



HAL
open science

Composés hybrides w-alcanol / hydroquinone à activité neurotrophique. Synthèse et étude des propriétés physicochimiques et biologiques.

Mazen Hanbali

► **To cite this version:**

Mazen Hanbali. Composés hybrides w-alcanol / hydroquinone à activité neurotrophique. Synthèse et étude des propriétés physicochimiques et biologiques.. Autre. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2005. Français. NNT: . tel-00116946

HAL Id: tel-00116946

<https://theses.hal.science/tel-00116946>

Submitted on 28 Nov 2006

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

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

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE
STRASBOURG

Discipline : Chimie Organique

par

Mazen HANBALI

**Composés hybrides ω -Alcanol / Hydroquinone à
activité neurotrophique. Synthèse et étude des
propriétés physicochimiques et biologiques.**

Soutenue le 17 Octobre 2005 devant la commission d'examen

Docteur	Francis SCHUBER	Rapporteur interne
Docteur	Bruno FIGADERE	Rapporteur externe
Professeur	Alain BURGER	Rapporteur externe
Professeur	Michel ROHMER	Examineur
Docteur	Dominique BAGNARD	Examineur
Docteur	Bang LUU	Directeur de thèse

A ma mère qui n'est plus de ce monde...

A ma famille,

A tous ceux qui m'ont compris,

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles sous la direction du Dr. Bang Luu. L'étude biologique a été, quant à elle réalisée au Laboratoire de Physiologie Moléculaire du Système Nerveux, sous la direction du Dr. Dominique Bagnard.

Au Docteur **Bang Luu**,

Je tiens à vous remercier très sincèrement de m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche et de m'avoir donné la possibilité de travailler sur un sujet passionnant mêlant la chimie organique et la biologie du système nerveux. Merci aussi pour la liberté d'initiatives que vous m'avez laissée ainsi que pour vos nombreux encouragements.

Au Docteur **Dominique Bagnard**,

Merci beaucoup de m'avoir appris la biologie expérimentale. Ta passion pour le sujet et ta bonne humeur ont rendu ces trois années de thèse très agréables et m'ont permis de réapprendre à aimer une matière que j'avais un peu quittée.

Aux Professeurs **Michel Rohmer** et **Alain Brger** ainsi qu'aux Docteurs **Francis Schuber** et **Bruno Figadère**,

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

Un grand merci au Dr. **Richard Sedrani** qui, malgré sa bonne volonté et ses efforts pour juger ce travail de thèse, n'a pu faire parti du jury d'examen.

Aux Docteurs **Elisabeth Trifilieff**, **Laurent Désaubry** et **Catherine Grosdemange** pour les discussions, aussi bien scientifiques que générales, les conseils enrichissants et la bonne humeur générale. Un chaleureux merci à Laurent pour m'avoir aidé à trouver un post-doc de qualité.

Au Docteur **Djalil Coowar** pour avoir initié un petit biologiste de formation, à la chimie organique expérimentale. Merci d'avoir été un ami aussi bien qu'un collaborateur.

A **Thierry** qui a représenté énormément pour moi. Sa bonne humeur continuelle, sa passion pour les petites choses de la vie et son amitié sans faille ont fait de lui un ami très cher, un frère, qui me manquera énormément.

A **Nadège** et **Frédérique**, les deux éternelles DEA du labo. Non seulement pour avoir corrigé mes fautes d'orthographe et de français dans ce manuscrit, mais aussi pour les moments partagés !
Vive les mojitos !

A **Catherine** et **Ludivine**, les deux plus jeunes du laboratoire qui ont fait aveuglément confiance à mes discours scientifiques ou autres, et qui sont devenues de bonnes amies.

A **Ronan**, **Odile**, **Nigel**, **Lionel**, **Mari**, **Olivier**, **Régis**, **Karim**, **Turibio**, **Jawei**, **Bertrand**, **Lise**, **Eric**, **Michael**, **Martine**, **Claire** et j'en oublie certainement... pour les bons moments passés ensemble ! Ces trois dernières années ont été une partie de plaisir grâce à vous.

A **Sarah**, pour avoir été plus qu'une confidente, une très bonne amie qui a partagé toutes mes peines et mes joies. Thank you, baby!

A **Thomas-François** et **Jean-Philippe**, les deux manouches, qui sont passés outre la différence d'âge et qui sont devenus de très bons amis. Merci pour les moments partagés et bien plus encore... Ne changez surtout pas !

A **Lydia**, avec qui j'ai partagé neuf années d'études. Dans la difficulté, la plaisanterie, les examens interminables, les défaites et les joies, nous avons su rester amis et partager encore beaucoup.

A **Olivier**, **Thalia**, **Corine** et **Catherine**, mes quatre amis les plus chers. Merci d'avoir été présents pendant plus de 5 ans. D'avoir subi mes hauts et mes bas sans jugement, d'avoir passé autant de temps avec moi et d'être devenus les quatre personnes qui me manqueront de loin le plus.

A mes sœurs **Didi** et **Biba**, mon frère **Maher** et ma nièce **Federica**, qui m'aiment.

Finalement, à tous ceux que j'ai connus, pendant ces 9 dernières années à Strasbourg et qui ont compté pour moi, mais que la vie a éloignée.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
I. LE SYSTEME NERVEUX, LES FACTEURS NEUROTROPHIQUES ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES	2
A. Le Système Nerveux	2
1. Les cellules du SNC	2
a. Les neurones	2
b. Les cellules gliales	2
i. Les astrocytes	3
ii. Les oligodendrocytes	4
iii. Les cellules microgliales	4
iv. Les cellules épendymaires	5
v. Les cellules souches neurales	5
B. Les maladies neurodégénératives et leur traitement	5
1. La maladie d'Alzheimer	5
a. Lésions histologiques	6
b. Implication des phénomènes inflammatoires et immunologiques	6
c. Les stratégies thérapeutiques	7
i. Inhibiteurs de l'acétylcholine estérase	7
ii. Inhibition de la formation de la protéine A β	8
iii. Anti-inflammatoires et immunosuppresseurs	8
2. La Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS)	8
a. Les formes cliniques de la maladie	9
b. Les mécanismes de la maladie	9
i. L'hypothèse excitotoxique	9
ii. Hypothèse génétique et stress oxydant	10
iii. D'autres mécanismes	10
c. Les stratégies thérapeutiques	10
i. Composés anti-glutamate	10
ii. Molécules neurotrophiques	11
C. Les facteurs neurotrophiques comme agents thérapeutiques	12
1. Les facteurs neurotrophiques naturels	12
2. Les facteurs neurotrophiques de substitution	13
a. Exemples de la littérature de molécules neurotrophiques	13
b. Les alcools à longue chaîne hydrocarbonée	15
c. Les alcools gras cyclohexéniques	15

D. Maladies neurodégénératives et atteintes axonales	16
1. Généralités	16
2. Réponse gliale	17
3. Atteintes axonales	17
II. CICATRISATION GLIALE ET REGENERATION NERVEUSE	17
A. La croissance axonale	17
1. Dynamique moléculaire du cône de croissance	18
2. Facteurs protéiques régulant la dynamique du cytosquelette	19
B. La cicatrisation gliale	20
1. Mise en place de la cicatrisation gliale	20
2. Les acteurs cellulaires	20
C. Les cellules inhibitrices de la croissance axonale	21
1. Les astrocytes	21
2. Les oligodendrocytes	22
3. Les précurseurs d'oligodendrocytes	22
4. La microglie	22
5. Les cellules des méninges	23
D. Les molécules inhibitrices de la croissance axonale	23
1. Les protéines associées à la myéline	23
a. Nogo	24
b. MAG	24
c. OMgp	24
d. Tenascine R	25
2. Les chondroïtines sulfates protéoglycanes	25
3. Les Sémaphorines	25
E. Etude détaillée de l'effet inhibiteur des protéines de myéline et de la Sema3A	27
1. Les protéines de myéline	27
a. Structure des protéines de myéline	27
b. Récepteur et co-récepteur de NogoA, OMgp et MAG	27
c. La signalisation intracellulaire et la réponse cellulaire	28
2. La Sema3A	29
a. Structure de la Sema3A	29
b. Récepteur et co-récepteur de la Sema3A	30
c. Voie de signalisation intracellulaire et réponse cellulaire	31
i. Phosphorylation du complexe récepteur sur une tyrosine	31
ii. Implication de la Cofiline	32
iii. Implication des protéines Rho	32

III. QUINONES : DE PUISSANTS ANTIOXYDANTS. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES	32
A. Répartition des quinones dans le monde vivant	32
B. Biosynthèse des quinones animales	33
C. Rôle biologique des quinones (quelques exemples)	34
1. Production d'énergie cellulaire	34
2. Acidification des lysosomes	35
D. Rôle physicochimique des quinones	35
1. L'ubiquinone existe sous différentes formes selon son état d'oxydation	35
2. Activité antioxydante de l'ubiquinol et de l'ubiquinone	36
3. Activité pro-oxydante des formes UQH [•] /UQH/UQ ^{•-}	36
4. L'activité antioxydante de l'ubiquinol est jumellée à celle de l'α-tocophérol	37
5. Effet de la chaîne hydrophobe sur le pouvoir antioxydant	37
E. Quinones, SNC et maladies neurodégénératives	39
1. Constatations expérimentales	39
2. Maladies neurodégénératives et coenzyme Q ₁₀	39
a. Maladie de Parkinson	39
i. Caractéristiques cliniques	39
ii. Causes de la maladie	40
iii. Rôle du coenzyme Q ₁₀	40
b. Maladie de Huntington	41
i. Caractéristiques cliniques	41
ii. Causes de la maladie	41
iii. Rôle du coenzyme Q ₁₀	41
c. Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS)	41
i. Caractéristiques cliniques	41
ii. Causes de la maladie	41
iii. Rôle du coenzyme Q ₁₀	42
IV. CADRE DU TRAVAIL	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	44

Chapitre I : Synthèse et étude du tCFA15

I.	INTRODUCTION	49
II.	PUBLICATION : « Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound »	50
III.	SYNTHESE CHIMIQUE DU tCFA15	51
	A. Synthèse de la chaîne latérale ω -alcanol	51
	B. Synthèse du cycle cyclohexénonique triméthylé	51
	C. Couplage et obtention du tCFA15	52
IV.	PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU tCFA15	52
	A. Test au DPPH	52
	1. Principe du test	52
	2. Résultats concernant le tCFA15	53
	B. Test à l'ABTS	53
	1. Principe du test	53
	2. Résultats concernant le tCFA15	54
	C. Incorporation du tCFA15 dans les vésicules multilamellaires de DPPC	54
	1. Principe du test	54
	2. Résultats sur le tCFA15	55
V.	PROPRIETES BIOLOGIQUES DU tCFA15	56
	A. Le tCFA15 peut stimuler la croissance axonale sur milieu inhibiteur	56
	B. Cascade intracellulaire cible du tCFA15	57
	1. Inhibition de multiples voies internes	57
	2. Effet sur la phosphorylation de Cdk-5	57
	3. Inhibition monooxygénase flavoprotéines	57
VI.	CONCLUSION	57
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58

Chapitre II : Synthèse des alcools gras quinoliques

I.	INTRODUCTION	59
II.	SYNTHESE DES QFA C-ALKYLES	60
	A. Rappels bibliographiques	60
	1. Le noyau quinolique nucléophile	60
	a. Couplage en milieu acide	60
	b. Couplage en milieu basique	61
	c. Autres méthodes	61
	2. Le noyau quinol électrophile	62
	3. Couplage exocyclique sur le noyau quinol	63
	a. Réaction de condensation	63
	b. Réaction de Wittig/Wadsworth-Emmons	64
	c. Couplage catalysé au Ni ⁰	65
	4. Couplage via la chimie de palladium et du fer	65
	a. Chimie du fer	65
	b. Chimie du palladium	66
	i. Couplage de Heck	66
	ii. Couplage de Negishi	66
	iii. Couplage de Suzuki	67
	iv. Couplage de Sonogashira	67
	B. Synthèse choisie	68
	1. Couplage direct	68
	2. Couplage de Negishi	69
	3. Couplage de Suzuki	69
	4. Couplage de Sonogashira	70
	C. Synthèse des QFA	72
	1. Synthèse des arylbromures	72
	a. Synthèse des dérivés di- et tri- méthoxylés	72
	b. Synthèse des dérivés tétraméthoxylés	73
	2. Synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxylés	73
	a. Synthèse des ω-bromoalcanols	73
	b. Synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxylés	74
	3. Couplage et hydrogénation	74
	4. Récapitulatif	75

III.	SYNTHESE DES QFA N/O-ALKYLES	75
	A. Rappels bibliographiques	76
	1. N-alkylation d'anilines	76
	2. O-alkylation de phénols	77
	B. Synthèse des QFA N-alkylés	79
	1. Sélection de la voie synthétique	79
	2. Synthèse des bromoalcools ω -silyloxylés	79
	3. Couplage et déprotection	80
	C. Synthèse des QFA O-alkylés	80
	1. Synthèse du 2,5-diméthoxyphénol	80
	2. Synthèse des O-QFA	80

IV.	CONCLUSION	81
------------	-------------------	----

	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82
--	------------------------------------	----

Chapitre III : Etude biologique

I.	INTRODUCTION	85
II.	CAPACITE ANTIOXYDANTE DES QFA	85
	A. Déméthylation des QFA	85
	B. Tests d'antioxydation	87
	C. Conclusion	89
III.	EFFET DES QFA SUR LA CROISSANCE NEURITIQUE	90
	A. Test biologique effectué	90
	B. Screening de la bibliothèque des QFA	90
	C. Activité du QFA15 sur les neurones	92
	1. Effet dose dépendant du QFA15	92
	2. QFA15 et inhibition axonale	93
	3. Voie intracellulaire sollicitée	95
	a. Tests biologiques effectuées	95
	b. Rôle des nucléotides cycliques dans la croissance et la régénération nerveuse	96
	c. Récapitulatif	97
IV.	DISCUSSION	98

V. CONCLUSION	99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	100

Chapitre IV : Synthèses supportées

I. INTRODUCTION	101
II. SYNTHESE SUPPORTEE DES QFA C-ALKYLES	102
A. Rappels bibliographiques	102
B. Synthèse des QFA C-alkylés	104
1. Schéma rétrosynthétique	104
2. Synthèse de l'alcyne vrai supporté	105
a. Résine en tant que nucléophile	105
b. Réaction de Mitsunobu	105
c. Résine en tant qu'électrophile	106
3. Synthèse	107
4. Récapitulatif	108
III. SYNTHESE D'UN DERIVE ACIDE HYDROXAMIQUE	108
A. Propriétés biologiques des acides hydroxamiques	108
B. Rappels bibliographiques	111
C. Synthèse effectuée	112
1. Oxydation de l'alcool primaire	112
a. Oxydation en une étape	113
b. Oxydation en deux étapes	113
2. Synthèse de la résine hydroxylamine	114
3. Couplage – Coupure	115
IV. CONCLUSION	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116

Conclusion et perspectives

I. SYNTHESE ORGANIQUE	118
------------------------------	-----

II. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE 119

III. PERSPECTIVES 120

Partie expérimentale

I. Synthèse des QFA C-alkylés 124

II. Synthèse des QFA N/O-alkylés 149

III. Synthèse supportée 158

IV. Analyses physicochimiques et biologiques 167

Communications scientifiques

ABREVIATIONS, ACRONYMES, SYMBOLES ET NOMS TRIVIAUX

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Sérum albumine bovine
Coll.	Collaborateurs
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DEAD	Diéthyl azodicarboxylate
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
éq.	Equivalent
GTP	Guanosine triphosphate
Ig	Immunoglobuline
Imid.	Imidazole
J	Constante de couplage
kDa	Kilo Dalton
mCPBA	Acide méta-chloroperbenzoïque
MHz	Méga hertz
mL	Mili litre
mM	Mili molaire
mm	Mili mètre
mmol	Mili mole
mol	Mole
N	Normal
NBS	N-bromosuccinimide
ng	Nano gramme
nM	Nano molaire
nm	Nano mètre
NMO	N-méthylmorpholine N-oxyde
PBS	Tampon Phosphate
PCC	Pyridinium chlorochromate
Pd/C	Palladium sur charbon
PDC	Pyridinium dichromate

PFA	Paraformaldéhyde
pM	Pico molaire
PM	Poids Moléculaire
ppm	Parties par millions
PV-PDV	Poly vinyl-pyridinium dichromate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SEM	Ecart par rapport à la moyenne
SN2	Substitution Nucléophile d'ordre 2
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
t.a.	Température ambiante
T°	Température
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>Tert</i> -butyldiméthysylile
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMG	1,1,3,3-tétraméthylguanidine
TPAP	Tétrapropylammonium perrhuténate
trk	Tyrosine kinase
v	Volume
Δ	Reflux
δ	Déplacement chimique
μ	Moment dipolaire
μg	Micro gramme
μL	Micro litre
μM	Micro molaire
μm	Micro mètre

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Depuis le début du XX^{ème} siècle, l'espérance de vie dans les pays développés est en constante augmentation, passant de 41 à 70 ans. Ce gain est dû à la baisse de la mortalité infantile mais également à l'allongement de l'espérance de vie grâce aux progrès de la médecine et de l'hygiène de vie.

Ce phénomène entraîne alors un vieillissement de la population qui va de pair avec l'apparition de pathologies liées à l'âge telles que :

- les accidents vasculaires (maladies cardio-vasculaires et cérébro-vasculaires)
- les maladies du système locomoteur (ostéoporose et maladies dégénératives articulaires)
- les cancers
- les neuropathies dégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson, sclérose en plaque)

Un des thèmes principaux du laboratoire concerne les maladies neurodégénératives se caractérisant par une perte progressive et irréversible d'une partie des cellules du système nerveux. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à la conception et à la synthèse d'agents thérapeutiques potentiels permettant de comprendre les phénomènes qui génèrent cette mort neurale ainsi qu'au développement de traitements pour ces neuropathies dégénératives.

Un point commun, caractéristique de toutes ces neuropathies, est l'atteinte axonale des neurones concernés. En effet, toute atteinte axonale, accidentelle ou liée à une maladie, va de pair avec l'apparition d'une zone de cicatrisation qui rend la régénération très difficile.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la régénération des neurones en présence de substrats non permissifs, et ce par l'étude de leur prolongement principale, l'axone.

I. LE SYSTEME NERVEUX, LES FACTEURS NEUROTROPHIQUES ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

A. Le Système Nerveux

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

Il se divise en deux parties bien distinctes :

- **le système nerveux central (SNC)** : encéphale (cerveau, cervelet, tronc cérébral) et moelle épinière. Il est responsable de l'intégration des messages reçus de toutes les régions de l'organisme,
- **le système nerveux périphérique (SNP)** : ensemble des nerfs rattachés au système nerveux central. Son rôle est de véhiculer les signaux générés par les stimuli externes vers le SNC, puis véhiculer la réponse aux stimuli vers les effecteurs.

1. Les cellules du SNC

Le SNC est constitué en grande partie des neurones, cellules qui assurent les relations de l'organisme avec les milieux externes et internes. En fonction des informations reçues, ils élaborent des réponses motrices ou sensorielles.

Les cellules gliales, quant à elles, sont essentielles au SNC de par leur fonction d'isolant, de protection et d'apport nutritionnel.

a. Les neurones

Les neurones, qui constituent 10 à 20% des cellules cérébrales, sont des cellules hautement spécialisées dans la réception, le traitement et la transmission de l'influx nerveux. Chez l'adulte, ces cellules sont post-mitotiques, et ne se divisent donc pas. Un neurone est constitué de trois parties bien distinctes :

- *le soma* : appelé aussi corps cellulaire, il contient le noyau et les organites cellulaires traditionnels. Il assure la synthèse des composés nécessaires au bon fonctionnement de la cellule entière. De plus, il est capable de par ses propriétés électriques particulières d'assurer l'intégration de plusieurs influx nerveux post-synaptiques pour en faire une seule réponse électrique.
- *l'axone* : il s'agit du prolongement le plus long du neurone. Il est commencé par un « cône d'émergence » où sont générés les signaux électriques à conduction

centrifuge. Constitué essentiellement de protéines du cytosquelette (microfilaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules), il assure aussi le transport de vésicules vers les boutons terminaux trouvés à son extrémité.

- *Les dendrites* : différents de l'axone de par leur longueur plus modeste et leur forme en arborescence, ils sont responsables de la conduction centripète du signal nerveux.

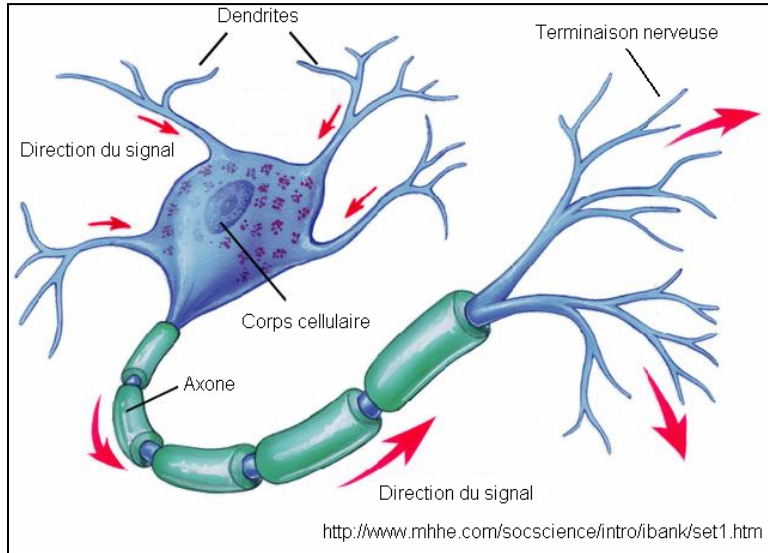


Fig. 1 : représentation schématique d'un neurone

b. Les cellules gliales

Les cellules gliales, longtemps considérées comme de simples cellules de soutien, exercent en réalité un rôle beaucoup plus étendu. Elles interagissent avec les neurones et assurent la bonne transmission du signal nerveux et donc le bon fonctionnement de tout le tissu nerveux.

i. Les astrocytes

Ils sont composés d'un corps cellulaire contenant le noyau et de nombreux prolongements diversement ramifiés. Ils constituent l'architecture cérébrale au cours du développement ainsi que la plasticité des synapses interneuronales. Il s'agit des acteurs principaux de la constitution de la barrière hémato-encéphalique. De plus, ils constituent le seul lieu de stockage du glucose dans le SNC. Les facteurs de croissance qu'ils sécrètent sont essentiels à la conservation des fonctions neurales ainsi qu'à la survie cellulaire.

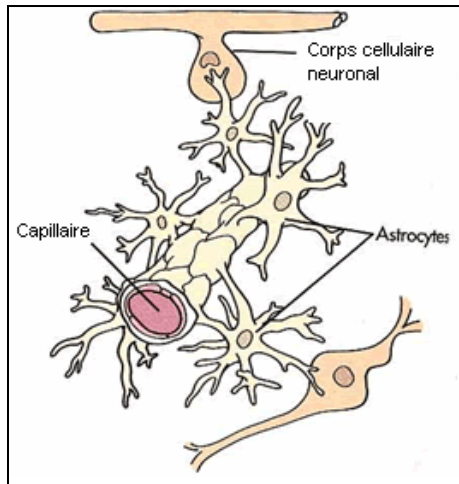


Fig. 2 : Représentation schématique d'un astrocyte (<http://learntech.uwe.ac.uk/radiography/RAnatomy/nervous/nervous7.htm>)

ii. Les oligodendrocytes

De petite taille, ces cellules émettent des prolongements cytoplasmiques qui s'enroulent autour des axones, constituant ainsi des enveloppes isolantes appelées « gaines de myéline ». Cet isolant permet une accélération de la conduction du signal nerveux.

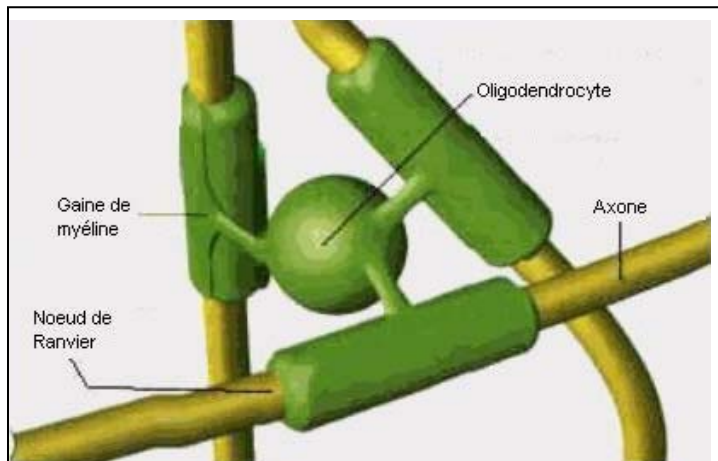


Fig. 3 : représentation schématique d'un oligodendrocyte avec ses prolongements en gaine de myéline. Les étranglements de la gaine de myéline s'appellent « Nœuds de Ranvier ». (<http://www.jdaross.cwc.net/intronerv2.htm>)

iii. Les cellules microgliales

Elles possèdent les caractéristiques morphologiques et immunologiques des monocytes-macrophages. Les microgliaocytes jouent un rôle essentiel au cours des réponses inflammatoires et immunitaires du SNC. Les cellules microgliales activées sécrètent des radicaux libres, des protéases ainsi que des cytokines impliqués dans les phénomènes inflammatoires.

iv. Les cellules épendymaires

Elles tapissent les formations ventriculaires. Elles sécrètent le liquide céphalorachidien et sont susceptibles de jouer un rôle lors de la migration de certaines cellules au cours du développement du système nerveux.

v. Les cellules souches neurales

Les cellules souches neurales sont des cellules multipotentes du système nerveux. Elles sont capables de se différencier en neurones fonctionnels et en cellules gliales. Le rôle des cellules souches dans le cerveau est d'intervenir dans le développement de la mémoire et d'aider à la reconstitution des tissus lésés. Leur nombre est très limité.

B. Les maladies neurodégénératives et leur traitement

Les neuropathies dégénératives font partie des pathologies du système nerveux. Elles sont caractérisées par une dégénérescence progressive, puis par la mort de certaines catégories ou sous-populations de neurones ou de cellules gliales.

La majorité de ces neuropathies dégénératives sont directement associées au vieillissement du système nerveux, plus rares sont celles liées à l'action d'agents viraux ou aux formes pathogènes de la protéine du prion comme la maladie de Creutzfeld-Jacob.

Ces maladies dégénératives peuvent être classées en deux catégories :

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

Nous allons détailler plus particulièrement deux neuropathies dégénératives : la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique.

1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui affecte, en général, les personnes âgées de plus de 80 ans. Elle se manifeste par une perte irréversible de la mémoire, une diminution des facultés de jugement et un changement du comportement¹. La maladie d'Alzheimer existe sous deux formes : la forme sporadique, la plus courante, et une forme familiale autosomique dominante.

a. Les lésions histologiques

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux modifications histologiques majeures : la production d'amyloïde et la formation neurofibrillaire. Ces modifications histologiques entraînent la mort des cellules nerveuses impliquées dans le processus de la mémoire ainsi que dans les fonctions gestuelles et intellectuelles situées principalement dans le cortex cérébral et l'hippocampe.

- Les plaques séniles sont des dépôts extracellulaires constitués principalement de la protéine **amyloïde bêta (A β)**, mais également de cofacteurs comme l'apolipoprotéine E et les protéoglycanes, ainsi que de cellules inflammatoires². La protéine A β provient du clivage d'une glycoprotéine transmembranaire « **amyloid precursor protein (APP)** ».

Son clivage par la β -sécrétase conduit au peptide A β présent lors du processus normal de vieillissement du système nerveux. Lors de la maladie d'Alzheimer, la concentration de peptide A β est cependant plus importante.

- Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intraneuronales provoquées par l'accumulation de fibrilles constituées de microtubules et de protéines Tau hyperphosphorylées³ responsables de la stabilisation des microtubules. Cette accumulation conduit à une mort neuronale.

b. Implication des phénomènes inflammatoires et immunitaires

Parmi les nombreuses hypothèses soulevées à propos de l'origine de la maladie d'Alzheimer, le rôle possible joué par des agents infectieux combinés à des changements du système immunitaire est souvent discuté⁴.

Les réponses immunes et inflammatoires jouent un rôle considérable dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer⁵. 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 en générant une inflammation chronique autour des plaques d'A β ⁶.

Les microglies activées sécrètent la protéine pro-inflammatoire interleukine-1 (IL-1) qui active la synthèse de l'APP. Sa production en excès pourrait dévier son métabolisme vers l'A β en saturant l' α -sécrétase, enzyme normalement chargée de sa métabolisation.

Les cellules gliales activées sécrètent également des radicaux libres qui seraient impliqués dans l'agrégation de l'A β via l'augmentation excessive de l'oxydation protéique.

A ce jour, il n'est pas certain que la maladie d'Alzheimer soit causée par un phénomène inflammatoire. Il est cependant incontestable que les réponses immunes et inflammatoires du système nerveux aux plaques séniles contribuent de façon décisive à l'évolution néfaste de la maladie.

c. Les stratégies thérapeutiques

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer. Les médicaments disponibles permettent uniquement un traitement symptomatique en retardant l'aggravation des troubles cognitifs.

i. Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les lésions cérébrales sont souvent accompagnées d'une perturbation de la neurotransmission. La dégénérescence des dendrites et des neurones au cours de la maladie va de pair avec une baisse importante de la concentration de l'**acétylcholine**.

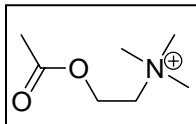


Fig. 4 : Acétylcholine

L'acétylcholine, neurotransmetteur étroitement lié aux facultés de mémoire, d'apprentissage et de raisonnement, subit une baisse importante (60 à 90%) au cours de la maladie (schéma 5). Cette déplétion cérébrale en acétylcholine est à l'origine de plusieurs voies de recherches thérapeutiques.

La stratégie thérapeutique consiste à utiliser des molécules bloquant l'activité de l'enzyme dégradant l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase, compensant ainsi le déficit de ce neurotransmetteur. Trois inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (**Tacrine**, **Donézépil**⁷ **Rivastigmine**⁸) (fig. 5) sont actuellement commercialisés en France.

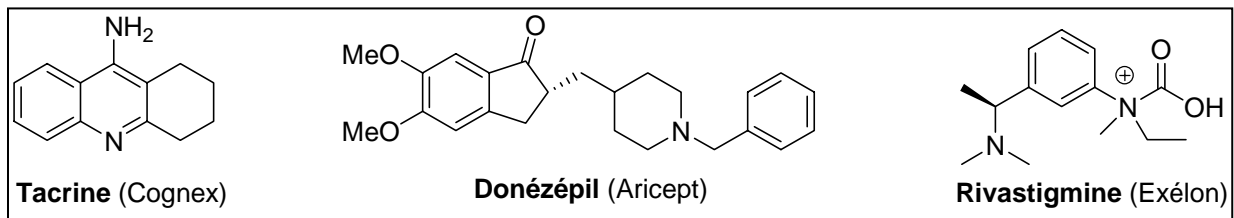


Fig. 5 : Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Ces composés retardent la progression de la maladie et améliorent la sémiologie, mais n'arrêtent pas le processus de dégénérescence. De plus, ils possèdent des effets secondaires assez prononcés : hépato-toxicité, effet sédatif, nausées et douleurs musculaires.

ii. Inhibition de la formation de la protéine A β

Les plaques séniles formées en grande partie par la protéine A β , font partie des plus importantes modifications histologiques au cours de la maladie. Des inhibiteurs de sécrétases, les enzymes responsables de la dégradation de l'APP, sont actuellement en cours d'évaluation. Parmi ces composés se trouvent des inhibiteurs sélectifs de la β -sécrétase (**Balfilomycin A**) et de la γ -sécrétase (**DAPT**)^{9,10}, enzymes produisant l'amyloïde bêta par clivage de l'APP (fig. 6).

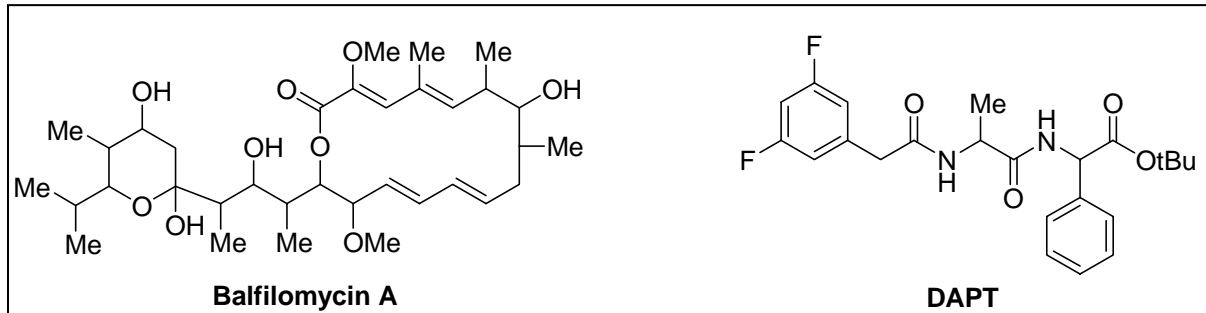


Fig. 6 : Inhibiteurs sélectifs de sécrétases

D'autres approches thérapeutiques dont le but est de traiter les troubles cognitifs de la maladie d'Alzheimer sont également entreprises. Des études concernant des inhibiteurs de la phosphorylation de la protéine Tau sont actuellement en cours. Beaucoup de moyens sont également déployés pour la recherche de composés neuroprotecteurs. Les principales cibles dans ce domaine sont la perturbation de l'homéostasie calcique cellulaire, la peroxydation lipidique et l'induction de l'apoptose.

iii. Anti-inflammatoires et immunosuppresseurs

Des études épidémiologiques ont montré un effet protecteur des anti-inflammatoires et d'immunosuppresseurs contre la survenue de la maladie d'Alzheimer. Leur utilisation en thérapie a cependant été décevante. Ils sont capables de retarder les symptômes en début de maladie, mais perdent toute efficacité au cours de l'évolution de la maladie.

2. La Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS)

La sclérose latérale amyotrophique (ALS), connue aussi sous le nom de « maladie de Charcot », est due à une neurodégénérescence progressive, impliquant les motoneurons du tronc cérébral et de la moelle épinière¹¹. Cette maladie est caractérisée par une faiblesse musculaire progressive jusqu'à la mort, résultant d'une insuffisance respiratoire trois à cinq ans après l'apparition des symptômes. L'ALS peut être sporadique dans 90% des cas, ou

familiale dans 10% des cas. La moyenne d'âge des malades est de 59 ans et son incidence est de 1 à 3 pour 100000 habitants.

