5) ; 7,18 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-2).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 56,2 (-OCH<sub>3</sub>) ; 56,3 (-OCH<sub>3</sub>) ; 65,1 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 95,4 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 95,5 (-OCH<sub>2</sub>-) ; 115,7 (C-5) ; 116,8 (C-6) ; 121,2 (C-2) ; 135,4 (C-1) ; 146,7 (C-3) ; 147,3 (C-4).

**Diéthyl 4-(méthoxyméthoxy)benzylphosphonate 87**



**83**

**87**

Du diiode (1,66 g ; 6,54 mmol ; 1,15 éq) est ajouté par petites portions à une solution de (4-méthoxyméthyl)benzaldéhyde **83** (1,00 g ; 5,95 mmol ; 1 éq) dans la triéthylphosphite (5,9 mL ; 34,5 mmol ; 5,8 éq) refroidie à 0°C. Après 5h de reflux, l'excès de triéthylphosphite est distillé sous vide. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 3-7 + 0,2% d'acide formique) pour donner 1,12 g d'une huile jaune pâle.

**Rendement : 65%**

**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>P

**PM :** 288,28

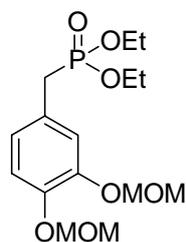
**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 2-8) R<sub>f</sub> = 0,2

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,24 (t, J = 6,9 Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>) ; 3,12 (d, J<sub>H-P</sub> = 21,30 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph) ; 3,47 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 4,02 (qnd, J<sub>H-P</sub> = 1,2 Hz et J = 7,2 Hz, 4H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 5,15 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-O) ; 6,97 (dd, J<sub>H-P</sub> = 0,66 Hz et J = 8,7 Hz, 2H, H-3 et H-5) ; 7,19 (dd, J = 8,7 Hz, J<sub>H-P</sub> = 2,6 Hz, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 16,3 (d, J<sub>C-P</sub> = 5,9 Hz, -CH<sub>3</sub>) ; 32,6 (d, J<sub>C-P</sub> = 138,4 Hz, CH<sub>2</sub>-Ph) ; 56,0 (-OCH<sub>3</sub>) ; 62,5 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,9 Hz, -OCH<sub>2</sub>-) ; 94,5 (-OCH<sub>2</sub>-O) ; 116,4 (d, J<sub>C-P</sub> = 2,9 Hz, C-3 et C-5) ; 124,3 (d, J<sub>C-P</sub> = 9,45 Hz, C-1) ; 130,8 (d, J<sub>C-P</sub> = 15,2 Hz, C-2 et C-6) ; 156,4 (C-4).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 28,0 (s)

### Diéthyl 3,4-bis(méthoxyméthoxy)benzylphosphonate **88**



**88**

Le composé **88** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **87**.

- Alcool 3,4-bis(méthoxyméthyl)benzylique **86** (0,624 g ; 2,73 mmol ; 1 éq)
- P(OEt)<sub>3</sub> (2,7 mL ; 15,9 mmol ; 5,8 éq)
- I<sub>2</sub> (0,763 g ; 3,01 mmol ; 1,1 éq)

**Rendement : 50%**

**Formule brute :** C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>P

**PM :** 348,33

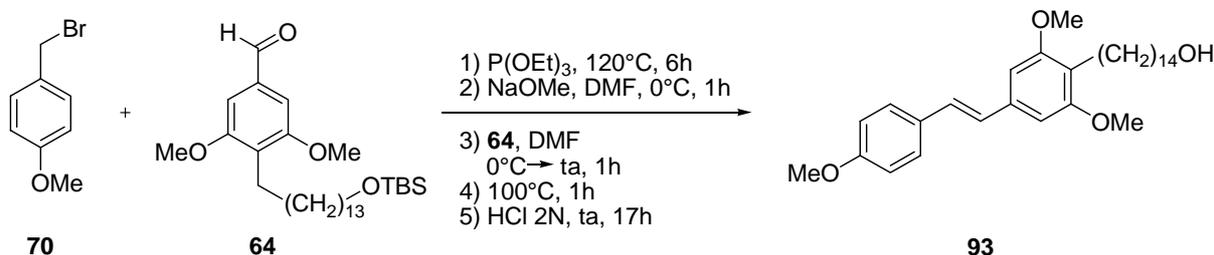
**CCM :** (heptane-AcOEt : 5-5) R<sub>f</sub> = 0,25

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,24 (t, J = 1,8 Hz, 6H, -CH<sub>3</sub>) ; 3,10 (d, J<sub>H-P</sub> = 1,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 3,50 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,50 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 4,03 (qn, J = 6,9 Hz, 4H, -OCH<sub>2</sub>-) ; 5,21 (d, J<sub>H-P</sub> = 4,2 Hz, 4H, -OCH<sub>2</sub>-O) ; 6,87 (m, 3H, H-2, H-5 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 16,4 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,0 Hz, -CH<sub>3</sub>) ; 33,0 (d, J<sub>C-P</sub> = 137,8 Hz, CH<sub>2</sub>Ph) ; 56,2 (-OCH<sub>3</sub>) ; 56,4 (-OCH<sub>3</sub>) ; 62,1 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz, -OCH<sub>2</sub>) ; 95,4 (-OCH<sub>2</sub>O) ; 95,5 (-OCH<sub>2</sub>O) ; 116,8 (d, J<sub>C-P</sub> = 5,1 Hz, C-2) ; 118,2 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,2 Hz, C-5) ; 121,4 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,6 Hz, C-1) ; 123,8 (d, J<sub>C-P</sub> = 6,8 Hz, C-6) ; 146,8 (C-4) ; 149,7 (C-3).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 28,0 (s)

**(E)-14-(4-(4-Méthoxystyryl)-2,6 diméthoxyphényl)tétradécan-1-ol 93**



De la triéthylphosphite (565 mg ; 3,44 mmol ; 2 éq.) et du bromure de 4-méthoxybenzyle **70** (478 mg ; 2,38 mmol ; 1,4 éq.) sont chauffés à 130°C. Après 6h, le mélange réactionnel est refroidi à 0°C puis une solution de méthylate de sodium dans le méthanol à 5,4 M (540 µL ; 2,92 mmol ; 1,7 éq.), du diméthylformamide (2 mL) et une solution de 4-(14-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde **64** (845 mg ; 1,72 mmol ; 1 éq.) dans le diméthylformamide (2 mL) sont successivement ajoutés. Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 1h, puis chauffé à 100°C pendant 1h supplémentaire. Le mélange est finalement agité à température ambiante pendant 17 heures. Une solution de HCl à 2 M (6 mL) est finalement ajoutée. Après 3h, le mélange est versé dans une solution saturée de KCl (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (150 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et

évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 7-3) pour donner 568 mg d'un solide blanc.

**Rendement : 69%**

**Formule brute :** C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>

**PM :** 482,69

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,2

**Point de fusion :** 92-93°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,26 (s large, 20H, H-3'' à H-12'') ; 1,30 à 1,59 (m, 4H, H-2'' et H-13'') ; 2,61 (m, 2H, H-14'') ; 3,64 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1'') ; 3,83 (s, 3H, OMe) ; 3,86 (s, 6H, OMe) ; 6,67 (s, 2H, H-3 et H-5) ; 6,90 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 6,98 (d, J = 16,1 Hz, 1H, H-8) ; 7,02 (d, J = 16,1 Hz, 1H, H-7) ; 7,45 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-2' et H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 23,0 (C-14'') ; 25,7 à 29,8 (C-3'' à C-13'') ; 32,8 (C-2'') ; 55,3 (OMe) ; 55,7 (OMe) ; 63,1 (C-1'') ; 101,9 (C-3 et C-5) ; 114,1 (C-3' et C-5') ; 119,4 (C-1) ; 127,2 (C-8) ; 127,4 (C-7) ; 127,6 (C-2' et C-6') ; 130,0 (C-1') ; 136 (C-4) ; 158,4 (C-2 et C-6) ; 159,2 (C-4').

**IR** ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3428, 3347 (OH) ; 3005 (=C-H) ; 2921, 2848 (C-H) ; 1572, 1512 (C=C) ; 1069 (C-O) ; 727 (C-H).

**MS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 489

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 489,3551 (calculée) ; 489,3558 (trouvée)

Les molécules **89** à **92**, **94** et **95**, analogues à **93** mais avec des longueurs de chaîne différentes, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **93**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

| n  | Bromure Benzylique 67<br>g (1,4 éq)<br>(mmol) | Aldéhyde<br>g (1 éq)<br>(mmol) | P(OEt) <sub>3</sub><br>μL (2 éq)<br>(mmol) | NaOMe<br>μL (1,6 éq)<br>(mmol) | DMF<br>mL (total) | Produit<br>g<br>(Rendement %) |
|----|---|--------------------------------|--|--------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 10 | 0,226 g<br>(1,12)                             | <b>60</b><br>0,350 g<br>(0,80) | 275 μL<br>(1,60)                           | 240 μL<br>(1,29)               | 2 mL              | <b>89</b><br>0,215 g<br>(63%) |
| 11 | 0,499 g<br>(2,48)                             | <b>61</b><br>0,800 g<br>(1,77) | 607 μL<br>(3,54)                           | 524 μL<br>(2,83)               | 6 mL              | <b>90</b><br>0,630 g<br>(81%) |
| 12 | 0,406 g<br>(2,02)                             | <b>62</b><br>0,620 g<br>(1,33) | 495 μL<br>(2,88)                           | 430 μL<br>(2,31)               | 4 mL              | <b>91</b><br>0,567 g<br>(75%) |
| 13 | 0,177 g<br>(0,88)                             | <b>63</b><br>0,300 g<br>(0,63) | 216 μL<br>(1,26)                           | 187 μL<br>(1,01)               | 2,5 mL            | <b>92</b><br>0,242 g<br>(82%) |
| 16 | 0,179 g<br>(0,89)                             | <b>65</b><br>0,331 g<br>(0,64) | 215 μL<br>(1,25)                           | 200 μL<br>(1,08)               | 2 mL              | <b>94</b><br>0,291 g<br>(60%) |
| 18 | 0,180 g<br>(0,89)                             | <b>66</b><br>0,352 g<br>(0,64) | 220 μL<br>(1,28)                           | 190 μL<br>(1,02)               | 2 mL              | <b>95</b><br>0,274 g<br>(79%) |

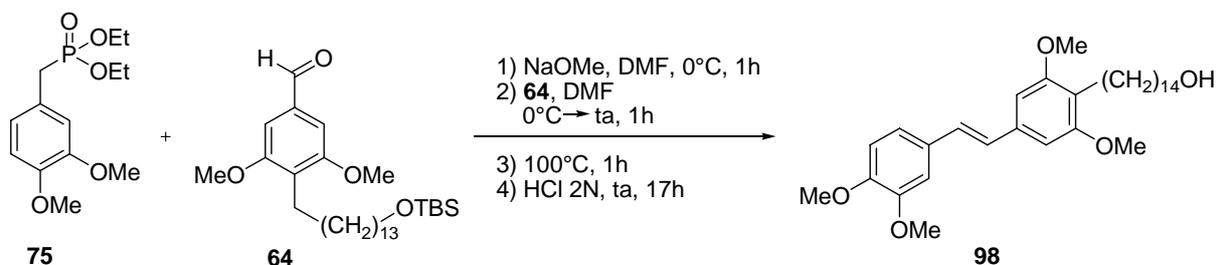
Les spectres RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C sont identiques à ceux obtenus pour **93**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux CH<sub>2</sub> supplémentaires.