Même si de nos jours l'ALS est fatale, deux avancées majeures ont ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement et la gestion de la maladie. Premièrement, il a été montré que 20% des patients souffrant de la forme familiale présentent des mutations de l'enzyme anti-oxydante superoxyde dismutase (SOD1)¹². Deuxièmement, la molécule anti-glutamate **Riluzole** permet d'allonger la durée de vie des patients.

a. Les formes cliniques de la maladie

La maladie se caractérise par l'installation progressive d'une paralysie touchant de manière variable les membres inférieurs ou les membres supérieurs dans la forme spinale ainsi que la parole, la déglutition et la respiration dans la forme bulbaire. La forme spinale est communément trouvée chez les hommes d'âge moyen. La forme bulbaire touche généralement les femmes, et les premiers symptômes sont une difficulté à parler ou à avaler et une hypersialorrhée (augmentation de la quantité de salive).

b. Les mécanismes de la maladie

Bien que les informations accumulées sur la maladie aient conduit à différentes hypothèses sur les mécanismes possibles, il n'est toujours pas établi si les anomalies biochimiques ou physiologiques observées *post-mortem* sont les causes ou les conséquences de la maladie. Les mécanismes proposés sont les suivants :

i. L'hypothèse excitotoxique

La forte concentration synaptique du glutamate, acide aminé exciteur le plus important du système nerveux, résulte en une dépolarisation prolongée des neurones. Une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} provoque des dommages mitochondriaux suivis d'une mort apoptotique des neurones¹³. Dans l'ALS, il y a des signes montrant qu'une défection de la recapture du glutamate conduirait à une augmentation du taux de glutamate extracellulaire avec des conséquences délétères¹⁴. Cette excitotoxicité interviendrait par une activation des récepteurs AMPA glutamatergiques dépendant du Ca^{2+} . Une anomalie des transporteurs glutamatergiques sur les cellules gliales, EAAT2 (astroglial-specific excitatory amino-acid transporter), dans le cortex moteur et la moelle épinière serait responsable de l'accumulation extracellulaire du glutamate.

ii. L'hypothèse génétique et stress oxydant

La première indication, associée à l'ALS familiale, est une mutation du gène de l'enzyme cytoplasmique SOD1 dont le gène est situé sur le chromosome 21¹³. La SOD1 est un homodimère complexant un cation de cuivre et de zinc. Il protège les cellules contre des dommages oxydants en convertissant le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Une mutation de la SOD1 entraîne une baisse de son activité antioxydante. Cette baisse d'activité enzymatique conduirait à une accumulation de radicaux superoxydes, toxiques pour les cellules. Même s'il n'est pas établi formellement que les fonctions de la SOD1 soient altérées pour une majorité des patients atteints de l'ALS, les symptômes cliniques sont assez similaires dans les formes familiale et sporadique de la maladie, ce qui indique clairement une toxicité liée au stress oxydant.

iii. D'autres mécanismes

L'éventualité que d'autres mécanismes puissent jouer un rôle dans la dégénérescence des motoneurones dans l'ALS est de plus en plus évidente. Ces mécanismes peuvent impliquer la mort programmée des motoneurones par apoptose¹⁵, des anomalies immunologiques provoquant des processus inflammatoires¹⁶, ou la dérégulation de l'expression des facteurs de croissance.

c. Les stratégies thérapeutiques

Plusieurs stratégies ont été étudiées en phase clinique pour l'ALS. Actuellement, le seul médicament mis sur le marché, et qui a démontré son efficacité clinique est le **Riluzole** (Rilutek®)¹⁷. Malheureusement, ce médicament engendre quelques effets secondaires (fatigue, nausée, maux de tête). Plusieurs autres molécules en cours de développement sont très prometteuses.

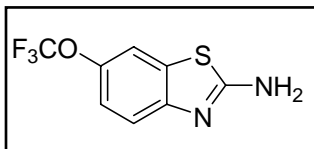


Fig. 7 : Riluzole (Rilutek®)

i. Composés anti-glutamate

Le **Topiramate** (Epitomax®), couramment utilisé dans le traitement de l'épilepsie, et des dérivés du **Dextromethorphan**, en cours d'études, semblent pouvoir abaisser le taux de glutamate dans le cerveau. Cependant l'efficacité clinique du dextromethorphan¹⁸ est limitée

par sa métabolisation trop rapide *in vivo*. Plusieurs dérivés plus stables sont étudiés pour leur efficacité sur les patients atteints par l'ALS. De même, des inhibiteurs de la NAALADase (*N*-acetylated- α -linked acidic dipeptidase) responsable de l'hydrolyse du *N*-acétylaspartylglutamate en *N*-acétylaspartate et glutamate, sont en cours de développement préclinique¹⁹.

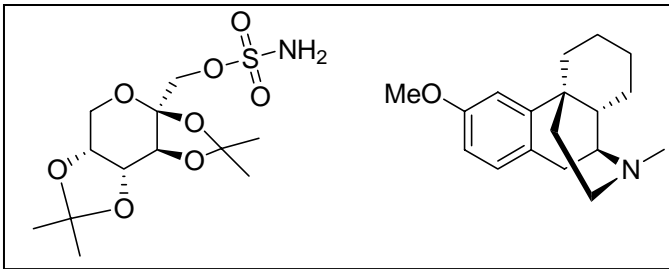


Fig. 8 : Topiramate et Dextromethorphan

ii. Molécules neurotrophiques

Le **Xaliprodène** (Xalipra®), un agoniste du récepteur 5-HT_{1A}, stimule la synthèse de facteurs de croissance tel que le BDNF, CDNF et le NGF. Il est capable de promouvoir la survie des motoneurons *in vivo*²⁰. Malheureusement, cette molécule a été retirée du développement clinique à cause d'un manque d'efficacité. D'autres stimulants neurotrophiques en phase clinique sont le **Buspirone** et le **Leteprinin**.

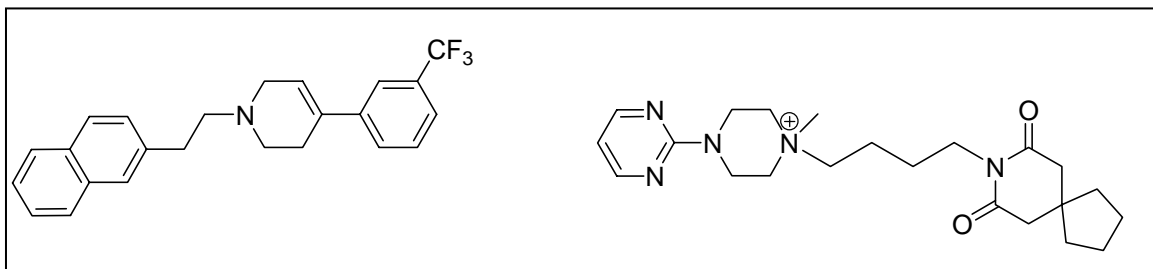


Fig. 9 : Xaliprodène et Buspirone

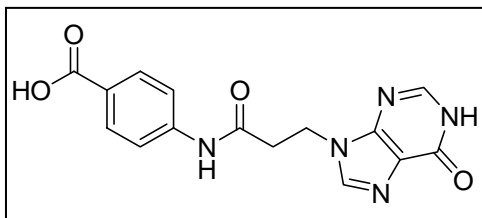


Fig. 10 : Leteprinin

C. Les facteurs neurotrophiques comme agents thérapeutiques

1. Les facteurs neurotrophiques naturels

Le rôle des facteurs de croissance naturels, en particulier ceux spécifiques au système nerveux, les facteurs neurotrophiques, est de promouvoir la survie, la différenciation et l'activité synaptique des neurones²¹. Ces macromolécules sont des agents essentiels au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du système nerveux. L'absence de ces facteurs de croissance se traduit par une mort cellulaire programmée des neurones connue sous le nom d'apoptose.

Les facteurs neurotrophiques naturels sont des protéines endogènes (13 à 24 kDa). Les principaux rôles physiologiques de ces polypeptides naturels s'exercent à plusieurs niveaux : la croissance neuronale normale, le maintien des capacités de stimulation ou de réponse des neurones et probablement l'inhibition de l'apoptose. Ils contrôlent le développement du système nerveux et sont essentiels au maintien des fonctions cérébrales nerveuses ainsi qu'aux phénomènes de plasticité adaptative certes diminués, mais persistent néanmoins chez l'adulte.

Toutes ces propriétés rendent les facteurs neurotrophiques prometteurs en tant qu'agents thérapeutiques pour les neuropathies dégénératives. La plupart des maladies neurodégénératives sont caractérisées par l'affection d'une catégorie spécifique de neurones (neurones cholinergiques pour la maladie d'Alzheimer, neurones dopaminergiques pour la maladie de Parkinson). Des facteurs neurotrophiques particuliers (Nerve Growth Factor pour la maladie d'Alzheimer, Glial-cell Derived Neurotrophic Factor pour la maladie de Parkinson) permettent de protéger et de régénérer les populations neuronales ou gliales touchées. Des études sur des modèles animaux de neurodégénérescence ont montré de très bons effets²².

Les résultats obtenus en phase clinique ont cependant été décevants. L'efficacité thérapeutique des facteurs neurotrophiques est fortement liée aux problèmes de la voie d'administration. La demi-vie très courte de ces polypeptides rend leur administration systémique difficile et entraîne des effets secondaires, probablement dus à l'activation de récepteurs périphériques. De plus, les facteurs neurotrophiques, de par leurs propriétés physico-chimiques, ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique.

Différentes approches ont cependant été développées pour permettre aux facteurs neurotrophiques d'atteindre le cerveau. Outre la transplantation de cellules génétiquement modifiées exprimant des facteurs neurotrophiques, l'utilisation de pompes à perfusion

continue, reliées par cathéter à la zone cible ou l'implantation dans le cerveau de polymères à résorption lente diffusant le facteur neurotrophique, sont en cours d'étude.

L'utilisation de composés lipidiques exogènes capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et de mimer les actions de facteurs neurotrophiques ou d'induire la synthèse de ceux-ci constitue également une approche intéressante.

2. Les facteurs neurotrophiques de substitution

Les substituants de facteurs neurotrophiques naturels peuvent être divisés en deux classes :

- les neurotrophines se liant aux récepteurs tyrosine kinase de la famille trK
- les cytokines neuropoïétiques et d'autres facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le EGF (Epidermal Growth Factor) décrits comme facteurs de croissance de tissu non nerveux, possédant également des propriétés neurotrophiques.

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

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

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

Il existe également des composés non protéiques capables d'assurer ces rôles. Ces molécules peuvent ainsi être considérées comme des facteurs neurotrophiques non protéiques.

a. Exemples de la littérature de molécules neurotrophiques

Depuis quelques années, de nombreuses molécules non-protéiques ayant une activité neurotrophique (induction de la croissance et de la différenciation de lignées de cellules nerveuses en culture) ont été décrites.

Les composés les plus connus sont respectivement la **lactacystine**²³ et l'**épolactaène**²⁴(fig. 11).

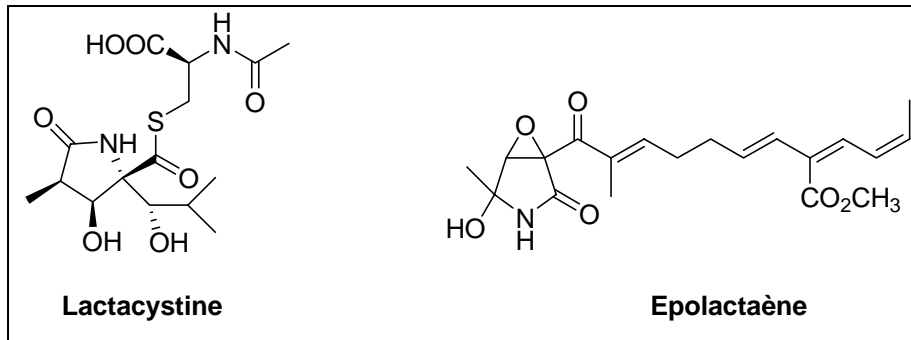


Fig. 11 : Facteurs neurotrophiques non-protéiques

La **lactacystine** a été isolée de *Streptomyces* sp. OM-6519. Cette molécule induit la croissance et la différenciation de neurones (lignée Neuro 2A) à la concentration de 1 μM et sa toxicité apparaît à partir de 12 μM . Des études de relation structure activité ont montré que la liaison thioester ainsi que la partie γ -lactame sont essentielles pour l'activité biologique.

L'**épolactaène** a été isolé de *Penicillium* sp. BM1689-P. Ce composé induit la croissance et la différenciation de cellules nerveuses (lignée SH-SY5Y) à une concentration de 25 μM . Il est instable à la lumière, et une étude de relation structure activité a montré que la fonction carbonyle ainsi qu'une longue chaîne insaturée en position 3 étaient essentielles pour l'activité biologique.

Le **FK506** est un immunosuppresseur utilisé dans la prévention des rejets d'organes transplantés (fig. 12)²⁵. *In vitro*, ce composé ainsi que des analogues **N-glycoylés** augmentent la croissance des neurones dopaminergiques. Ils sont capables de stimuler la croissance axonale et de rétablir les fonctions neurales après une lésion dans un modèle de la maladie de Parkinson.

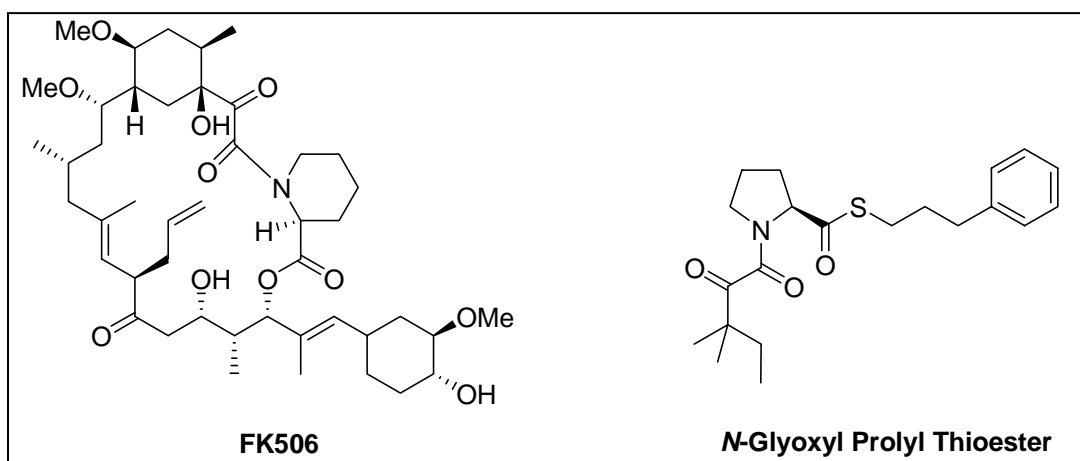


Fig. 12 : Immunosuppresseurs ayant des propriétés neurotrophiques

b. Les alcools à longue chaîne hydrocarbonée

Par le passé, une équipe de notre laboratoire a étudié des plantes utilisées dans la pharmacopée chinoise pour leurs vertus cicatrisantes. Il est connu que, dans certaines conditions physiologiques, il existe une relation entre les facteurs neurotrophiques et la cicatrisation cutanée.

Notre équipe a pu montrer la présence de composés capables de promouvoir la survie et la différenciation des neurones dans une plante possédant une activité cicatrisante, l'*Hygrophila erecta* (famille des Acanthacées originaires du Sud-Est asiatique). La plus active de ces substances est l'**hexacosanol** (fig. 13), un alcool primaire à longue chaîne hydrocarbonée contenant 26 atomes de carbones²⁶.

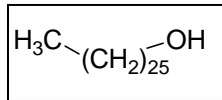


Fig. 13 : Hexacosanol

L'hexacosanol présente plusieurs des propriétés biologiques des facteurs neurotrophiques. Il est cependant très faiblement soluble, aussi bien dans les milieux aqueux que dans les milieux organiques. Cette faible solubilité engendre de mauvaises reproductibilités des expériences biologiques et restreint les possibilités d'investigation thérapeutique.

D'autres composés comportant le motif alcool à longue chaîne, pourvus de propriétés neurotrophiques semblables tout en présentant une meilleure solubilité, ont ainsi été recherchés.

c. Les alcools gras cyclohexéniques

Différentes études de relation structure activité ont permis de démontrer les activités neurotrophiques des analogues du rétinol et du perhydrorétinol (fig. 14)²⁷.

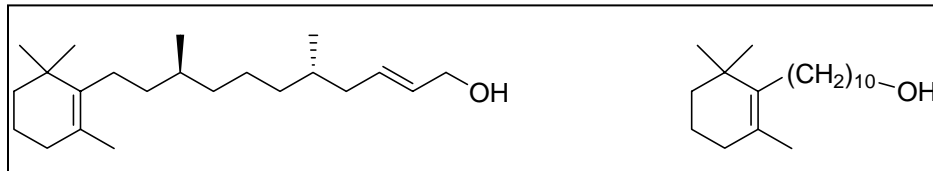


Fig. 14 :
Analogues du rétinol.

Des dérivés quinoniques (**Idébénone**) (Schéma 14) comportant un alcool gras sont capables de stimuler la synthèse de Nerve Growth Factor (NGF), induisant ainsi la croissance, la survie et la différenciation des neurones de façon indirecte²⁸. Ces études ont permis d'établir que la longueur de la chaîne ω-hydroxylée, ainsi que la présence d'un cycle oxygéné, étaient déterminantes pour l'activité biologique.

Partant sur ces bases, la synthèse d'alcools gras cyclohexéniques a été entreprise afin d'étudier l'effet d'une fonction énone sur l'activité neurotrophique²⁹.

Une cyclohexénone triméthylée comportant une chaîne ω -hydroxylée à 15 atomes de carbones, le **tCFA15** (trimethyl Cyclohexenonic Fatty Alcohol) (fig. 16), a montré les meilleurs activités *in vitro*³⁰.

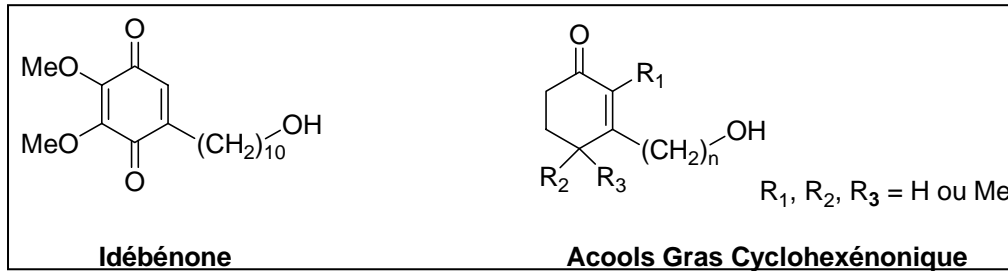


Fig. 15 : Alcools gras quinonique et cyclohexénonique

Le tCFA15 est capable de promouvoir la différenciation de neurosphères dérivant des cellules souches neurales à une concentration de 10^{-7} M. Il agit non seulement sur la maturation cellulaire mais, également sur le déterminisme, en favorisant la production de neurones au détriment des astrocytes.

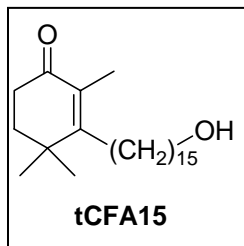


Fig. 16 : Mimétique de facteurs neurotrophiques

Le tCFA15 a ainsi démontré les mêmes effets biologiques que les facteurs neurotrophiques naturels, et possède par conséquent un potentiel intéressant pour le traitement des neuropathies dégénératives.

D. Maladies neurodégénératives et atteintes axonales

1. Généralités

Les maladies neurodégénératives se divisent en deux catégories bien distinctes³¹ :

- les maladies axogéniques : la lésion commençant au niveau de l'axone
- les maladies somagéniques : la lésion commençant au niveau du soma.

Dans les deux cas, l'issue de la maladie est la perte neuronale. Cependant, dans les maladies axogéniques (glaucome ou sténose spinale) la mort neuronale est plus tardive. Dans le cas des maladies somagéniques (Alzheimer, ALS), la perte neuronale est plus rapide mais les lésions observées au niveaux des axones peuvent aussi être contournées pour assurer, sinon un recouvrement fonctionnel total, au moins un recouvrement partiel.

2. Réponse gliale

Lors d'une atteinte du SNC, il y a toujours une gliose réactionnelle, aussi appelée la cicatrisation gliale (p.19). Il est aussi important de distinguer deux sortes de cicatrices bien distinctes³² :

- la cicatrice anisomorphe, qui concerne le SNC et la barrière hémato-encéphalique
- la cicatrice isomorphe, qui concerne uniquement le SNC.

Dans les deux cas, les processus de cicatrisation sont similaires et concernent de nombreuses cellules et de nombreuses molécules de signalisation.

3. Atteintes axonales³³

La mort cellulaire des motoneurones observée chez les malades (ou souris mutantes) atteints d'ALS serait la cause de la perte fonctionnelle suivie de la dégénérescence axonale affectant ces mêmes neurones. En effet, cette dégénérescence est entamée bien avant le début de la perte neuronale.

Parmi les lésions axonales observées, il a été constaté :

- une longueur axonale diminuée de plus de 50%,
- une morphologie normale du cône de croissance du neurone avec cependant l'apparition de zones d'inflammations caractérisées par un marquage irrégulier à la tubuline. Ceci traduit un défaut de la formation des microtubules,
- des mutations de la dynéine, protéine utilisée lors du transport axonal le long des microtubules.

Ces observations sont à l'origine de l'hypothèse axonale des maladies somagéniques engendrées par une dégénérescence des axones des motoneurones.

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'aspect neuritique, et précisément axonal des maladies neurodégénératives, ainsi qu'aux atteintes anisomorphes du SNC (lésions accidentelles).

II. CICATRISATION GLIALE ET REGENERATION NERVEUSE

A. La croissance axonale

Lors du développement du SNC, les neurones projettent leurs axones à des distances considérables pour atteindre la cible à innover. Sur le chemin, le « cône de croissance » situé à l'extrémité de l'axone, réagit à la présence de signaux attractifs ou répulsifs. Ces signaux,

solubles ou membranaires, agissent respectivement à distance ou localement. Il est connu que de nombreux signaux peuvent être bifonctionnels et ceci serait dû à la biologie intrinsèque du cône de croissance.

Lors d'une lésion du SNC, les axones lésés doivent en théorie réinnervier leurs cibles. Cette réinnervation se fait de la même façon que lors du développement, le « cône de croissance » de l'axone étant le principal acteur. Elle est inhibée par la formation post-lésion d'une « cicatrice gliale ».

Dans un premier temps, nous nous intéresserons au « cône de croissance » et à sa biologie intrinsèque.

1. Dynamique moléculaire du cône de croissance

A l'extrémité de l'axone naissant, ou régénérant dans le cas d'une lésion du SNC, se trouve le cône de croissance. Il est capable de reconnaître et de répondre rapidement aux facteurs présents dans le milieu environnant.

Il est composé de deux structures bien distinctes :

- les lamellipodes : portant un réseau complexe de filaments d'actine,
- les filopodes : structures labiles composées de paquets de F-actine qui peuvent palper le milieu extracellulaire.

Ce réseau d'actine est associé, dans la portion proximale du cône de croissance, aux microtubules de la région distale de l'axone et contribue à l'assemblage et la translocation de ces derniers (fig. 17)³⁴.

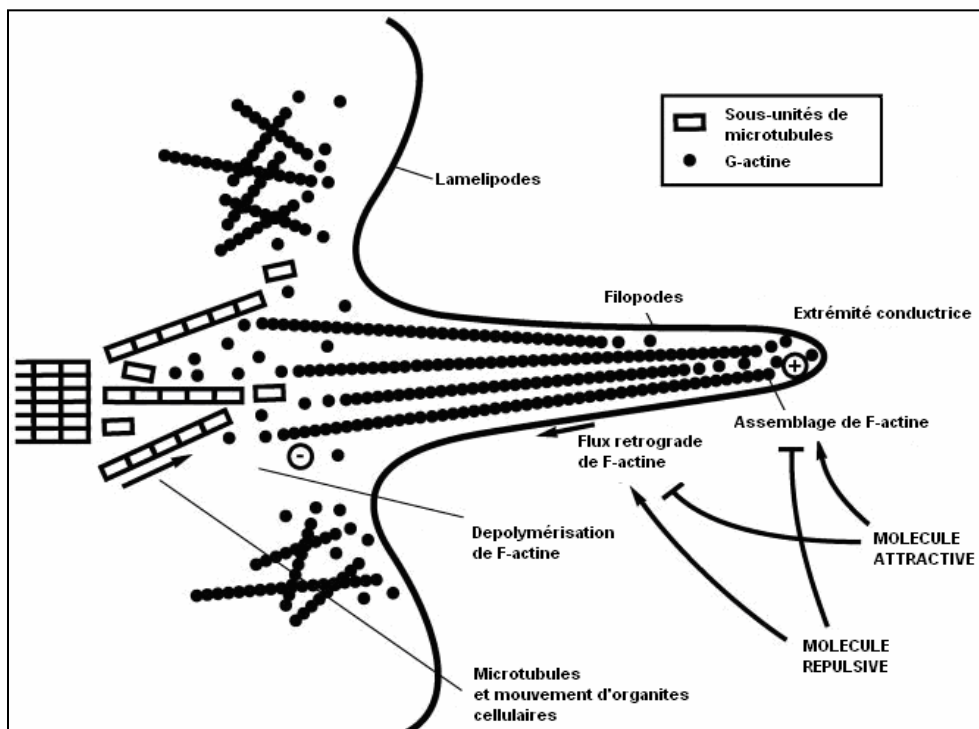


Fig. 17 : Schéma représentatif d'un cône de croissance et du cytosquelette sous-jacent.

2. Facteurs protéiques régulant la dynamique du cytosquelette

La signalisation du cône de croissance implique l'action de petites protéines monomériques appartenant à la famille Rho. Ces protéines lient le GTP (Guanosine TriPhosphate) seraient les régulateurs clés de la dynamique du cytosquelette d'actine. Les membres de la famille Rho dirigent la contraction actine-myosine dépendante, tout en contrôlant le flux rétrograde de F-actine au sein du cône de croissance. Les protéines les mieux étudiées actuellement sont : Cdc42, Rac et Rho A.

Une protéine Rho est active lorsqu'elle est liée au GTP. L'hydrolyse de la molécule de GTP en GDP inactive la protéine³⁵. Ce processus de switch-on / switch-off est régulé de deux manières différentes :

- une propriété GTPasique intrinsèque de la protéine Rho,
- l'activité de deux protéines distinctes : les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui « allument » Rho en remplaçant le GDP par un GTP et les GAPs (GTPases Activating Proteins) qui « éteignent » Rho en activant sa propriété GTPasique.

Ces propriétés sont représentées dans la figure 18.

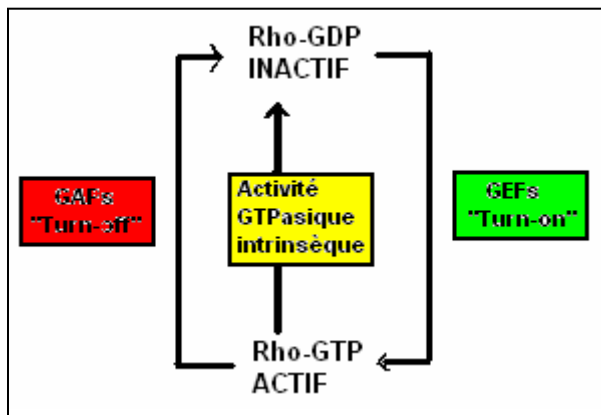


Fig. 18 : Activation et inactivation des protéines Rho par leur activité GTPasique intrinsèque ou par le biais de protéines telles que GEF ou GAP.

Les protéines Rho sont les actrices principales de la croissance axonale. Naturellement, cela n'exclut pas la présence d'autres cibles moléculaires ayant une activité tout aussi importante. Dans la suite de l'exposé, nous présenterons plus en détail l'activité de ces différentes molécules.

B. La cicatrisation gliale

1. Mise en place de la cicatrisation gliale

Lorsqu'il est lésé, le SNC subit une réponse à cette lésion, connue sous le nom de « gliose réactionnelle » ou « cicatrisation gliale ». Quelle que soit la nature de la lésion, cette réponse est toujours présente. Suite à une période initiale de dommage et de mort cellulaire, tout traitement visant à réparer les dégâts du SNC devra tenir compte de la présence de cette cicatrice gliale. Il est important de connaître les différents acteurs, aussi bien cellulaires que moléculaires, qui sont à l'origine de l'inhibition de la croissance axonale.

En effet, les événements cellulaires prenant place au sein de la cicatrice évoluent sur plusieurs jours. Il est ainsi clair que la « cicatrice gliale » est une structure évolutive avec des cellules variées intervenant à des moments différents. Les premières cellules à atteindre le lieu de la lésion sont les macrophages du système vasculaire et les cellules microgliales. Après 3 à 4 jours, un grand nombre de précurseurs d'oligodendrocytes sont recrutés des tissus environnants. Des cellules des méninges sont recrutées uniquement si la lésion concerne aussi les méninges. La structure finale de la cicatrice gliale est en grande partie astrocytaire. Ces cellules se divisent activement et migrent au niveau de la lésion pour combler les espaces vacants.

2. Les acteurs cellulaires

Parmi les cellules présentes au sein de la cicatrice gliale, nous trouvons :

- * les **oligodendrocytes** : à l'origine des débris myéliniques³⁶ rencontrés dans la cicatrice
- * les **cellules microgliales** : activées après la lésion, elles y migrent³⁷ et prennent une structure « macrophage-like »
- * les cellules des méninges : elles reforment les couches gliales entourant le SNC
- * les **précurseurs d'oligodendrocytes**³⁸ : recrutés pour se différencier en oligodendrocytes au sein même de la cicatrice
- * les **astrocytes** : recrutés directement après la lésion, ils sont très rapidement hypertrophiés, avec de nombreux prolongements et se divisent activement
- * les **progéniteurs multipotents** : cellules exprimant la nestine, elles sont retrouvées au sein de la cicatrice ou elles se différencient en astrocytes³⁹. Leur rôle n'est pas connu.

C. Les cellules inhibitrices de la croissance axonale

Une raison majeure de l'absence de régénération axonale au sein du SNC est la nature inhibitrice de l'environnement glial. Il est cependant important de noter que la capacité de régénérescence des axones du SNC est faible⁴⁰. Ainsi, de faibles degrés d'inhibition peuvent prévenir la régénération. Puisque toute lésion du SNC va de pair avec l'apparition d'une cicatrisation gliale, la régénération nerveuse doit se confronter à l'environnement inhibiteur de cette première. Tous les types cellulaires constitutifs de la cicatrice gliale ont des propriétés inhibitrices et peuvent ainsi stopper la régénération axonale.

1. Les astrocytes

De par la structure même de la cicatrice gliale, il est évident que tout axone voulant la traverser sera confronté à un environnement hautement astrocytaire⁴¹. De nombreuses expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que ce tissu peut être de nature à la fois très inhibitrice et activatrice en matière de régénération axonale. Il en a été déduit que dans un tissu sain, les astrocytes sont capables de promouvoir la régénération axonale. Suite à une lésion du SNC, la formation de la cicatrice gliale, très riche en astrocytes, devient un milieu très inhibiteur de la régénération. La question reste cependant entière : qu'est ce qui fait qu'un astrocyte peut être activateur ou inhibiteur ? Existe-t-il différents sous-types d'astrocytes ?

Il est connu que différentes morphologies astrocytaires sont présentes au sein du SNC, ainsi qu'au sein de la cicatrice gliale. Des expériences effectuées par Davies et coll.⁴² sur des lésions du SNC montrent que les astrocytes distaux de la cicatrice gliale sont très permissifs à la régénération axonale alors que les astrocytes proximaux sont très inhibiteurs. Ces résultats suggèrent que la lésion est à l'origine d'une libération de différents facteurs qui changent la fonction astrocytaire permissive en inhibitrice.

De nombreuses études ont montré que les astrocytes de la cicatrice gliale présentent des différences moléculaires très prononcées en matière de constituants sécrétés, transmembranaires et de matrice extracellulaire. Parmi toutes les molécules ainsi synthétisées, il est établi que les plus inhibitrices sont les « chondroïtine sulfate protéoglycanes » présentes au sein même de la cicatrice gliale.

Il est aussi important de noter que les nombreuses expériences montrant la permissivité des astrocytes à la régénération axonale ont été effectuées *in vitro* sur des monocouches d'astrocytes⁴³. Or, une monocouche d'astrocyte n'est absolument pas représentative de la réalité intrinsèque de la cicatrice gliale. En effet, *in vitro*, les axones n'ont pas besoin de pénétrer un tissu dense et peuvent simplement passer par dessus la monocouche astrocytaire. Un autre point important est que la sécrétion de différents facteurs inhibiteurs par les

astrocytes est masquée par un effet de dilution très important dû au milieu de culture lui-même. Or, dans la cicatrice gliale, les facteurs sécrétés localement restent piégés dans les espaces intercellulaires et sont, de ce fait, beaucoup plus concentrés. Cet effet de dilution *in vitro* est très important pour de nombreux protéoglycanes, protéases, inhibiteurs de protéases, facteurs de croissance et cytokines. Une expérience mettant ceci en évidence a été effectuée par Fawcett et coll.⁴⁴ Des astrocytes cultivés dans des tubes millipore très fins, de manière à constituer un tissu astrocytaire tridimensionnel, deviennent très inhibiteurs de la régénération axonale.

Enfin, une autre explication de la forte inhibition de la cicatrice gliale repose sur sa structure même. En effet, la charpente astrocytaire qui constitue la cicatrice gliale est un milieu très dense et impénétrable pour la régénération des axones. Cette cicatrice constituerait alors une barrière physique et mécanique hautement inhibitrice de la régénération axonale.

2. Les oligodendrocytes

La régénération axonale est impossible dans les endroits myélinisés du SNC, alors qu'elle est limitée dans les endroits non myélinisés. En effet, les oligodendrocytes matures *in vitro* sont non permissifs à la régénération axonale⁴⁵ et provoquent un collapsus du cône de croissance. L'administration, *in vivo*, d'anticorps IN-A sur un site de lésion neutralise le constituant de la myéline dit NI250/Nogo. Nous notons alors une régénération axonale. Les oligodendrocytes sont les cellules capables de synthétiser la myéline. Or, plusieurs de ses composants (Nogo, MAG (myelin-associated glycoprotein), OMgp et la tenascin R) sont de nature inhibitrice. Les oligodendrocytes matures sont donc clairement des cellules inhibitrices de la régénération axonale.

3. Les précurseurs d'oligodendrocytes

Le rôle des précurseurs d'oligodendrocytes n'est pas encore clair. Cependant, leur présence dans la zone de cicatrisation gliale fait d'eux des acteurs de la réponse de cette même cicatrice à la régénération axonale³⁸. En effet, il a été montré que des extraits purifiés du protéoglycane NG2 trouvé sur la surface des précurseurs d'oligodendrocytes, sont capables d'inhiber la croissance axonale *in vitro*.

4. La microglie

Les cellules microgliales sont activées par une lésion du SNC. Elles se divisent et migrent vers le site de lésion. Ainsi, la cicatrice gliale se trouve envahie par un grand nombre de ces cellules. Elles sont capables de produire des molécules de défense très toxiques. La microglie

activée a, en effet, les mêmes propriétés que les macrophages et peut ainsi subir une hyperactivité respiratoire et libérer de nombreux radicaux libres oxygénés, de l'oxyde nitrique, des dérivés de l'acide arachidonique et d'autres molécules toxiques⁴⁶. Cependant, des expériences effectuées par Rabchevshy et Streit montrent que des cellules microgliales implantées seules dans un site de lésion du SNC permettent une certaine régénération axonale⁴⁷. Par ailleurs, des cellules microgliales injectées sur un site de lésion en présence d'astrocytes rendent ces derniers permissifs à la croissance axonale.