| Produit<br>(n)    | Formule brute                                  | PM     | Rf* | Point de fusion | MS<br>(FAB <sup>+</sup> )<br>m/z<br>(M+Li <sup>+</sup> )** | HRMS<br>(FAB <sup>+</sup> )<br>Trouvée<br>(calculée) |
|-------------------|--|--------|-----|-----------------|--|--|
| <b>89</b><br>(10) | C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> | 426,59 | 0,2 | 84-86°C         | 433  | 433,2986<br>(433,2925)                               |
| <b>90</b><br>(11) | C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> | 440,61 | 0,2 | 84-86°C         | -  | -  |
| <b>91</b><br>(12) | C <sub>29</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> | 454,64 | 0,2 | 88-89°C         | 461  | 461,3234<br>(461,3238)                               |
| <b>92</b><br>(13) | C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub> | 468,67 | 0,2 | 90-91°C         | -  | -  |
| <b>94</b><br>(16) | C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub> | 510,75 | 0,3 | 96-98°C         | 517  | 517,3947<br>(517,3864)                               |
| <b>95</b><br>(18) | C <sub>35</sub> H <sub>54</sub> O <sub>4</sub> | 538,80 | 0,3 | 100-101°C       | 545  | 545,4241<br>(545,4177)                               |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 7-3

\*\* Le lithium provient du calibrant

**(E)-14-(4-(3,4-Diméthoxystyryl)-2,6-diméthoxyphényl)tétradécan-1-ol 98**



Une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (0,470 mL ; 2,54 mmol ; 2,5 éq) est ajoutée à une solution de (3,4-diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique **75** (0,53 g ; 2,03 mmol ; 2 éq) dans le diméthylformamide (0,7 mL) refroidie à 0°C. Une solution de 4-(14-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)tétradécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde **64** (0,5 g ; 1,01 mmol ; 1 éq) dans le DMF (1,3 mL) est ensuite ajoutée. Après 1h à température ambiante, le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 1h supplémentaire. Le mélange est refroidi à température ambiante avant l'ajout d'une solution aqueuse de HCl 2M (3 mL). L'agitation est maintenue pendant 17 heures. Ensuite, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de KCl (100 mL) puis extrait à l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec

une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 6-4) pour donner 0,178 g d'un solide blanc.

**Rendement : 34%**

**Formule brute :** C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub>

**PM :** 512,72

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 5-5) R<sub>f</sub> = 0,3

**Point de fusion :** 117-119°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,26 (s large, 20H, H-3'' à H-12'') ; 1,43 à 1,59 (m, 4H, H-2'' et H-13'') ; 2,61 (m, 2H, H-14'') ; 3,64 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1'') ; 3,86 (s, 6H, OMe) ; 3,91 (s, 3H, OMe) ; 3,95 (s, 3H, OMe) ; 6,68 (s, 2H, H-3 et H-5) ; 6,86 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-5') ; 6,93 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,02 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,07 (m, 2H, H-2' et H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 23,0 (C-14'') ; 25,8 à 29,9 (C-3'' à C-13'') ; 32,8 (C-2'') ; 55,7 (OMe) ; 55,9 (OMe) ; 56,0 (OMe) ; 63,1 (C-1'') ; 102,0 (C-3 et C-5) ; 106,7 (C-1) ; 111,2 (C-2') ; 119,5 (C-5') ; 119,8 (C-6') ; 123,2 (C-1') ; 127,4 (C-8) ; 127,6 (C-7) ; 130,7 (C-1') ; 136,0 (C-4) ; 148,9 (C-4') ; 149,1 (C-3') ; 158,4 (C-2 et C-6).

**IR** ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3424, 3327 (OH) ; 3002 (=C-H) ; 2924, 2848 (C-H) ; 1581, 1515 (C=C) ; 1139 (C-O) ; 811 (C-H).

**MS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 519

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 519,3657 (calculée) ; 519,3668 (trouvée)

Les molécules **96** et **97**, **99** et **100**, analogues à **98** mais avec des longueurs de chaîne différentes, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **98**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

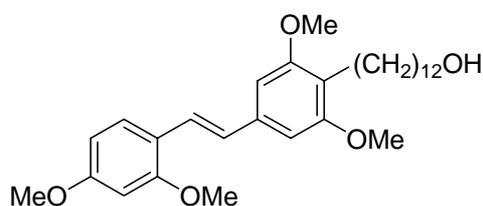
| n  | Phosphonate<br><b>75</b><br>g (1,8 éq)<br>(mmol) | Aldéhyde<br>g (1 éq)<br>(mmol) | NaOMe<br>mL (2 éq)<br>(mmol) | DMF<br>mL (total) | Produit<br>g<br>(Rendement %)  |
|----|--|--------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| 10 | 0,280 g<br>(1,07)                                | <b>60</b><br>0,260 g<br>(0,60) | 0,220 mL<br>(1,19)           | 1,5 mL            | <b>96</b><br>0,118 g<br>(43%)  |
| 12 | 0,450 g<br>(1,55)                                | <b>62</b><br>0,405 g<br>(0,87) | 0,350 mL<br>(1,74)           | 2 mL              | <b>97</b><br>0,230 g<br>(55%)  |
| 16 | 0,503 g<br>(1,75)                                | <b>65</b><br>0,506 g<br>(0,97) | 0,360 mL<br>(1,94)           | 3,2 mL            | <b>99</b><br>0,331 g<br>(63%)  |
| 18 | 0,415 g<br>(1,44)                                | <b>66</b><br>0,439 g<br>(0,80) | 0,300 mL<br>(1,60)           | 2 mL              | <b>100</b><br>0,109 g<br>(24%) |

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C sont identiques à ceux obtenus pour **98**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,9 ppm correspondant aux CH<sub>2</sub> supplémentaires.

| Produit<br>(n)     | Formule brute                                  | PM     | Rf* | Point de<br>fusion | MS<br>(FAB <sup>+</sup> )<br>m/z<br>(M+Li <sup>+</sup> )** | HRMS<br>(FAB <sup>+</sup> )<br>Trouvée<br>(calculée) |
|--------------------|--|--------|-----|--------------------|--|--|
| <b>96</b><br>(10)  | C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub> | 456,61 | 0,2 | 115-116°C          | 463  | 463,2957<br>(463,3031)                               |
| <b>97</b><br>(12)  | C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub> | 484,67 | 0,2 | 116-117°C          | 491  | 491,3312<br>(491,3344)                               |
| <b>99</b><br>(16)  | C <sub>29</sub> H <sub>52</sub> O <sub>5</sub> | 540,34 | 0,4 | 120-121°C          | 547  | 547,3997<br>(547,3970)                               |
| <b>100</b><br>(18) | C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>5</sub> | 568,83 | 0,4 | 122-123°C          | 575  | 575,4283<br>(575,4283)                               |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 6-4

\*\* Le lithium provient du calibrant

**(E)-12-(4-(2,4-Diméthoxystyryl)-2,6-diméthoxyphényl)dodécan-1-ol 101****101**

Le composé **101** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **98**.

- 4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde **62** (0,38 g ; 0,82 mmol ; 1 éq)
- (2,4-diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique **74** (0,378 g ; 1,31 mmol ; 1,6 éq)
- NaOMe (0,300 mL ; 1,64 mmol ; 2 éq)
- DMF (3 mL)
- HCl 2N (3,5 mL)

**Rendement : 60%**

**Formule brute :** C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>

**PM :** 484,67

**CCM :** (pentane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,2

**Point de fusion :** 94-95°C

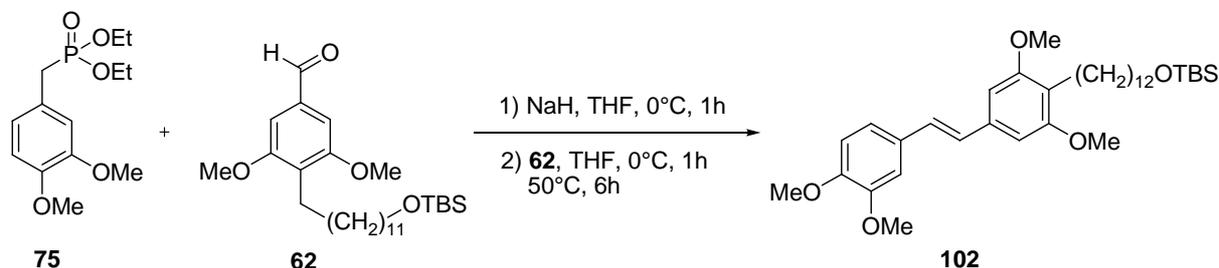
**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,26 (s large, 16H, H-3'' à H-10'') ; 1,43 à 1,59 (m, 4H, H-2'' et H-11'') ; 2,61 (t, J = 7,5 Hz, 2H, H-12'') ; 3,64 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1') ; 3,84 (s, 3H, OMe) ; 3,85 (s, 6H, OMe) ; 3,88 (s, 3H, OMe) ; 6,48 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-3') ; 6,52 (dd, J = 8,4 Hz et J = 2,4 Hz, 1H, H-5') ; 6,68 (s, 2H, H-3 et H-5) ; 6,97 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,31 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,50 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 23,0 (C-12'') ; 25,8 à 29,8 (C-3'' à C-11'') ; 32,8 (C-2'') ; 55,4 (OMe) ; 55,6 (OMe) ; 55,8 (OMe) ; 63,1 (C-1'') ; 98,5 (C-3') ; 102,0 (C-3 et C-5) ; 105,0 (C-5') ; 119,1 (C-1) ; 119,6 (C-1') ; 122,5 (C-6') ; 127,2 (C-8) ; 127,8 (C-7) ; 136,8 (C-4) ; 158,0 (C-2') ; 158,3 (C-2 et C-6) ; 160,4 (C-4').

**IR** ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3360 (OH) ; 3012 (=C-H) ; 2919, 2850 (C-H) ; 1571, 1506 (C=C) ; 1136 (C-O) ; 821 (C-H).

**MS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>+</sup>) : 483

**HRMS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>+</sup>) : 483,3105 (calculée) ; 483,3118 (trouvée)

**(E)-(12-(4-(3,4-Diméthoxystyryl)-2,6-diméthoxyphényl)dodécyloxy)(tert-butyl)diméthylsilyle 102**

De l'hydrure de sodium (0,027 g ; 1,16 mmol ; 2,6 éq) est ajouté à une solution de (3,4-diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique **75** (0,248 g ; 0,86 mmol ; 2 éq) dans le THF (1,5 mL) refroidie à 0°C. Après 1h, une solution de 4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde **62** (0,203 g ; 0,44 mmol ; 1 éq) dans le THF (0,2 mL) est ajoutée. Après 6h de chauffage à 50°C, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante avant l'ajout d'une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant pentane-AcOEt : 9-1) pour donner 0,184 g d'un solide blanc.