Il a donc été suggéré que la microglie est capable d'aider la régénération nerveuse sur un site de lésion, à la seule condition qu'aucun facteur, quel qu'il soit, ne la rende neurotoxique. Sa présence dans la cicatrice gliale serait certainement en faveur d'une régénération axonale.

5. Les cellules des méninges

Les cellules des méninges migrent vers l'endroit de la lésion pour former une couche de cellules qui recouvre la cicatrice gliale sous laquelle se reforment les limitants gliaux. L'invasion de la cicatrice par les cellules des méninges est souvent observée dans le cas de lésions de la moelle épinière, mais ne se fait pas obligatoirement. Ces cellules ne sont pas a priori un bon substrat pour la régénération axonale. En effet, malgré leur capacité à synthétiser de grandes quantités de laminine, molécule promotrice de la croissance axonale, des axones régénérants ne sont jamais observés parmi elles⁴⁸. Elles sont aussi capables de synthétiser le protéoglycane NG2, même si leur nature inhibitrice n'ait jamais été reliée à cette molécule. Par ailleurs, elles synthétisent également de la tenascine, molécule fortement inhibitrice de la régénération axonale.

D. Les molécules inhibitrices de la croissance axonale

Il est établi qu'une lésion du SNC engendre une cicatrisation gliale constituée de différents types cellulaires produisant différentes molécules inhibitrices.

1. Les protéines associées à la myéline

Suite à une lésion du SNC, la rupture des axones myélinisés est à l'origine de débris de myéline dispersés au sein de la zone de cicatrisation gliale. Ces débris sont éliminés grâce à l'activité phagocytaire de la microglie et des macrophages. Ce processus étant lent, ces débris restent longtemps au sein même de la zone de cicatrisation. Parmi ceux-ci, nous trouvons : Nogo exprimé à la surface de la myéline et présent dans des extraits de myéline, MAG sur la membrane des oligodendrocytes ainsi que sous forme soluble, OMgp également sur la

membrane des oligodendrocytes et la Tenascine R présente dans la substance blanche et au sein de la matrice extracellulaire.

a. Nogo

Nogo possède une activité de collapsus du cône de croissance. Son activité inhibitrice est stoppée par l'anticorps IN-1 qui reconnaît des fractions de myéline. Différents groupes ont identifié le gène *nogo* et la protéine correspondant à l'antigène reconnu par IN-1. Le gène *nogo* subit un épissage différentiel de manière à générer trois protéines différentes avec des extrémités N-terminales différentes. L'isoforme le plus long est Nogo A qui contient une séquence unique, appelée « amino-Nogo » portant un grand pourcentage d'acides aminés⁴⁹. C'est une protéine transmembranaire avec ses extrémités N- et C-terminales intracellulaires. Un boucle extracellulaire portant une autre séquence appelée « Nogo-66 » est à l'origine de l'activité inhibitrice de Nogo A, ainsi que la séquence amino-Nogo. Aussi bien « amino-Nogo » que « Nogo-66 » présentent une activité inhibitrice qui s'expliquerait par l'existence de deux conformations transmembranaires différentes où les deux parties intéressantes / inhibitrices de Nogo A seraient exposées à la surface des oligodendrocytes. L'isoforme Nogo A est exprimé par les oligodendrocytes myélinisants du SNC, et pas par les cellules de Schwann qui myélinisent le SNP. Nogo B est un isoforme mineur peu rencontré, alors que Nogo C est un isoforme retrouvé dans le SNP.

b. MAG

Des fractions purifiées de MAG sont clairement inhibitrices *in vitro* et présentes dans le SNC, aussi bien à la surface des oligodendrocytes, que sous forme soluble. Son activité inhibitrice est modulable par divers facteurs de croissances par un mécanisme dépendant de l'AMPC. MAG est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines⁴⁵. Elle contient cinq boucles immunoglobulines (Ig). Elle existe sous deux isoformes différents, variant uniquement au niveau du domaine intracellulaire. Elle est retrouvée aussi bien dans le SNC que dans le SNP, située sur les membranes périaxonales, facilitant ainsi son interaction avec des récepteurs axonaux.

c. OMgp

OMgp a été récemment identifié comme un puissant inhibiteur de la croissance axonale présent dans la myéline du SNC⁵⁰. C'est une protéine membranaire greffée sur un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elle ne contient donc pas de domaine intracellulaire. Contrairement à ce qu'indique sa nomination, OMgp n'est pas exprimé uniquement dans les

oligodendrocytes. En effet, il a été trouvé à la surface de nombreux neurones. C'est un composant mineur de la myéline et, de la même manière que Nogo et MAG, il induit le collapsus du cône de croissance des axones régénérants.

d. Tenascine R

La tenascine R est présente dans la matrice extracellulaire au sein du SNC, dans la substance blanche. Elle est synthétisée par les oligodendrocytes et surexprimée après une lésion. *In vitro*, elle est capable d'inhiber la régénération axonale de différents types neuronaux.

2. Les chondroïtines sulfate protéoglycanes

Un autre type majeur de molécules inhibitrices du SNC lésé est constitué par les chondroïtines sulfate protéoglycanes (CS-PGs). Il a été longtemps considéré que les CS-PGs d'un site de lésion sont synthétisés par les astrocytes constitutifs de la cicatrice gliale. De nouvelles avancées ont permis de vérifier qu'une autre source de CS-PGs serait les oligodendrocytes et les cellules des méninges.

Il y a trois raisons pour lesquelles les CS-PGs sont considérés comme des molécules inhibitrices de la régénération nerveuse :

- * une surexpression de CS-PGs au sein même du site de lésion. En effet, une forte concentration de CS-PGs a été observée quelques jours après une lésion. De plus, il a été prouvé que la régénération axonale s'arrête précisément dans la zone où se situent les CS-PGs⁵¹.

- * de nombreux CS-PGs purifiés ont été utilisés *in vitro* pour montrer leur effet inhibiteur sur la croissance axonale. Parmi ceux-ci, on trouve l'aggrecan, le brevican, le versican, le neurocan, tous présents dans le SNC⁵².

- * une digestion enzymatique des CS-PGs sur un site de lésion est une condition suffisante pour une reprise de la régénération axonale⁵³.

Ces trois constatations sont une preuve irréfutable que les CS-PGs sont de forts inhibiteurs de la croissance axonale à travers la cicatrice gliale.

3. Les sémaphorines

Les sémaphorines constituent une grande famille de molécules secrétées ou transmembranaires, classées en huit groupes différents basés sur des caractéristiques structurales distinctes, notamment leur extrémités C-terminal. Les sémaphorines de classe 1 et 2 sont présentes chez les invertébrés, les classes 3 à 7 chez les vertébrés et la classe V chez les virus^{54,55}. Le rôle des sémaphorines est très varié au sein d'un organisme. Elles possèdent un

domaine Sema bien conservé entre les différentes classes. La figure 19 représente les différentes classes de sémaphorines.

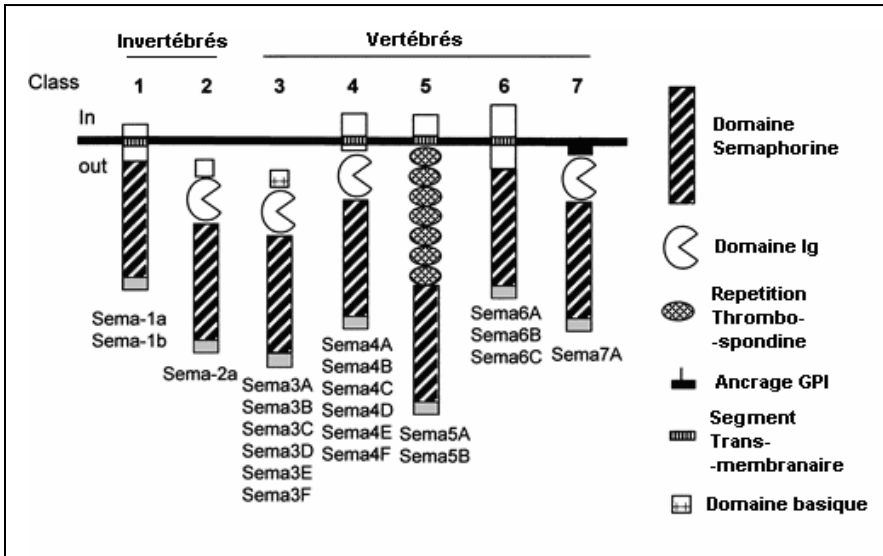


Fig.19 : Schéma représentatif des sémaphorines des classes 1 à 7 et de leurs caractéristiques structurales.

Elles agissent sur :

- le guidage axonale
- la modulation de la réponse immunitaire
- l'organogénèse
- l'angiogénèse
- l'apoptose neurale

Elles ont en outre été impliquées dans diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie du Cri-du-chat ou la dégénérescence des neurones moteurs.

Dans le SNC sain, une sémaphorine de classe 3, nommée Sema3A, a une activité chimioréulsive et constitue ainsi une barrière infranchissable pour les axones en croissance. Suite à une lésion du SNC, la Sema3A de nature répulsive est surexprimée dans la cicatrice gliale. Nous notons en effet une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour cette dernière. Curieusement, la distribution des cellules surexprimant la Sema3A varie en fonction de l'emplacement de la lésion :

- une lésion au niveau du cerveau provoque une surexpression de la Sema3A dans tout le site de lésion
- une lésion au niveau de la colonne vertébrale se traduit par une surexpression de la Sema3A uniquement sur la partie dorsale et les parties latérales de la lésion.

Les cellules de la cicatrice gliale surexprimant la Sema3A sont les fibroblastes (qui contribuent aussi à la formation de la cicatrice gliale) et les cellules des méninges. Cela peut paraître curieux puisque toutes les autres molécules inhibitrices sont surexprimées par les oligodendrocytes et les astrocytes. Une autre source de Sema3A, plus étonnante, serait les neurones lésés eux-mêmes.

Ainsi, suite à une lésion du SNC, les neurones intacts ainsi que ceux lésés seraient une source supplémentaire de Sema3A, renforçant davantage la nature non permissive de la cicatrice gliale à la régénération axonale⁵⁶.

E. Etude détaillée de l'effet inhibiteur des protéines de myéline et de la Sema3A

Nous avons énoncé plus haut tout un panel de molécules retrouvées dans la cicatrice gliale apparemment responsables de la non permissivité de cette dernière à la régénération axonale. Pour ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet inhibiteur de deux classes de molécules inhibitrices : les protéines de myéline et la Sema3A. Dans cette partie, nous essaierons de comprendre le mécanisme moléculaire de l'inhibition provoquée par ces deux composantes.

En effet, les protéines de myéline aussi bien que la Sema3A sont des ligands de récepteurs distincts qui, par une voie de signalisation propre à chacun d'eux, arrivent à arrêter la croissance d'un axone régénéréscent.

1. Les protéines de myéline

a. Structure des protéines de myéline

Comme expliqué précédemment, les protéines de myéline sont constituées de trois composantes différentes qui sont la protéine Nogo A, OMgp et MAG. La structure de chacune d'elle est décrite respectivement en D. 1. a) b) et c).

b. Récepteur et co-récepteur de Nogo A, OMgp et MAG

En 2001, Strittmatter et coll.⁵⁷ ont cloné un gène dont la protéine résultante avait une grande affinité pour Nogo-66. Il s'agissait de la protéine NgR, ou « Nogo Receptor », exprimée à la surface des neurones. Des études supplémentaires ont montré que NgR était aussi récepteur pour MAG⁵⁷ et OMgp⁵⁴

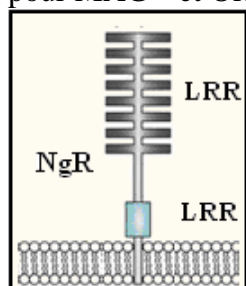


Fig. 20 : Le récepteur NgR est constitué de deux domaines LRR (Leucine Rich Repeat) et il est relié à la membrane cellulaire par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol).

Il est important de noter que la configuration de Nogo exposant la séquence amino-Nogo en surface n'est pas un ligand pour NgR. Un autre récepteur serait responsable de son activité inhibitrice.

Paradoxalement, l'absence de domaine intracellulaire du NgR ne fait pas de lui un récepteur fonctionnel. Des études de coprécipitation ont montré que la neurotrophine $p75^{NTR}$ coprécipitait avec Nogo, MAG, OMgp et NgR^{58,59}.

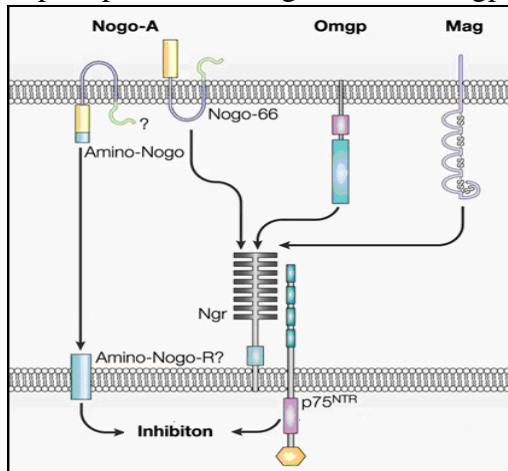


Fig. 21 : Schéma récapitulatif de l'interaction de Nogo, MAG et OMgp avec gR et son co-récepteur $p75^{NTR}$.

c. La signalisation intracellulaire et la réponse cellulaire⁶⁰

L'identification d'un complexe-récepteur pour les protéines de myéline suggère qu'un signal intracellulaire est initié suite à l'interaction des récepteurs avec l'un ou plusieurs des trois acteurs principaux de la myéline.

Plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont possiblement impliquées :

- * la protéine **Rho** qui intervient dans le réarrangement du cytosquelette axonal. Celle-ci interagirait avec $p75^{NTR}$ pour finalement aboutir à un réarrangement du cytosquelette⁶¹ résultant au collapsus du cône de croissance. Inversement, l'inactivation de Rho par la toxine C3 (exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum*) résulte en une activation importante de la régénérescence et de la croissance axonale.

- * les protéines G hétérotrimériques **Gi** ou **Go**⁶² inhiberaient l'adénylate cyclase qui diminuerait les quantités intracellulaires d'AMPc. Or, cet AMPc est nécessaire pour induire la synthèse de polyamines intracellulaires bloquant l'inhibition.

- * le **calcium** étant nécessaire à tout réarrangement du cytosquelette, il serait normalement impliqué aussi ici. La myéline est connue pour induire un influx de calcium dans les neurones et le collapsus du cône de croissance induit par Nogo et MAG serait lui aussi calcium-dépendant⁶³. Le rôle exact du calcium ainsi que sa source intra- ou extra-cellulaire reste à être identifié.

De toutes ces données, une voie de signalisation possible est représentée sur la figure 22.

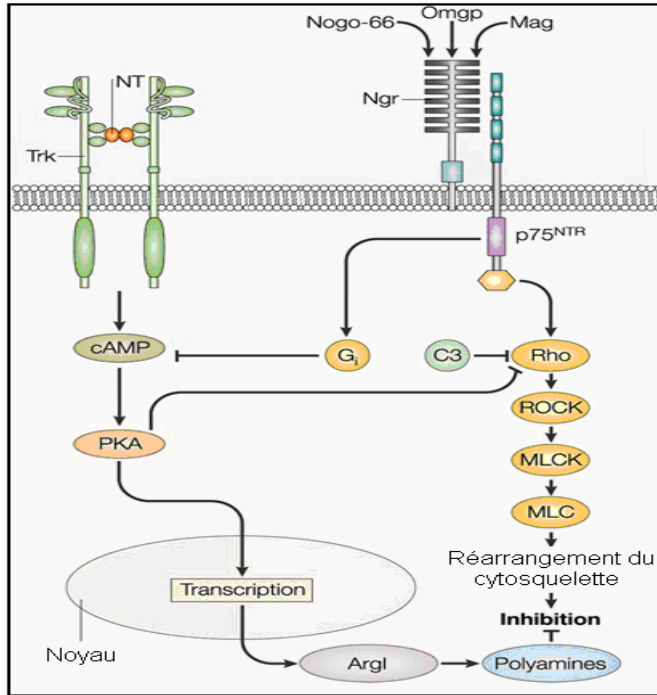


Fig. 22 : La protéine Rho est activée par son interaction avec p75^{NTR}. Ceci entraîne l'activation de la ROCK (Rho Kinase) qui va phosphoryler le MLCK (kinase de la chaîne légère de myosine). Celle-ci va à son tour phosphoryler la MLC (Chaîne légère de myosine) qui résulte au collapsus du cône de croissance.

L'activation de la protéine Gi entraîne une diminution de l'AMPc intracellulaire. Ceci inactive la PKA (protéine kinase A) qui n'active plus des facteurs de transcription permettant l'expression du gène *argl*. Les polyamines qui en résultent bloquent l'inhibition myéline-dépendante.

Même si des progrès énormes ont été effectués afin d'élucider les mécanismes intracellulaires conduisant à l'inhibition de la régénération axonale par la myéline, tout n'est certainement pas encore connu. Cela dit, le fait que toutes les composantes de la myéline agissent sur le même complexe de récepteur est encourageant en matière de thérapie, puisque tous les trois constituants de la myéline peuvent être bloqués simultanément. Cependant, comme c'est le cas pour la séquence amino-Nogo, il est possible que d'autres voies de signalisation soient activées lors de l'interaction de la myéline avec l'axone régénérantes. Naturellement, en matière de réparation totale suite à une lésion, lever l'inhibition de la myéline face à la croissance axonale ne représente qu'une seule partie d'un problème bien plus complexe. En effet, une fois les axones régénérés à travers la cicatrice gliale, ils doivent être capables d'innover les bonnes cibles, en établissant des synapses fonctionnelles. Dans la mesure où la régénérescence des axones à travers la cicatrice gliale est un des points les plus essentiels, les progrès effectués jusqu'ici sont très prometteurs.

2. La Sema3A

a. Structure de la Sema3A

La Sema3A fait partie de la famille des Sémaphorines. C'est une molécule soluble dans le milieu extracellulaire, contenant un « domaine sémaphorine » constitué de 500 acides aminés, un domaine Ig et un domaine basique⁵⁶. Elle est capable de provoquer le collapsus du cône de

croissance d'un axone à des concentrations aussi faibles que 10 pM. La structure de la Sema3A est représentée dans la figure 23.

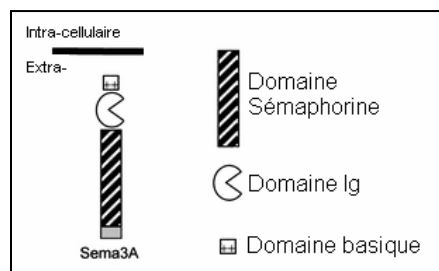


Fig. 23 : Conformation structurale de la Sema3A

Initialement, la Sema3A a été identifiée comme une molécule chimioréulsive du cône de croissance. Cependant, des études plus récentes ont montré qu'elle peut aussi agir en tant que chimioattracteur par des changements de la quantité de GMPc intracellulaire.

b. Récepteur et co-récepteurs de la Sema3A

Les premiers récepteurs des Sémaphorines ont été identifiés en 1997. Il s'agit de la Neuropiline-1 (NP-1) et de la Neuropline-2 (NP-2). Ce sont des protéines transmembranaires. Le récepteur de la Sema3A est NP-1⁶⁴. Les deux récepteurs peuvent former des dimères, dimérisation qui est indépendante du ligand. La formation d'hétérodimères est également possible et confère une large spécificité de substrat.

La NP-1 est nécessaire à la réponse neuronale à la Sema3A. Elle est présente dans tous les neurones qui répondent à la Sema3A. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps anti-NP-1 abolit le collapsus du cône de croissance en présence de Sema3A.

Autre fait marquant, le récepteur NP-1 est aussi capable de se lier à la Sema3B et la Sema3C, activatrices de la croissance axonale. Ainsi, la présence simultanée de Sema3A et Sema3B ou C, ainsi que leur compétition pour NP-1, pourrait rendre certaines régions du SNC accessibles à des axones inhibés par la Sema3A.

Le récepteur NP-1 ayant un domaine intracellulaire très court, la présence d'un co-récepteur est essentielle à son activité biologique. Il s'agit des plexines⁶⁵ présentant des homologies de séquences avec le domaine sémaphorine.

Takahashi et Rohm ont récemment apporté des preuves montrant que les plexines pourraient être les composantes du récepteur NP-1 permettant la signalisation intracellulaire⁶⁶. Les interactions plexine-NP-1 sont représentées sur la figure 24 A.

Castellani et coll.⁶⁷ ont démontré que la molécule d'adhésion cellulaire L1 peut co-précipiter avec la NP-1 et que des neurones de souris knock-out du gène L1 ne répondent plus à la Sema3A. Une représentation schématique de ce complexe est donnée sur la figure 24 B.

Tuttle et O'Leary⁶⁸ ont montré que les facteurs neurotrophiques peuvent moduler la réponse neuronale de la Sema3A. Ils ont montré que trkA (récepteur à haute affinité de NGF) et trkB

(récepteur à haute affinité de BDNF) peuvent former des complexes avec NP-1. La formation de ce complexe est représentée sur la figure 24 C.

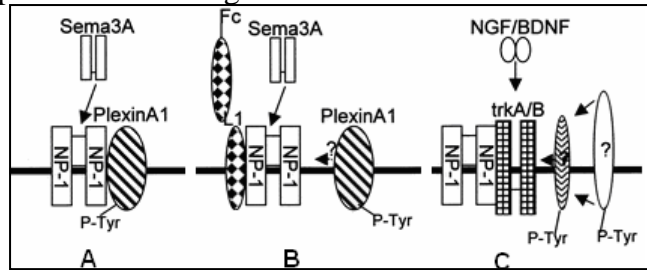


Fig. 24 : Représentation schématique de l'interaction du récepteur NP-1 avec différents types de co-récepteurs. **A** : Interaction avec les pléxines. Selon l'expression cellulaire en pléxines, un neurone peut changer de réponse face à un milieu riche en sémaphorines. **B** : Interaction avec la protéine L1. Si L1 est lié à une L1 soluble, le complexe ainsi formé rend la sema3A chimioattractive pour les axones. **C** : Interaction avec trkA / B. Sous la présence de NGF / BDNF, des protéines hautement phosphorylées, de nature inconnue, sont recrutés dans le complexe.

c. Voie de signalisation intracellulaire et réponse cellulaire

Suite à l'interaction de la Sema3A avec son récepteur, il a été observé une diminution des filaments d'actine du cytosquelette, ce qui va de pair avec le collapsus du cône de croissance. Cependant, la voie de signalisation qui relie le récepteur à la réponse finale de l'axone n'est pas encore connue. De nombreuses voies de signalisation pourraient être impliquées

i. Phosphorylation du complexe récepteur sur une tyrosine⁶⁸

La phosphorylation de la tyrosine est un événement accru au niveau du cône de croissance. Ceci suggère un rôle possible de cette phosphorylation au cours de la réponse à la Sema3A. Une éventualité serait donc que l'interaction de la Sema3A avec le récepteur NP-1 induise la phosphorylation de la pléxine adjacente, cette dernière servant ainsi de point d'ancrage pour recruter d'autres protéines intracellulaires. Ce processus est représenté dans la figure 25.

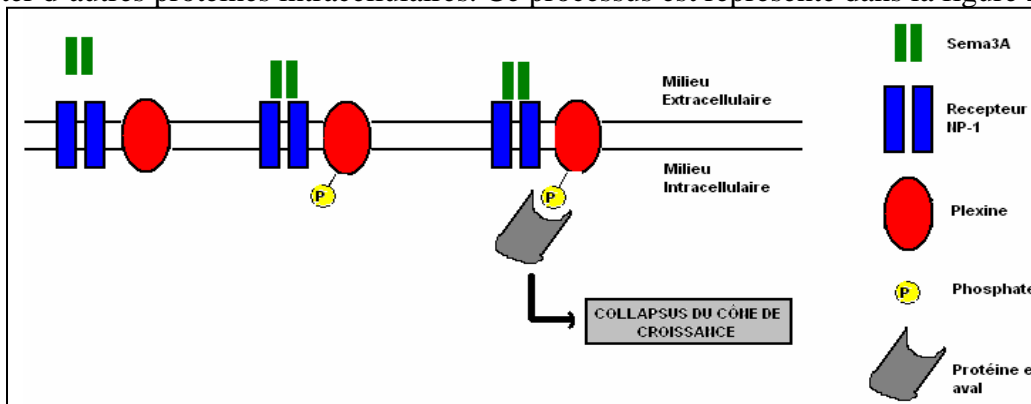


Fig. 25 : Voie possible de l'interaction de Sema3A avec NP-1. La phosphorylation de la pléxine recrute des protéines intracellulaires qui par une cascade de signalisation inconnue provoqueraient le collapsus du cône de croissance.

ii. Implication de la Cofiline

La Sema3A régulerait la dynamique des filaments d'actine en phosphorylant une protéine appelée « cofiline » via une Ser/Thr kinase appelée LIM-kinase (LIMK). La phosphorylation de la cofiline l'inactivant, ceci diminue sa capacité à promouvoir l'élongation des filaments d'actine.

iii. Implication des protéines Rho

La phosphorylation du domaine intracellulaire de la plexine A1 serait un site de reconnaissance de deux protéines : Rnd1 et RhoD. Une compétition entre ces deux molécules est à l'origine de deux réponses cellulaires différentes⁶⁹. Si Rnd1 s'y fixe, la plexine A1 est activée ce qui se traduit par une dépolymérisation des filaments d'actine. Si RhoD s'y fixe, la plexine A1 ne peut plus être activée. Cette compétition est représentée sur la figure 26.

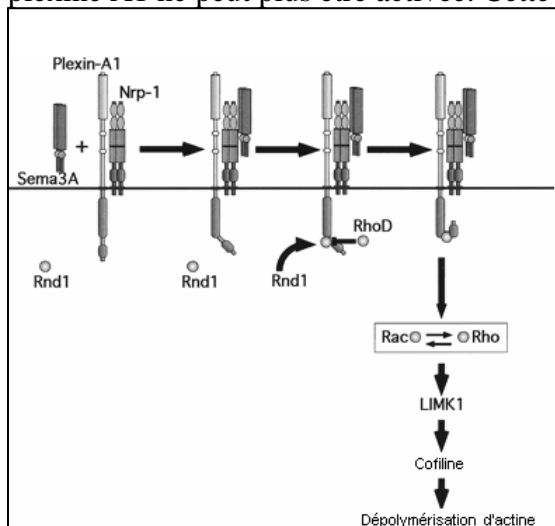


Fig. 26 : La fixation de Sema3A sur le récepteur NP-1 lié à la plexine A1 recrute Rnd1. Rnd1 a une faible activité GTPasique intrinsèque, de ce fait il est considéré comme constitutivement lié au GTP. L'interaction de Rnd1 avec la plexine A1 active cette dernière ce qui provoque la dépolymérisation de la F-actine en aval. A l'inverse, si RhoD déplace l'équilibre et se fixe lui-même sur la plexine A1, la dépolymérisation est bloqué.

Les molécules activatrices et inhibitrices de la cicatrice gliale agissent de manières diverses et variées sur différentes cibles moléculaires de la membrane du cône de croissance. Le résultat final est un collapsus du cône de croissance, généré en grande partie par les effets inhibiteurs des protéines de myéline et de la Sema3A. Cette barrière chimique infranchissable ainsi constituée, une régénération axonale à travers la cicatrice gliale est rendue impossible.

III. QUINONES : DE PUISSANTS ANTIOXYDANTS. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES

A. Répartition des quinones dans le monde vivant

Les quinones sont présentes chez les animaux, les végétaux et les microorganismes. Les trois types de quinones les plus courantes sont le coenzyme Q (ubiquinones, 2-méthyl-5,6-

diméthoxy-1,4-benzoquinone), les plastoquinones (2,3-diméthyl-1,4-benzoquinone) et la vitamine K (ménaquinones, 2-méthyl-1,4-naphthoquinone)⁷⁰ (fig. 27). Chez les animaux, nous trouvons naturellement que le coenzyme Q, la vitamine K étant apportée par l'alimentation alors que les plastoquinones sont inexistantes. Les végétaux possèdent tous les trois types de quinones avec, en prime, la tocophérolquinone. Pour la suite de l'exposé, nous nous concentrerons sur les caractéristiques et les différentes activités du coenzyme Q, quinone majeure du règne animal.

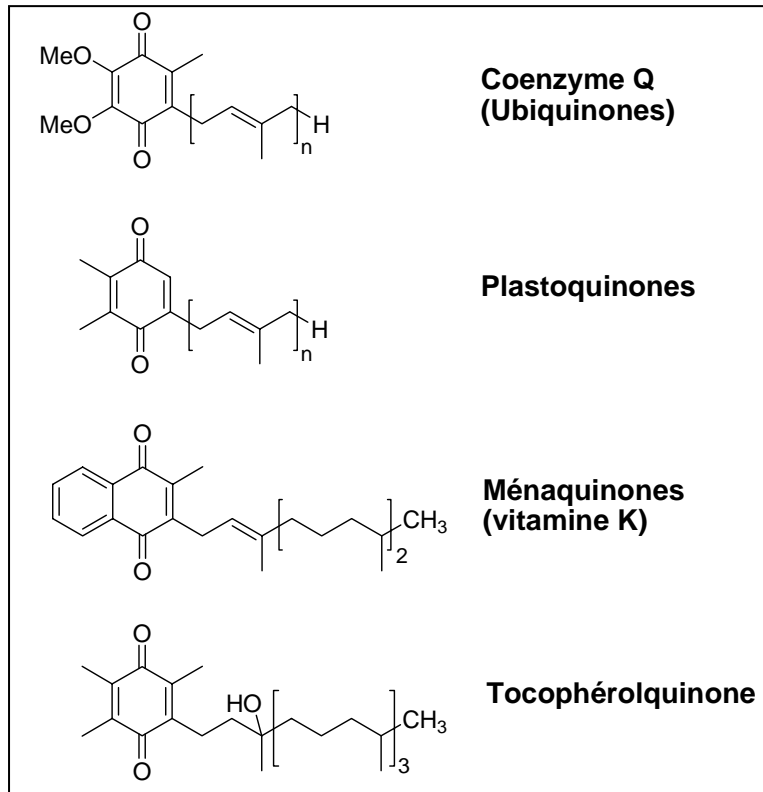


Fig. 27 : Différents types de quinones trouvées chez les êtres vivants

B. Biosynthèse des quinones animales

Le coenzyme Q₁₀, appelé aussi ubiquinone de par sa répartition ubiquitaire dans l'organisme, est un composé liposoluble et amphipathique. Il est constitué d'une tête benzoquinonique et d'une queue hydrophobe greffée en position C-6 du noyau benzoquinonique. Elle est constituée d'un nombre n de sous unités isopréniques en cinq carbones. La valeur de n donne le nom à la quinone. Ainsi, le coenzyme Q₁₀ est doté d'une queue hydrophobe constituée de 10 sous unités isopréniques, soit 50 atomes de carbone. Il existe plusieurs homologues du coenzyme Q chez les eucaryotes et les procaryotes classés de : Q₀ à Q₁₂, le coenzyme Q₁₀ est la forme prédominante chez les humains⁷⁰.

Dans les cellules des mammifères, l'ubiquinone est issue de l'interaction de deux voies métaboliques distinctes. La sous unité quinonique est issue de la tyrosine (ou

exceptionnellement de la phénylalanine) alors que la queue hydrophobe est synthétisée à partir de l'acétyl-CoA par une cascade réactionnelle connue sous la « voie du mévalonate »^{71, 72}.

Il a été montré que dans les cellules animales, l'ubiquinone est présente dans les mitochondries, dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes, les peroxyosomes et la membrane plasmique.

C. Rôle biologique des quinones (quelques exemples)

Les fonctions biologiques des quinones sont diverses et variées. Dans cette partie, nous présenterons deux exemples essentiels au bon fonctionnement cellulaire : la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire des mitochondries, et l'élimination des déchets cellulaires par les lysosomes.

1. Production d'énergie cellulaire⁷³

L'ubiquinone est un composé essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale en raison de ses propriétés oxydo-réductrices. Dans un premier temps, l'ubiquinone est réduite par le complexe I (CI) en ubiquinol. Celui-ci, devenant plus polaire, migre vers la surface de la membrane où il est réoxydé en ubiquinone par le complexe III (CIII). Les électrons sont par la suite véhiculés par le cytochrome c et atteignent le complexe IV (CIV) où ils réduisent l'oxygène moléculaire en eau. Lors de ce jeu d'oxydo-réductions, des protons sont véhiculés vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Ces mêmes protons sont de nouveau véhiculés dans la matrice mitochondriale par le biais d'une ATP synthase, le complexe V (CV). Ce transit de protons permet au complexe V de synthétiser de l'ATP (fig. 28)

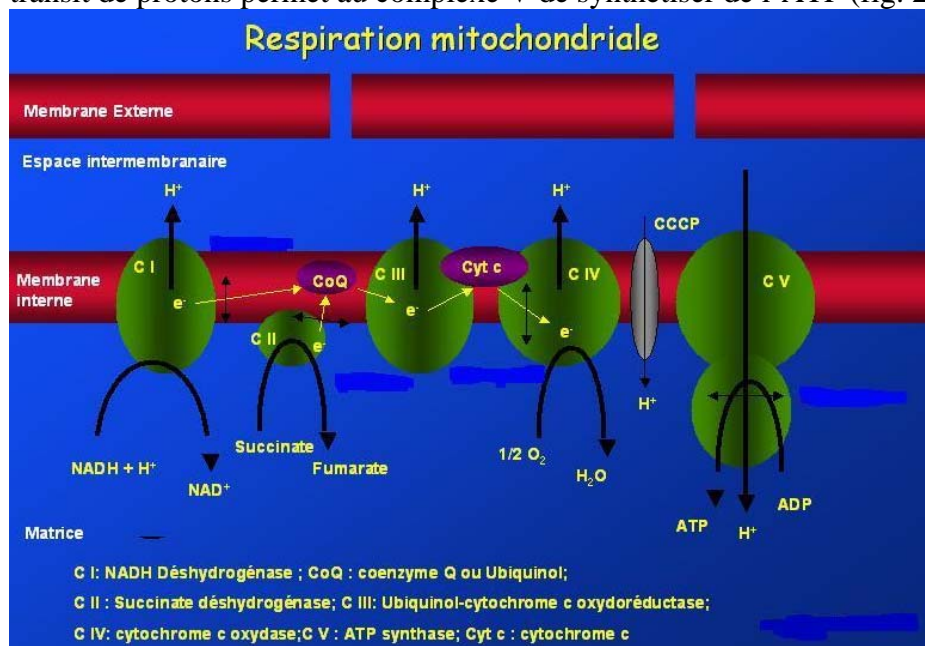
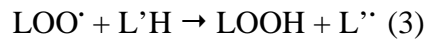
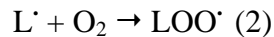
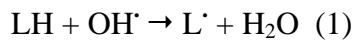


Fig. 28 :
Mouvements des électrons dans la chaîne respiratoire.
(<http://www.timo ne.univ-mrs.fr/medecine/recherche/lab/ph arma/Mitochondrie.htm>)

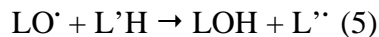
Les valeurs des pKa indiqués sur le schéma ont été mesurées dans un milieu eau/éthanol considéré comme un milieu proche de celui de la surface de la membrane interne mitochondriale. Parmi ces différents états représentés ci-dessus, la forme UQH₂ (ubiquinol) est la forme antioxydante par excellence. A l'inverse, le passage de UQH₂ à UQ suppose un intermédiaire ubisemiquinone (UQH[•]) fortement pro-oxydant.

2. Activité antioxydante de l'ubiquinol et de l'ubiquinone

L'ubiquinol UQH₂ a pour rôle principal d'éviter la peroxydation lipidique^{75,76}. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène (H[•]) d'un acide gras insaturé (LH) par un radical hydroxyle OH[•] (Equation 1). Le radical ainsi formé réagit rapidement avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy (LOO[•]) (Equation 2) qui peut de nouveau retirer un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé (Equation 3).



Ce peroxyde lipidique peut à son tour se décomposer en présence de Fe²⁺ ou Cu⁺ pour former un radical alkoxy (LO[•]) (Equation 4) qui peut à son tour retirer un atome d'hydrogène d'un acide gras insaturé. (Equation 5)



Le rôle de l'ubiquinol UQH₂ dans les membranes biologiques est d'éviter la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux hydroxyles, peroxydes ou alkoxydes (Réaction 6)



Dans les membranes biologiques, l'ubiquinone existe sous ses deux formes UQH₂ et UQ. Il a été récemment postulé que la forme UQ possède également des propriétés antioxydantes indirectes. En effet, à l'inverse de UQH₂ qui piège directement les radicaux en s'oxydant lui-même, la forme UQ aurait un rôle de structurant membranaire. Il diminuerait ainsi la fluidité de cette membrane et éviterait l'interaction des radicaux hydroxyles avec les lipides membranaires.

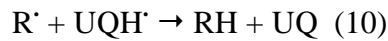
3. Activité pro-oxydante des formes UQH[•] / UQH⁻ / UQ⁻

D'après la réaction (6), suite à la neutralisation de différents radicaux oxygénés par UQH₂, nous notons l'apparition de la forme ubisemiquinone UQH[•]. L'évolution de la forme ubisemiquinone dans les milieux biologiques est à l'origine de l'apparition de molécules pro-

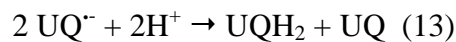
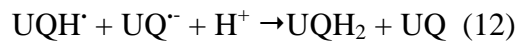
oxydantes^{75,77} tels que les radicaux hydroperoxydes (Equation 7), hydroxydes (Equation 8), et alkoxydes (Equation 9).



Il est cependant à noter que, malgré cet effet pro-oxydant de l'ubisemiquinone, il existe des mécanismes de régulation permettant d'éviter l'apparition de ces radicaux. En effet, une autre issue pour le radical ubisemiquinone serait sa réaction avec un autre radical pour donner la forme UQ (Equation 10).



Alternativement, deux molécules d'ubisemiquinone peuvent réagir par « dismutation » pour donner une molécule d'ubiquinone et une molécule d'ubiquinol. Trois cas de figure sont possibles (Equations 11, 12 et 13) :

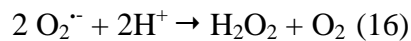


La réaction entre les deux anions (13) est très lente en raison de la répulsion électrostatique. Ce sont donc les réactions (11) et (12) qui prennent la relève. Ceci étant, dans les membranes biologiques, la réaction qui prédomine est la (11).

Les formes UQH[·] et UQ^{·-} réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former le radical anion superoxyde O₂^{·-} (Equations 14 et 15)



Le radical anion superoxyde ainsi formé est directement réduit par la **Superoxyde Dismutase** (SOD) en milieu acide pour donner du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène (Equation 16).



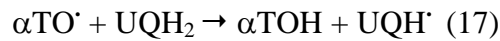
Il est intéressant de noter que les formes UQ ou UQH₂ ainsi obtenues sont de nouveau utilisées dans la chaîne respiratoire comme transporteur de protons et d'électrons.

L'effet antioxydant de l'ubiquinol doit donc être vu comme un ensemble de réaction pro- et anti-oxydantes sur lesquelles se greffent des systèmes de régulation indispensables à la neutralisation des radicaux.

4. L'activité antioxydante de l'ubiquinol est jumelée à celle de l' α -tocophérol⁷⁸

La vitamine E, ou α -tocophérol, est souvent considérée comme un antioxydant majeur pour protéger les membranes biologiques de la peroxydation lipidique. Le radical α -tocophéryle résultant est reconverti en α -tocophérol par l'acide ascorbique. Un synergisme possible entre l'ubiquinol et la vitamine E en terme d'activité antioxydante serait donc concevable. En effet,

il a été postulé que l'ubiquinol en lui-même ne serait pas antioxydant en lui-même ; il exercerait son activité antioxydante en régénérant la forme active de la vitamine E de manière plus efficace que l'acide ascorbique. Cependant, des études portant sur la peroxydation lipidique générée par de l'ADP-Fe³⁺ sur des membranes mitochondriales dépourvues de vitamine E indiquent que la seule présence d'ubiquinol est capable de neutraliser les radicaux ainsi formés. Ces expériences montrent bien l'effet antioxydant de l'ubiquinol lui-même. Il découle de cette étude que l'ubiquinol et l' α -tocophérol agissent de manière synergique⁷⁵. En effet, l'ubiquinol est capable de régénérer l' α -tocophérol à partir du radical α -tocophéryle (α TO \cdot) (Equation 17) :



Il est aussi possible que l'ubisemiquinone réagisse directement avec le radical α -tocophéryle pour régénérer l' α -tocophérol, réduisant ainsi davantage l'effet néfaste de ce premier (Equation 18) :



Par conséquent, l'ubiquinol prévient la peroxydation lipidique par voie directe en utilisant ses propriétés antioxydantes intrinsèques et par voie indirecte en régénérant la forme active de la vitamine E.

Le synergisme entre ces deux antioxydants n'est pas uniquement chimique, il est aussi géographique. En effet, d'après le coefficient de partage de l'ubiquinol et de l' α -tocophérol, il est concevable que l'ubiquinol se trouve en profondeur dans la bicouche lipidique et l' α -tocophérol, légèrement plus polaire, se trouve plus en surface. L'ubiquinol est légèrement moins polaire que l' α -tocophérol en raison des liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les groupements hydroxyles et méthoxy du noyau (fig. 30).

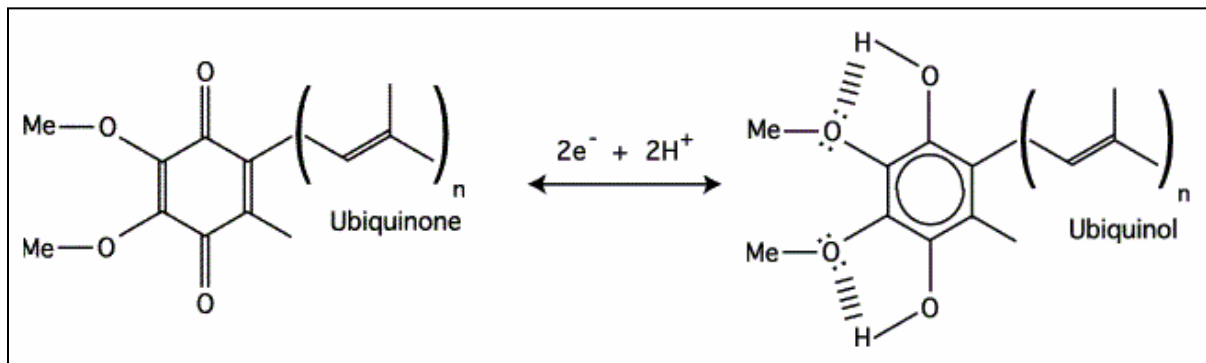


Fig. 30 : Les liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les groupement hydroxyles et méthoxy de l'ubiquinol diminuent sa polarité.

Ainsi, ces deux composés constituent chacun une barrière chimique contre les radicaux se situant à deux niveaux différents de la bicouche phospholipidique.

5. Effet de la chaîne hydrophobe sur le pouvoir antioxydant

Il est démontré que la chaîne latérale hydrophobe n'a pas d'effet sur le pouvoir antioxydant de l'ubiquinol *in vitro*. A l'inverse, l'efficacité antioxydante contre la peroxydation lipidique *in vivo* diminue en fonction de la longueur de la chaîne⁷⁰. En effet, il est démontré que les coenzymes Q portant des chaînes hydrophobes courtes sont de meilleurs antioxydants que leurs homologues à chaîne longue. Ceci s'explique par la mobilité des différents coenzymes Q dans la bicouche phospholipidique. Plus la chaîne hydrophobe est courte, plus le coenzyme Q est mobile et plus son mouvement intramembranaire est facilité lors des réactions d'oxydoréduction. Il est important aussi de noter que le coenzyme Q₀ n'exerce qu'une très faible activité antioxydante *in vivo*. Cette constatation traduit bien l'importance de la chaîne hydrophobe, et de l'intercalation de l'ubiquinol entre les phospholipides sur son pouvoir antioxydant.

E. Quinones, SNC et maladies neurodégénératives

1. Constatations expérimentales

Il a été constaté une forte diminution de coenzyme Q₁₀ dans le cerveau de sujets âgés. Une administration orale de coenzyme Q₁₀ est capable de restaurer les quantités physiologiques. On le retrouve alors dans le cerveau, le cœur, le foie et le sang. Il faut notamment noter une forte augmentation de coenzyme Q₁₀ dans les mitochondries des cellules nerveuses.

2. Maladies neurodégénératives et coenzyme Q₁₀

De nombreuses maladies neurodégénératives sont souvent associées à un stress oxydant ainsi qu'à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries. Dans tous les cas, ceci va de pair avec une diminution de la concentration du coenzyme Q₁₀ dans les membranes mitochondriales⁷⁹.

a. Maladie de Parkinson⁸⁰

i. Caractéristiques cliniques

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative se manifestant en général chez l'homme de plus de 50 ans. Elle se traduit par un tremblement au repos, des troubles du tonus

et une akinésie, diversement associés. Elle affecte également l'élocution et le "langage corporel". Comme beaucoup d'autres troubles neurologiques, la maladie de Parkinson est chronique, évolutive et pour le moment incurable. Elle est d'étiologie inconnue.

ii. Causes de la maladie

Une implication plus directe du dysfonctionnement mitochondrial dans la maladie de Parkinson a été mise en évidence après la découverte du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine) qui provoque un syndrome parkinsonien chez les humains, des primates non humains et des souris. Le mode d'action de cette molécule donne un indice sur une des causes possibles de la maladie de Parkinson. En effet, elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries. Une étude du fonctionnement mitochondrial de sujets atteints prouve que le complexe I voit son activité diminuer par rapport à celui de mitochondries saines.

Si le dysfonctionnement mitochondrial est à l'origine de la maladie de Parkinson, il devrait pouvoir être mis en évidence auprès des sujets présentant des signes précoces de la maladie. Shultz et Hass⁸¹ ont montré une diminution significative de l'activité des complexes mitochondriaux I et III chez les malades précoces.

Il a été avancé que le dysfonctionnement mitochondrial serait dû à des dommages oxydants qui conduiraient à des mutations de l'ADN mitochondrial. De telles mutations seraient à l'origine du mauvais fonctionnement des complexes I et III. Nous nous retrouvons alors dans un cercle vicieux où la génération de radicaux libres par la chaîne respiratoire serait elle-même à l'origine des dommages causés sur cette dernière.

iii. Rôle du coenzyme Q₁₀

Le coenzyme Q₁₀, comme décrit précédemment, se retrouve sur la membrane interne des mitochondries. Son rôle antioxydant serait, dans le cas de la maladie de Parkinson, d'une importance majeure puisqu'il aurait un rôle protecteur de la mitochondrie elle-même. En effet, des études ont montré que chez les sujets malades, la quantité de coenzyme Q₁₀ est diminuée de 33% dans les membranes mitochondriales par rapport à des sujets sains. Ceci n'est pourtant pas le cas pour le sérum. Un apport nutritionnel en coenzyme Q₁₀ serait bénéfique pour la protection de la chaîne respiratoire des mitochondries ainsi que de l'ADN mitochondrial. Cependant, un apport excessif de coenzyme Q₁₀ serait pour l'instant déconseillé puisque des études cliniques plus poussées n'ont pas encore été réalisées.

b. Maladie de Huntington ⁷⁹

i. Caractéristiques cliniques

La Chorée de Huntington est une maladie progressive et neurodégénérative, autosomale et dominante. Elle est due à une répétition de la séquence trinuécléotidique CAG dans le gène *huntingtin*. Les manifestations cliniques de la maladie sont une chorée, un déclin cognitif et des problèmes comportementaux. La dégénération d'une population neuronale bien précise dite « medium spiny » du striatum est également à noter.

ii. Causes de la maladie

Des études sur la fonction mitochondriale indiquent une diminution de l'activité des complexes II et III de la chaîne respiratoire ainsi qu'une diminution moins marquée de l'activité du complexe IV.

iii. Rôle du coenzyme Q₁₀

Le lien avec le coenzyme Q₁₀ dans la chorée de Huntington n'est pas encore clair. Ceci étant, il est démontré que l'administration de coenzyme Q₁₀ à des modèles de souris malades, augmente leur survie.

c. Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS) ⁷⁹

i. Caractéristiques cliniques

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative liée à l'altération progressive des neurones moteurs, les cellules qui commandent les muscles volontaires. La maladie se déclare entre 45 et 75 ans. C'est une affection handicapante à aggravation progressive, dont l'évolution moyenne est d'environ 36 mois.

ii. Causes de la maladie

Encore une fois, le stress oxydatif serait à l'origine de cette maladie. La présence des radicaux libres serait à l'origine de la mort neuronale observée, probablement par une atteinte des membranes neuronales ainsi que d'une atteinte de l'ADN

iii. Rôle du coenzyme Q₁₀

Dans ce cas, l'administration de coenzyme Q₁₀ ne prolongerait que très modestement l'espérance de vie des modèles animaux. Des études supplémentaires sont nécessaires pour valider ces résultats.

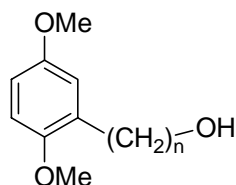
IV. CADRE DU TRAVAIL

L'intérêt porté aux mimétiques des facteurs neurotrophiques pouvant induire une différenciation ou une régénération d'un axone au sein de la cicatrice gliale a été la force motrice de ce travail de thèse. La présence de radicaux libres au sein même de la cicatrice gliale, générés par la microglie activée, rend l'aspect antioxydant de ces composés très important.

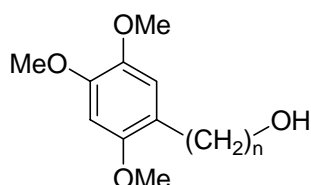
Mon travail a consisté à :

- étudier les propriétés biologiques et physicochimiques du tCFA15. Ces résultats seront présentés dans le chapitre 1.
- Synthétiser de nouveaux composés plus antioxydants que le tCFA15 tout en maintenant la propriété biologique. Nous avons ainsi synthétisé 5 séries de molécules jumelant l'activité antioxydante du noyau hydroquinonique perméthylé (stables à l'oxydation) et les propriétés neurotrophiques de la chaîne ω -alcanol. Ces produits s'appellent les « **Quinol Fatty Alcohols** » ou **QFA**.

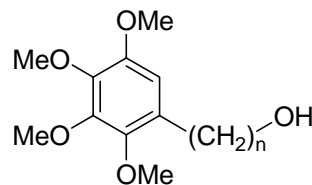
Introduction générale



QFA

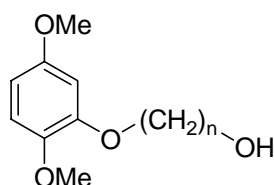


Q₃FA

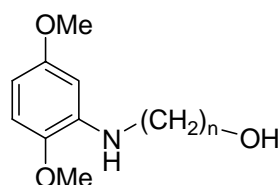


Q₄FA

n = 12, 14, 15, 16, 18



O-QFA



N-QFA

n = 10, 12, 14, 16

Ces résultats seront exposés dans les chapitres 2 et 3.

Suite à l'activité biologique très intéressante observée pour l'un des produits synthétisés, le QFA15, j'ai essayé d'adapter cette synthèse sur support solide. Ceci permettra :

- de synthétiser le produit désiré en s'affranchissant des étapes de purification souvent fastidieuses
- l'accès à d'autres molécules à travers la synthèse parallèle, en couplant d'autres cycles antioxydants ou ayant des propriétés pharmacologiques intéressantes, sur une même chaîne ω-alcanol et ce dans l'optique de trouver de nouveaux « hits » (Chapitre 4).

Enfin, en vue d'étudier une nouvelle activité biologique intéressante, j'ai synthétisé un dérivé du QFA15 à travers un réactif supporté où l'alcool terminal est remplacé par un acide hydroxamique. Les acides hydroxamiques sont de puissants chélateurs de métaux et, de ce fait de puissants inhibiteurs d'une famille d'enzymes appelées « métalloprotéases matricielles » impliqués dans de nombreuses pathologies telles que l'arthrose⁸², la métastase des tumeurs⁸³ et la sclérose en plaques⁸⁴(Chapitre 4).

REFERENCES 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.; Ruiten, D. J.; de Waal, R. M. The role of amyloid in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 937-950.
- (3) Imahori, K.; Hoshi, M.; Ishiguro, K.; Sato, K.; Takahashi, M. et al. Possible role of tau protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **1998**, *19*, S93-98.
- (4) 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.
- (5) Quintanilla, R. A.; Orellana, D. I.; Gonzalez-Billault, C.; Maccioni, R. B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp. Cell Res.* **2004**, *295*, 245-257.
- (6) Kim, H. J.; Ifergan, I.; Antel, J. P.; Seguin, R.; Duddy, M. et al. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 7144-7153.
- (7) Bryson, H. M.; Benfield, P. Donepezil. *Drugs Aging* **1997**, *10*, 234-239.
- (8) 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.
- (9) Dovey, H. F.; John, V.; Anderson, J. P.; Chen, L. Z.; de Saint Andrieu, P. et al. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 173-181.
- (10) Aisen, P. S.; Davis, K. L.; Berg, J. D.; Schafer, K.; Campbell, K. et al. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Neurology* **2000**, *54*, 588-593.
- (11) Mulder, D. W.; Kurland, L. T.; Offord, K. P.; Beard, C. M. Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **1986**, *36*, 511-517.
- (12) Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **1993**, *364*, 362.
- (13) Choi, D. W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **1992**, *23*, 1261-1276.
- (14) Leigh, P. N.; Meldrum, B. S. Excitotoxicity in ALS. *Neurology* **1996**, *47*, S221-227.
- (15) Sathasivam, S.; Ince, P. G.; Shaw, P. J. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2001**, *27*, 257-274.
- (16) Appel, S. H.; Smith, R. G.; Engelhardt, J. I.; Stefani, E. Evidence for autoimmunity in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1993**, *118*, 169-174.
- (17) Bensimon, G.; Lacomblez, L.; Delumeau, J. C.; Bejuit, R.; Truffinet, P. et al. A study of riluzole in the treatment of advanced stage or elderly patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **2002**, *249*, 609-615.
- (18) Gredal, O.; Werdelin, L.; Bak, S.; Christensen, P. B.; Boysen, G. et al. A clinical trial of dextromethorphan in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **1997**, *96*, 8-13.
- (19) Jackson, P. F.; Slusher, B. S. Design of NAALADase inhibitors: a novel neuroprotective strategy. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 949-957.
- (20) Iwasaki, Y.; Shiojima, T.; Kinoshita, M.; Ikeda, K. SR57746A: a survival factor for motor neurons in vivo. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *160 Suppl 1*, S92-96.

- (21) Fischer, W.; Victorin, K.; Bjorklund, A.; Williams, L. R.; Varon, S. et al. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* **1987**, *329*, 65-68.
- (22) Thoenen, H.; Sendtner, M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5 Suppl*, 1046-1050.
- (23) Omura, S.; Fujimoto, T.; Ootoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R. et al. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1991**, *44*, 113-116.
- (24) Kakeya, H.; Onozawa, C.; Sato, M.; Arai, K.; Osada, H. Neuritogenic effect of epolactaene derivatives on human neuroblastoma cells which lack high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 391-394.
- (25) Avramut, M.; Zeevi, A.; Achim, C. L. The immunosuppressant drug FK506 is a potent trophic agent for human fetal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **2001**, *132*, 151-157.
- (26) Borg, J.; Toazara, J.; Hietter, H.; Henry, M.; Schmitt, G. et al. Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons. *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 406-410.
- (27) Keyling-Gilger, F.; Schmitt, G.; Beck, A.; Luu, B. Synthesis of optically active diastereomers of a non proteic neurotrophic mimetic. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14891-14904.
- (28) 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.
- (29) Girlanda-Junges, C.; Keyling-Bilger, F.; Schmitt, G.; Luu, B. Effect of cyclohexenonic long chain fatty alcohols on neurite outgrowth. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7735-7748.
- (30) Gonzalez de Aguilar, J. L.; Girlanda-Junges, C.; Coowar, D.; Duportail, G.; Loeffler, J. P. et al. 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.
- (31) Schwartz, M.; Yoles, E.; Levin, L. A. 'Axogenic' and 'somagenic' neurodegenerative diseases: definitions and therapeutic implications. *Mol. Med. Today* **1999**, *5*, 470-473.
- (32) Gaillard, S.; Nasarre, C.; Gonthier, B.; Bagnard, D. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la croissance axonale. *Rev. Neurol. (Paris)* **2005**, *161*, 153-172.
- (33) Jablonka, S.; Wiese, S.; Sendtner, M. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* **2004**, *58*, 272-286.
- (34) Suter, D. M.; Forscher, P. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J. Neurobiol.* **2000**, *44*, 97-113.
- (35) Luo, L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2000**, *1*, 173-180.
- (36) Perry, V. H.; Gordon, S. Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **1991**, *125*, 203-244.
- (37) Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 312-318.
- (38) Levine, J. M. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 4716-4730.
- (39) Johansson, C. B.; Momma, S.; Clarke, D. L.; Risling, M.; Lendahl, U. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **1999**, *96*, 25-34.

- (40) Fawcett, J. W. Axon growth and regeneration : Intrinsic neuronal effects. *Trends Neurosci.* **1992**, *15*, 5-8.
- (41) Berry, M.; Maxwell, W. L.; Logan, A.; Mathewson, A.; McConnell, P. et al. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* **1983**, *32*, 31-53.
- (42) Davies, S. J.; Field, P. M.; Raisman, G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp. Neurol.* **1996**, *142*, 203-216.
- (43) Neugebauer, K. M.; Tomaselli, K. J.; Lilien, J.; Reichardt, L. F. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **1988**, *107*, 1177-1187.
- (44) Fawcett, J. W.; Housden, E.; Smith-Thomas, L.; Meyer, R. L. The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev. Biol.* **1989**, *135*, 449-458.
- (45) McGee, A. W.; Strittmatter, S. M. The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 193-198.
- (46) Lewis, C. E.; McGee, J. O. The macrophage. *Oxford: Oxford University Press* **1992**, 1-57.
- (47) Rabchevsky, A. G.; Streit, W. J. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* **1997**, *47*, 34-48.
- (48) Levine, J. M.; Nishiyama, A. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1996**, *3*, 245-259.
- (49) GrandPre, T.; Li, S.; Strittmatter, S. M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* **2002**, *417*, 547-551.
- (50) Wang, K. C.; Koprivica, V.; Kim, J. A.; Sivasankaran, R.; Guo, Y. et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **2002**, *417*, 941-944.
- (51) Pindzola, R. R.; Doller, C.; Silver, J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesion. *Dev. Biol.* **1993**, *156*, 34-48.
- (52) Margolis, R. K.; Rauch, U.; Maurel, P.; Margolis, R. U. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1996**, *3*, 273-290.
- (53) McKeon, R. J.; Schreiber, R. C.; Rudge, J. S.; Silver, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 3398-3411.
- (54) He, Z.; Wang, K. C.; Koprivica, V.; Ming, G.; Song, H. J. Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Sci. STKE* **2002**, *2002*, RE1.
- (55) Pasterkamp, R. J.; Verhaagen, J. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2001**, *35*, 36-54.
- (56) Gavazzi, I. Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 275-284.
- (57) Fournier, A. E.; GrandPre, T.; Strittmatter, S. M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **2001**, *409*, 341-346.
- (58) Yamashita, T.; Higuchi, H.; Tohyama, M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 565-570.
- (59) Wang, K. C.; Kim, J. A.; Sivasankaran, R.; Segal, R.; He, Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **2002**, *420*, 74-78.

- (60) Filbin, M. T. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 703-713.
- (61) Fournier, A. E.; Takizawa, B. T.; Strittmatter, S. M. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 1416-1423.
- (62) Igarashi, M.; Strittmatter, S. M.; Vartanian, T.; Fishman, M. C. Mediation by G-proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science* **1993**, *259*, 77-79.
- (63) Bandtlow, C. E.; Schmidt, M. F.; Hassinger, T. D.; Schwab, M. E.; Kater, S. B. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science* **1993**, *259*, 80-83.
- (64) Kolodkin, A. L.; Levenson, D. V.; Rowe, E. G.; Tai, Y. T.; Giger, R. J. et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **1997**, *90*, 753-762.
- (65) Winberg, M. L.; Noordermeer, J. N.; Tamagnone, L.; Comoglio, P. M.; Spriggs, M. K. et al. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **1998**, *95*, 903-916.
- (66) Raper, J. A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2000**, *10*, 88-94.
- (67) Castellani, V.; Chedotal, A.; Schachner, M.; Faivre-Sarrailh, C.; Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Semaphorin 3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **2000**, *27*, 237-249.
- (68) Tuttle, R.; O'Leary, D. D. Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol. Cell Neurosci.* **1998**, *11*, 1-8.
- (69) Zanata, S. M.; Hovatta, I.; Rohm, B.; Puschel, A. W. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 471-477.
- (70) Albano, C. B.; Muralikrishnan, D.; Ebadi, M. Distribution of coenzyme Q homologues in brain. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 359-368.
- (71) Bloch, K. Sterol molecule : structure, biosynthesis and function. *Steroids* **1992**, *57*, 378-383.
- (72) Ernster, L.; Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1271*, 195-204.
- (73) Crane, F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* **2001**, *20*, 591-598.
- (74) Frei, B.; Kim, M. C.; Ames, B. N. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1990**, *87*, 4879-4883.
- (75) James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 47-56.
- (76) Nohl, H.; Gille, L.; Kozlov, A. V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 666-675.
- (77) Niki, E. Mechanisms and dynamics of antioxidant action of ubiquinol. *Mol. Aspects Med.* **1997**, *18 Suppl*, S63-70.
- (78) Cadenas, E.; Hochstein, P.; Ernster, L. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1992**, *65*, 97-146.
- (79) Shults, C. W. Coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1917-1921.
- (80) Shults, C. W. Mitochondrial dysfunction and possible treatments in Parkinson's disease-a review. *Mitochondrion* **2004**, *4*, 641-648.

- (81) Hass, R.; Nasirian, F.; Nakano, K.; Ward, D.; Pay, M. et al. Low platelet mitochondrial Complex I and Complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **1995**, *37*, 714-722.
- (82) Firestein, G. S.; Paine, M. M.; Littman, B. H. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum.* **1991**, *34*, 1094-1105.
- (83) Pyke, C.; Ralfkiaer, E.; Huhtala, P.; Hurskainen, T.; Dano, K. et al. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 1336-1341.
- (84) Gijbels, K.; Galardy, R. E.; Steinman, L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* **1994**, *94*, 2177-2182.

Chapitre I :
Synthèse et étude
du tCFA15

I. INTRODUCTION

Nous avons décrit précédemment que le SNC adulte est incapable de régénérer les extensions axonales suite à une lésion. Ceci est dû à la formation, *post trauma*, d'une cicatrice gliale qui recrute tout un panel de cellules neurales. Ces cellules surexpriment une grande quantité de molécules parmi lesquelles la Sema3A et les protéines de myéline (Nogo A, MAG, OMgp). Ces substances sont très fortement inhibitrices de la régénération axonale en interagissant avec des récepteurs localisés sur le cône de croissance de l'axone.

Dans cette étude, nous montrons que le tCFA15 (3-(15-hydroxypentadécyl)-2,4,4-triméthylcyclohexène-2-one), un cyclohexénone contenant une longue chaîne hydrocarbonée à 15 atomes de carbone, est capable de promouvoir une croissance axonale en milieu inhibiteur c'est à dire en présence de Sema3A ou de myéline.

- II. PUBLICATION : « Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound »**
M. Hanbali, F. Bernard et al. *J. Neurochem.*, 2004, 90, 1423-1431.

Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound

Mazen Hanbali,*†¹ Frédéric Bernard,*¹ Caroline Berton,* Gilles Gatineau,* Martine Perraut,* Dominique Aunis,* Bang Luu† and Dominique Bagnard*

*INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Centre de Neurochimie and †CNRS-ULP UMR7123, Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles, Centre de Neurochimie, Strasbourg, France

Abstract

One of the reasons for the lack of nerve regeneration in the CNS is the formation of a glial scar over-expressing multiple inhibitory factors including myelin-associated proteins and members of the Semaphorin family. Innovative therapeutic strategies must stimulate axon extension across the lesion site despite this inhibitory molecular barrier. We recently developed a synthetic neurotrophic compound combining an ω -alkanol with a retinol-like cycle (3-(15-hydroxy-pentadecyl)-2,4,4-trimethyl-cyclohexen-2-one (tCFA15)). Here, we demonstrate that tCFA15 is able to promote cortical axon out-

growth *in vitro* even in the presence of the inhibitory Semaphorin 3A and myelin extracts. This growth-promoting effect is selectively observed in axons and requires multiple growth-associated intracellular pathways. Our results illustrate the potential use of synthetic neurotrophic compounds to promote nerve regeneration by counteracting the axonal growth inhibition triggered by glial scar-associated inhibitory factors.

Keywords: axon, cortex, myelin, neurotrophic factor, regeneration, Semaphorin.

J. Neurochem. (2004) **90**, 1423–1431.

Adult mammalian brain and spinal cord have limited capacity for regeneration. This makes the repair of any injuries hazardous and, consequently, CNS traumas are devastating. Intrinsically, CNS neurones are able to regenerate their injured axons when exposed to appropriate extracellular signals (Gurgo *et al.* 2002). Nevertheless, as reviewed by Schwab and colleagues (Fouad *et al.* 2001), a lack of expression of both growth-associated proteins that are expressed during development and neurotrophic factors which mediate cell survival is generally observed during CNS lesions. Moreover, the formation of the glial scar constitutes a mechanical barrier blocking nerve regeneration. The inhibition of nerve re-growth is also the consequence of the expression of many factors, such as myelin-associated proteins (Nogo and MAG), chondroitin sulphate proteoglycans or Semaphorins, that all possess strong inhibitory properties for growing axons. Accordingly, various strategies have been used to promote nerve regeneration (Fouad *et al.* 2001; Gimenez y Ribotta *et al.* 2002; Schwab 2002). One of these strategies is to provide neurotrophic compounds within the lesion site in order to improve neurone survival, sprouting and axon re-growth (Schnell *et al.* 1994; Tuszynski *et al.* 1997; Liu *et al.* 1999; Ramer *et al.* 2000).

Nevertheless, the major problems in applying neurotrophic factors are their poor nervous system penetration, relative instability and wide range of local and systemic biological activities (Xie and Longo 2000). To address these limitations, a suitable approach consists of developing small molecules which are able to mimic the biological effects of the naturally occurring proteic factors. Initial investigations, based on the screening of medicinal plants to look for a lead compound, showed that hexacosanol, a long-chain ω -alkanol, possesses neurotrophic effects. Several chemical modifications, such as the combination of the partial structure of ω -alkanol and that of retinol, were performed to improve the physicochemical

Received February 26, 2004; revised manuscript received April 13, 2004; accepted May 17, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Dr D. Bagnard, INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Centre de Neurochimie, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

E-mail: bagnard@neurochem.u-strasbg.fr

¹These authors contributed equally to this article.

Abbreviations used: EGCG, epigallocatechin gallate; PBS, phosphate-buffered saline; Sema3A, Semaphorin 3A; tCFA15, 3-(15-hydroxy-pentadecyl)-2,4,4-trimethyl-cyclohexen-2-one.

properties and the biological effect (Girlanda-Junges *et al.* 2000). Hence, we were able to identify an effect on neurite outgrowth on mice foetal neurones at 10^{-7} M (Gonzalez de Aguilar *et al.* 2001). One central issue in developing this synthetic neurotrophic compound towards a new therapeutic strategy is the proof that its biological activity is maintained in the presence of inhibitory molecules. Among these factors, members of the Semaphorin family, guidance molecules providing inhibitory signals preventing axon extension, are up-regulated in the newly formed glial scar (Fournier and Strittmatter 2001; Pasterkamp and Verhaagen 2001; De Winter *et al.* 2002). Myelin-associated proteins, including Nogo and MAG, are also responsible for the lack of nerve regeneration (Fournier and Strittmatter 2001). Hence, an essential prerequisite for axon re-growth is to overcome this inhibitory environment by stimulating axon extension despite negative forces. Here, we show that tCFA15, a cyclohexenoic long chain ω -alkanol, possesses a specific growth-promoting effect for cortical axons and that this growth-promoting effect counteracts the inhibitory properties of Semaphorin 3A (Sema3A) and myelin proteins. Therefore, it is the first demonstration that synthetic neurotrophic compounds could be used as potential chemicals to promote nerve outgrowth by counteracting the inhibitory capacity of some glial scar-associated growth inhibitory factors.

Materials and methods

Culture of CNS neurones

Foetal mouse cerebral hemispheres (15 days old) were dissected in cold Gey's balanced salt solution supplemented with glucose in order to isolate neocortex. Cells were dispersed by trypsin and mechanical dissociation. They were then plated at a density of 200 000 cells/well on glass cover-slips coated with 1 μ g/mL poly-L-lysine and incubated for 24 h at 37°C over 5% CO₂ in a serum-containing medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, glutamine 2 mM, 1 g/L glucose, 10% foetal calf serum, penicillin/streptomycin, all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

On day 2, the medium was replaced by a defined medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, 2 mM glutamine, 1 g/L glucose, 16 μ g/mL putrescine, 52 ng/mL selenium, holo-transferrin 10 μ g/mL, 5 μ g/mL insulin and 3 ng/mL progesterone, all from Sigma, St Louis, MO, USA) and the testing compounds added at different concentrations. Cells were again incubated for 24 h at 37°C over 5% CO₂.

Immunocytochemical staining and morphometric analysis

On day 3, cells were fixed with 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. After two washes with PBS, the permeation of cells was performed with 100% methanol for 5 min. After five washes with PBS, cells were stained with an anti-phospho-neurofilament antibody (Smi312, Sternberger Monoclonal, Lutherville, MD, USA) diluted 1/400 in PBS-bovine serum albumin (3%) for 2 h. Several washes with PBS were then followed by a secondary immunostaining with Alexa488-coupled antibody diluted 1/200 in

PBS for 45 min in the dark. After two final washes with PBS, plates were washed with water and mounted with aqua-polymount.