**Rendement : 70%**

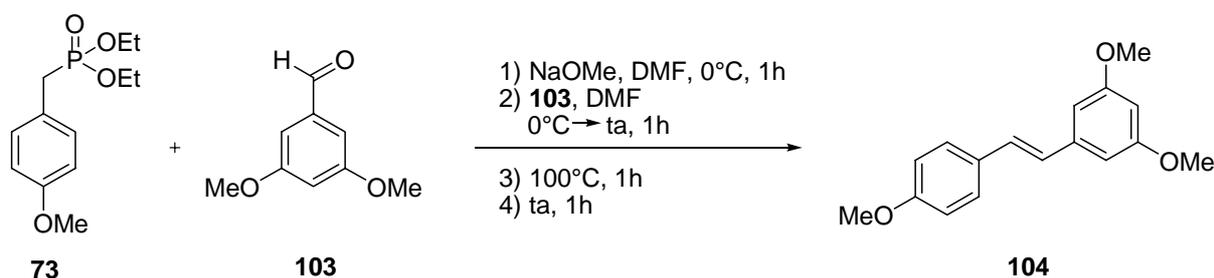
**Formule brute :** C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>5</sub>Si

**PM :** 598,93

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,5

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,89 (s, 9H, CH<sub>3</sub>C) ; 1,27 (s large, 16H, H-3'' à H-10'') ; 1,43 à 1,52 (m, 4H, H-2'' et H-11'') ; 2,61 (m, 2H, H-1'') ; 3,59 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-12'') ; 3,86 (s, 6H, OMe) ; 3,91 (s, 3H, OMe) ; 3,95 (s, 3H, OMe) ; 6,68 (s, 2H, H-3 et H-5) ; 6,87 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-5') ; 6,93 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,02 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,06 (m, 2H, H-2' et H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 23,0 (C-1'') ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 25,8 à 29,9 (C-2'' à C-10'') ; 32,8 (C-11'') ; 55,7 (OMe) ; 55,9 (OMe) ; 56,0 (OMe) ; 63,1 (C-12'') ; 102,0 (C-3 et C-5) ; 106,7 (C-1) ; 111,2 (C-2') ; 119,5 (C-5') ; 119,8 (C-6') ; 127,4 (C-8) ; 127,6 (C-7) ; 130,7 (C-1') ; 136,0 (C-4) ; 148,9 (C-4') ; 149,1 (C-3') ; 158,4 (C-2 et C-6).

**(E)-1-(4-Méthoxystyryl)-3,5-diméthoxybenzène 104**

Une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (2,8 mL ; 15,05 mmol ; 2,5 éq) est ajoutée à une solution de (4-méthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique **73** (3,11 g ; 12,04 mmol ; 2 éq) dans le diméthylformamide (11 mL) refroidie à 0°C. Une solution de 3,5-diméthoxybenzaldéhyde **103** (1 g ; 6,02 mmol ; 1 éq) dans le DMF (1 mL) est ensuite ajoutée. Après 1h à température ambiante, le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 1h supplémentaire. L'agitation est maintenue à température ambiante pendant la nuit. Après 17h, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de KCl (100 mL) puis extrait à l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 6-4) pour donner 1,25 g d'un solide blanc.

**Rendement : 77%**

**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**PM :** 270,31

**CCM :** (éluant heptane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,3

**Point de fusion :** 53-54°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,83 (s, 9H, OMe) ; 6,38 (t, J = 2,2 Hz, 1H, H-4) ; 6,65 (d, J = 2,2 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 6,90 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 6,91 (d, J = 16,3 Hz, 1H, H-8) ; 7,04 (d, J = 16,3 Hz, 1H, H-7) ; 7,45 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-2' et H-6').

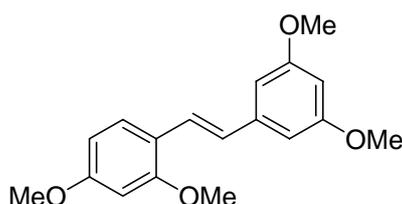
**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 55,4 (OMe) ; 99,6 (C-4) ; 104,3 (C-2 et C-6) ; 114,2 (C-3' et C-5') ; 126,6 (C-8) ; 127,8 (C-2' et C-6') ; 128,8 (C-7) ; 129,9 (C-1') ; 139,7 (C-1) ; 159,4 (C-4') ; 161,0 (C-3 et C-5).

IR  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) : 3049 (=C-H) ; 2989, 2931, 2831 (C-H) ; 1588, 1449 (C=C) ; 1152 (C-O) ; 820 (C-H).

MS (FAB<sup>+</sup>) m/z (M+H<sup>+</sup>) : 271

HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z (M+H<sup>+</sup>) : 271,1329 (calculée) ; 271,1336 (trouvée)

**(E)-1-(2,4-diméthoxystyryl)-3,5-diméthoxybenzène 105**



**105**

Le composé **105** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **104**.

- 3,5-diméthoxybenzaldéhyde **103** (0,35 g ; 2,11 mmol ; 1 éq)
- (2,4-diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique **74** (0,971 g ; 3,37 mmol ; 1,8 éq)
- NaOMe (0,780 mL ; 4,21 mmol ; 2 éq)
- DMF (5 mL)

**Rendement : 57%**

**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>

**PM :** 300,35

**CCM :** (pentane-AcOEt : 8-2) R<sub>f</sub> = 0,3

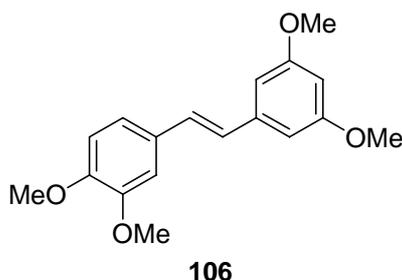
**Point de fusion :** 83-85°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 3,83 (s, 6H, OMe) ; 3,84 (s, 3H, OMe) ; 3,87 (s, 3H, OMe) ; 6,36 (t, J = 2,1 Hz, 1H, H-4) ; 6,47 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-3') ; 6,51 (dd, J = 8,4 Hz et J = 2,4 Hz, 1H, H-5') ; 6,67 (d, J = 2,1 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 6,94 (d, J = 16,5 Hz, 1H, H-8) ; 7,36 (d, J = 16,5 Hz, 1H, H-7) ; 7,49 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 55,3 (2xOMe) ; 55,4 (OMe) ; 55,5 (OMe) ; 98,5 (C-4) ; 99,4 (C-6') ; 104,4 (C-2 et C-6) ; 105,0 (C-5') ; 119,3 (C-1') ; 123,9 (C-3') ; 127,0 (C-8) ; 127,4 (C-7) ; 140,4 (C-1) ; 158,1 (C-2') ; 160,6 (C-4') ; 160,9 (C-3 et C-5).

IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 2999 (=C-H) ; 2945, 2840 (C-H) ; 1587, 1454 (C=C) ; 1150 (C-O) ; 815 (C-H).

**(E)-1-(2,4-Diméthoxystyryl)-3,5-diméthoxybenzène 106**



Le composé **106** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **104**.

- 3,5-diméthoxybenzaldéhyde **103** (0,085 g ; 0,51 mmol ; 1 éq)
- (3,4-diméthoxyphényl)méthylphosphonate diéthylique **75** (0,24 g ; 0,92 mmol ; 1,8 éq)
- NaOMe (0,2 mL ; 1,08 mmol ; 2 éq)
- DMF (1,5 mL)

**Rendement : 76%**

**Formule brute :**  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4$

**PM :** 300,35

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3)  $R_f = 0,3$

**Point de fusion :** 68-69°C

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3,83 (s, 6H, OMe) ; 3,90 (s, 3H, OMe) ; 3,95 (s, 3H, OMe) ; 6,38 (t,  $J = 2,2$  Hz, 1H, H-4) ; 6,66 (d,  $J = 2,2$  Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 6,85 (s, 1H, H-2') ; 6,90 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H, H-8) ; 7,03 (d,  $J = 16,5$  Hz, 1H, H-7) ; 7,04 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, H-5' et H-6').

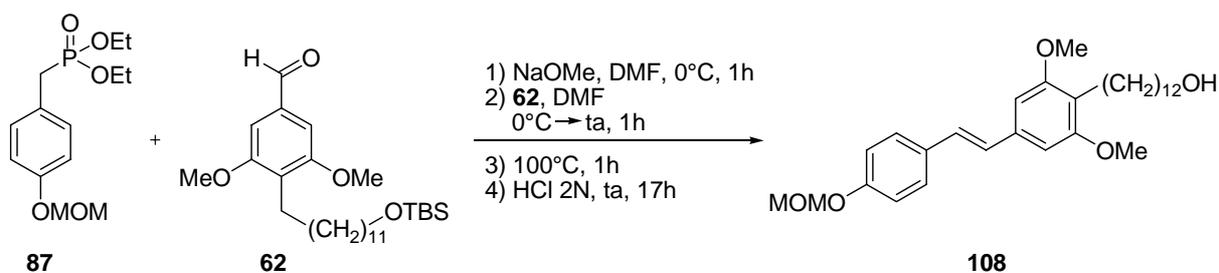
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 55,4 (2xOMe) ; 55,9 (OMe) ; 56,0 (OMe) ; 99,7 (C-4) ; 104,4 (C-2 et C-6) ; 108,8 (C-2') ; 111,2 (C-5') ; 120,0 (C-6') ; 126,8 (C-8) ; 129,0 (C-7) ; 130,3 (C-1') ; 139,6 (C-1) ; 149,0 (C-3') ; 149,1 (C-4') ; 161,0 (C-3 et C-5).

IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 2995 (=C-H) ; 2955, 2839 (C-H) ; 1577, 1502 (C=C) ; 1147 (C-O) ; 817 (C-H).

MS (FAB<sup>+</sup>) m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 307

HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 307,1517 (calculée) ; 307,1532 (trouvée)

**(E)-12-(4-(Méthoxyméthoxy)styryl)-2,6-diméthoxyphényl)dodécan-1-ol 108**



Une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (0,383 mL ; 2,07 mmol ; 2,4 éq) est ajoutée à une solution de diéthyl 4-(méthoxyméthoxy)benzylphosphonate **87** (0,496 g ; 1,72 mmol ; 2 éq) dans le diméthylformamide (3 mL) refroidie à 0°C. Une solution de 4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde **62** (0,4 g ; 0,86 mmol ; 1 éq) dans le DMF (0,5 mL) est ensuite ajoutée. Après 1h à température ambiante, le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 1h supplémentaire. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante avant l'ajout d'une solution aqueuse de HCl à 2M (5 mL). Après 17h, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de KCl (100 mL) puis extrait à l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 65-35) pour donner 0,297 g d'un solide blanc.

**Rendement : 71%**

**Formule brute :** C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>

**PM :** 484,67

**CCM :** (éluant heptane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,4

**Point de fusion :** 78-79°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,27 (s large, 16H, H-3'' à H-10'') ; 1,46 à 1,59 (m, 4H, H-2'' et H-11'') ; 2,61 (m, 2H, H-12'') ; 3,50 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,64 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1') ; 3,86 (s, 6H, OMe) ; 5,20 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>) ; 6,67 (s, 2H, H-3 et H-5) ; 6,94 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,02 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,03 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 7,45 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2' et H-6').

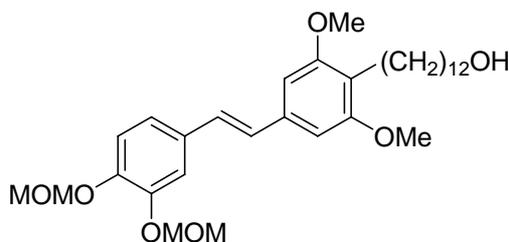
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 23,0 (C-12'') ; 25,7 à 29,8 (C-3'' à C-11'') ; 32,8 (C-2'') ; 55,7 (2xOMe) ; 56,1 (-OCH<sub>3</sub>) ; 63,1 (C-1'') ; 94,4 (-OCH<sub>2</sub>) ; 102,0 (C-3 et C-5) ; 116,4 (C-3' et C-5') ; 119,5 (C-1) ; 127,3 (C-8) ; 127,6 (C-2' et C-6') ; 127,7 (C-7) ; 132,4 (C-1') ; 136,0 (C-4) ; 156,8 (C-4') ; 158,4 (C-2 et C-6).

**IR**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3418, 3341 (OH) ; 3010 (=C-H) ; 2925, 2849 (C-H) ; 1572, 1509 (C=C) ; 1138 (C-O) ; 830 (C-H).

**MS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 491

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 491,3344 (calculée) ; 491,3381 (trouvée)

**(E)-12-(4-(3,4-bis(Méthoxyméthoxy)styryl)-2,6-diméthoxyphényl)dodécan-1-ol 109**



**109**

Le composé **109** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **108**.

- 4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodécyl)-3,5-diméthoxybenzaldéhyde **62** (0,278 g ; 0,60 mmol ; 1 éq)
- diéthyl 3,4-bis(méthoxyméthyl)benzylphosphonate **88** (0,416 g ; 1,19 mmol ; 2 éq)
- NaOMe (0,27 mL ; 1,44 mmol ; 2,4 éq)
- DMF (2,5 mL)

**Rendement : 54%**

**Formule brute** :  $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_7$

**PM** : 544,72

**CCM** : (heptane-AcOEt : 6-4)  $R_f = 0,2$

**Point de fusion** : 68-69°C

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,27 (s large, 16H, H-3'' à H-10'') ; 1,44 à 1,59 (m, 4H, H-2'' et H-11'') ; 2,61 (m, 2H, H-12'') ; 3,53 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,56 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,64 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H-1'') ; 3,86 (s, 6H, OMe) ; 5,25 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>) ; 5,30 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>) ;

6,68 (s, 2H, H-3 et H-5) ; 6,96 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,00 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,11 (dd, J = 8,4 Hz et J = 1,8 Hz, 1H, H-6') ; 7,15 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-5') ; 7,34 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-2').

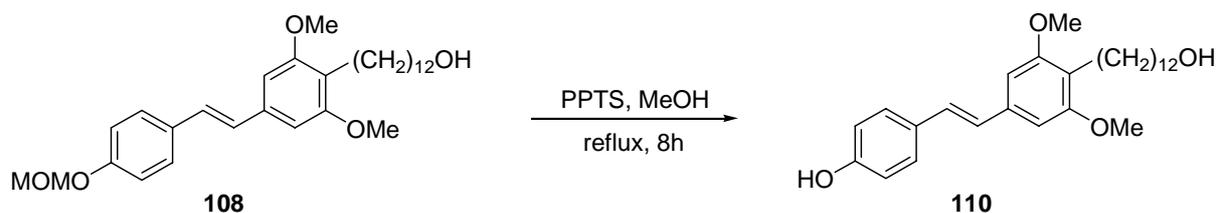
**RMN**  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 23,0 (C-12'') ; 25,8 à 29,8 (C-3'' à C-11'') ; 32,8 (C-2'') ; 55,8 (2xOMe) ; 56,2 (-OCH<sub>3</sub>) ; 56,3 (-OCH<sub>3</sub>) ; 63,1 (C-1'') ; 95,4 (-OCH<sub>2</sub>) ; 102,0 (C-3 et C-5) ; 114,2 (C-2') ; 116,7 (C-5') ; 119,6 (C-1) ; 120,9 (C-6') ; 127,3 (C-8) ; 128,1 (C-7) ; 132,1 (C-1') ; 135,8 (C-4) ; 147,0 (C-4') ; 147,5 (C-3') ; 158,4 (C-2 et C-6).

**IR**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3342 (OH) ; 3002 (=C-H) ; 2917, 2849 (C-H) ; 1576, 1509, 993 (C=C) ; 1140 (C-O) ; 817 (C-H).

**MS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 551

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Li<sup>+</sup>) : 551,3555 (calculée) ; 551,3596 (trouvée)

**(E)-4-(4-(12-Hydroxydodécyl)-3,5-diméthoxystyryl)phénol 110**



Du *para*-toluène sulfonate de pyridinium (1,42 g ; 5,65 mmol ; 10 éq) est ajouté à une solution de (E)-12-(4-(méthoxyméthyl)styryl)-2,6-diméthoxyphényl)dodécan-1-ol **108** (0,274 g ; 0,57 mmol ; 1 éq) dans le méthanol (6 mL). Après 6h à reflux, le méthanol est évaporé et une solution saturée de NaCl (50 mL) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther (3x50 mL). La phase organique est lavée à l'eau (2x50 mL), séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 5-5) pour donner 0,239 g d'un solide blanc.

**Rendement : 95%**

**Formule brute** :  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4$

**PM** : 440,61

**CCM** : (éluant heptane-AcOEt : 5-5)  $R_f = 0,3$

**Point de fusion** : 119-120°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 1,26 (s large, 16H, H-3'' à H-10'') ; 1,46 à 1,59 (m, 4H, H-2'' et H-11'') ; 2,57 (t, J = 7,9 Hz, 2H, H-1'') ; 3,51 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-12'') ; 3,81 (s, 6H, OMe) ; 6,71 (s, 2H, H-2 et H-6) ; 6,74 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2' et H-6') ; 6,90 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,03 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3' et H-5').

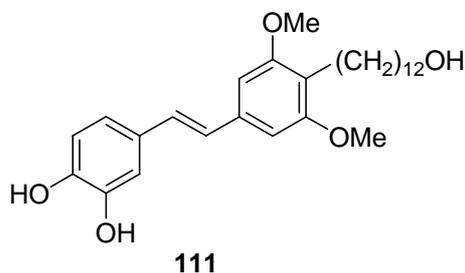
**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 22,8 (C-1'') ; 25,7 à 29,8 (C-2'' à C-10'') ; 32,8 (C-11'') ; 55,7 (OMe) ; 56,1 ; 63,1 (C-12'') ; 102,0 (C-2 et C-6) ; 116,4 (C-2' et C-6') ; 119,5 (C-4) ; 127,3 (C-8) ; 127,6 (C-3' et C-5') ; 127,7 (C-7) ; 132,4 (C-4') ; 136,0 (C-1) ; 157,7 (C-1') ; 158,4 (C-3 et C-5).

**IR**  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) : 3191 (OH) ; 3017 (=C-H) ; 2917, 2849 (C-H) ; 1576, 1513, 956 (C=C) ; 1143 (C-O) ; 821 (C-H).

**MS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>+</sup>) : 439

**HRMS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>+</sup>) : 439,2843 (calculée) ; 439,2878 (trouvée)

**(E)-4-(4-(12-Hydroxydodécyl)-3,5-diméthoxystyryl)benzène-1,2-diol 111**



Le composé **111** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **110**.

- (E)-12-(4-(3,4-bis(méthoxyméthyl)styryl)-2,6-diméthoxyphényl)dodécane-1-ol **109** (0,145 g ; 0,27 mmol ; 1 éq)
- *para*-toluène sulfonate de pyridinium (1,34 g ; 5,32 mmol ; 20 éq)
- MeOH (3 mL)

**Rendement : 93%**

**Formule brute** : C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>

**PM** : 456,61

**CCM** : (heptane-AcOEt : 3-7) R<sub>f</sub> = 0,4

**Point de fusion** : 120-121°C

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 1,28 (s large, 16H, H-3'' à H-10'') ; 1,39 à 1,54 (m, 4H, H-2'' et H-11'') ; 2,58 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H, H-1'') ; 3,53 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H, H-12'') ; 3,83 (s, 6H, OMe) ; 6,54 (s, 2H, H-2 et H-6) ; 6,73 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, H-6') ; 6,87 (dd,  $J = 8,4$  Hz et  $J = 1,8$  Hz, 1H, H-5') ; 6,88 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H-8) ; 6,98 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H-7) ; 7,05 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H, H-3').

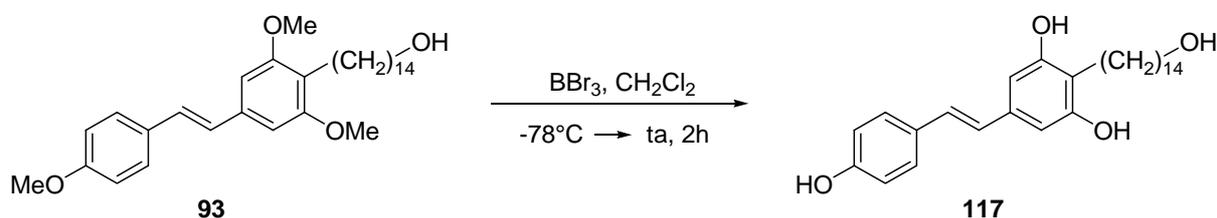
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 23,0 (C-1'') ; 25,5 à 29,3 (C-2'' à C-10'') ; 32,2 (C-11'') ; 54,7 (2xOMe) ; 61,6 (C-12'') ; 101,4 (C-2 et C-6) ; 112,4 (C-4) ; 115,0 (C-3') ; 118,2 (C-6') ; 118,7 (C-5') ; 126,0 (C-8) ; 127,6 (C-7) ; 129,8 (C-4') ; 136,6 (C-1) ; 145,0 (C-1') ; 145,1 (C-2') ; 158,2 (C-3 et C-5).

**IR  $\nu_{\text{max}}$**  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3213 (OH) ; 3018 (=C-H) ; 2918, 2850 (C-H) ; 1575, 1526, 953 (C=C) ; 1140 (C-O) ; 810 (C-H).

**MS (FAB $^-$ )**  $m/z$  (M-H $^+$ ) : 455

**HRMS (FAB $^-$ )**  $m/z$  (M-H $^+$ ) : 455,2792 (calculée) ; 455,2793 (trouvée)

**(E)-5-(4-Hydroxystyryl)-2-(14-hydroxytétradécyl)benzène-1,3-diol 117**



Du tribromure de bore (0,23 mL ; 2,42 mmol ; 15 éq.) est ajouté à une solution de (*E*)-14-(4-(4-méthoxystyryl)-2,6-diméthoxyphényl)tétradécane-1-ol **93** (78 mg ; 0,16 mmol ; 1 éq.) dans le dichlorométhane (5 mL) à  $-78^\circ\text{C}$ . Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante. Après 2h, de l'eau (50 mL) est ajoutée à  $-78^\circ\text{C}$ . La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (3x50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de NaCl (50 mL), séchées sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrées puis évaporées. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 45-55) pour donner 38 mg d'un solide blanc.

**Rendement : 54%**

**Formule brute** :  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4$

**PM** : 440,61

**CCM** : (éluant heptane-AcOEt : 4-6)  $R_f = 0,3$

**Point de fusion :** 171-172°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 1,28 (s large, 20H, H-3'' à H-12'') ; 1,40 à 1,52 (m, 4H, H-2'' et H-13'') ; 2,57 (t, J = 7,5 Hz, 2H, H-1'') ; 3,53 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-14'') ; 6,45 (s, 2H, H-4 et H-6) ; 6,74 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-8) ; 6,75 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 6,89 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-7) ; 7,32 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-2' et H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 22,9 (C-1'') ; 25,7 à 29,8 (C-2'' à C-12'') ; 29,7 (C-13'') ; 64,3 (C-14'') ; 104,6 (C-4 et C-6) ; 115,4 (C-2) ; 115,9 (C-3' et C-5') ; 126,3 (C-8) ; 127,1 (C-7) ; 128,1 (C-2' et C-6') ; 128,6 (C-1') ; 135,7 (C-5) ; 156,7 (C-1 et C-3) ; 156,8 (C-4').

**IR** ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3353 (OH) ; 3011 (=C-H) ; 2915, 2848 (C-H) ; 1586, 1511, 1426, 956 (C=C) ; 1249 (C-O) ; 832 (C-H).