The actin cytoskeleton was visualized by a one-step fixation, permeabilization and staining process consisting of the addition of 4% formaldehyde with rhodamine phalloidin (10 units; R-415, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 20 min.

Randomly selected photographs were taken ($\times 20$ magnification) using an Axiovert 200 microscope (Zeiss France, Le Pecq, France) equipped with a digital camera (CoolSnap fx, Roper Scientific, Evry, France). For each neurone, both axonal and dendrite length were determined using a computer-assisted image analyser (UTHSCSA Image Tool 3.0). A minimum of 20 fields (containing 10–20 neurones) was analysed for each experimental condition.

Preparation of Semaphorin and myelin substrates

Human embryonic kidney 293 cells (ATCC CRL 1573) expressing Sema3A were used as a source of Sema3A [Flag-His-Sema3A (Adams *et al.* 1997), cell line 602.108]. Cells were cultured in MEM containing 5000 u/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, 200 mM L-glutamine, 10% foetal calf serum and 1 mg/mL G418 (Invitrogen). The Sema3A was purified from conditioned medium using an anti-flag M2 affinity gel (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) as previously described (Bagnard *et al.* 2001b). Purified Sema3A (100 ng/mL) was directly added to the culture medium in order to provoke growth cone collapse and axon retraction (Bagnard *et al.* 1998, 2001a,b). Myelin extracts were obtained from crude myelin isolated from a 5% adult brain homogenate in 0.32 M sucrose by density-gradient centrifugation on a step of 0.82 M sucrose. Myelin was water-shocked and centrifuged twice at low speed, lyophilized and stored at -20°C for further use (Norton and Poduslo 1973). Myelin extract solution was prepared by re-hydrating in PBS. The solution was homogenized, sonicated and protein content determined by the Bradford method. The stock solution consisted of 7.6 mg/mL total proteins obtained from 20 mg lyophilized myelin in 1 mL PBS.

Signalling pathway inhibitors

Tyrosine kinase, cyclin-dependent protein kinase, serine/threonine kinase, ERK1/2 and p38 MAPK, oxidoreductase, adenylate and guanylate cyclase were blocked, respectively, by two general inhibitors of tyrosine kinase, genistein (4',5,7-trihydroxy isoflavone; 345838, Calbiochem, San Diego, CA, USA) and lavendustin A (428150, Calbiochem), olomoucine (2-[2-hydroxyethylamino]-6-benzylamino-9-methylpurine; 494620, Calbiochem), LiCl, 2'-amino-3'-methoxyflavone (513000, Calbiochem), 4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole (559388), epigallocatechin gallate (EGCG; E4143, Sigma), *cis-N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride (M-182, Sigma) and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (03636, Sigma). Inhibitors were used at concentrations of 1 μ M [olomoucine, lavendustine, EGCG and *cis-N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride], 10 μ M (genistein, 2'-amino-3'-methoxyflavone, 4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) or 1 mM (LiCl). These concentrations were those producing a maximal effect in our model. It is important to note that, due to cell toxicity, it was not possible to work with higher concentrations in the case of olomoucine, lavendustine, EGCG, *cis-N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride and LiCl.

Western blot analysis

Cortical neurones were grown in the presence of Sema3A, tCFA15 (10^{-7} M) or Sema3A + tCFA15 (10^{-7} M) or for 24 h. The culture medium was removed, the cells washed with PBS, collected using a cell scraper and centrifuged at room temperature for 5 min at 1000 g. The pellet was suspended in lysis buffer [150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate] and frozen for 5 min at -20°C before sonication for 30 s. The protein content was determined using the Bradford method, the samples electrophoresed on sodium dodecyl sulphate gels (4–16% gradient) and electro-transferred to a nitrocellulose membrane. After transfer, the membrane was washed for 5 min at room temperature in TBS-Tween and blocked for 1 h in Tris buffer containing 0.1% Tween 20 and 5% bovine serum albumin. The blots were incubated overnight at 4°C with gentle agitation with the primary antibody anti-phospho-Cdc2 (Tyr15, 1/1000; 9111, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA), rinsed and washed to be incubated for 2 h at room temperature with ImmunoPure Protein A/G peroxidase conjugated (32490, Pierce, Rockford, IL, USA). Bound antibodies were detected using an ECL western blotting kit (34076, Pierce). The relative optical density of the blots was determined using Image Tool (UTHSCSA Image Tool 3.0).

Test substances

The tCFA15 was synthesized in the Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles UMR7123 (CNRS-ULP, Strasbourg, France) as described previously (Girlanda-Junges *et al.* 2000). It was then dissolved in ethanol and diluted to a final concentration of 0.1% ethanol. Control cells were incubated under the same conditions.

Statistics

Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Student's *t*-test (KyPlot version 2.0 beta 13). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Each experimental condition was tested in at least three independent experiments and analysed by two different people in blind conditions.

The statistical analysis of rhodamine phalloidin staining was performed using a χ^2 test.

Results

tCFA15 stimulates cortical axon outgrowth

To determine the effect of tCFA15 on axonal growth, cortical neurones were incubated with increasing concentrations of tCFA15 ranging from 10^{-12} to 10^{-7} M. Axons were identified by immunostaining of the phosphorylated form of neurofilament (Figs 1a–c). In control conditions, axons extended over 70 μm after 2 days in culture. Strikingly, the addition of tCFA15 induced a significant 60–70% increase of axonal growth that reached 125–130 μm (Figs 1d and e; $P < 0.05$, student's *t*-test, $n = 133$). As described in Fig. 2(a), this growth-promoting effect was dose dependent with a maximal effect obtained with 0.1 μM tCFA15. In this model, it is

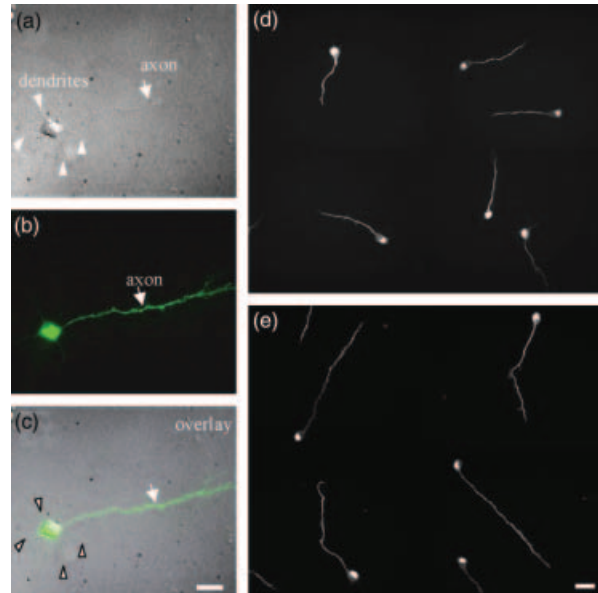


Fig. 1 Model of cortical neurones. Immunostaining of phosphorylated neurofilament allowed the identification of axon (green staining) versus dendrite (no staining). Neurones were grown on a neutral poly-L-lysine substrate and observed using (a) interferential contrast objective or (b) fluorescence before (c) overlay of both images. Scale bar, 20 μm . Representative growth of cortical axon outgrowth (d) in the control condition or (e) in the presence of 0.1 μM tCFA15. Axons are visualized after an immunostaining of phospho-neurofilament. Scale bar, 20 μm .

possible to identify dendrites as the non-neurofilament positive processes (Figs 1a–c). Thus, we found that the neurotrophic effect of tCFA15 was axon specific because the mean dendritic length was similar to control (Fig. 2b). In fact, we observed a significant reduction of the number of dendritic processes extending from the cell body (-40% , $p < 0.05$, Student's *t*-test, Fig. 2c). Hence, tCFA15 acts on the polarity of cortical neurones by favouring axon extension instead of dendrite formation (Figs 1 and 2).

tCFA15 is a general activator of growth-promoting pathways

To elucidate the molecular mechanism of tCFA15 we repeated the experiments in the presence of various selective inhibitors of growth-associated intracellular pathways. As described in Fig. 3, the growth-promoting effect of tCFA15 was significantly reduced by the general inhibitors of tyrosine kinases (lavendustine, -25% and genistein, -40%), ERK1/2 (Alessi *et al.* 1995) and the p38 MAPK (Engelman *et al.* 1998) inhibitors (2'-amino-3'-methoxyflavone, -28% and 4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole, -40%) and the inhibitors of adenylate and guanylate cyclases [*cis*-*N*-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride, -25% and

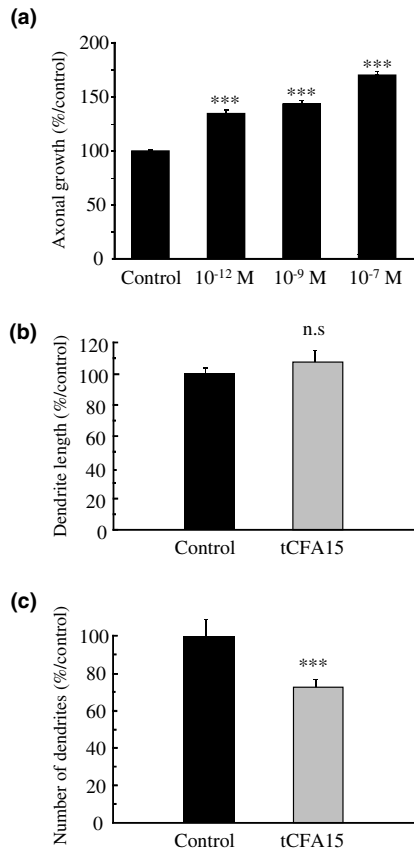


Fig. 2 Promoting effect of tCFA15 on axonal growth. (a) Addition of tCFA15 produced a dose-dependent increase of axonal length. Data are presented as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ versus control. (b and c) Lack of growth-promoting effect of tCFA15 (10^{-7} M) on dendrites. (b) The determination of mean individual dendrite length revealed no effect of tCFA15 whereas (c) tCFA15 (10^{-7} M) induced a significant reduction of the number of dendrites per neurones.

1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, -23%). The strongest inhibition was observed in the presence of the oxidoreductase blocker EGCG (-42%) and the serine/threonine kinase blocker LiCl (-43%). No significant reduction of the growth-promoting effect of tCFA15 was detected in the presence of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine. Thus, tCFA15 requires multiple intracellular pathways to trigger its growth-promoting effect. To address the functional consequence of such a general activation of growth-promoting pathways, we performed rhodamine phalloidin staining to analyse the modulation of the actin cytoskeleton as an index of axon extension. In the control conditions, we found that axons and their growth cones exhibited moderate actin-rich surface protrusions (filopodia) in 40% of the neurones (Figs 4a and c). On the other hand, the addition of tCFA15 significantly increased, in a dose-dependent manner, the formation of filopodia which were more numerous and present in more than 70–85% of the neurones (Figs 4b and c).

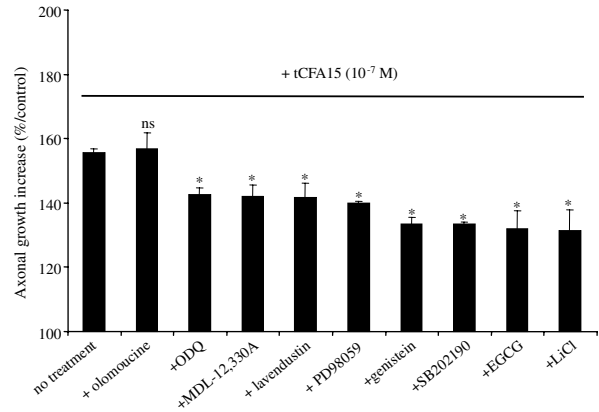


Fig. 3 Determination of the pharmacological properties of tCFA15. Cortical neurones were grown in the presence of tCFA15 (10^{-7} M) and various pharmacological inhibitors including two general inhibitors of tyrosine kinase (genistein, $10 \mu\text{M}$ AND lavendustin, $1 \mu\text{M}$), one cyclin-dependent protein kinase inhibitor (olomoucine, $1 \mu\text{M}$), a serine/threonine kinase inhibitor (LiCl, 1 mM), two MAPK inhibitors [4-[4-fluorophenyl]-2-[4-hydroxyphenyl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole (SB202190), $10 \mu\text{M}$ and 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059), $10 \mu\text{M}$], inhibitors of adenylate cyclase [*cis*-N-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride (MDL-12,330), $1 \mu\text{M}$] or guanylate cyclase [1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), $1 \mu\text{M}$] and an oxidoreductase inhibitor [epigallocatechin gallate (EGCG), $1 \mu\text{M}$]. Data are presented as a percentage of growth increase \pm SEM compared with the control situation (tCFA15 without inhibitors). * $p < 0.01$ versus no treatment. ns, not significant, Student's *t*-test.

tCFA15 prevents the inhibitory effect of Semaphorin 3A

One of the principal obstacles to nerve regeneration is the accumulation of numerous inhibitory molecules within the lesion site. In an attempt to study the effect of tCFA15 in the presence of inhibitory factors up-regulated after an injury in the CNS, cortical neurones were incubated with Sema3A and tCFA15. As described in Fig. 5(a), addition of 100 ng/mL Sema3A induced a 40% reduction of axonal growth relative to control. Strikingly, addition of 10^{-7} M tCFA15 in the presence of Sema3A was able to restore an axonal growth comparable to that of the control. Thus, the neurotrophic activity of tCFA15 is able to counteract the inhibitory property of Sema3A (Fig. 5a).

tCFA15 prevents inhibitory effect of myelin extracts

In order to further investigate the capacity of tCFA15 to restore a functional growth in the presence of inhibitory factors, we decided to repeat the experiments with other inhibitory factors, such as myelin proteins. To this end, a myelin extract was used as a substrate for elongating cortical axons. Under these conditions, we observed a dose-dependent decrease of axon length as a function of myelin extract concentrations (Fig. 5b). The maximal concentration of $10 \mu\text{g/mL}$ myelin extract used in these experiments induced a 35% decrease of axon extension. Similar to what we found

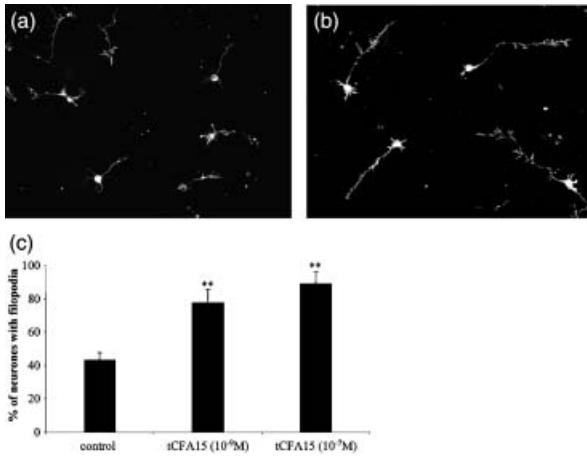


Fig. 4 tCFA15 induces filopodia formation. To visualize the actin cytoskeleton modulations in response to tCFA15, we performed a rhodamine phalloidin staining. Cortical neurones exhibit few filopodia (a) in control conditions whereas (b) addition of tCFA15 (10^{-7} M) induced numerous filopodia. (c) Quantitative analysis of the number of neurones with filopodia. ** $p < 0.01$ χ^2 analysis.

in the presence of Sema3A, addition of 10^{-7} M tCFA15 counteracted the inhibitory effect of myelin proteins. In all cases, axon growth was significantly higher compared with control conditions without tCFA15 (+32.2% on 1 μ g/mL myelin extract, +14.72% on 10 μ g/mL myelin extract, $p < 0.05$ Student's *t*-test). To further demonstrate the growth-promoting effect of tCFA15 in the presence of myelin, we determined the number of neurones exhibiting axons. This was necessary because the measurement of axonal length underestimated the growth inhibitory effect of myelin extracts as many neurones exhibited no axon outgrowth when exposed to myelin proteins. The results presented in Fig. 6 show that only 43% (± 4.2 ; $n = 783$) of the neurones were growing on myelin extracts. On the other hand, addition of tCFA15 (10^{-7} M) restored axon outgrowth in 69% (± 4.16 ; $n = 566$) of the neurones, similar to the control condition (67% ± 2.55 ; $n = 330$). Thus, tCFA15 appears to be a strong neurotrophic compound capable of exerting its function despite multiple inhibitory factors.

tCFA15 does not antagonize the transduction pathways of inhibitory molecules

The capacity of tCFA15 to promote axon outgrowth in the presence of inhibitory factors could be due to its capacity to antagonize the growth inhibitory pathways or to maintain activation of growth-promoting pathways. To address this possibility, we monitored the phosphorylation level of phospho-Cdk5, which has been shown to be increased during the inhibitory signalling triggered by Sema3A (Sasaki *et al.* 2002). The western blot analysis revealed that the phosphorylation level of Cdk5 was significantly higher when cortical neurones were grown in the presence of Sema3A or

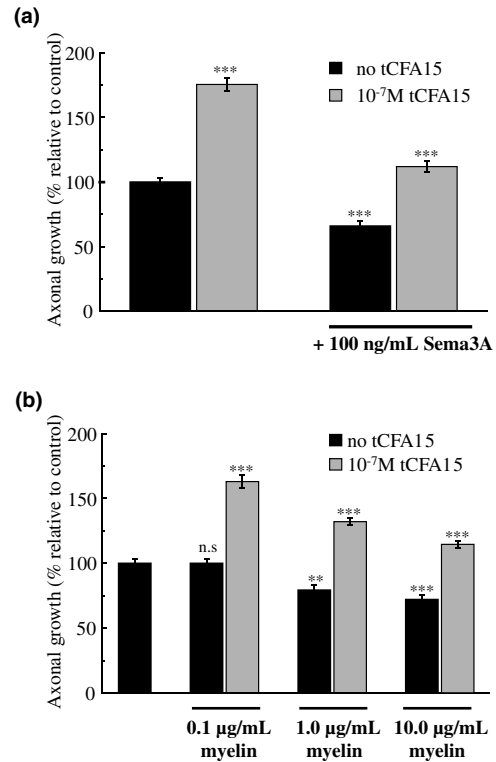


Fig. 5 Growth-promoting effect of tCFA15 on axonal growth in the presence of various inhibitory factors. tCFA15 is able to promote axon outgrowth despite the presence of (a) Semaphorin 3A (Sema3A) or (b) myelin proteins. Data are presented as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control. n.s., not significant.

Sema3A and tCFA15 compared with the control situation (+186.5 \pm 34.8 and +159.7 \pm 10.1%, respectively, $p < 0.01$, Student's *t*-test). No significant increase of phospho-Cdk5 was monitored in the presence of tCFA15 alone. Thus, tCFA15 was not able to antagonize the transduction pathway triggered by Sema3A.

Discussion

The success of CNS regeneration is largely dependent on the growth capacity of axons. Both the lack of growth-promoting factors and the expression of growth inhibitory factors repress nerve regeneration. Innovative therapeutic strategies must, therefore, take into account this crucial problem in order to be effective. We designed a new neurotrophic compound composed of a ω -alkanol chain combined with a retinol-like cycle (tCFA15). Previous studies have demonstrated the trophic activity of tCFA15 for CNS neurones (Gonzalez de Aguilar *et al.* 2001). In the present study we show that this growth-promoting effect is specific for axons and is able to counteract some of the major inhibitory molecules shown to be over-expressed in a lesion site.

Interestingly, tCFA15 had no growth-promoting effect on dendrites, which were as long as in the control conditions.

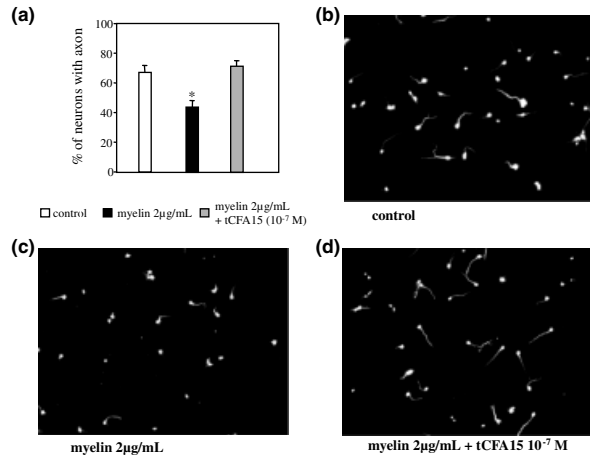


Fig. 6 (a) Quantification of the number of neurones exhibiting axons under various experimental conditions. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, Student's *t*-test. Representative micrographs showing cortical neurones in (b) control condition, (c) 2 μ g/mL myelin-containing substrates and (d) myelin + tCFA15 (10^{-7} M).

Rather, the analysis of the mean number of dendrites revealed a significant reduction of the number of dendritic processes suggesting, therefore, that tCFA15 might interfere with cortical neurone polarity by favouring axon outgrowth. The acquisition of neuronal polarity is an important stage of cell differentiation determining the function of the different neuritic processes (Andersen and Bi 2000). Our results suggest that tCFA15 might exert its function by modulating the actin dynamic according to subcellular specificity. In terms of nerve regeneration, this property might be important because the observed switch from extension of axons to extension of dendrites during normal development might contribute to regeneration failure (Condic 2002).

The current view is that many of the factors expressed in the glial scar, being formed in nerve lesions, are key regulators of CNS development. Moreover, adult and foetal neurones respond to Semaphorins in a similar way (Tanelian *et al.* 1997). Several studies now indicate that the variations of Sema3A expression in lesion sites might be correlated to the lack of nerve regeneration (De Winter *et al.* 2002). Considering that Sema3A is mainly a growth inhibitor for distinct neuronal populations during brain development, the presence of Sema3A in fibroblast-like meningeal cells in the neural scar might impede axons from going across the lesion site (Nicolou *et al.* 2003). Thus, the inactivation of the growth inhibitory property of Sema3A might represent an interesting strategy to promote nerve regeneration in the CNS. In our model, cortical neurones are very sensitive to Sema3A, which induced a strong reduction of axon extension at a low concentration (100 ng/mL) similar to our previous results which demonstrated the chemorepulsive role of Sema3A for cortical neurones (Bagnard *et al.* 1998, 2000). The presence of tCFA15 (10^{-7} M) was sufficient to counteract the Sema3A-

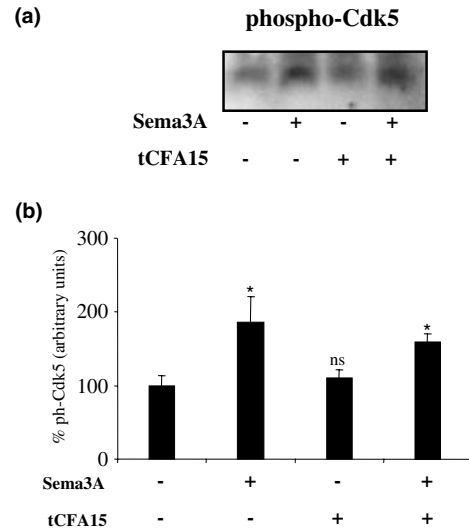


Fig. 7 Growth-promoting effect of tCFA15 in the presence of Semaphorin 3A (Sema3A) is not due to an antagonism of Sema3A signalling. (a) Western blot analysis of the level of phospho-Cdk5 as a reflection of the Sema3A signalling cascade. (b) Quantitative analysis of western blots. Results were obtained for three independent experiments. * $p < 0.01$. ns, not significant, Student's *t*-test.

dependent growth inhibition. Other inhibitory factors, such as chondroitin sulphate proteoglycans, are also largely responsible for the lack of nerve regeneration. Hence, the combination of synthetic neurotrophic compounds and chondroitinase, that has been shown to promote spinal cord regeneration by degrading chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) (Bradbury *et al.* 2002; Zuo *et al.* 2002), might, for example, represent an interesting strategy to cure nerve lesions.

This is further supported by our results showing that tCFA15 is able to stimulate axon outgrowth even in the presence of multiple inhibitory factors, as demonstrated by experimental growth on myelin extract-containing substrates. Myelin-associated neurite growth inhibitors, including Nogo and MAG, are extremely important in the inhibition of nerve regeneration (Fournier and Strittmatter 2001). Many studies are investigating function blocking strategies to improve axonal growth and functional recovery following nerve lesion by providing antagonists to the receptors of inhibitory proteins or by modifying the signalling pathways triggered by these factors (Schwab 2002). Our results provide evidence for a potential application of tCFA15 as a general growth-promoting compound overcoming the signal transduction of such diverse inhibitory factors. The molecular mechanism of tCFA15 remains to be fully elucidated. Nevertheless, the block of various intracellular pathways involved in axon outgrowth and guidance, such as tyrosine kinases (Desai *et al.* 1997), MAPK (Vaudry *et al.* 2002; Campbell and Holt 2003), cyclic nucleotides (Song and Poo 1999; Nishiyama *et al.* 2003) or serine/threonine kinase (Jones *et al.* 2003; Eickholt 2002), significantly reduced the tCFA15 growth-

promoting effect. Interestingly, the addition of EGCG, an inhibitor of flavoprotein monooxygenases (Terman *et al.* 2002), also reduced the growth-promoting effect, suggesting that tCFA15 possesses an antioxidant activity favouring axon extension. One general problem with the use of pharmacological inhibitors is their lack of real specificity (Davies *et al.* 2000). For instance, EGCG also inhibits protein kinases such as PRAK, DYRK and ROCK-II (Bain *et al.* 2003). Moreover, the addition of most of the agents used in the present study caused a marked reduction of axon outgrowth in the control condition without tCFA15. Therefore, it is not possible to establish a hierarchy of the signalling pathways recruited by tCFA15. Rather, the present results demonstrate that tCFA15 exerts its growth-promoting effect by activating various parallel pathways which compensate each other as it was not possible to completely suppress tCFA15-dependent growth promotion. Considering that these pathways participate directly or indirectly in the modulation of the actin dynamic, these results suggest that tCFA15 acts as a general activator of multiple intracellular pathways leading to actin remodelling. Indeed, our data provide evidence for a modulation of the actin cytoskeleton by tCFA15. Rhodamine phalloidin staining revealed a dose-dependent increase of filopodia formation in neurones treated with tCFA15. This strongly suggested a specific activation of Cdc42 which is known to be a key regulator of filopodia formation (Hall 1998). This is particularly interesting in the perspective of nerve regeneration because recent studies have demonstrated that the activation of RhoA, inhibiting neurite outgrowth, might represent the point of convergence of the signalling pathways triggered by the inhibitory factors MAG and Nogo (Fournier *et al.* 2003; McGee and Strittmatter 2003). Considering the fact that Cdc42 and RhoA have opposing effects on the remodelling of the actin cytoskeleton, a putative promotion of Cdc42 activation by tCFA15 might represent an interesting feature favouring nerve regeneration. To investigate how tCFA15 exerts its growth-promoting effects in the presence of inhibitory factors, such as those encountered in a CNS lesion site, we monitored the phosphorylation levels of Cdk5, a cyclin-dependent kinase which has been shown to mediate Sema3A-induced growth cone collapse (Sasaki *et al.* 2002). We found that tCFA15 was not able to reduce the phosphorylation level of Cdk-5 reached in the presence of Sema3A. Hence, the growth-promoting effect observed in the presence of Sema3A seems to be essentially due to the general activation of numerous growth-promoting pathways but not to the block of the Sema3A inhibitory signalling. Moreover, it has been shown that prior exposure to neurotrophins blocks the inhibition of axonal growth of dorsal root ganglions (DRG) neurones by MAG and myelin substrates (Cai *et al.* 1999). This effect of neurotrophins was mediated by an increase of intracellular cAMP concentration (Cai *et al.* 2001). Such results are in favour of the use of neurotrophins as potential therapeutic targets to promote

nerve regeneration. In our model, prior exposure to tCFA15 was not necessary to observe the growth-promoting effect in the presence of the inhibitory factors tested. Thus, tCFA15 could be applied at any stage of the lesion and may represent an ideal therapeutic agent challenging the general problem of low bio-availability and poor stability of neurotrophins and other proteic substances. Finally, recent papers presenting the regeneration phenotypes of three different Nogo knockout mice pointed out the necessity of developing drugs with general effects rather than being specific for a single inhibitory molecule (Kim *et al.* 2003; Simonen *et al.* 2003; Zheng *et al.* 2003). In fact, many questions remain to be answered about the molecular mechanism of inhibitory molecules like Nogo before using specific blockers of such factors in patients (Woolf 2003). In contrast, tCFA15 is designed in such a way as to circumvent bio-availability problems, activated numerous growth-promoting pathways and is able to counteract multiple growth inhibitory factors. So far, our *in vitro* studies, together with results showing a beneficial effect of tCFA15 on peripheral neuropathy *in vivo* (Watanabe and Miyagawa 2002), provide consistent data that tCFA15 might represent an outstanding compound with strong clinical potential when the aspects of drug administration, compound stability, passage through the blood-brain barrier and lack of toxicity are clarified. Future studies will investigate the function of tCFA15 *in vivo* in a model of a nerve lesion to further validate the present *in vitro* data.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the FRM (no. INE20011109006) and BQR-ULP (no. BE/CH/2001-225 V) to DB and from Meiji Dairies Corporation (Japan) to MH and BL. We thank A.W. Püschel for providing the Sema3A-expressing cell line and J. Bolz for helpful comments on the manuscript.

References

- Adams R. H., Lohrum M., Klostermann A., Betz H. and Püschel A. W. (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J.* **16**, 6077–6086.
- Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T. and Saltiel A. R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489–27494.
- Andersen S. S. and Bi G. Q. (2000) Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* **22**, 172–179.
- Bagnard D., Lohrum M., Uziel D., Püschel A. W. and Bolz J. (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* **125**, 5043–5053.
- Bagnard D., Thomasset N., Lohrum M., Püschel A. W. and Bolz J. (2000) Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J. Neurosci.* **20**, 1030–1035.

- Bagnard D., Chounlamountri N., Puschel A. W. and Bolz J. (2001a) Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb. Cortex* **11**, 278–285.
- Bagnard D., Vaillant C., Khuth S. T., Dufay N., Lohrum M., Puschel A. W., Belin M. F., Bolz J. and Thomasset N. (2001b) Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci.* **21**, 3332–3341.
- Bain J., McLauchlan H., Elliott M. and Cohen P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **371**, 199–204.
- Bradbury E. J., Moon L. D., Popat R. J., King V. R., Bennett G. S., Patel P. N., Fawcett J. W. and McMahon S. B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**, 636–640.
- Cai D., Shen Y., De Bellard M., Tang S. and Filbin M. T. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* **22**, 89–101.
- Cai D., Qiu J., Cao Z., McAtee M., Bregman B. S. and Filbin M. T. (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* **21**, 4731–4739.
- Campbell D. S. and Holt C. E. (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* **37**, 939–952.
- Condic M. L. (2002) Neural development: axon regeneration derailed by dendrites. *Curr. Biol.* **12**, R455–R457.
- Davies S. P., Reddy H., Caivano M. and Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95–105.
- Desai C. J., Sun Q. and Zinn K. (1997) Tyrosine phosphorylation and axon guidance: of mice and flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 70–74.
- De Winter F., Holtmaat A. J. and Verhaagen J. (2002) Neuropilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **515**, 115–139.
- Eickholt B. J., Walsh F. S. and Doherty P. (2002) An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signalling. *J. Cell Biol.* **157**, 211–217.
- Engelman J. A., Lisanti M. P. and Scherer P. E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 32c111–32120.
- Fouad K., Dietz V. and Schwab M. E. (2001) Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **36**, 204–212.
- Fournier A. E. and Strittmatter S. M. (2001) Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 89–94.
- Fournier A. E., Takizawa B. T. and Strittmatter S. M. (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J. Neurosci.* **23**, 1416–1423.
- Gimenez y Ribotta M., Gaviria M., Menet V. and Privat A. (2002) Strategies for regeneration and repair in spinal cord traumatic injury. *Prog. Brain Res.* **137**, 191–212.
- Girlanda-Junges C., Lutz-Bucher B., Gonzalez de Aguilar J. L., Loeffler J. P. and Luu B. (2000) 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2537–2539.
- Gonzalez de Aguilar J. L., Girlanda-Junges C., Coowar D., Dupontail G., Loeffler J. P. and Luu B. (2001) Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res.* **920**, 65–73.
- Gurgo R. D., Bedi K. S. and Nurcombe V. (2002) Current concepts in central nervous system regeneration. *J. Clin. Neurosci.* **9**, 613–617.
- Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514.
- Jones D. M., Tucker B. A., Rahimtula M. and Mearow K. M. (2003) The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. *J. Neurochem.* **86**, 1116–1128.
- Kim J. E., Li S., GrandPre T., Qiu D. and Strittmatter S. M. (2003) Axon regeneration in young adult mice lacking nogo-a/b. *Neuron* **38**, 187–199.
- Liu Y., Kim D., Himes B. T., Chow S. Y., Schallert T., Murray M., Tessler A. and Fischer I. (1999) Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J. Neurosci.* **19**, 4370–4387.
- McGee A. W. and Strittmatter S. M. (2003) The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci.* **26**, 193–198.
- Niclou S. P., Franssen E. H., Ehlert E. M., Taniguchi M. and Verhaagen J. (2003) Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth. *Mol. Cell Neurosci.* **24**, 902–912.
- Nishiyama M., Hoshino A., Tsai L., Henley J. R., Goshima Y., Tessier-Lavigne M., Poo M. M. and Hong K. (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* **424**, 990–995.
- Norton W. T. and Poduslo S. E. (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* **21**, 749–757.
- Pasterkamp R. J. and Verhaagen J. (2001) Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**, 36–54.
- Ramer M. S., Priestley J. V. and McMahon S. B. (2000) Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* **403**, 312–316.
- Sasaki Y., Cheng C., Uchida Y. *et al.* (2002) Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* **35**, 907–920.
- Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde Y. A. and Schwab M. E. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* **367**, 170–173.
- Schwab M. E. (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science* **295**, 1029–1031.
- Simonen M., Pedersen V., Weinmann O., Schnell L., Buss A., Ledermann B., Christ F., Sansig G., van der Putten H. and Schwab M. E. (2003) Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor nogo-a improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* **38**, 201–211.
- Song H. J. and Poo M. M. (1999) Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 355–363.
- Tanelian D. L., Barry M. A., Johnston S. A., Le T. and Smith G. M. (1997) Semaphorin III can repulse and inhibit adult sensory afferents in vivo. *Nat. Med.* **3**, 1398–1401.
- Terman J. R., Mao T., Pasterkamp R. J., Yu H. H. and Kolodkin A. L. (2002) MICALS, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**, 887–900.
- Tuszynski M. H., Murai K., Blesch A., Grill R. and Miller I. (1997) Functional characterization of NGF-secreting cell grafts to the acutely injured spinal cord. *Cell Transplant* **6**, 361–368.
- Vaudry D., Stork P. J., Lazarovici P. and Eiden L. E. (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* **296**, 1648–1649.
- Watanabe T. and Miyagawa I. (2002) Effects of long-chain fatty alcohol on peripheral nerve conduction and bladder function in diabetic rats. *Life Sci.* **70**, 2215–2224.