**MS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>-</sup>) : 439

**HRMS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>-</sup>) : 439,2843 (calculée) ; 439,2912 (trouvée)

Les molécules **113** à **116** et **118**, analogues à **117** mais avec des longueurs de chaîne différentes, sont obtenues suivant le même procédé que celui décrit pour **117**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant :

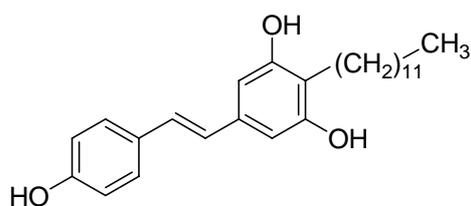
| <b>n</b> | <b>RFA triméthoxylé</b><br>g (1 éq)<br>(mmol) | <b>BBr<sub>3</sub> (99,9%)</b><br>mL (15 éq)<br>(mmol) | <b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b><br>mL | <b>Produit</b><br>g<br>(Rendement %) |
|----------|---|--|---|--------------------------------------|
| 10       | 0,053 g<br>(0,12)                             | 0,176 mL<br>(1,86)                                     | 5 mL                                      | <b>113</b><br>0,035 g<br>(76%)       |
| 11       | 0,070 g<br>(0,16)                             | 0,225 mL<br>(2,38)                                     | 6,5 mL                                    | <b>114</b><br>0,029 g<br>(46%)       |
| 12       | 0,150 g<br>(0,33)                             | 0,470 mL<br>(4,95)                                     | 8 mL                                      | <b>115</b><br>0,070 g<br>(54%)       |
| 13       | 0,070 g<br>(0,15)                             | 0,212 mL<br>(2,24)                                     | 6 mL                                      | <b>116</b><br>0,052 g<br>(80%)       |
| 16       | 0,060 g<br>(0,12)                             | 0,170 mL<br>(1,76)                                     | 5 mL                                      | <b>118</b><br>0,042 g<br>(75%)       |

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont identiques à ceux obtenus pour **117**, avec à chaque fois +/- 2H ou 4H à 1,26 ppm et +/- 1C ou 2C entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux  $\text{CH}_2$  supplémentaires.

| Produit<br>(n)     | Formule brute                          | PM     | Rf* | Point de<br>fusion | MS<br>(FAB <sup>-</sup> )<br>m/z<br>(M-H <sup>-</sup> ) | HRMS<br>(FAB <sup>-</sup> )<br>Trouvée<br>(calculée) |
|--------------------|--|--------|-----|--------------------|---|--|
| <b>113</b><br>(10) | $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4$ | 384,51 | 0,2 | 166-168°C          | 383   | 383,2231<br>(383,2217)                               |
| <b>114</b><br>(11) | $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_4$ | 398,54 | 0,2 | 171-173°C          | -   | -  |
| <b>115</b><br>(12) | $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_4$ | 412,56 | 0,3 | 173-174°C          | 411   | 411,2512<br>(411,2530)                               |
| <b>116</b><br>(13) | $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$ | 426,59 | 0,3 | 172-174°C          |   |  |
| <b>118</b><br>(16) | $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$ | 468,67 | 0,5 | -                  | -   | -  |

\* éluant pour les CCM : heptane-AcOEt : 4-6

**(E)-5-(4-Hydroxystyryl)-2-(dodécyl)benzène-1,3-diol 148**



**148**

Le composé **148** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **110**.

- (E)-12-(4-(4-méthoxystyryl)-2,6 diméthoxyphényl)dodécane (0,07 g ; 0,16 mmol ; 1 éq)
- $\text{BBr}_3$  (0,226 mL ; 2,39 mmol ; 15 éq)
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6,5 mL)

**Rendement : 63%**

**Formule brute :**  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_3$

**PM :** 396,56

**CCM :** (pentane-AcOEt : 7-3) Rf = 0,2

**Point de fusion :** 186-189°C

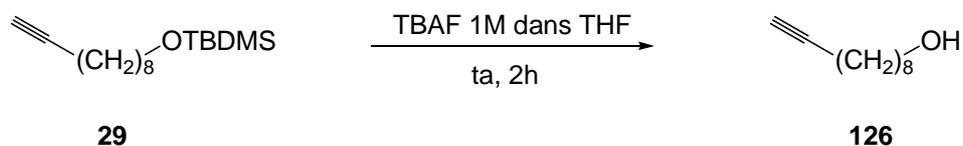
**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 0,89 (t, J = 6,6 Hz, 3H, H-12'') ; 1,28 (s large, 18H, H-3'' à H-11'') ; 1,51 (m, 2H, H-2'') ; 2,57 (t, J = 7,5 Hz, 2H, H-1'') ; 4,86 (s, 3H, OH) ; 6,45 (s, 2H, H-4 et H-6) ; 6,74 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-8) ; 6,75 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 6,89 (d, J = 15,9 Hz, 1H, H-7) ; 7,32 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-2' et H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 13,0 (C-12'') ; 22,3 (C-11'') ; 22,7 (C-1'') ; 28,9 à 29,4 (C-3'' à C-10'') ; 31,7 (C-2'') ; 104,2 (C-4 et C-6) ; 115,0 (C-2) ; 115,5 (C-3' et C-5') ; 125,8 (C-8) ; 126,8 (C-7) ; 127,2 (C-2' et C-6') ; 129,2 (C-1') ; 136,0 (C-5) ; 156,0 (C-1 et C-3) ; 156,7 (C-4').

**IR** ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3351 (OH) ; 3016 (=C-H) ; 2916, 2848 (C-H) ; 1574, 1512, 1425, 965 (C=C) ; 1248 (C-O) ; 829 (C-H).

**MS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>-</sup>) : 395

**HRMS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>-</sup>) : 395,2581 (calculée) ; 395,2583 (trouvée)

**Déc-9-yn-1-ol 126**

Une solution de fluorure de tétrabutylammonium (10,2 mL ; 10,2 mmol ; 2 éq) à 1M dans le THF est ajoutée au *tert*-butyl(déc-9-ynyloxy)diméthylsilylane **29** (1,37 g ; 5,10 mmol ; 1 éq). Après 2h à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mL) puis extrait avec de l'éther (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$  (100 mL), séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane-AcOEt : 7-3) pour donner 0,701 g d'une huile incolore.

**Rendement : 89%**

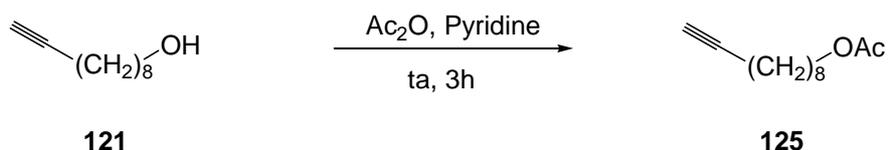
**Formule brute :**  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$

**PM :** 154,25

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3)  $R_f = 0,3$

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,26 (s large, 4H, H-3 à H-6) ; 1,54 (m, 4H, H-2 et H-7) ; 1,93 (t,  $J = 2,6$  Hz, 1H, H-10) ; 2,18 (td,  $J = 6,9$  Hz et  $J = 2,6$  Hz, 2H, H-8) ; 3,64 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H, H-1).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 18,4 (C-8) ; 25,7 (C-3 et C-7) ; 28,5 à 29,5 (C-4 à C-6) ; 32,8 (C-2) ; 63,1 (C-1) ; 68,1 (C-10) ; 84,8 (C-9).

**Déc-9-ynyl acétate 125**

De l'anhydride acétique (0,84 mL ; 8,88 mmol ; 2 éq) est ajouté à une solution de déc-9-yn-1-ol **121** (0,685 g ; 4,44 mmol ; 1 éq) dans la pyridine (10 mL). Après 5h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution aqueuse de  $\text{HCl}$  à 2N (50 mL) puis extrait avec de l'éther (3x50 mL). La phase organique est lavée avec une

solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane-AcOEt : 9-1) pour donner 0,811 g d'une huile incolore.

**Rendement : 93%**

**Formule brute :** C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>

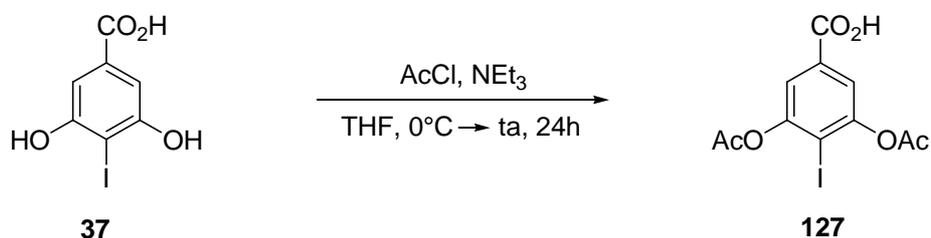
**PM :** 196,29

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,6

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,27 (s large, 4H, H-3 à H-6) ; 1,51 (m, 4H, H-2 et H-7) ; 1,92 (t, J = 2,6 Hz, 1H, H-10) ; 2,05 (s, 3H, OMe) ; 2,18 (td, J = 6,9 Hz et J = 2,6 Hz, 2H, H-8) ; 3,87 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-1).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 19,4 (C-8) ; 20,7 (OAc) ; 26,7 (C-3) ; 28,5 à 29,5 (C-2 à C-7) ; 65,1 (C-1) ; 68,1 (C-10) ; 84,8 (C-9) ; 170,3 (CO).

### Acide 3,5-diacétoxy-4-iodobenzoïque 127



Du chlorure d'acétyle (0,200 mL ; 2,86 mmol ; 8 éq) est ajouté à une solution refroidie à 0°C d'acide 4-iodobenzoïque **37** (0,100 g ; 0,36 mmol ; 1 éq) dans le THF (1,6 mL) et de triéthylamine (0,500 mL ; 3,6 mmol ; 10 éq). Après 24 h à température ambiante, Le mélange réactionnel est versé dans une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (3x50 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (pentane-AcOEt: 4-6 + 0,5% d'acide formique) pour donner 0,129 g d'un solide blanc.

**Rendement : 98%**

**Formule brute :** C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>IO<sub>6</sub>

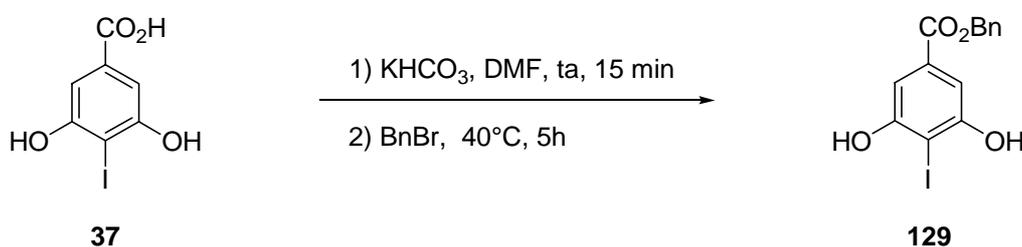
**PM :** 364,09

CCM : (pentane-AcOEt : 1-9) Rf = 0,6

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2,40 (s, 6H, OAc) ; 7,69 (s, 2H, H-2 et H-6).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 21,2 (OAc) ; 96,5 (C-4) ; 121,7 (C-2 et C-6) ; 131,2 (C-1) ; 152,8 (C-3 et C-5) ; 168,1 (2xCO) ; 169,1 (CO).

**4-iodo-3,5-dihydroxybenzoate de benzyle 129**



De l'hydrogénocarbonate de potassium (0,209 g ; 2,08 mmol ; 1,2 éq) est ajouté à une solution d'acide 3,5-dihydroxy-4-iodobenzoïque **37** (0,486 g ; 1,74 mmol ; 1 éq) dans le DMF (2,7 mL). Après 15 minutes à température ambiante, du bromure de benzyle (0,311 mL ; 2,60 mmol ; 1,5 éq) est ajouté. Après 5h de chauffage à 40°C, de l'eau (50 mL) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3x50 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) puis avec une solution saturée de NaCl (50 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 75-25) pour donner 0,547 g d'un solide blanc.

**Rendement : 85%**

**Formule brute :** C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>IO<sub>4</sub>

**PM :** 370,14

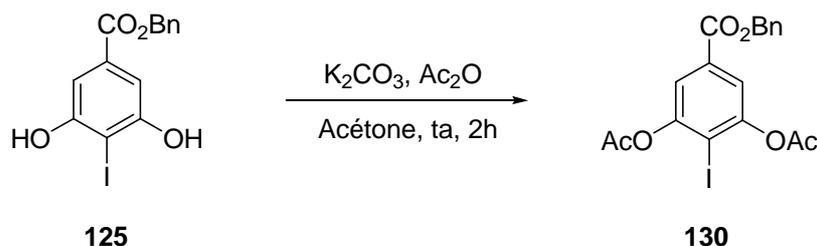
CCM : (heptane-AcOEt : 7-3) Rf = 0,3

**Point de fusion :** 155-157°C

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 6,42 (s, 2H, OH) ; 6,83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 8,54 (s, 2H, H-2 et H-6) ; 8,92 (m, 5H, H<sub>benz</sub>).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 66,4 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 80,7 (C-4) ; 105,9 (C-2 et C-6) ; 127,7 ( $2\times\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 127,9 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 128,2 ( $2\times\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 131,1 (C-1) ; 136,1 ( $\text{C}_{\text{quaternaire}}$ ) ; 158,2 (C-3 et C-5) ; 166,1 (CO).

**4-Iodo-3,5-diacétoxybenzoate de benzyle 130**



Du carbonate de potassium (1,77 g ; 12,8 mmol ; 3 éq) et de l'anhydride acétique (1,13 mL ; 12,0 mmol ; 2,8 éq) sont ajoutés à une solution de 4-iodo-3,5-dihydroxybenzoate de benzyle **125** (1,58 g ; 4,27 mmol ; 1 éq) dans l'acétone. Après 2h à température ambiante, l'acétone est évaporée. Le brut réactionnel ainsi obtenu est dissous dans de l'éther (100 mL). La phase organique est lavée à l'aide d'une solution aqueuse à 1M de  $\text{KHSO}_4$  (100 mL) et d'une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  à 1M (100 mL), séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 8-2) pour donner 1,91 g d'un solide blanc.

**Rendement : 98%**

**Formule brute :**  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{IO}_6$

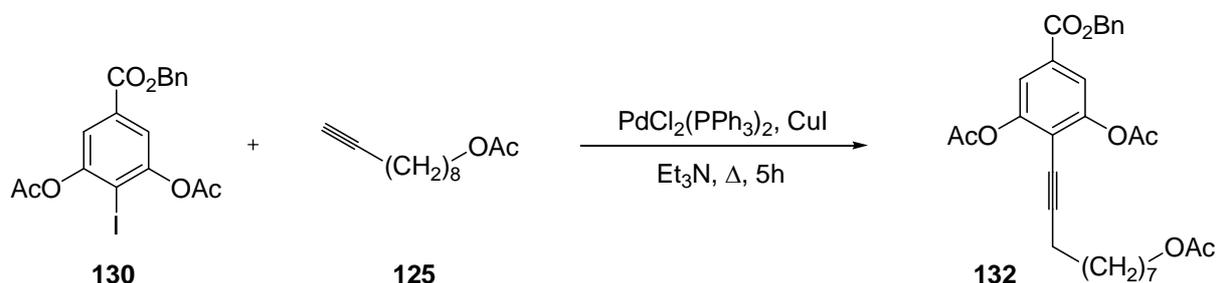
**PM :** 454,21

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3)  $R_f = 0,3$

**Point de fusion :** 111-112°C

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2,38 (s, 6H, OAc) ; 5,34 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 7,40 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ) ; 7,65 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 21,1 (OAc) ; 67,5 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 95,5 (C-4) ; 121,3 (C-2 et C-6) ; 128,5 ( $2\times\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 128,6 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 128,8 ( $2\times\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 132,1 (C-1) ; 135,3 ( $\text{C}_{\text{quaternaire}}$ ) ; 152,7 (C-3 et C-5) ; 164,3 (CO) ; 168,1 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ).

**3,5-Diacétoxy-4-(10-acétoxydéc-1-ynyl)benzoate de benzyle 132**

Du  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (0,092 g ; 0,13 mmol ; 0,07 éq.) et l'iodure de cuivre (0,025 g ; 0,13 mmol ; 0,07 éq.) sont ajoutés à une solution de 4-iodo-3,5-diacétoxybenzoate de benzyle **130** (0,854 g ; 1,88 mmol ; 1 éq.) dans la triéthylamine (7,5 mL). Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 10 minutes, puis du déc-9-ynyl acétate **125** (0,627 g ; 3,20 mmol ; 1,7 éq.) est ajouté. Après 5h de chauffage à reflux, le mélange est versé dans une solution saturée de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mL) puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (3x100 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée de  $\text{NaCl}$  (150 mL), séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est adsorbé sur silice (200  $\mu\text{m}$ ) avant d'être purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 75-25) pour donner 0,788 g d'une huile jaune.

**Rendement : 80%**

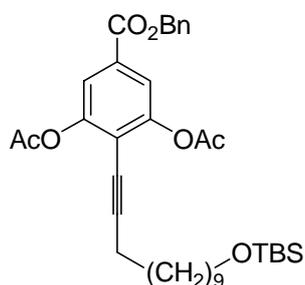
**Formule brute :**  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_8$

**PM :** 522,59

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 6-4)  $R_f = 0,5$

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 1,33 (s large, 8H, H-5' à H-8') ; 1,35 à 1,61 (m, 4H, H-4' et H-9') ; 2,04 (s, 3H, OAc) ; 2,32 (s, 6H, OAc) ; 2,45 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H, H-3') ; 4,05 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H, H-10') ; 5,33 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 7,39 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{benz}}$ ) ; 7,67 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 20,8 (2xOAc) ; 21,0 (OAc) ; 25,9 (C-8') ; 28,0 à 29,0 (C-3' à C-7') ; 29,1 (C-9') ; 64,6 (C-10') ; 67,3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ) ; 70,7 (C-1') ; 103,6 (C-4) ; 121,0 (C-2 et C-6) ; 128,4 (2x $\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 128,6 ( $\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 128,7 (2x $\text{C}_{\text{benz}}$ ) ; 130,0 (C-1) ; 135,5 ( $\text{C}_{\text{quaternaire}}$ ) ; 152,2 (C-3 et C-5) ; 168,2 (CO) ; 170,9 (2x $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ) ; 171,9 ( $\text{CO}_{\text{Ac}}$ ).

**3,5-Diacétoxy-4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodéc-1-ynyl)benzoate de benzyle** 131**131**

Le composé **131** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **132**.

- 4-iodo-3,5-diacétoxybenzoate de benzyle **130** (0,692 g ; 1,52 mmol ; 1 éq)
- *tert*-butyl(décane-11-ynyloxy)diméthylsilane **31** (0,813 g ; 2,74 mmol ; 1,8 éq)
- PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,075 g ; 0,11 mmol ; 0,07 éq)
- CuI (0,020 g ; 0,11 mmol ; 0,07 éq)
- NEt<sub>3</sub> (6 mL)

**Rendement : 60%**

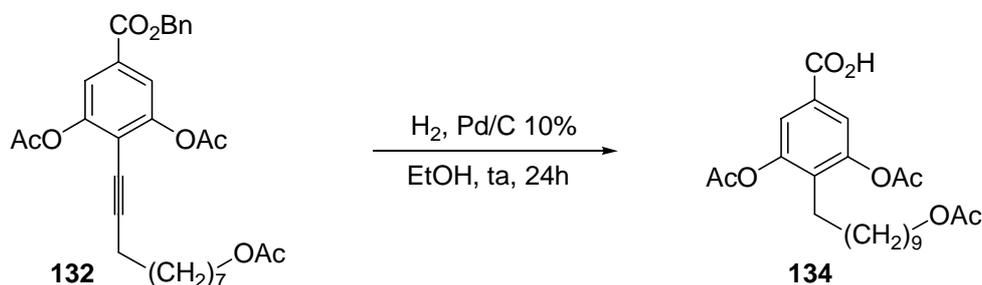
**Formule brute :** C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>O<sub>7</sub>Si

**PM :** 622,86

**CCM :** (heptane-AcOEt : 8-2) R<sub>f</sub> = 0,5

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,04 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,88 (s, 9H, CSi) ; 1,28 (s large, 8H, H-5' à H-10') ; 1,42 à 1,61 (m, 4H, H-4' et H-11') ; 2,32 (s, 6H, OAc) ; 2,44 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H-3') ; 3,59 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H-12') ; 5,33 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph) ; 7,40 (m, 5H, H<sub>benz</sub>) ; 7,67 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 20,7 (2xOAc) ; 19,8 (C-3') ; 25,8 à 29,6 (C-4' à C-10') ; 32,9 (C-11') ; 63,3 (C-12') ; 67,3 (CH<sub>2</sub>Ph) ; 70,8 (C-1') ; 103,6 (C-4) ; 121,0 (C-2 et C-6) ; 128,4 (2xC<sub>benz</sub>) ; 128,6 (C<sub>benz</sub>) ; 128,7 (2xC<sub>benz</sub>) ; 130,0 (C-1) ; 136,8 (C<sub>quaternaire</sub>) ; 152,2 (C-3 et C-5) ; 164,4 (CO) ; 168,2 (2xCO<sub>Ac</sub>).

**Acide 3,5-diacétoxy-4-(10-acétoxydécyl)benzoïque 134**

Du palladium sur charbon 10% (0,16 g ; 0,15 mmol ; 0,05 éq.) est ajouté à une solution de 3,5-diacétoxy-4-(10-acétoxydéc-1-ynyl)benzoate de benzyle **132** (0,766 g ; 1,47 mmol ; 1 éq.) dans l'éthanol (3 mL). Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante. Après 24h, le mélange est filtré sur célite pour donner 0,597 g de solide blanc.

**Rendement : 92%**

**Formule brute :** C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>

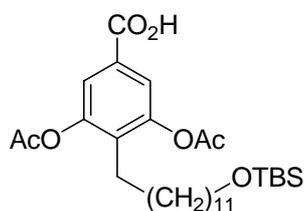
**PM :** 436,50

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 5-5) R<sub>f</sub> = 0,1

**Point de fusion :** 97-99°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,28 (s large, 12H, H-3' à H-8') ; 1,46 (qn, J = 7,2 Hz, 2H, H-9') ; 1,61 (qn, J = 7,2 Hz, 2H, H-2') ; 2,04 (s, 3H, OAc) ; 2,35 (s, 6H, OAc) ; 2,48 (m, 2H, H-1') ; 4,05 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H-10') ; 7,68 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20,8 (2xOAc) ; 21,0 (OAc) ; 25,2 (C-1') ; 25,9 (C-9') ; 28,6 à 29,5 (C-3' à C-8') ; 29,7 (C-2') 64,6 (C-10') ; 121,9 (C-2 et C-6) ; 128,1 (C-1) ; 134,2 (C-4) ; 149,7 (C-3 et C-5) ; 168,2 (CO<sub>acide</sub>) ; 168,9 (2xCO<sub>Ac</sub>) ; 169,4 (CO<sub>Ac</sub>).

**Acide 3,5-diacétoxy-4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodécyl)benzoïque 133****133**

Le composé **133** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **134**.