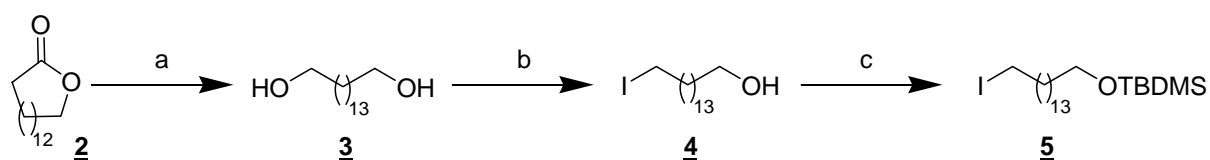
- Woolf C. J. (2003) No nogo. Now where to go? *Neuron* **38**, 153–156.
- Xie Y. and Longo F. M. (2000) Neurotrophin small-molecule mimetics. *Prog. Brain Res.* **128**, 333–347.
- Zheng B., Ho C., Li S., Keirstead H., Steward O. and Tessier-Lavigne M. (2003) Lack of enhanced spinal regeneration in nogo-deficient mice. *Neuron* **38**, 213–224.
- Zuo J., Neubauer D., Graham J., Krekoski C. A., Ferguson T. A. and Muir D. (2002) Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp. Neurol.* **176**, 221–228.

III. SYNTHÈSE CHIMIQUE DU tCFA15

La première synthèse du tCFA15 a été décrite par Girlanda-Jungès et coll.¹ en 2000. En 2004, une amélioration de la synthèse de ce même composé a été mise en avant par Luu et coll.². Cette synthèse est décrite ci-dessous.

A. Synthèse de la chaîne latérale ω -alcanol

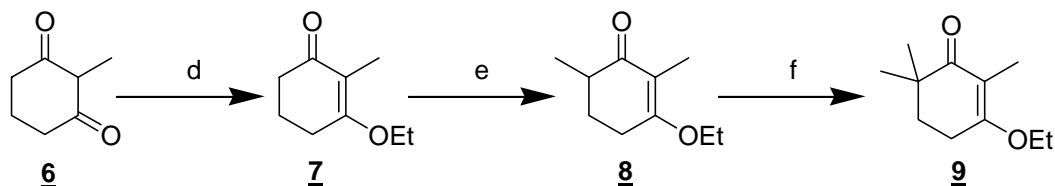
La chaîne ω -alcanol utilisée pour synthétiser le tCFA15 est issue d'une réduction du pentadécanolide **2** par l'hydrure mixte de lithium et d'aluminium, suivi d'une monoiodation du pentadécan-1, 15-diol **3** en milieu hétérogène HI et cyclohexane. La fonction hydroxyle du 15-iodopentadécan-1-ol **4** est ensuite protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle pour donner le composé **5**.



a) LiAlH₄, THF, 0°C à t.a. **75%** b) HI 57%, Cyclohexane, Reflux, 6h, **60%** c) i) TBDMS-Cl, Imid., CH₂Cl₂, t.a., 3h, **98%**.

B. Synthèse du cycle cyclohexénique triméthylé

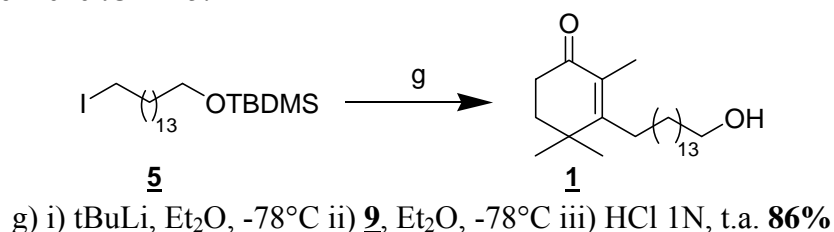
Le cycle cyclohexénique constituant le tCFA15 est issu de la 2-méthylcyclohexan-1,3-dione **6** qui, suite à une protection de l'un des deux groupements cétones sous forme d'éther d'énol pour donner le 3-éthoxy-2-méthylcyclohexèn-2-énone **7**. Ce dernier subit ensuite deux méthylation consécutives en position 6 pour donner le 3-éthoxy-2,6-diméthylcyclohexèn-2-énone **8** puis le 3-éthoxy-2,6,6-triméthylcyclohexèn-2-énone **9**. La double méthylation *in situ*, quant à elle, ne donne pas de rendements convenables.



d) *p*TsOH, EtOH, Toluène, Reflux, **89%** e) i)LDA ii)MeI, THF, -78°C à t.a., **86%** f) i)LDA ii)MeI, THF, -78°C à t.a., **92%**.

C. Couplage et obtention du tCFA15

Les composés **5** et **9** ainsi obtenus sont couplés selon la réaction suivante. Un échange halogène-métal est effectué sur le composé **5** avec du tert-butyllithium. Ce nucléophile s'additionne sur la cétone du composé **9** qui, suite à une déprotection de l'éther d'énol en milieu acide donne le tCFA15.



Cette voie de synthèse permet d'obtenir le produit final avec un rendement global de 38%.

IV. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU tCFA15

L'activité antioxydante du tCFA15 a été étudiée à l'aide de deux tests différents, le test au DPPH et le test à l'ABTS.

A. Test au DPPH³

1. Principe du test

Le DPPH, ou 2,2-di(4-tert-octylphényl)-1-picrylhydrazyle, est un radical stabilisé qui absorbe à 550 nm lorsqu'il est solubilisé dans de l'éthanol pur (figure 40). Lorsqu'il est mis en présence d'un composé antioxydant, il est réduit et de ce fait n'absorbe plus à 550 nm. Cette diminution de l'absorbance à 550 nm est directement proportionnelle à la quantité de radical DPPH non réduit restant dans le milieu et donc traduit une activité de piègeur de radicaux pour le composé testé.

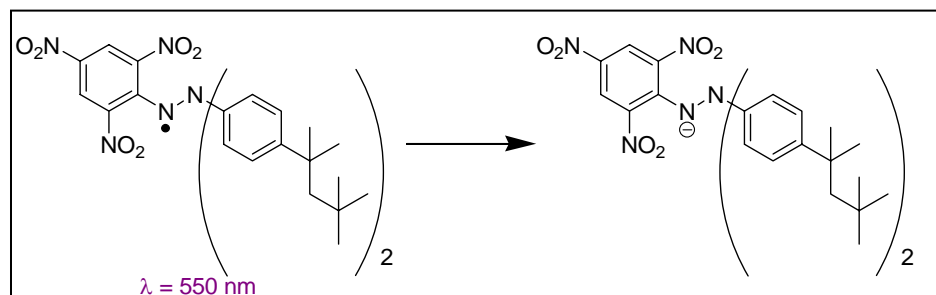


Fig. 40 :
Neutralisation
du radical
DPPH

2. Résultat concernant le tCFA15

Le test au DPPH a été effectué avec deux antioxydants connus : le Trolox® (un dérivé soluble de la vitamine E) et l'acide ascorbique (vitamine C), ainsi que sur le tCFA15. Les résultats, exprimés en concentration nécessaire à réduire 50% du radical DPPH (IC_{50}), sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Produit testé	IC_{50} (mM)
Vitamine C	0,048
Trolox®	0,275
tCFA15	> 10

La valeur de l' IC_{50} du tCFA15 indique que ce dernier n'est pas capable de réduire le radical DPPH.

B. Test à l'ABTS⁴

1. Principe du test

L'ABTS, ou acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (fig. 41), est un composé qui en présence de radicaux hydroxyles peut donner un radical cation $ATBS^{\cdot+}$ qui absorbe à 405 nm (Equation 1).

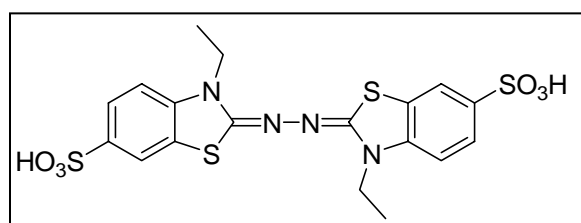


Fig. 41 : Formule semi-développée de l'ABTS

Durant l'expérience, les radicaux hydroxyles sont générés par la réaction de Fenton (Equation 2).



Ces radicaux hydroxyles ainsi générés peuvent générer le radical cation $ATBS^{\cdot+}$. Si dans le milieu on rajoute un composé qui est capable de réduire les radicaux hydroxyles en ions hydroxyles, il se met en place une compétition entre le composé antioxydant et l'ABTS pour

les radicaux hydroxyles. Cette compétition se traduit par une diminution de l'absorbance à 405 nm qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du composé testé.

2. Résultat concernant le tCFA15

Le test à l'ABTS a été effectué avec la même référence que pour le test au DPPH, à savoir le Trolox®, ainsi que sur le tCFA15. Les résultats, exprimés en IC₅₀, sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Produit testé	IC ₅₀ (mM)
Trolox®	0,6
tCFA15	> 10

La valeur de l'IC₅₀ du tCFA15 indique que ce dernier n'est pas capable de réduire les radicaux hydroxyles.

C. Incorporation du tCFA15 dans des vésicules multilamellaires de DPPC

D'après les résultats présentés ci-dessus, le tCFA15 n'a pas d'activité antioxydante apparente. Cependant, d'après des études effectuées sur les quinones, Tomasetti et coll.⁵ avancent que la forme quinone (oxydée) pourrait avoir un léger effet antioxydant en tant que stabilisateur de la bicouche phospholipidique. En effet, comme le cholestérol, la forme quinonique aurait un rôle de stabilisateur membranaire qui empêcherait l'attaque de la membrane par les radicaux libres. Des travaux non publiés, effectué par le Dr. Guy Duportail, montrent que le tCFA15 a un comportement voisin de celui du cholestérol, à savoir qu'il déstabilise une bicouche lipidique à l'état gel, avec diminution de la température de transition de phase, et stabilise l'état cristal liquide en diminuant (légèrement) sa fluidité.

1. Principe du test⁶

Des vésicules multilamellaires de **DiPalmitoylePhosphatidylCholine** (DPPC) sont obtenues soit pures, soit en y incorporant du tCFA15 à 5% et 10%. Ces vésicules sont en outre marquées par ajout d'une sonde fluorescente lipophile, le 1,6-diphényl-1,3,5-héxatriène (DPH). Cette sonde est communément utilisée pour mesurer la "microviscosité" membranaire (ou inversement sa fluidité) par mesure de son anisotropie de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence est une technique qui permet de mesurer la diffusion de rotation d'une molécule fluorescente, pendant un temps donné τ correspondant au temps de vie de la

molécule fluorescente, ceci dans un milieu donné. Tout paramètre, comme par exemple la fluidité du milieu, qui influe sur le mouvement de rotation de la sonde peut donc être indirectement mesuré par cette technique.

L'anisotropie de fluorescence peut se définir à partir de deux vecteurs (moments dipolaires) caractéristiques de la molécule fluorescente considérée :

- le vecteur moment dipolaire d'absorption : μ_A
- le vecteur moment dipolaire d'émission : μ_E

L'anisotropie de fluorescence, notée « r », peut se définir à partir de l'angle α formé entre les deux vecteurs μ_A (au temps $t = 0$ auquel se produit la transition d'absorption) et μ_E (au moment où sont émis les photons de fluorescence, $t = \tau$) selon la relation

$$r = (3 \cos^2\alpha - 1)/2$$

Cet angle α intègre l'angle α_0 intrinsèque entre les deux moments de transition pour la molécule immobile, et un angle $\alpha(t)$ résultant de la diffusion brownienne de rotation. Dans un milieu rigide, dans lequel les molécules ne peuvent tourner, seul intervient l'angle α_0 . L'anisotropie r peut donc atteindre une valeur maximale (anisotropie fondamentale r_0) de 0,4 dans le cas particulier où les deux moments μ_A et μ_E sont colinéaires. Dans le cas du DPH, l'angle α_0 n'est pas totalement nul et la valeur de r_0 est de 0.362. A l'inverse, dans un milieu très fluide, le mouvement brownien de rotation de grande ampleur conduira à une valeur de r nulle. En conséquence, pour le DPH, l'échelle d'anisotropie allant de 0 (milieu très fluide) à 0.362 (milieu rigide, de viscosité "infinie") sera également une échelle de fluidité. Ainsi, une vésicule phospholipique à l'état gel donnera une anisotropie supérieure à 0.3, alors qu'à l'état cristal liquide elle ne sera plus que de 0.1, ces deux valeurs variant avec la température qui influe elle-même sur le mouvement brownien, et donc sur la fluidité.

2. Résultats sur le tCFA15

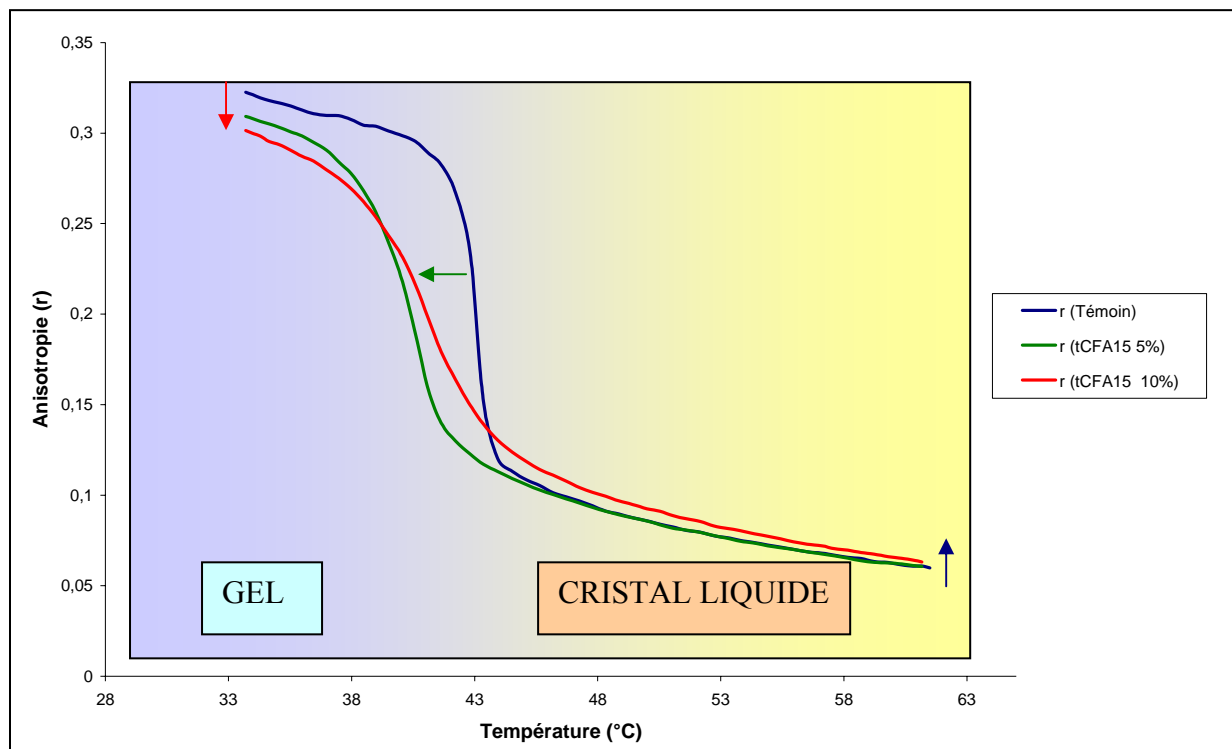
La mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH marquant des vésicules de DPPC ayant incorporé du tCFA15 traduit l'effet de cette incorporation sur la stabilité et la fluidité de la bicouche elle-même, dans ses différentes phases. Les résultats sont présentés ci-dessous dans le graphe 42.

L'incorporation de tCFA15 dans la bicouche induit :

- une diminution relativement importante de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans la phase gel de la bicouche, aux températures inférieures à la température de transition de phase T_m . (→) entre phase gel et phase cristal liquide.
- Une diminution également importante de cette température de transition de phase (←)

Ces deux observations montrent clairement que le tCFA15, molécule lipophile, est effectivement incorporé dans la bicouche de DPPC puisque sa seule présence perturbe fortement cette bicouche.

- Une augmentation relativement faible, mais reproductible de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans la phase cristal liquide de la bicouche, aux températures supérieures à T_m . (→). C'est ce résultat que nous mettrons en exergue, car une membrane **biologique** ne peut se concevoir que dans la phase cristal liquide, et en aucun cas dans une phase gel



Graphe 42 : Variation de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans des vésicules suite à l'incorporation du tCFA15 à 5% ou 10%.

On peut supposer que l'effet antioxydant du tCFA15 soit relié indirectement à cette diminution de la fluidité d'une bicouche phospholipidique en phase cristal liquide, qui rendrait plus difficile l'attaque des radicaux et leur pénétration dans la cellule. Cette hypothèse est cependant à relativiser vu le fort ratio d'incorporation du tCFA15 dans cette série d'expériences par rapport à celui existant vraisemblablement *in vivo*.

V. PROPRIETES BIOLOGIQUES DU tCFA15

A. Le tCFA15 peut stimuler la croissance axonale sur milieu inhibiteur

L'étude effectuée sur des neurones corticaux d'embryons de souris au stade E15 (15^e jour de gestation) indique que :

- le tCFA15 est capable de promouvoir la croissance axonale en doublant la longueur de l'axone à une concentration de 10^{-7} M.
- l'effet promoteur du tCFA15 est spécifique à l'axone. Les prolongements dendritiques ne sont pas concernés.
- l'effet inhibiteur de la Sema3A est antagonisé par le tCFA15 à 10^{-7} M.
- l'effet inhibiteur des protéines de la myéline (Nogo A, MAG, OMgp) est aussi antagonisé par le tCFA15 à 10^{-7} M.

Suite à ces résultats intéressants, il devient essentiel d'élucider le mode d'action du tCFA15 sur la croissance axonale des neurones.

B. Cascade intracellulaire cible du tCFA15

1. Inhibitions de multiples voies internes

Pour étudier le mode d'action du tCFA15, nous avons inhibé de nombreuses voies de signalisations intracellulaires de manière à voir que l'inactivation d'une de ces voies est capable d'abolir l'effet du tCFA15. Nous avons procédé à l'inhibition des :

- tyrosine kinases
- MAP kinases
- des voies de nucléotides cycliques
- Ser/Thr kinases

L'inhibition de ces voies de signalisation produit un même effet antagonistique sur l'action du tCFA15. Ce résultat nous a suggéré que le composé agit de manière non-spécifique sur de nombreuses cibles intracellulaires.

2. Effet sur la phosphorylation de Cdk-5

La phosphorylation de la Cdk-5 (Cyclin-dépendant kinase 5) est liée au collapsus du cône de croissance engendré par la Sema3A. Nous avons étudié l'effet du tCFA15 sur la phosphorylation de Cdk-5.

Cette étude nous a montré que le tCFA15 n'agit pas sur cette phosphorylation, ce qui suggère que le tCFA15 n'agit pas en aval du récepteur de la Sema3A. Il exerce son effet biologique probablement en activant des voies parallèles qui pourraient induire la croissance nerveuse.

3. Inhibition des monooxygénases à flavoprotéines.

L'utilisation d'un inhibiteur des flavoprotéines monooxygénase diminue l'effet promoteur du tCFA15 sur la croissance axonale. Ceci montre que le léger effet antioxydant du tCFA15 pourrait être à l'origine de son effet biologique.

Cet effet antioxydant étant de nature indirect, un effet direct du pouvoir antioxydant pourrait être bénéfique pour l'activité biologique du tCFA15.

VI. CONCLUSION

L'effet biologique du tCFA15 sur la régénérescence axonale pourrait avoir des retombées biomédicales importantes. Cependant, l'absence d'une réelle activité antioxydante serait ressentie au sein de la cicatrice gliale ou une forte génération de radicaux libres est observée. Nous nous sommes donc proposés de synthétiser des produits qui auraient des activités biologiques identiques à celles du tCFA15 tout en possédant une activité antioxydante accrue. Nous avons choisi comme cible le noyau antioxydant quinonique de part sa structure proche de celle du tCFA15.

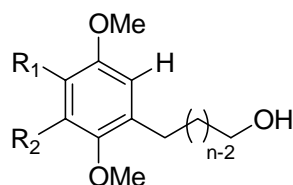
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Girlanda-Junges, C.; Lutz-Bucher, B.; Gonzalez de Aguilar, J. L.; Loeffler, J. P.; Luu, B. 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2537-2539.
- (2) Luu, B.; Neuberg, P.; Trancard, D.; Yamada, M.; Oshiba, Y. et al. Process for producing cyclohexenone long chain fatty alcohols, 2004, WO2004087630.
- (3) Tziveleka, L. A.; Kourounakis, A. P.; Kourounakis, P. N.; Roussis, V.; Vagias, C. Antioxidant potential of natural and synthesised polyprenylated hydroquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 935-939.
- (4) Poeggeler, B.; Thuermann, S.; Dose, A.; Schoenke, M.; Burkhardt, S. et al. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* **2002**, *33*, 20-30.
- (5) Tomasetti, M.; Littarru, G. P.; Stocker, R.; Allewa, R. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Biol Med* **1999**, *27*, 1027-1032.
- (6) Houbre, D.; Schindler, P.; Trifilieff, E.; Luu, B.; Duportail, G. Selectivity of lipid-protein interaction with myelin proteolipids PLP and DM-20. A fluorescence anisotropy study. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1029*, 136-142.

Chapitre II :
Synthèse des
alcools gras
quinoliques

I. INTRODUCTION

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse de dérivés quinoliques substitués en position 2 par des chaînes ω -alcanols contenant 12 à 18 atomes de carbone. Les noyaux quinoliques utilisés sont différemment substitués par des groupements méthoxy en position 5 et 6.

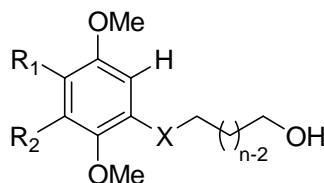


$R_1, R_2 = \text{H ou OMe}$

$n = 12, 14, 15, 16, 18$

Alcools Gras Quinoliques (QFA)

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse d'analogues des QFA substitués en position 2 par une chaîne ω -alcanol portée par un hétéroatome tel que l'oxygène ou l'azote. Dans ce cas-ci, les noyaux quinoliques ne sont pas substitués par des groupements méthoxy en position 5 et 6.



$R_1, R_2 = \text{H}$

$n = 10, 12, 14, 16$

QFA O-alkylés (X=O)

QFA N-alkylés (X=N)

Nous discuterons dans ce chapitre de la voie de synthèse utilisée pour obtenir ces différents composés par une chimie simple et facilement reproductible.

Diverses méthodes sont décrites dans la littérature pour greffer des substituants en position 2 d'un noyau quinol et ce en utilisant des propriétés différentes du noyau quinol lui-même. La substitution par des chaînes alkyles ou alcényles est courante tandis que la substitution de l'extrémité de la chaîne par un groupement hydroxyle est beaucoup plus rare.

Parmi les méthodologies les plus rencontrées, nous trouvons :

- l'utilisation du noyau quinolique en tant que nucléophile, de manière à faire réagir un électrophile pour former une liaison carbone-carbone,

- l'utilisation du noyau quinolique en tant qu'électrophile suite à une halogénéation,
- l'activation du noyau quinolique par diverses méthodes de manière à effectuer des couplages exocycliques,
- l'utilisation de la chimie des métaux de transition tels que le palladium et le fer.

II. SYNTHÈSE DES QFA C-ALKYLES

A. Rappels bibliographiques

1. Le noyau quinolique nucléophile

L'utilisation du noyau quinolique comme nucléophile est effectuée selon des conditions réactionnelles diverses. Le couplage d'un groupement alkyle électrophile peut se faire soit en conditions acides, soit en conditions basiques en passant par un organolithien.

a. Couplage en milieu acide

L'acylation du 1,4-diméthoxybenzène avec un acide carboxylique approprié (ou avec le chlorure d'acide correspondant) est effectuée selon les conditions de Friedel-Craft¹ (schéma 1). L'utilisation du chlorure d'acide va de pair avec l'obtention de quantités non-négligeables de 4-méthoxyphénol, ce qui suggère une déméthylation sélective sur la position en α du site d'attaque. Pour éviter ceci, l'adjonction dans le milieu d'acide polyphosphorique permet d'obtenir le produit de couplage avec des rendements modestes de 40%.

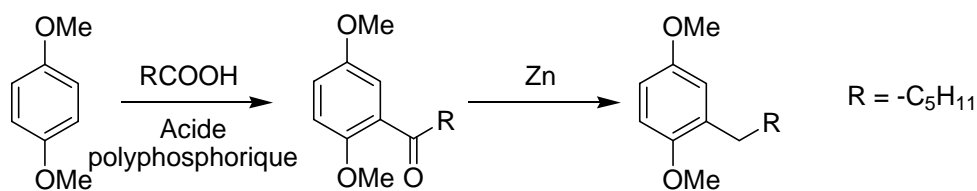


Schéma 1 : Acylation de Friedel-Craft en milieu acide

La cétone ainsi obtenue est réduite par une réaction de Clemmensen² avec du zinc en milieu acide.

b. Couplage en milieu basique

Les couplages effectués sur le noyau quinol en milieu basique passent par la formation d'un organolithien aromatique. Deux exemples décrits dans la littérature donnent des rendements satisfaisants.

Le couplage effectué par Groweiss et coll.³ part du 1,4-diméthoxybenzène qui est lithié avec du n-BuLi (schéma 2). L'ajout dans le milieu du 1-bromohexadécane permet d'obtenir le produit de couplage avec un rendement de 80%. Le produit obtenu est alors traité avec du BBr₃ pour cliver les éthers méthyliques générant ainsi le noyau quinol.

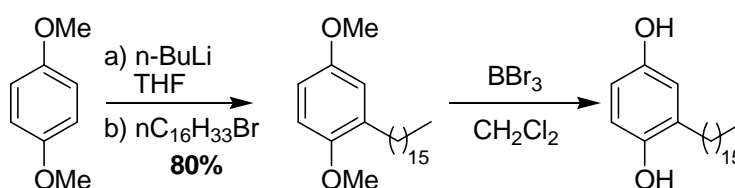


Schéma 2 : Utilisation d'organolithien

Les travaux de Poigny et coll.⁴ consistent en des couplages similaires entre le 1,2,4,5-tétraméthoxybenzène et des alkylbromures de tailles variables (schéma 3). L'utilisation de HMPA ainsi que des alkylodures ne permettent pas d'améliorer les rendements réactionnels qui avoisinent les 70%.

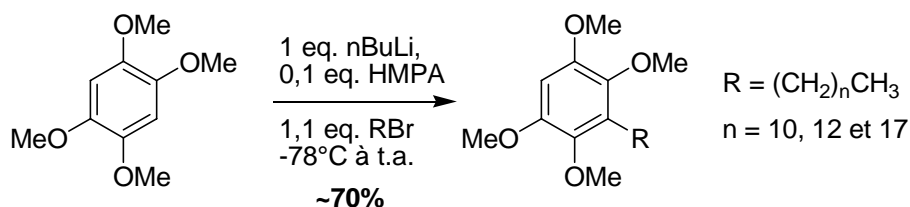


Schéma 3 : Utilisation d'organolithien

c. Autres méthodes

Une méthode intéressante pour l'obtention de quinones substituées consiste en une étape de cycloaddition de Diels Alder d'une quinone oxydée substituée à souhait, avec le cyclopentadiène⁵ (schéma 4).

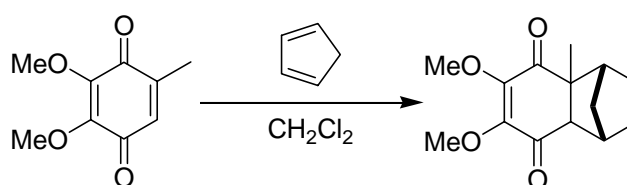


Schéma 4 : Cycloaddition entre une quinone oxydée et le cyclopentadiène

L'intermédiaire obtenu est déprotonné par le tert-butylate de potassium. L'anion ainsi formé réagit avec un alkyl iodure substitué en bout de chaîne pour des modifications ultérieures (schéma 5). En fin de synthèse, la quinone de départ est régénérée par une retro-Diels Alder⁶.

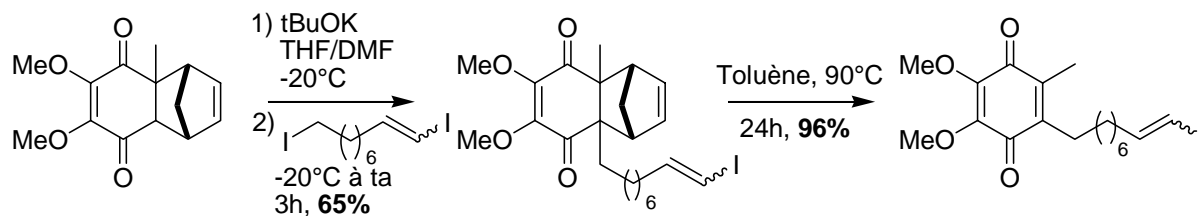


Schéma 5 : Couplage de chaînes alkyles sur une quinone oxydée

2. Le noyau quinol électrophile

L'utilisation du noyau quinol en tant qu'électrophile est moins largement décrite dans la littérature. Les travaux de Biehl et coll.⁷ décrivent le couplage de nitriles sur le 2-bromo-1,4-diméthoxybenzène en milieu basique pour obtenir des 2-(α -cyanoalkyl)-1,4-diméthoxybenzènes (schéma 6). Les rendements des réactions sont compris entre 53% et 86%.

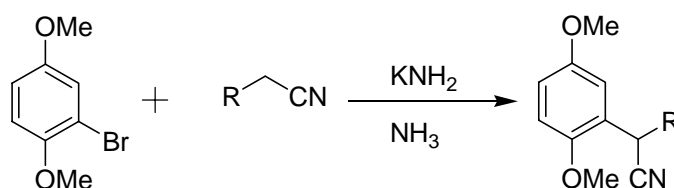


Schéma 6 : Couplage de nitriles sur le 2-bromo-1,4-diméthoxybenzène

Lors de cette réaction, l'absence de polarisation de l'intermédiaire benzyne est due à l'annulation des effets inductifs des deux groupements méthoxy (schéma 7). L'absence de sélectivité de l'attaque nucléophile est à l'origine des bons rendements obtenus puisqu'un seul produit de couplage est obtenu.

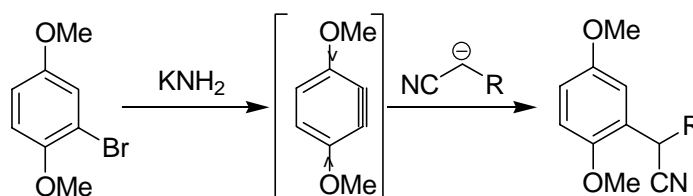


Schéma 7 : Passage par un intermédiaire benzyne

3. Couplage exocyclique sur le noyau quinol

Parmi les couplages carbone-carbone effectués sur les noyaux quinol (ou catéchol), l'utilisation de benzaldéhydes substitués est très représentée. Ceux-ci sont donc utilisés pour des réactions de condensation ainsi que dans des réactions de Wittig ou de Wadsworth-Emmons.

a. Réactions de condensation

Singh et coll.⁸ décrivent la synthèse de dérivés 2-alkyl-1,4,5-trihydroxybenzènes à partir du 2,4,5-triméthoxybenzaldéhyde et d'alkylmagnésiens (schéma 8).

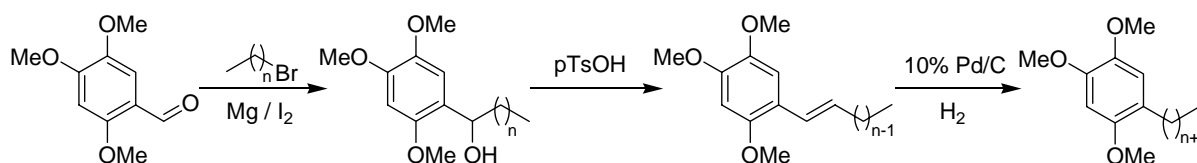


Schéma 8 : Synthèse de dérivés 2-alkyl-1,4,5-triméthoxybenzènes

Cette synthèse consiste en l'addition des alkylmagnésiens sur le 2,4,5-triméthoxybenzaldéhyde pour donner des dérivés benzylalcools. Une déshydratation via l'ajout d'acide para-toluène sulfonique donne des oléfines qui par la suite sont hydrogénées en présence de palladium sur charbon pour donner les composés escomptés. Les rendements globaux de cette synthèse sont modestes, de l'ordre de 20% à 40%.

De manière très inattendue, l'équipe de Groweiss³ a réussi à coupler un alkylmagnésien sur le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde en obtenant une cétone au lieu d'un alcool secondaire (schéma 9).

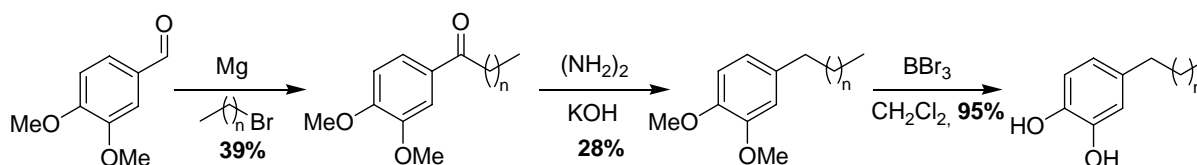


Schéma 9 : Couplage d'un magnésien sur le 3,4-diméthoxybenzaldéhyde

Ce produit intermédiaire a été analysé par RMN et par spectrométrie de masse ce qui a permis la caractérisation de produits résultants du réarrangement de McLafferty⁹ (schéma 10), caractéristique d'une cétone portant un hydrogène en position γ .

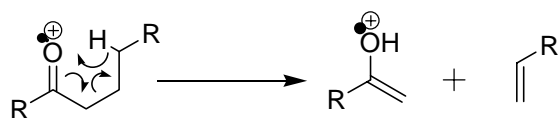


Schéma 10 : Réarrangement de McLafferty

La cétone ainsi obtenue est réduite par une réaction de Wolf-Kishner¹⁰ puis les fonctions hydroxyles sont déméthylées avec du BBr₃ dans le dichlorométhane.

b. Réactions de Wittig / Wadworth-Emmons

L'équipe de Arndt et coll.¹¹ a procédé à un couplage de Wittig sur le 2,3,4,5-tétraméthoxytoluène substitué en position 6 par une courte chaîne portant une fonction aldéhyde (schéma 11).

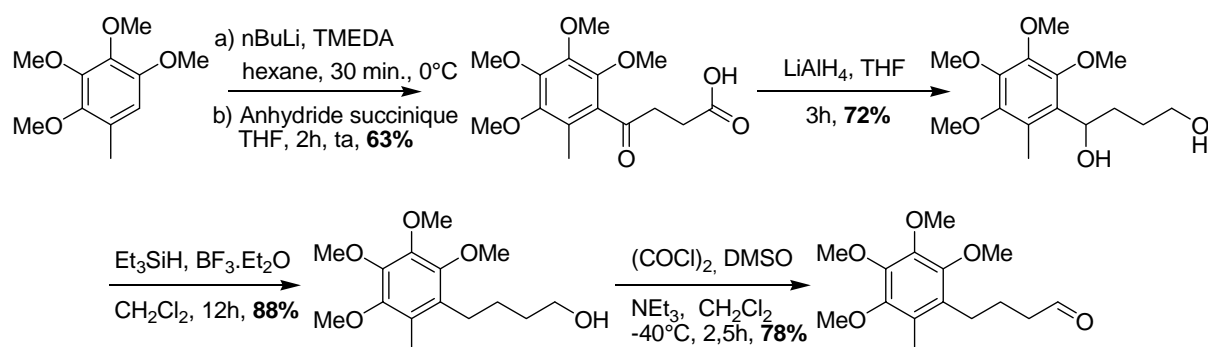


Schéma 11 : Substitution du 2,3,4,5-tétraméthoxytoluène par une courte chaîne aldéhydrique

Cette stratégie consiste en la réaction de l'aromatique *ortho*-lithié sur l'anhydride succinique. La réduction des fonctions cétone et acide carboxylique est suivie d'une désoxygénation de l'alcool benzylique avec Et₃SiH, BF₃·Et₂O. Une oxydation de Swern permet finalement d'obtenir la fonction aldéhyde en bout de chaîne.