- 3,5-diacétoxy-4-(12-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)dodéc-1-ynyl)benzoate de benzyle **131** (0,954 g ; 1,53 mmol ; 1 éq)
- Pd/C 10% (0,095 g ; 0,090 mmol ; 0,06 éq)
- EtOH (3 mL)

**Rendement : 88%**

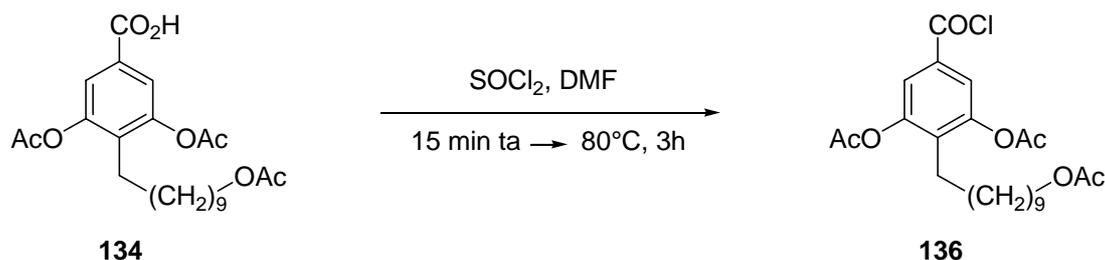
**Formule brute :** C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>Si

**PM :** 536,77

**CCM :** (heptane-AcOEt : 4-6) R<sub>f</sub> = 0,2

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,05 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si) ; 0,89 (s, 9H, CSi) ; 1,26 (s large, 18H, H-2' à H-10') ; 1,43 à 1,53 (m, 2H, H-11') ; 2,34 (s, 6H, OAc) ; 2,48 (t, J = 7,5 Hz, 2H, H-1') ; 3,60 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H-12') ; 7,69 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -5,2 (CH<sub>3</sub>Si) ; 18,4 (CSi) ; 20,8 (2xOAc) ; 25,3 (C-1') ; 26,0 (CH<sub>3</sub>C) ; 25,8 à 29,7 (C-2' à C-10') ; 32,9 (C-11') ; 63,4 (C-12') ; 122,0 (C-2 et C-6) ; 128,2 (C-1) ; 134,3 (C-4) ; 149,7 (C-2 et C-6) ; 168,9 (2xCO) ; 170,0 (CO).

**Chlorure de 3,5-diacétoxy-4-(10-acétoxydécyl)benzoyle 136****134****136**

Du chlorure de thionyle (0,597 mL ; 8,18 mmol ; 6,5 éq) fraîchement distillé et 2-3 gouttes de diméthylformamide sont ajoutés à de l'acide 3,5-diacétoxy-4-(10-acétoxydécyl) benzoïque **134** (0,549 g ; 1,26 mmol ; 1 éq). Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est chauffé à 80°C. Après 3h, l'excès de chlorure de thionyle est éliminé par distillation. Le brut réactionnel ainsi obtenu est dissous dans du toluène (30 mL). Le précipité formé est éliminé par filtration. La phase organique est évaporée pour donner 0,570 g d'un solide blanc.

**Rendement : 99%**

**Formule brute :** C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>ClO<sub>7</sub>

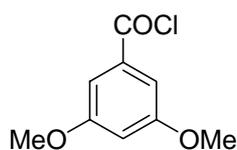
**PM :** 454,94

**CCM :** (éluant heptane-AcOEt : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,1

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,28 (s large, 12H, H-3' à H-8') ; 1,42 à 1,65 (m, 4H, H-2' et H-9') ; 2,04 (s, 3H, OAc) ; 2,35 (s, 6H, OAc) ; 2,49 (m, 2H, H-1') ; 4,04 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H-10') ; 7,71 (s, 2H, H-2 et H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 20,8 (2xOAc) ; 21,0 (OAc) ; 25,3 à 29,4 (C-3' à C-9') ; 25,7 (C-1') ; 29,6 (C-2') ; 64,6 (C-10') ; 123,0 (C-2 et C-6) ; 131,8 (C-4) ; 136,4 (C-1) ; 149,9 (C-3 et C-5) ; 166,7 (COCl) ; 168,7 (2xCO<sub>Ac</sub>) ; 169,4 (CO<sub>Ac</sub>).

### Chlorure de 3,5-diméthoxybenzoyle **144**



**144**

Le composé **144** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **136**.

- Acide 3,5-diméthoxybenzoïque **143** (0,524 g ; 2,88 mmol ; 1 éq)
- Chlorure de thionyle (1,4 mL ; 18,7 mmol ; 6,5 éq)

**Rendement : 97%**

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClO<sub>3</sub>

**PM :** 200,62

**CCM :** (heptane-AcOEt : 4-6) R<sub>f</sub> = 0,1

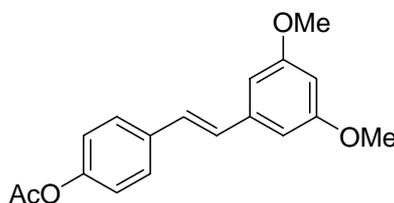


**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 20,9 (2xOAc) ; 21,0 (OAc) ; 21,2 (OAc) ; 24,9 (C-10'') ; 25,9 à 29,7 (C-2'' à C-9'') ; 64,7 (C-1'') ; 118,0 (C-3 et C-5) ; 121,8 (C-3' et C-5') ; 126,9 (C-1) ; 127,2 (C-8) ; 127,5 (C-2' et C-6') ; 128,9 (C-7) ; 134,7 (C-1') ; 136,4 (C-4) ; 150,0 (C-2 et C-6) ; 150,3 (C-4') ; 169,2 (3xCO<sub>Ac</sub>) ; 169,4 (CO<sub>Ac</sub>).

**MS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Na<sup>+</sup>) : 575

**HRMS (FAB<sup>+</sup>)** m/z (M+Na<sup>+</sup>) : 575,2615 (calculée) ; 575,2618 (trouvée)

**(E)-4-(3,5-Diméthoxystyryl)phényl acétate 145**



**145**

Le composé **145** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **146**.

- Chlorure de 3,5-diméthoxybenzoyle **144** (0,524 g ; 2,61 mmol ; 1 éq)
- 4-acétoxystyrène **134** (0,799 g ; 5,22 mmol ; 1,2 éq)
- acétate de palladium (0,024 g ; 0,11 mmol ; 0,05 éq)
- *N*-éthylmorpholine (0,332 mL, 2,61 mmol ; 1,2 éq)
- xylène (5,2 mL)

**Rendement : 91%**

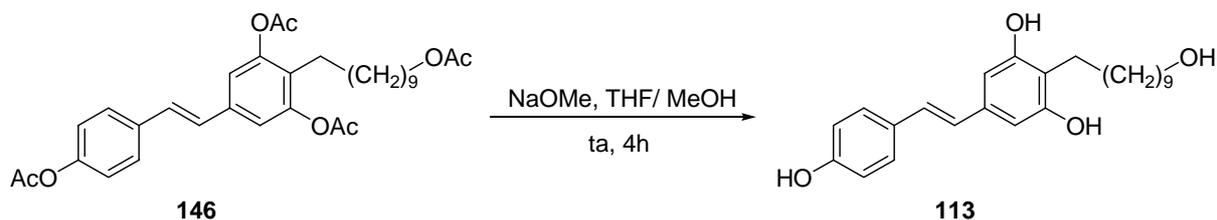
**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**PM :** 298,33

**CCM :** (heptane-AcOEt : 7-3) R<sub>f</sub> = 0,4

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2,31 (s, 3H, OAc) ; 3,83 (s, 6H, OMe) ; 6,40 (t, J = 2,1 Hz, 1H, H-4) ; 6,66 (d, J = 2,1 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 6,98 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,06 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,10 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 7,51 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2' et H-6').

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 21,2 (OAc) ; 55,4 (OMe) ; 100,1 (C-4) ; 104,6 (C-2 et C-6) ; 121,8 (C-3' et C-5') ; 127,5 (C-2' et C-6') ; 128,2 (C-8) ; 128,9 (C-7) ; 135,0 (C-1') ; 139,2 (C-1) ; 150,1 (C-4') ; 161,0 (C-3 et C-5) ; 169,4 (CO).

**(E)-5-(4-Hydroxystyryl)-2-(10-hydroxydodécyl)benzène-1,3-diol 113**

Une solution de méthylate de sodium (0,4 mL ; 2,16 mmol ; 6éq) dans le méthanol est ajoutée à une solution de (E)-10-(4-(4-acétoxystyryl)-2,6 diacétoxyphényl)décane-1-acétoxy **146** (0,199 g ; 0,36 mmol ; 1 éq) dans un mélange THF/MeOH : 1/1 (1,6 mL). Après 4h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans une solution aqueuse de HCl 2N (50 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3x50 mL). La phase organique est lavée à l'aide d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (100 mL), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt : 4-6) pour donner 0,076 g d'un solide blanc.

**Rendement : 55%**

**Formule brute :** C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>

**PM :** 384,51

**CCM :** (heptane-AcOEt : 4-6) R<sub>f</sub> = 0,2

**Point de fusion :** 166-168°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 1,32 (s large, 12H, H-3'' à H-8'') ; 1,48 à 1,63 (m, 4H, H-2'' et H-9'') ; 2,57 (m, 2H, H-1'') ; 3,53 (t, J = 6,6 Hz, 2H, H-10'') ; 6,45 (s, 2H, H-4 et H-6) ; 6,74 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 6,75 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 6,89 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-7) ; 7,32 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2' et H-6').

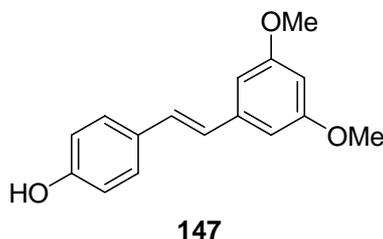
**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 22,9 (C-1'') ; 25,7 à 29,8 (C-2'' à C-8'') ; 29,7 (C-9'') ; 64,3 (C-10'') ; 104,6 (C-4 et C-6) ; 115,4 (C-2) ; 115,9 (C-3' et C-5') ; 126,3 (C-8) ; 127,1 (C-7) ; 128,1 (C-2' et C-6') ; 128,6 (C-1') ; 135,7 (C-5) ; 156,7 (C-1 et C-3) ; 156,8 (C-4').

**IR** ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>) : 3353 (OH) ; 3011 (=C-H) ; 2915, 2848 (C-H) ; 1586, 1511, 1426, 956 (C=C) ; 1249 (C-O) ; 832 (C-H).

**MS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>+</sup>) : 383

**HRMS (FAB<sup>-</sup>)** m/z (M-H<sup>+</sup>) : 383,2217 (calculée) ; 383,2231 (trouvée)

**(E)-4-(3,5-diméthoxystyryl)phénol 147**



Le composé **147** est obtenu selon le même procédé que celui décrit pour **113**.

- (E)-4-(3,5-diméthoxystyryl)phényl acétate **147** (0,287 g ; 0,96 mmol ; 1 éq)
- NaOMe (0,267 mL ; 1,44 mmol ; 1,5 éq)
- MeOH/THF : 1/1 (4 mL)
- 30 minutes

**Rendement : 91%**

**Formule brute :** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

**PM :** 256,30

**CCM :** (heptane-AcOEt : 6-4) R<sub>f</sub> = 0,4

**Point de fusion :** 61-63°C

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3,83 (s, 6H, OMe) ; 4,84 (s, 1H, OH) ; 6,38 (t, J = 2,4 Hz, 1H, H-4) ; 6,65 (d, J = 2,4 Hz, 2H, H-2 et H-6) ; 6,83 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-3' et H-5') ; 6,89 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,03 (d, J = 16,2 Hz, 1H, H-8) ; 7,40 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2' et H-6').

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 55,4 (OMe) ; 99,6 (C-4) ; 104,4 (C-2 et C-6) ; 115,6 (C-3' et C-5') ; 126,7 (C-8) ; 128,0 (C-2' et C-6') ; 128,7 (C-7) ; 130,2 (C-1') ; 139,4 (C-1) ; 155,3 (C-4') ; 160,9 (C-3 et C-5).

---

*Partie Expérimentale*  
*Physico-chimie*  
*et Biologie*

---

## **Tests physico-chimiques**

### **Test au DPPH**

Les différents composés à tester, ainsi que le resvératrol et le Trolox<sup>®</sup>, sont dissous dans l'éthanol afin d'obtenir des solutions mères à 10 mM. Par des dilutions en cascade, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 10 mM à 1 µM. Sur une plaque 96 puits sont introduits, 100 µL/puits des différents produits à tester aux différentes concentrations puis 100 µL/puits d'une solution éthanolique de DPPH à 400 µM. La plaque est agitée pendant quelques minutes. Après 1 heure d'incubation dans l'obscurité, la mesure de l'absorbance à 550 nm est déterminée par un spectrophotomètre. La diminution de l'absorbance à 550 nm traduit l'efficacité des composés à réduire le radical DPPH.

### **Test à l'ABTS**

Les différents composés à tester, ainsi que le resvératrol et le Trolox<sup>®</sup>, sont dissous dans l'éthanol afin d'obtenir des solutions mères à 10 mM. Par des dilutions en cascade, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 10 mM à 1 µM. Sur une plaque 96 puits, sont introduits successivement dans chaque puits, 180 µL d'un mélange eau/éthanol : 1/1, 30 µL d'une solution aqueuse d'ABTS à 1 mM, 30 µL d'une solution aqueuse de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0,5 mM, 30 µL des différents produits à tester aux différentes concentrations puis 30 µL d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 100 mM. La plaque est agitée pendant quelques minutes. Après 2 heures d'incubation dans l'obscurité, la mesure de l'absorbance à 405 nm est déterminée par un spectrophotomètre. La diminution de l'absorbance à 405 nm traduit l'efficacité des composés à neutraliser les radicaux hydroxyles.

## Tests biologiques

### Culture cellulaire

La culture de la lignée MMGT-12 se fait dans du milieu DMEM/Ham's F12 (1/1), auquel ont été ajoutés 2% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) et 10% de milieu conditionné de cellules WEHI (WEHI 3, ATCC, Rockville MD). Ces cellules relarguent notamment dans le milieu de l'interleukine-3 et du granulocyte-macrophage-colony stimulating factor. Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Toutes les expériences sont réalisées dans le milieu DMEM/Ham's F12 contenant 10% de SVF, dans des puits contenant 10<sup>4</sup> cellules/mL (MTT) ou 2.10<sup>4</sup> cellules/mL (NO, TNF, phagocytose). Après trois jours, la moitié du milieu d'expérience est remplacée par la même quantité de milieu contenant les produits à tester à une concentration donnée.

### Test de survie (Test au MTT)

La survie des cellules MMGT-12 est contrôlée par un test au MTT basé sur la réduction du bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par les déshydrogénases mitochondriales dans les cellules vivantes.

### Dosage du taux de nitrites

Le dosage du taux de NO se fait de façon indirecte en mesurant le taux de nitrites dans le surnageant des cellules MMGT-12 par la méthode de Griess. Des solutions de NaNO<sub>2</sub> à différentes concentrations servent de standards et du milieu d'expérience frais sert de contrôle. Sur une plaque 96 puits sont introduits 100 µL/puits de standard ou d'échantillon puis 100 µL/puits de réactif de Griess (1% sulfanilamide ; 0,1% de *N*-(1-naphthyl)éthylènediamine ; 2,5% d'acide phosphorique). Après 10 minutes d'incubation dans l'obscurité, la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 550 nm avec une correction à 630 nm. La concentration de nitrites est exprimée en µg/mL.

### **Dosage du taux de TNF- $\alpha$**

Le dosage du TNF- $\alpha$  se fait en suivant le protocole du test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) mouse TNF- $\alpha$  de R&D. Une solution de 100  $\mu$ L/puits d'anticorps de capture est additionnée sur une plaque de 96 puits et incubée dans l'obscurité pendant la nuit. Chaque puit est alors rincé trois fois avec une solution de lavage tamponnée (1,5 L PBS ; 750  $\mu$ L Tween 20 ; pH = 7,2-7,4). Une solution de saturation tamponnée (30 mL PBS ; 0,3 g BSA dans du PBS ; pH = 7,2-7,4 ; filtrée sur 0,2 $\mu$ m), 300  $\mu$ L/puits, est ajoutée. Après une heure, les puits sont rincés trois fois et 100  $\mu$ L/puits de solution standard ou d'échantillon sont ajoutés et incubés pendant 2 heures dans l'obscurité. Le procédé de lavage est répété et une solution de 100  $\mu$ L/puits d'anticorps de détection est ajoutée. Après 2 heures, le procédé de lavage est répété, suivi de l'ajout de 100  $\mu$ L/puits de solution de substrat. Après 20 minutes d'incubation dans l'obscurité, sont ajoutés 50  $\mu$ L/puits de solution *Stop* (solution d'acide sulfurique à 2N) et la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm avec une correction à 540 nm. La concentration en TNF- $\alpha$  est exprimée en pg/mL.

### **Test de phagocytose**

L'estimation de la capacité phagocytaire des cellules MMGT-12 est réalisée en utilisant des billes fluorescentes.

L'azoture de sodium, l'interféron- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  servent de contrôles négatifs et du milieu expérimental frais sert de contrôle. Après 24 heures d'incubation à 37°C en présence des différents produits à tester, 25  $\mu$ L/puits de billes en solution dans l'eau stérile sont ajoutés. L'incubation est maintenue pendant 1 heure supplémentaire. Tout le milieu expérimental est éliminé, en veillant à ne pas perturber le tapis cellulaire. Trois lavages successifs à l'aide d'une solution d'Opti-MEM (1 mL/puits) sont effectués. La lecture de la fluorescence est réalisée grâce à un lecteur de microplaques à fluorescence.

### **RT-PCR**

- *Principe*

La technique de RT-PCR permet d'évaluer le niveau d'expression d'un gène, à partir de l'analyse des ARNm qui sont rétrotranscrits, puis amplifiés par PCR.

Cette méthode sensible, permet de détecter les ARNm, issus de gènes faiblement exprimés. Une première étape de rétrotranscription à partir des ARN totaux, permet la synthèse d'un

stock d'ADNc. A l'aide de *primers*, d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des transcrits recherchés, il est possible d'amplifier les ADNc correspondants.

- *Extraction des ARN totaux*

Les ARN cellulaires totaux sont isolés en utilisant le kit d'extraction de PROMEGA (SV total RNA isolation system). L'ARN est donc finalement repris dans un volume adéquat (de 100µl) d'H<sub>2</sub>O DMPC (diméthyl pyrocarbonate). Puis les concentrations sont déterminées par lecture des DO à 260 nm.

- *Purification des ARN*

Le surnageant des cellules est enlevé et 2 mL d'une solution de lyse tamponnée SV RNA sont ajoutés. Une solution de dilution tamponnée (300 µL) SV RNA (blue) est ajoutée à 175 µL de lysat. Le mélange est ensuite chauffé à 70°C pendant 3 minutes et centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 20-25°C. De l'éthanol à 95% (200 µL) est ajouté au surnageant pour faire précipiter les ARN et le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé et 600 µL d'une solution de lavage tamponnée sont ajoutées. Le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 1 minute et le surnageant est éliminé. Du *Yellow Core Buffer* (40 µL), 5 µL d'une solution de MnCl<sub>2</sub> à 0,09 M et 5 µL d'enzyme DNase I sont ajoutés dans cet ordre. Incuber 25 µL de cette solution pendant 15 minutes à 20-25°C. Puis 200 µL d'une solution *SV DNase Stop* sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 1 minute. Une solution de lavage tamponnée (600 µL) est ajoutée et le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé et l'opération de lavage et de centrifugation est répétée. Finalement, 100 µL d'eau extrapure sont ajoutés au culot et le mélange est centrifugé à 12000 g pendant 1 minute.

- *Transcription inverse (RT)*

La réaction de « Transcription inverse » est réalisée avec 500 ng d'oligonucléotides hexamériques aléatoires (Amersham Pharmacia Biotech, England) et 3 µg d'ARN totaux dans un volume total de 10 µl. Ces réactifs sont incubés à 65°C pendant 5 minutes, puis ramenés à température ambiante. Ensuite, la réaction se poursuit à 37°C après addition de 20 µl de tampon de *reverse transcription* (Life Technologies, France), 4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl à 10 mM de dNTPs, 1 µl d'inhibiteur de RNase, et 2 µl de ImProm-II reverse transcriptase (200 IU/ml) (Life Technologies, France). Ce mélange est incubé pendant 50 minutes à 37°C, puis à 95°C pendant 5 minutes.

- *Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)*

L'amplification des différents transcrits est réalisée avec 2 µl du produit de la réaction de *reverse transcription* dans 20 µl de réactif pour la réaction de PCR, comprenant 500 nM d'amorces oligonucléotidiques (*primers*) sens et antisens appropriés.

Les réactifs pour la réaction de PCR sont : 15 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM de dNTPs, 60 mM de Tris/HCl pH 8,8 et 1 IU de *Taq* DNA polymérase (PROMEGA) par réaction. Les conditions de PCR sont les suivantes : dénaturation à 94°C pendant 3 minutes suivie par les cycles de PCR : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation ("annealing") à 55°C pendant 30 secondes et extension à 72°C pendant 1 minute, finalement terminé par une extension supplémentaire à 72°C pendant 7 minutes. 30 cycles sont effectués pour générer les produits de PCR dans un appareil PCR type 9700 ou 2400 (Perkin Elmer).

Les gènes de ménage de la glycéraldéhyde 3- phosphate déhydrogénase (GAPDH) et de la  $\beta$ -actine sont utilisés comme témoins internes.

- *Séparation électrophorétique des ADNc*

Les produits de PCR sont séparés sur un gel d'agarose à 2%.(système E-gel de Invitrogen). Chaque produit de PCR (20 µL) est déposé sur le gel. L'électrophorèse est réalisée à une intensité de 70 Volts et arrêtée après 30 minutes. Les gels sont ensuite photographiés sous lumière UV.

## Statistiques

Les résultats sont reportés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM, à partir de trois expériences indépendantes. Afin de pouvoir comparer deux valeurs différentes, un test t de Student a été effectué.

## **Publications**

**Frédérique Hauss**, Jiawei Liu, Alessandro Michelucci, Djalil Coowar, Paul Heuschling and Bang Luu.

”Dual Bio-activities of A New Class of Compounds: On Differentiation of Neural Stem Cells and Modulation of Neuro-Inflammation”, soumis.

**Frédérique Hauss**, Djalil Coowar, Dominique Bagnard and Bang Luu.

“Indol Fatty Alcohols promote axonal outgrowth”, en préparation

## **Brevet**

Bang Luu, **Frédérique Hauss**, Djalil Coowar, Jiawei Liu, Paul Heuschling, Eleonora Morga, Luc Grandbarbe et Alessandro Michelucci.

“Dérivés du resvératrol à longue chaîne hydroxylée utiles comme neurotrophique”,

Brevet français, n° de dépôt : 0601906, date de dépôt : 3 mars 2006

## **Communications orales**

**Frédérique Hauss**, Paul Heuschling et Bang Luu.

“Hybrides resvératrol/ $\omega$ -alcanols : composés neuroprotecteurs et neurorégénérateurs”

Semaine d’Etude de Chimie Organique (SECO 43), Fréjus, France, du 14 au 20 mai 2006

**Frédérique Hauss**, Alessandro Michelucci, Jiawei Liu, Paul Heuschling et Bang Luu.

“Composés hybrides resvératrol/ $\omega$ -alcanols : Modulateurs de l’activation microgliale et inducteurs de la différenciation cellulaire”

Séminaire midi-jeunes chercheurs, Strasbourg, France, 6 juin 2006