Suivant une méthode similaire, Snyder¹² a synthétisé des oxoménaquinones en passant par un couplage de Wadsworth-Emmons comme décrit sur le schéma 12.

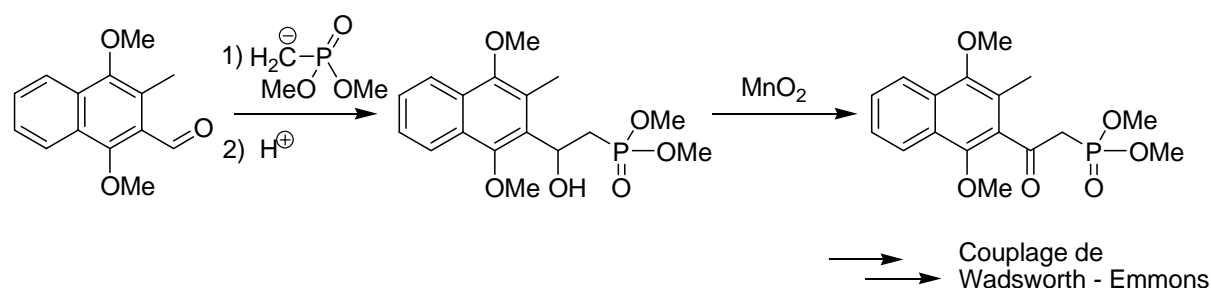


Schéma 12 : Synthèse d'oxoménaquinones par couplage de Wadsworth-Emmons

L'acide méthylphosphonique diméthylester réagit sur le 2-méthyl-3-formyl-1,4-diméthoxynaphtalène pour obtenir le phosphonate désiré. L'alcool benzylique est oxydé en cétone par du dioxyde de manganèse. Le phosphonate ainsi obtenu est utilisé pour des couplages de Wadsworth-Emmons.

c. Couplage catalysé au Ni⁰

Lipshutz et coll.¹³ ont effectué le couplage entre le 1-chlorométhyl-2,3,4,5-tétraméthoxy-6-méthylbenzène et des vinylalanes variés en présence de quantités catalytiques de Ni⁰ (schéma 13).

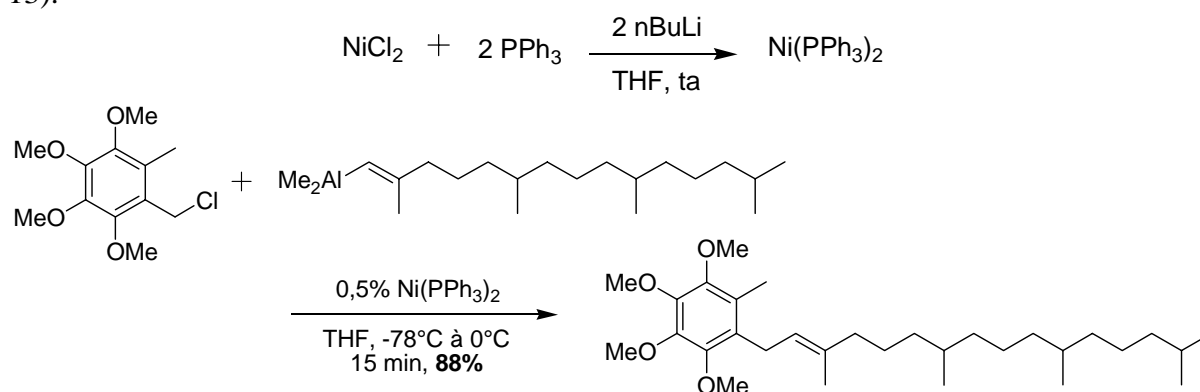


Schéma 13 : Formation du catalyseur au Ni⁰ et couplage

4. Couplage via la chimie du palladium et du fer

Le couplage de différents groupements alkyles sur des aromatiques méthoxylés ou polyméthoxylés via la chimie du palladium est exhaustivement traitée dans la littérature. Nous trouvons les couplages les plus classiques tels que le couplage de Suzuki, de Heck, de Negishi ou de Sonogashira donnant tous des rendements satisfaisants. L'équipe de Fürstner¹⁴ a également décrit un couplage entre un alkylmagnésien et un aryltriflate diméthoxylé en présence de Fe(II).

a. Chimie du fer

La réaction entre un aryltriflate et un alkylmagnésien en présence de quantités catalytiques de Fe(II) passe par un intermédiaire « Grignard inorganique » Fe(MgX)₂. Celui-ci s'insère ensuite entre le groupement aryle et le triflate par une addition oxydante. Suite à une transmétallation et une élimination réductrice le produit de couplage escompté est obtenu. (schéma 14).

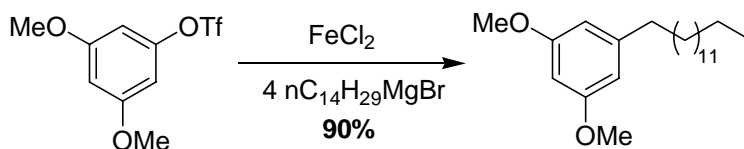


Schéma 14 : Couplage catalysé au Fe(II)

b. Chimie du palladium

i. Couplage de Heck

L'équipe de Yadav¹⁵ a décrit une synthèse de dérivés quinoliques substitués avec de courtes chaînes ω-alcanol. Un couplage de Heck est effectué entre le 1-bromo-3-méthoxy-2,5-bis(méthoxyméthoxy)benzène et le 9-décèn-1-ol en présence de Pd (II) avec des rendements de 65% (schéma 14).

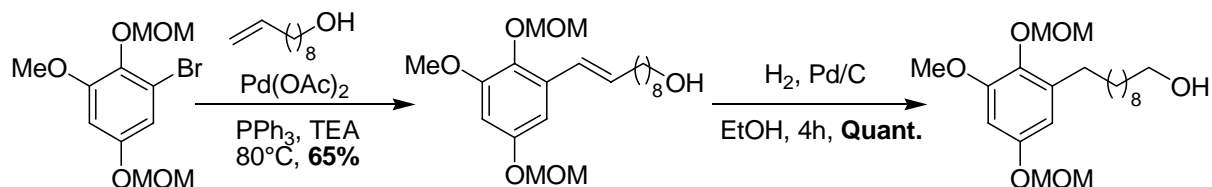


Schéma 14 : Couplage de Heck

Une hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon 10% donne le produit désiré.

ii. Couplage de Negishi

Andreas Palmgren et coll.¹⁶ ont décrit une méthode permettant d'obtenir des quinones 2,5-bisubstituées par des chaînes alkyles via un couplage de Negishi en présence de Pd(0) (schéma 15). Le 2,5-dibromo-1,4-diméthoxybenzène est couplé sur divers organozinciques. Les faibles rendements obtenus en présence d'alkylzinciques sont dus à un phénomène de β-élimination.

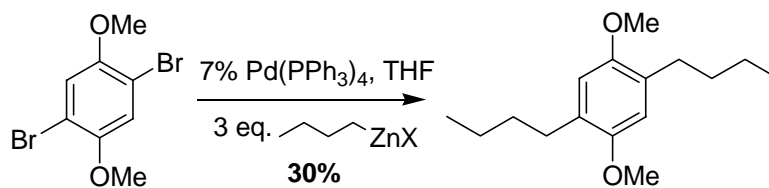


Schéma 15 : Couplage de Negishi

Ce même couplage sur des organozinciques aryliques ou benzyliques donnent des rendements nettement supérieurs, entre 60% et 80%.

iii. Couplage de Suzuki

Le couplage de Suzuki sur des acides aryl- ou alcényl-boroniques avec des alcényl- ou aryl-halogénures ou triflates est largement décrit dans la littérature. Cependant, ce même couplage effectué en présence de bromures ou de triflates portés par un carbone sp^3 est beaucoup plus rare. De récents travaux de Fu et coll.¹⁷ ont démontré l'efficacité du couplage de Suzuki entre des acides arylboroniques et des alkylbromures en présence de Pd(II) et de phosphine (schéma 16).

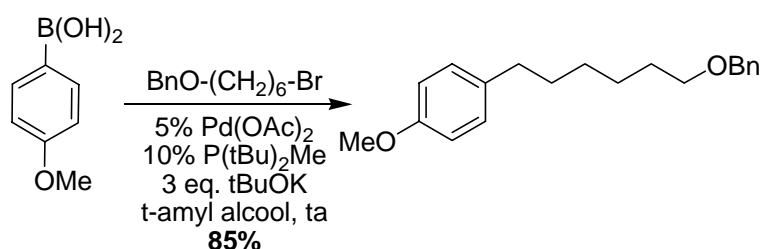


Schéma 16 : Couplage de Suzuki sur Csp^3 .

Les rendements de ces réactions souvent très élevés s'échelonnent entre 67% et 93%. La présence de la phosphine est capitale pour le bon déroulement de la réaction et la modification de cette dernière diminue sensiblement les rendements.

iv. Couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira est décrit comme l'un des plus efficaces concernant le couplage d'alcynes vrais sur des arylhalogénures méthoxylés ou polyméthoxylés.

L'équipe de Hadfield a effectué ce couplage lors de la synthèse de l'irisquinone¹⁸. Il se déroule entre le 1-iodo-3-méthoxy-2-méthoxyméthoxybenzène et le 9-décyn-1-ol en présence de quantités catalytiques de Pd(0) et de CuI dans la pipéridine (schéma 17).

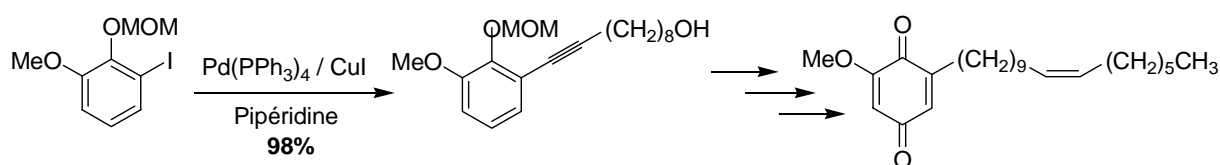


Schéma 17 : Couplage de Sonogashira pour la synthèse de l'irisquinone.

Finalement, Brimble et coll.¹⁹ ont décrit de multiples couplages de Sonogashira entre des arylbromures mono- ou bis-méthoxylés et le 4-pentyn-1-ol, avec du Pd(II) et du CuI dans la triéthylamine dont les rendements s'échelonnent entre 81% et 95% (schéma 18).

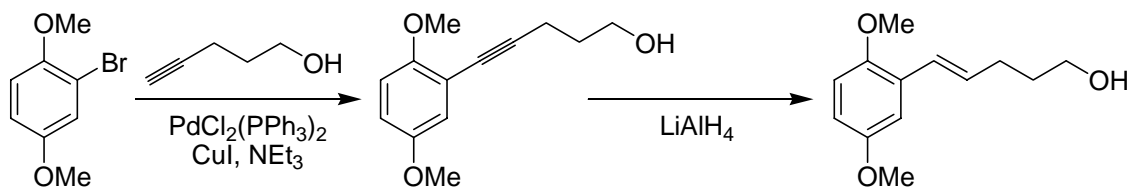


Schéma 18 : Couplage de Sonogashira

B. Synthèse choisie

Pour synthétiser les QFA, nous voulions une synthèse simple, reproductible et avec de bons rendements globaux. D'après l'étude de la littérature, quatre possibilités s'offraient à nous :

- le couplage direct en utilisant le noyau quinol comme nucléophile ou électrophile,
- le couplage de Negishi proposé par Palmgren et coll.¹⁶ sur un alcénylzincique,
- le couplage de Suzuki proposé par Fu et coll.¹⁷ avec un alkylbromure,
- le couplage de Sonogashira.

Ces différentes propositions ont été testées individuellement. Les réactions tests ont été effectuées avec des chaînes ω -alcanols protégées ou des chaînes alkyles dépourvues du groupement hydroxyle terminal.

1. Couplage direct

L'utilisation du noyau quinol en tant que nucléophile aussi bien qu'électrophile n'a pas donné de résultats satisfaisants (schéma 19).

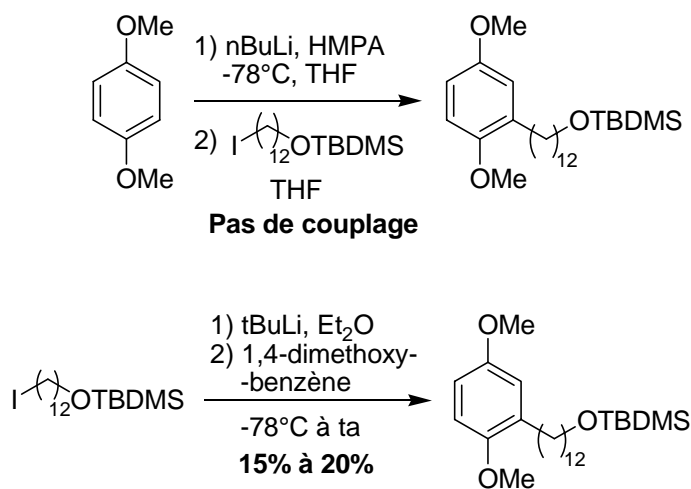


Schéma 19 : Couplage direct

2. Couplage de Negishi

Les résultats peu satisfaisants du couplage direct nous ont dirigés vers un couplage au palladium, de type Negishi qui, en présence d'alcénylzinciques, donne de très bons rendements. Ce couplage effectué sur le 1-iodohexadéc-1-ène avec le 1-bromo-2,5-diméthoxybenzène donne des rendements satisfaisants de 50% (schéma 20).

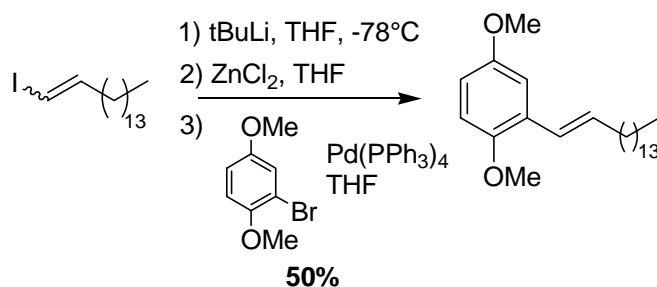


Schéma 20 : Couplage de Negishi

L'utilisation de chaînes ω-hydroxyprotégées n'a, quant à elle, pas donné les résultats espérés. La variation des groupements protecteurs de la fonction alcool mène toujours à l'absence de couplage (schéma 21).

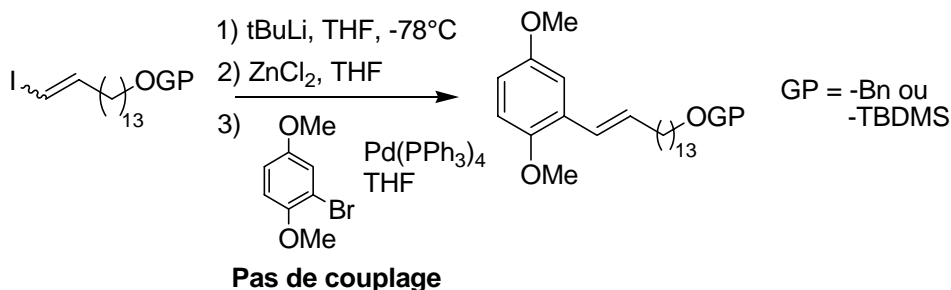


Schéma 21 : Absence de couplage avec des chaînes ω-hydroxyprotégées

3. Couplage de Suzuki

Nous avons ainsi voulu réaliser le couplage de Suzuki selon la méthode décrite par l'équipe de Gregory Fu. En effet, l'utilisation d'un alkybromure nous éviterait une étape d'hydrogénation après le couplage et ainsi seule une déprotection de la fonction alcool terminale serait à concevoir. Le schéma rétrosynthétique est représenté sur le schéma 22.

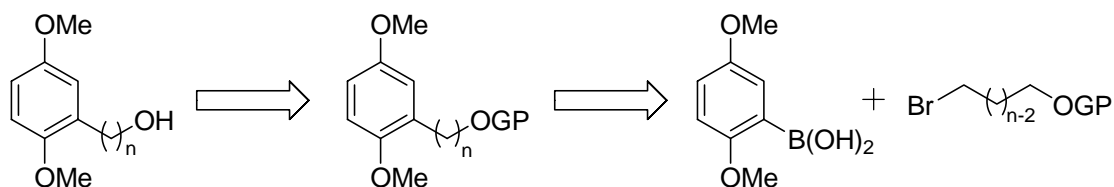


Schéma 22 : Rétrosynthèse du couplage de Suzuki

Les essais effectués entre le (12-bromo-dodécyloxy)-*tert*-butyl-diméthyl-silane et l'acide 2,5-diméthoxyphénylboronique ne donnent pas les résultats escomptés (voir tableau ci-dessous). En effet, tous les couplages effectués mènent à la formation du 2,5-diméthoxyphénol, la chaîne grasse restant intacte.

Réactifs	Catalyseur	Phosphine	Solvant	Rendement
Acide 2,5-diméthoxybenzylboronique (12-bromo-dodécyloxy)- <i>tert</i> -butyl-diméthyl-silane	Pd(OAc) ₂	PPh ₃	<i>t</i> -amylalcool	∅
	Pd(OAc) ₂	PPh ₃	Dioxane	∅
	Pd(PPh ₃) ₄	∅	<i>t</i> -amylalcool	∅
	Pd(PPh ₃) ₄	∅	Dioxane	∅
	Pd(OAc) ₂	Di- <i>tert</i> butylméthylphosphine	<i>t</i> -amylalcool	∅
	Pd(OAc) ₂	Di- <i>tert</i> butylméthylphosphine	Dioxane	∅

4. Couplage de Sonogashira

Enfin, nous avons voulu tester le couplage de Sonogashira qui, dans la littérature, donne de loin les meilleurs rendements. Nous avons testé dans un premier temps, les conditions classiques de Sonogashira, à savoir dans la triéthylamine, avec du CuI et du Pd(II) en quantités catalytiques (schéma 23).

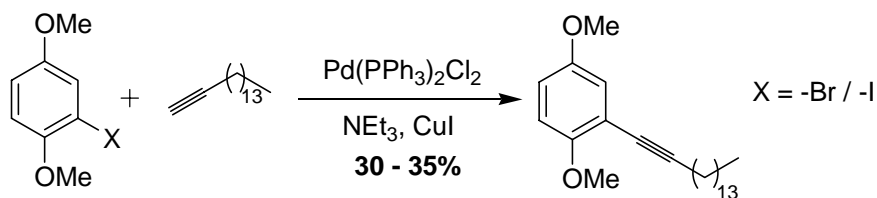


Schéma 23 : Couplage classique de Sonogashira

Les rendements étant modestes, nous avons testé le même couplage dans la pipéridine avec du Pd(0) et du CuI en quantités catalytiques (schéma 24).

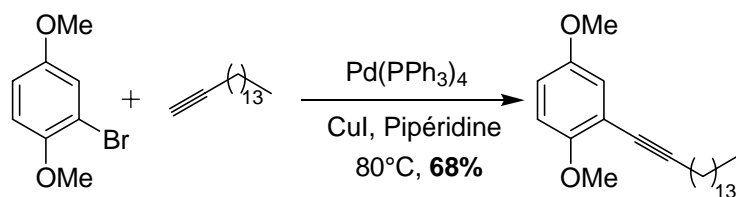


Schéma 24 : Couplage de Sonogashira dans la pipéridine

Alami et coll.²⁰ ont démontré que la présence de CuI n'est pas essentielle pour un couplage efficace entre l'arylbromure et l'alcyne vrai. Nous avons donc supprimé le CuI du milieu réactionnel. Cela s'est révélé être la méthode la plus fructueuse puisque nous avons obtenus des rendements de couplage supérieurs à 90% (schéma 25).

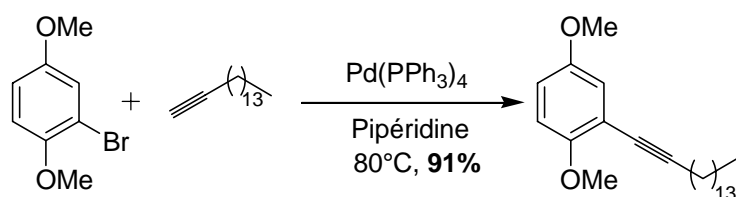


Schéma 25 : Couplage de Sonogashira en l'absence de CuI

Les différents résultats obtenus avec nos réactions tests nous ont menés à choisir le couplage de Sonogashira effectué dans la pipéridine avec du Pd(0) pour synthétiser nos QFA C-alkylés. Le schéma rétrosynthétique choisi est décrit dans le schéma 26.

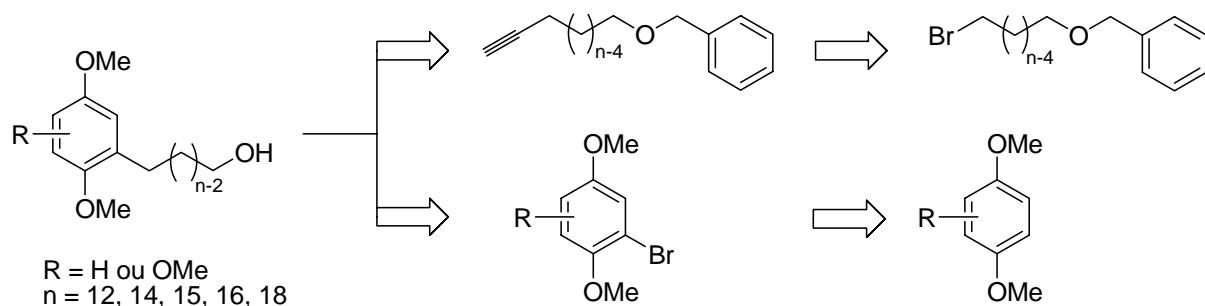


Schéma 26 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse des QFA C-alkylés

Nous allons dans un premier temps présenter la synthèse des arylbromures différemment substitués suivie de la synthèse des alcynes vrais ω-hydroxybenzylés. Nous nous intéresseront par la suite au couplage de Sonogashira suivi de l'hydrogénation qui nous permettra finalement d'obtenir les produits escomptés.

C. Synthèse des QFA

1. Synthèse des arylbromures

Pour synthétiser différentes familles de QFA C-alkylés, nous nous sommes proposés de faire varier le nombre de groupements méthoxy sur le noyau benzénique. De cette manière, nous pouvons aussi jouer sur la capacité de nos composés à neutraliser les radicaux libres.

Nous nous proposons donc de synthétiser :

- le 1-bromo-2,5-diméthoxybenzène **2**,
- le 1-bromo-2,4,5-triméthoxybenzène **4**,
- le 1-bromo-2,3,4,5-tétraméthoxybenzène **8**.

a. Synthèse des dérivés di- et tri-méthoxylés

Nous procédons à la bromation directe du 1,4-diméthoxybenzène **1** ou du 1,3,4-triméthoxybenzène **3** avec du *N*-bromosuccinimide²¹ dans le dichlorométhane²² (schéma 27).

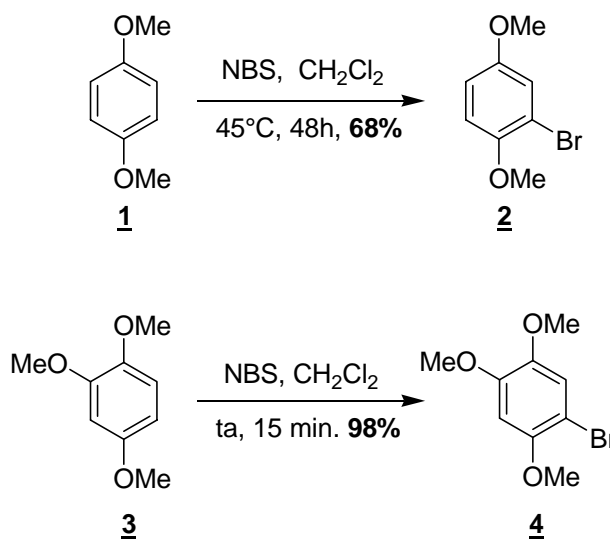


Schéma 27 : Bromation des cycles benzéniques avec NBS

L'obtention du composé **2** étant longue avec une purification fastidieuse, nous avons essayé d'améliorer la réaction de bromation en utilisant du dibrome dans le dichlorométhane comme décrit par Park²³ et Sutherland²⁴. La neutralisation du milieu réactionnel avec NaS_2O_3 évite ainsi une purification, à condition que la réaction soit totale.

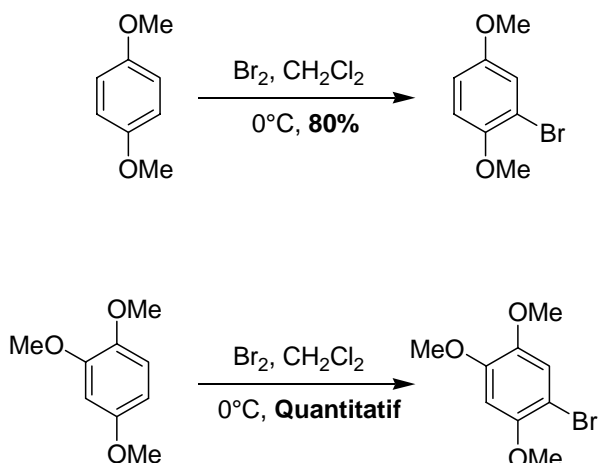


Schéma 28 : Bromation des cycles benzéniques avec Br₂.

L'application de cette méthode a donné des résultats très satisfaisants pour l'obtention du composé **4**. L'obtention du composé **2** s'est révélée un peu plus difficile avec des rendements avoisinant néanmoins 80% (schéma 28).

b. Synthèse des dérivés tétraméthoxylés

La synthèse du composé **8** a nécessité plusieurs étapes réactionnelles en partant du 2,3,4-triméthoxybenzaldéhyde **5**. Comme décrit par Tisdale et coll.²⁵, nous avons procédé à une oxydation de Baeyer-Villiger suivie d'une saponification de manière à obtenir le 2,3,4-triméthoxyphénol **6**. Ce dernier est alors méthylyé avec du diméthylsulfate²⁶, puis bromé avec du NBS²⁷ (schéma 29) pour former le dérivé d'arylbromure tétraméthoxylé **8**.

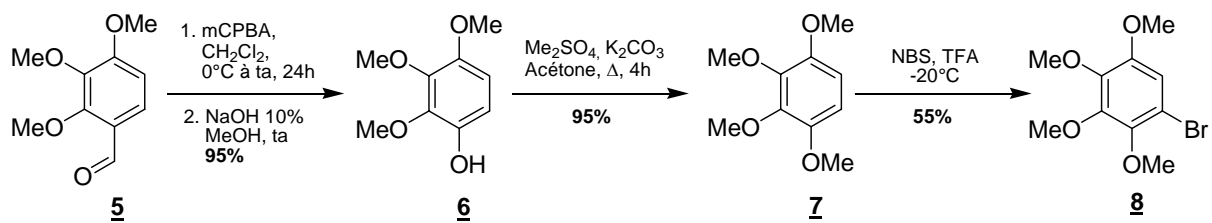


Schéma 29 : Synthèse du composé **8**

2. Synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxylysés

a. Synthèse des ω-bromoalcanols

Les 1,13-tridécane-1,13-diol **14**, 1,14-tétradécane-1,14-diol **15** et 1,16-hexadécane-1,16-diol **16** sont obtenus par réduction des diacides **9**, **10** et **11** avec de l'hydruire mixte de lithium et d'aluminium. Les 1,10-décane-1,10-diol **12** et 1,12-dodécane-1,12-diol **13** sont commerciaux. Les diols sont ensuite monobromés en présence d'acide bromhydrique dans le cyclohexane^{28,29} (schéma 30).

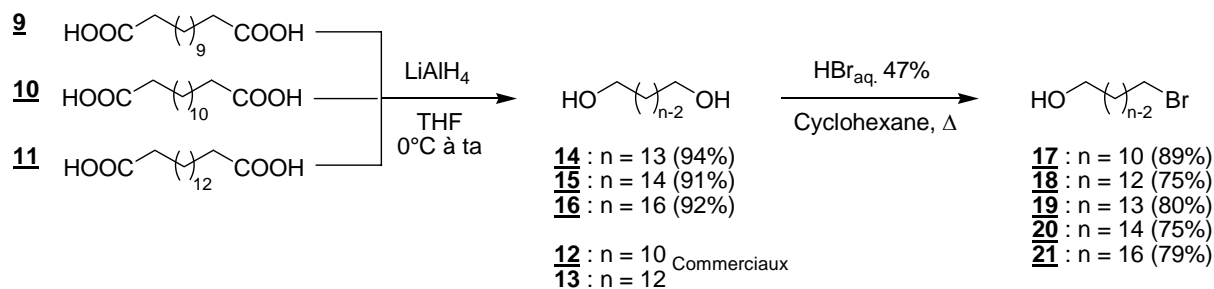


Schéma 30 : Synthèse des ω-bromoalcanols

b. Synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxylés

Les ω-bromoalcanols ainsi obtenus sont par la suite benzylés après déprotonation par de l'hydrure de sodium. L'alcoolate ainsi formé est mis en présence de bromure de benzyle, dans le THF à reflux³⁰. Les bromoalcanols ω-benzyloxylés sont par la suite transformés en alcynes vrais en présence d'une suspension d'acétylure de lithium dans le DMSO³¹ (schéma 31).

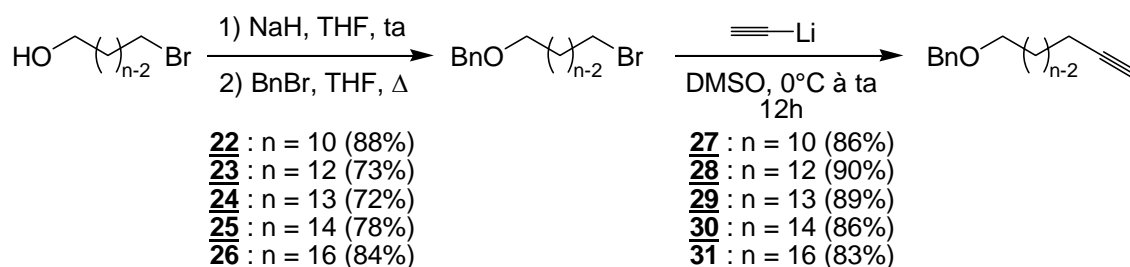


Schéma 31 : Synthèse des alcynes vrais ω-hydroxybenzylés.

3. Couplage et hydrogénation

Les alcynes vrais ω-benzyloxylés sont couplés sur les aryles bromures **2**, **4** et **8** par un couplage de Sonogashira dans la pipéridine avec du Pd(0). Les produits de couplages obtenus sont hydrogénés avec du Pd/C 5% sous atmosphère d'hydrogène (schéma 32 à 34).

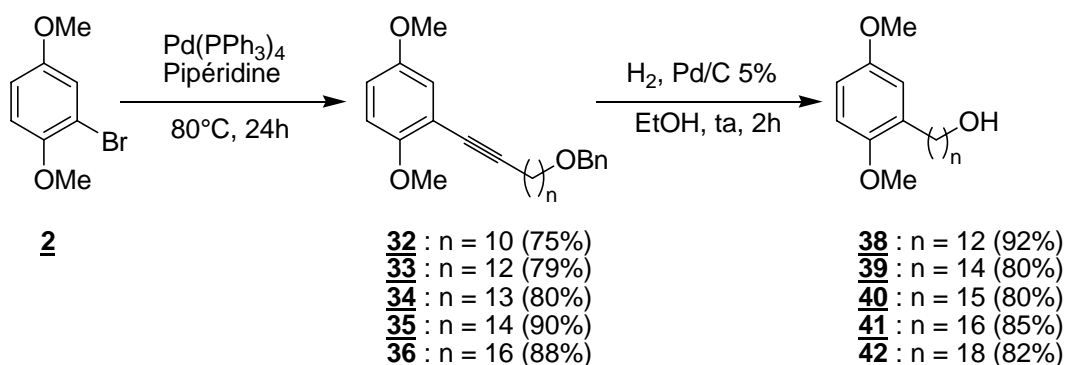


Schéma 32 : Couplage de Sonogashira et hydrogénation pour obtenir les QFA

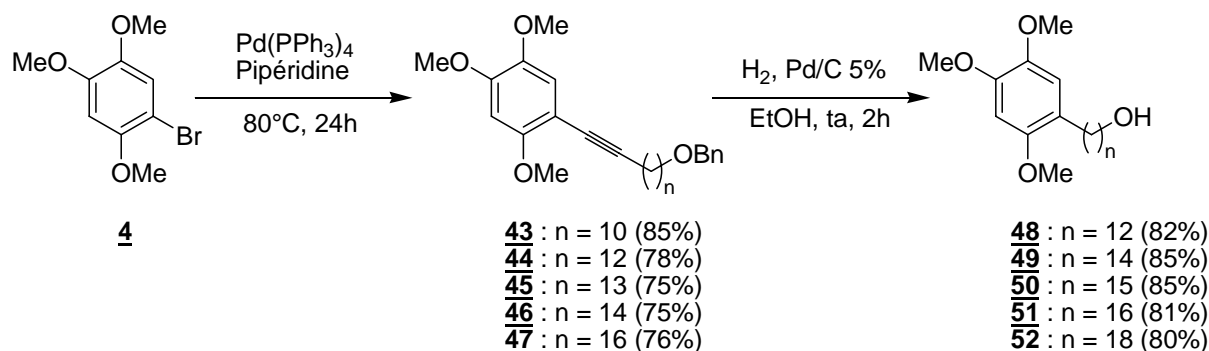


Schéma 33 : Couplage de Sonogashira et hydrogénation pour obtenir les Q₃FA

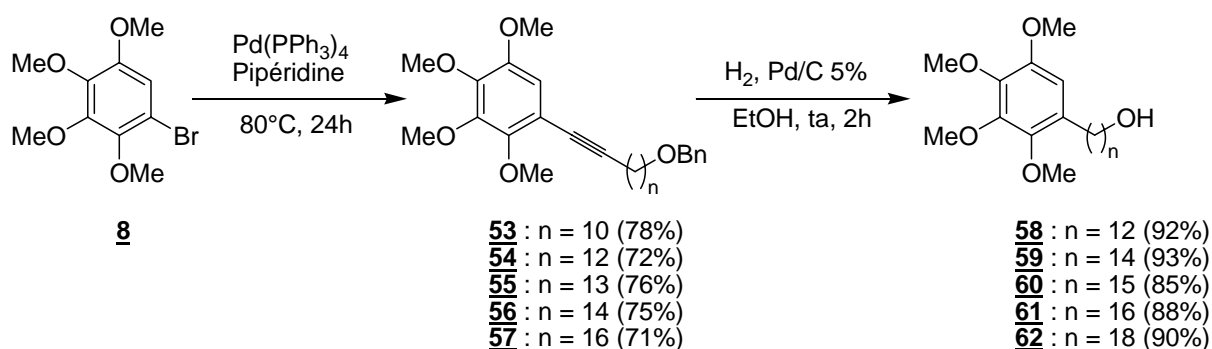


Schéma 34 : Couplage de Sonogashira et hydrogénation pour obtenir les Q₄FA

4. Récapitulatif

Nous avons mis au point une synthèse convergente pour la synthèse des « Quinol Fatty Alcohols » (QFA) différemment substitués sur le noyau quinolique. Cette synthèse est effectuée en trois étapes :

- la synthèse des arylbromures polyméthoxylés,
- la synthèse des alcynes vrais ω-benzyloxy,
- le couplage de Sonogashira suivi d'une hydrogénation catalytique.

Nous avons ainsi obtenu trois familles de QFA C-alkylés : les QFA (deux groupements méthoxy), les Q₃FA (trois groupements méthoxy) et les Q₄FA (quatre groupements méthoxy). Les rendements globaux des synthèses effectuées sont compris entre 30% et 83%.

III. SYNTHÈSE DES QFA N/O-ALKYLES

La synthèse des dérivés *O* ou *N*-alkylés va nous permettre par la suite d'étudier l'effet de la nature de la liaison entre la chaîne et le cycle sur l'activité biologique.

A. Rappels bibliographiques

Les synthèses de dérivés aniline *N*-alkylés ou de dérivés phénols *O*-alkylés sont largement décrites dans la littérature. Nous présenterons ici les réactions de couplage permettant d'aboutir aux produits recherchés avec des rendements satisfaisants.

1. *N*-alkylations d'anilines

La réaction la plus courante pour obtenir des anilines *N*-alkylées est la substitution nucléophile de deuxième ordre (S_N2). L'utilisation d'un alkyl- ou benzyl- bromure en présence de dérivés anilines et de base donne les produits de couplage avec de bons rendements.

De cette manière, Srivastava et coll.³² ont synthétisé la *N*-hexylaniline à partir de 1-bromohexane et d'aniline dans du DMSO en présence de K_2CO_3 (schéma 35).

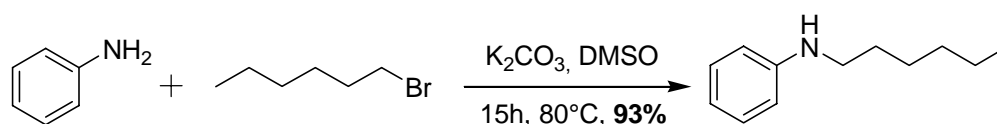


Schéma 35 : Synthèse de *N*-héxylaniline

De manière similaire, l'équipe de Vitale³³ a synthétisé la *N*-butylaniline à partir de 1-bromobutane, d'aniline et en présence de *n*BuLi dans le THF. Cette méthode plus rapide semble néanmoins donner des rendements moins élevés (schéma 36).

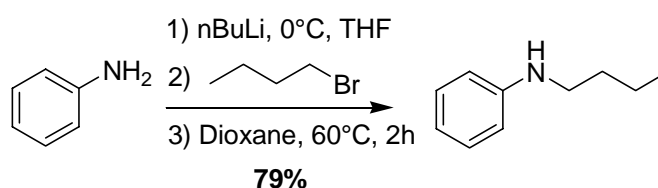


Schéma 36 : Obtention de *N*-alkylaniline en utilisant du *n*BuLi.

L'équipe de Rosowsky³⁴ a synthétisé des inhibiteurs de la dihydrofolate réductase à partir de 2,5-diméthoxyaniline et de bromure benzylique dans le diméthylacétamide avec du carbonate de calcium. Les temps de réaction dans ce cas sont très longs et les rendements faibles (schéma 37).

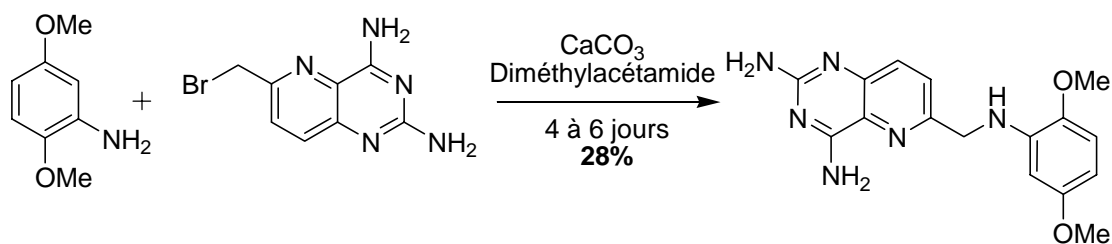


Schéma 37 : Obtention de *N*-benzylamines en présence de CaCO₃.

Une autre façon d'obtenir des alkylamines est le passage par une imine réduite par la suite par un hydrure³⁵ (schéma 38).

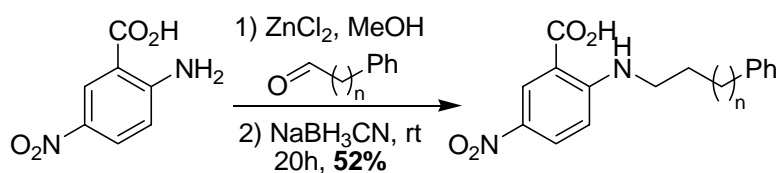


Schéma 38 : Obtention de *N*-alkylamines par le biais d'imines

Finalement, une méthode récente décrite par Kwong³⁶ permet d'obtenir les mêmes produits à partir d'arylbromure et d'alkylamine en présence de quantités catalytiques de CuI (schéma 39).

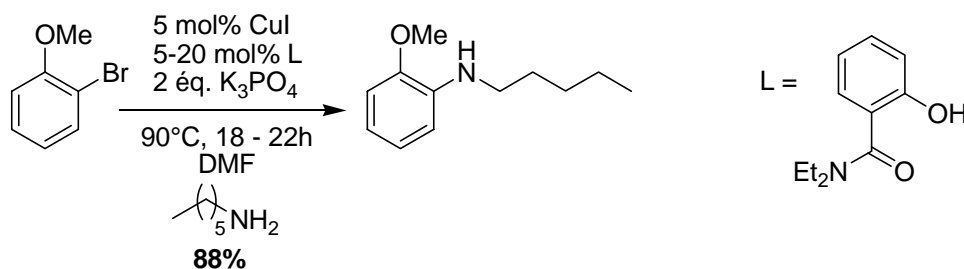


Schéma 39 : Couplage entre un arylbromure et une alkylamine, catalysé au Cu(I)

2. *O*-alkylations de phénols

Les phénols *O*-alkylés sont très souvent obtenus par S_N2 entre le phénol et un alkylhalogénure en présence de base. Les bases les plus souvent employées sont l'hydrure de sodium, la soude ou le carbonate de potassium. Nous citerons trois exemples de couplages obtenus dans des solvants différents avec des bases différentes.

Soula³⁷ a synthétisé le *O*-héxylphénol dans le DMF à reflux en présence de K₂CO₃ avec des rendements satisfaisants (schéma 40).

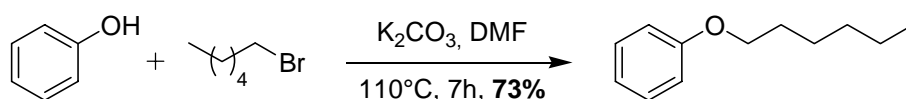


Schéma 40 : Couplage en présence de K₂CO₃ dans la DMF

L'utilisation d'une base plus forte n'a pas d'incidence directe sur les rendements comme démontré par Sircar³⁸ (schéma 41).

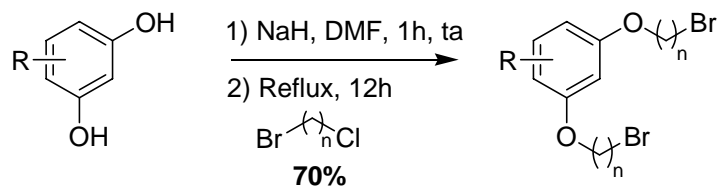


Schéma 41 : Couplage en présence de NaH dans la DMF

L'utilisation de l'acétone en remplacement de le DMF ainsi que l'utilisation d'alkyliodures à la place d'alkyles bromures³⁹, a considérablement amélioré les rendements, rendant ainsi les couplages quasi quantitatifs (schéma 42).

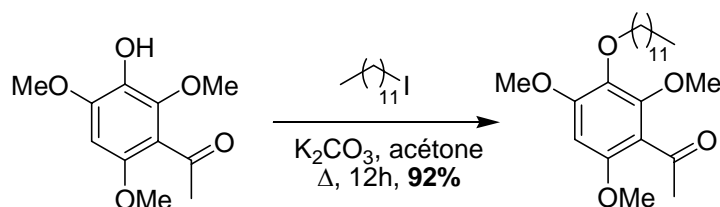


Schéma 42 : Couplage en présence de K_2CO_3 dans l'acétone

Pour synthétiser nos composés *N*- ou *O*-alkylés, respectivement les *N*-QFA et les *O*-QFA, nous cherchions des couplages simples et reproductifs entre la 2,5-diméthoxyaniline ou le 2,5-diméthoxyphénol et des bromoalcools ω -hydroxyprotégés ou non. Nous avons donc opté pour la méthode la plus largement décrite dans les deux cas, à savoir la $\text{S}_{\text{N}}2$.

Le schéma rétrosynthétique utilisé est décrit dans la figure 43.

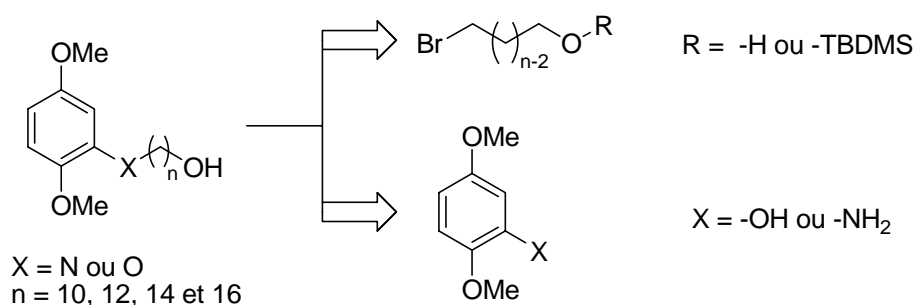


Figure 43 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse des *O/N*-QFA

B. Synthèse des QFA N-alkylés

1. Sélection de la voie synthétique

Des essais de couplages effectués entre la 2,5-diméthoxyaniline et le 1-bromotétradécane sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Produits testés	Base	Solvant	Rendements
2,5-diméthoxyaniline 1-bromotétradécane	K ₂ CO ₃	DMF	Pas de réaction
	K ₂ CO ₃	DMSO	Pas de réaction
	NaH	THF	20%
	nBuLi	THF	65%

Les assez bons rendements obtenus avec la méthode décrite par Vitale nous ont suggéré d'effectuer la synthèse des *N*-QFA en utilisant du nBuLi dans le THF. L'obtention de faibles quantités d'aniline dialkylée nous a incité à effectuer des essais de protection du groupement amine par un groupement carbamate. Ceci ne nous a pas permis d'augmenter les rendements sur le dérivé monoalkylé. Nous avons donc utilisé la 2,5-diméthoxyaniline sous sa forme non protégée.

Les bromoalcools utilisés pour le couplage seront protégés sur le groupement hydroxyle pour éviter des déprotonations par le nBuLi.

2. Synthèse des bromoalcool ω-silyloxylés

Les diols et bromoalcools représentés sur le schéma 44 ont été obtenus comme décrit précédemment. La fonction hydroxyle des composés **17** à **21** a été protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle.

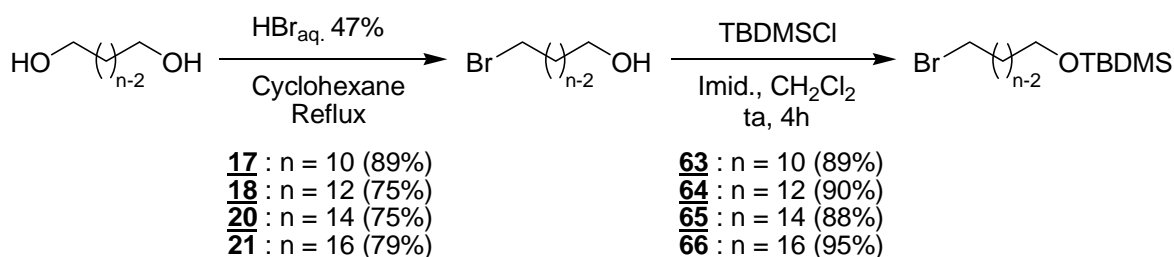


Schéma 44 : Synthèse des bromoalcools ω-silyloxylés

3. Couplage et déprotection

La 2,5-diméthoxyaniline est couplée par S_N2 sur les composés **63** à **66** selon la méthode de Vitale (schéma 45).

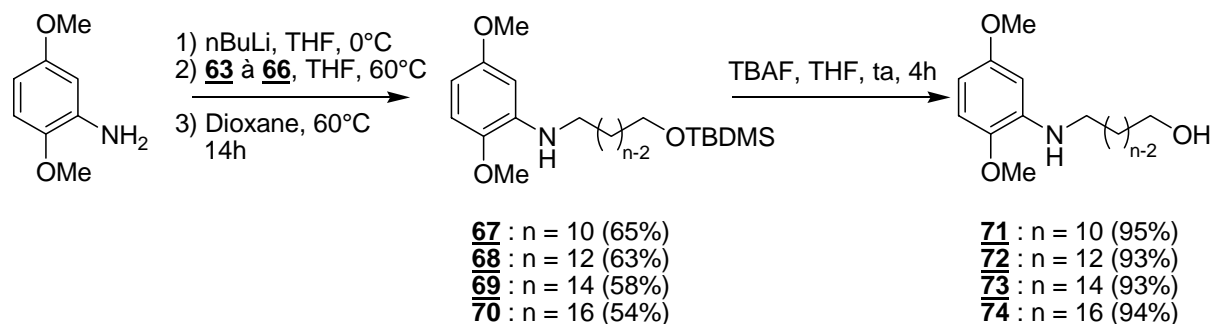


Schéma 45 : Couplage S_N2 et désilylation

Les produits de couplages **67** à **70** ont été déprotégés avec une solution de fluorure de tétrabutylammonium dans le THF.

C. Synthèse des QFA *O*-alkylés

Pour synthétiser les *O*-QFA, nous avons opté pour le couplage direct entre le phénol et le bromoalcool non protégé sur la fonction hydroxyle.

1. Synthèse du 2,5-diméthoxyphénol

Le 2,5-diméthoxyphénol est obtenu en une étape à partir du 2,5-diméthoxybenzaldéhyde qui est oxydé par du *m*CPBA. L'ester formique obtenu est saponifié avec de la soude aqueuse à 10% dans le méthanol (schéma 46).

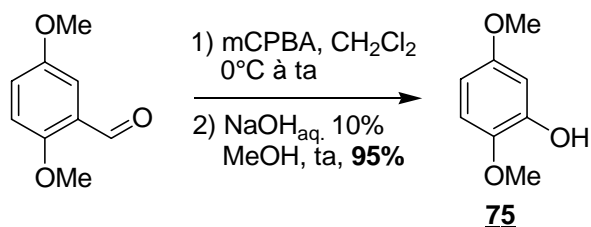
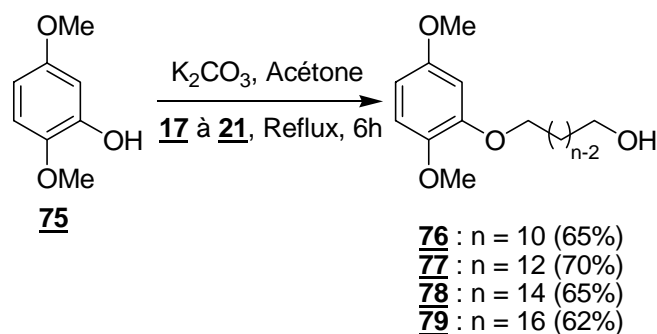


Schéma 46 : Oxydation de Baeyer-Villiger

2. Synthèse des *O*-QFA

Les *O*-QFA sont obtenus en une étape en présence de K_2CO_3 dans l'acétone à reflux (schéma 47).


 Schéma 47 : Couplage $\text{S}_{\text{N}}2$

IV. Conclusion

Nous avons synthétisé cinq séries de composés hybrides quinol / ω -alcanol différenciés par le nombre de groupements méthoxy sur le noyau benzénique ou par la nature de la liaison entre le cycle aromatique et la chaîne ω -alcanol.

La synthèse des QFA C-alkylés est caractérisée par l'étape de couplage entre un arylbromure et un alcyne vrai par la réaction de Sonogashira dans la pipéridine avec du Pd(0). Les rendements très satisfaisants nous ont permis d'obtenir trois séries de cinq produits différents avec de bons rendements globaux (schéma 48).

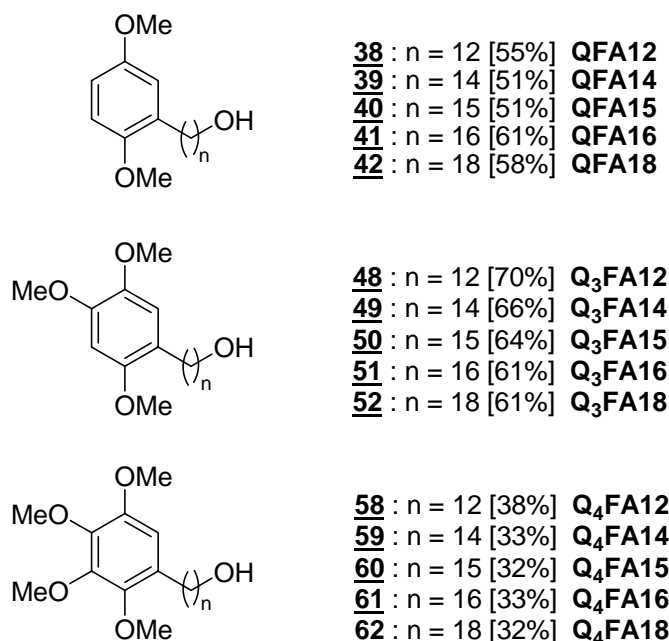


Schéma 48 : QFA C-alkylés et rendements globaux

La synthèse des QFA *N/O*-alkylés est basée sur des couplages de type $\text{S}_{\text{N}}2$ entre la 2,5-diméthoxyaniline ou le 2,5-diméthoxyphénol et des bromoalcools de longueurs variées. Ces synthèses, simples à mettre en œuvre et nécessitant peu d'étapes, donnent également des rendements globaux satisfaisants (schéma 49).

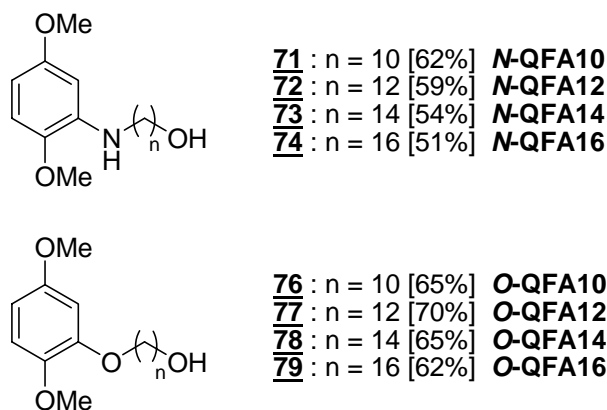


Schéma 49 : QFA *N/O*-alkylés et rendements globaux

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Shulgin, A. T. Psychotomimetic Phenylisopropylamines. 5. 4-Alkyl-2,5-dimethoxyphenylisopropylamines. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1201-1204.
- (2) Poutsma, M.; Wolthuis, E. Clemmensen Reduction of Acetophenone. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 875-877.
- (3) Groweiss, A.; Cardellina, J. H.; Pannell, L. K.; Uyakul, D.; Kashman, Y. et al. Novel Cytotoxic, Alkylated Hydroquinones from *Lansea welwitschii*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 116-121.
- (4) Poigny, S.; Guyot, M.; Samadi, M. Total Synthesis of Maesanin and Analogues. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14791-14802.
- (5) Ohshima, M.; Miyoshi, H.; Sakamoto, K.; Takegami, K.; Iwata, J. et al. Characterization of the Ubiquinone Reduction Site of Mitochondrial Complex I Using Bulky Synthetic Ubiquinones. *Biochemistry* **1998**, *37*, 6436-6445.
- (6) Yabunaka, H.; Abe, M.; Kenmochi, A.; Hamada, T.; Nishioka, T. et al. Synthesis and Inhibitory Activity of Ubiquinone-Acetogenin Hybrid Inhibitor with Bovine Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2385-2388.
- (7) Han, Y. X.; Jovanovic, M. V.; Biehl, E. R. Reaction of 2-Bromo-1,4-dimethoxybenzene with Various Nucleophiles via Aryne Reaction. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1334-1337.
- (8) Singh, U. S.; Scannell, R. T.; An, H.; Carter, B. J.; Hecht, S. M. DNA Cleavage by Di- and Trihydroxyalkylbenzenes. Characterization of Products and the Roles of O₂, Cu(II), and Alkali. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12691-12699.
- (9) McLafferty, F. W.; Kornfeld, R.; Haddon, W. F.; Levsen, K.; Sakai, I. et al. Application of Collisional Activation Spectra to the Elucidation of Organic Ion Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3886-3892.
- (10) Kaiser, E. M.; Henoch, F. E.; Hauser, C. R. Formation of 1,1-Dianions of Hydrazones by Certain Bases. *N,N*-Dialkylation with Halides. Decomposition to Form Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7287-7291.
- (11) Arndt, S.; Emde, U.; Bäurle, S.; Friedrich, T.; Grubert, L. et al. Quinone - Annonaceous Acetogenins: Synthesis and Complex I Inhibition Studies of a New Class of Natural Products Hybrids. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 993-1005.
- (12) Snyder, C. D.; Bondinell, W. E.; Rapoport, H. Synthesis of Chlorobiumquinone. *J. Org. Chem.* **1971**, *56*, 3951-3960.

- (13) Lipshutz, B. H.; Bulow, G.; Fernandez-Lazaro, F.; Kim, S. K.; Lowe, R. et al. A Convergent Approach to Coenzyme Q. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11664-11673.
- (14) Fürstner, A.; Leitner, A.; Méndez, M.; Krause, H. Iron-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13856-13863.
- (15) 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.
- (16) Palmgren, A.; Thorarensen, A.; Bäckvall, J. E. Efficient Synthesis of Symmetrical 2,5-Disubstituted Benzoquinones via Palladium-Catalyzed Double Negishi Coupling. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3764-3768.
- (17) 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.
- (18) Hadfield, J. A.; McGown, A. T.; Butler, J. A High-Yielding Synthesis of the Naturally Occurring Antitumor Agent Irisquinone. *Molecules* **2000**, *5*, 82-88.
- (19) Brimble, M. A.; Pavia, G. S.; Stevenson, R. J. A facile synthesis of arylidihydropyrans using a Sonogashira-selenoetherification strategy. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1735-1738.
- (20) Alami, M.; Ferri, F.; Linstrumelle, G. An Efficient Palladium-Catalysed Reaction of Vinyl and Aryl Halides or Triflates with Terminal Alkynes. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6403-6406.
- (21) Mitchell, R. H.; Lai, Y.-H.; Williams, R. V. N-bromosuccinimide - dimethylformamide: a mild, selective nuclear bromination reagent for reactive aromatic compounds. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4733-4735.
- (22) *Synthetic Comm.* **1998**, *28*, 2087-2095.
- (23) Park, M. Y.; Yang, S. G.; Jadhav, V.; Kim, Y. H. Practical and regioselective bromination of aromatic compounds using tetrabutylammonium peroxydisulfate. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4887-4890.
- (24) Sutherland, H. S.; Higgs, K. C.; Taylor, N. J.; Rodrigo, R. Isobenzofurans and orthobenzoquinone monoketals in syntheses of xestoquinone and its 9- and 10-methoxy derivatives. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 309-317.
- (25) Tisdale, E. J.; Chowdhury, C.; Vong, B. G.; Li, H.; Theodorakis, E. A. Regioselective synthesis of the bridged tricyclic core of Garcinia natural products via intramolecular aryl acrylate cycloadditions. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 909-912.
- (26) Piggott, M. J.; Wege, D. The Synthesis of Ventilone A. *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 749-754.
- (27) Syper, L.; Mlochowski, J.; Kloc, K. Synthesis of oxiranylquinones as new potential bioreductive alkylating agents. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 781-792.
- (28) Girlanda-Jungès, 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.
- (29) Chong, J. M.; Heuft, M. A.; Rabbat, P. Solvent Effects on the Monobromination of α,ω -Diols: A Convenient Preparation of ω -Bromoalkanols. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5837-5838.
- (30) Coowar, D.; Bouissac, J.; Hanbali, M.; Paschaki, M.; Mohier, E. et al. Effects of indole fatty alcohols on the differentiation of neural stem cell derived neurospheres. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6270-6282.
- (31) Jayasuriya, N.; Bosak, S.; Regen, S. L. Design, Synthesis and Activity of Membrane-Disrupting Bolaphiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5844-5850.

- (32) Srivastava, S. K.; Chauhan, P. M. S.; Bhaduri, A. P. A Novel Strategy for N-alkylation of Primary Amines. *Syn. Comm.* **1999**, 29, 2085-2092.
- (33) Vitale, A. A.; Chioconi, A. A. A Facile One-pot Method for the Preparation of N-Alkylanilines. *J. Chem. Res. Synop.* **1996**, 7, 336-337.
- (34) Rosowsky, A.; Forsch, R. A.; Queener, S. F. 2,4-Diaminopyrido[3,2-*d*]pyrimidine Inhibitors of Dihydrofolate Reductase from *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2615-2620.
- (35) Giles, K. R.; Humphries, M.; Abell, A.; Garill, A. The Synthesis of NPPB and NPBB by Reductive Amination and the Effects of these Compounds on K⁺ Channels of the Alga *Nitella hookeri*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 293-295.
- (36) Kwong, F. Y.; Buchwald, S. L. Mild and Efficient Copper-Catalyzed Amination of Aryl Bromides with Primary Alkylamines. *Org. Lett.* **2003**, 5, 793-796.
- (37) Soula, G. Tris(polyoxaalkyl)amines (trident), a new class of solid-liquid phase-transfer catalysts. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3717-3721.
- (38) Sircar, I.; Hoefle, M.; Maxwell, R. E. Phenylenebis(oxy)bis[2,2-dimethylpentanoic acid]s: Agents That Elevate High-Density Lipoproteins. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 1020-1027.
- (39) Horie, T.; Tsukayama, M.; Kourai, H.; Yokoyama, C.; Furukawa, M. et al. Syntheses of 5,6,7- and 5,7,8-trioxygenated 3',4'-dihydroxyflavones having alkoxy groups and their inhibitory activities against arachidonate 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 2256-2262.

Chapitre III :

Etude biologique

I. INTRODUCTION

Dans le cadre des maladies neurodégénératives, ainsi que dans celui d'une lésion du SNC, les neurones, cellules principales du Système Nerveux Central, sont sujets à des stress physiologiques considérables.

Dans un premier temps, une inflammation immédiate du tissu nerveux est à l'origine d'une hyperactivité des cellules microgliales. Cette « gliose réactionnelle » se traduit par une hyperproduction de radicaux libres résultant d'une respiration cellulaire accrue. En outre, le SNC sain, âgé, est aussi le siège d'une attaque oxydante, résultant quant à elle de l'accumulation de radicaux libres durant la vie de l'individu.

Par la suite, cette gliose réactionnelle, appelée aussi « cicatrice gliale », est également le siège d'une surexpression de nombreux facteurs inhibiteurs. Parmi ces facteurs, nous trouvons la Sema3A, les protéines de myéline (Nogo, MAG, OMgp) ainsi que les chondroïtine-sulfate protéoglycanes. La nature inhibitrice de ces facteurs empêche une réinnervation correcte des cibles. De plus, la nature très compacte de cette cicatrice constitue également une barrière physique infranchissable pour les prolongements neuronaux.

Dans le chapitre 1, nous avons discuté de l'effet bénéfique du tCFA15 au sein de la cicatrice gliale. En effet, ce dernier est capable de lever l'inhibition de la Sema3A ou de la myéline, en restaurant des axones de longueur normale. Dans ce chapitre nous étudierons non seulement l'activité biologique des QFA sur ce même modèle cellulaire, mais aussi la capacité des QFA à neutraliser les radicaux libres.

II. CAPACITE ANTIOXYDANTE DES QFA

L'activité antioxydante des QFA est évaluée, comme celle du tCFA15, à l'aide de deux tests de neutralisation de radicaux, à savoir le test au DPPH et le test à l'ABTS. La forme antioxydante d'une quinone étant la forme réduite, le quinol, il faut dans un premier temps démethyler les QFA, de manière à leur rendre leur activité physicochimique.

A. Démethylation des QFA

La déméthylation de noyaux aromatiques méthoxylés est une réaction largement décrite dans la littérature. La manière la plus simple de procéder consiste à utiliser du BBr_3 dans du dichlorométhane à froid¹ (schéma 1).

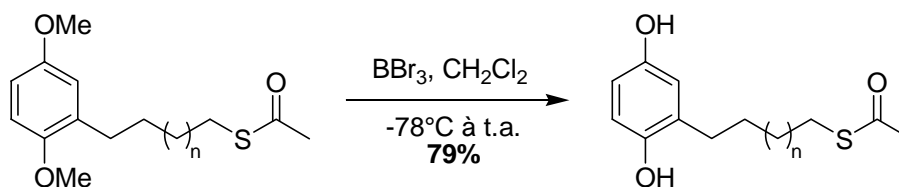


Schéma 1 : Déméthylation avec BBr₃

Une autre méthode, facile à mettre en œuvre, est l'utilisation de tétrachlorure de silicium en présence d'iodure de sodium. L'agent déméthylant est dans ce cas le iodotrichlorosilane formé *in situ*² (schéma 2).

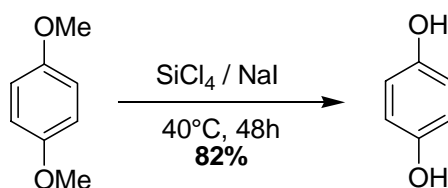


Schéma 2 : Déméthylation avec SiCl₃I

Finalemt, des travaux effectués par Vickery et coll³. ont décrit l'utilisation de l'iodure de triméthylsilyle dont l'utilisation s'est avérée aussi fructueuse que celle de BBr₃, notamment pour la déméthylation de catéchols (schéma 3). Il est à noter que la présence de groupements supplémentaires sur le noyau aromatique, aussi bien en méta qu'en para, diminue considérablement les rendements réactionnels.

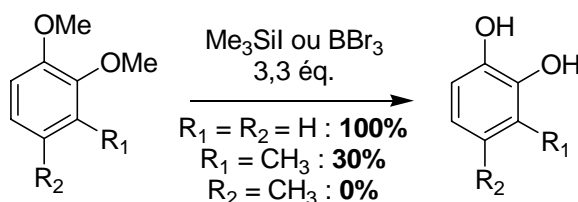


Schéma 3 : Déméthylation de catéchols par BBr₃ ou TMSI

Nous avons opté pour la déméthylation de nos produits avec du tribromure de bore dans le dichlorométhane (schéma 4). Cependant, tous les composés n'ont pas été déméthylés. Nous avons choisi de déméthylé un composé substitué par une chaîne courte ($n = 12$, **81**) et un composé substitué par une chaîne longue ($n=18$, **82**) de manière à pouvoir ensuite évaluer l'effet de la longueur de la chaîne sur le pouvoir antioxydant.

Par ailleurs, afin d'étudier l'effet de la présence du groupement -OH en bout de chaîne sur le pouvoir antioxydant, nous avons synthétisé un analogue des QFA dépourvu de la fonction hydroxyle, le **QFA16c**. Ce composé a également été déméthylé (**83**).

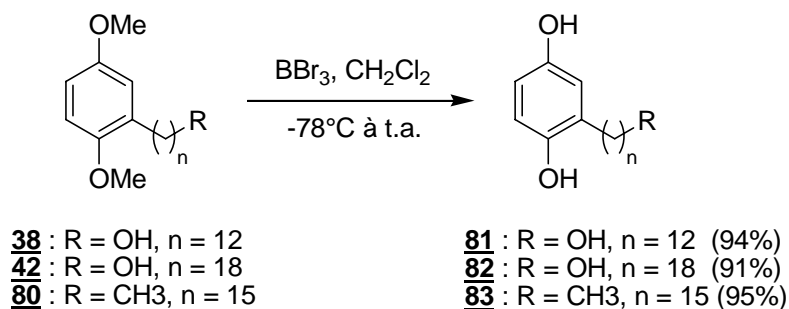


Schéma 4 : Déméthylation des QFA stratégiquement choisis

Les tentatives de déméthyliser les Q₃FA ou les Q₄FA ont toutes échoué. En effet, ces composés sont très instables sous leur forme déméthylée et s'oxydent très facilement pendant la réaction ou le work-up. Nous obtenons uniquement des produits de dégradation. De ce fait, nous nous sommes contentés de déméthyliser uniquement les QFA mentionnés ci-dessus.

B. Tests d'antioxydation

Les principes des deux tests utilisés, à savoir le test au DPPH et le test à l'ABTS, ont été décrits dans le chapitre 1 (p.51 et 52). Nous utilisons comme témoin positif le Trolox®, un dérivé hydrosoluble de la vitamine E (schéma 5).

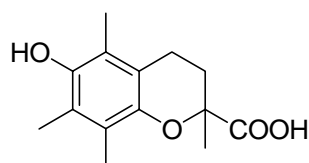


Schéma 5 : Structure du Trolox®

Nous avons testé les composés portant la chaîne la plus courte (n = 12) et la chaîne la plus longue (n = 18). Nous avons également testé les QFA déméthylés ainsi que les analogues dépourvus de groupement hydroxyle terminal. Nous avons alors déterminé une IC₅₀ qui correspond à la concentration de produit permettant de neutraliser 50% du radical DPPH ou 50% des radicaux hydroxy générés *in situ* (test à l'ABTS). Les résultats sont représentés dans le tableau 1.

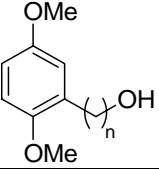
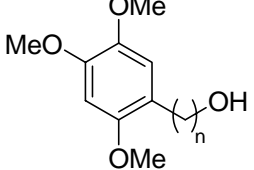
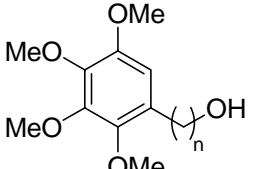
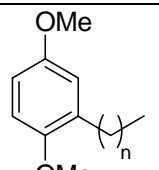
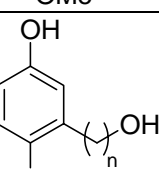
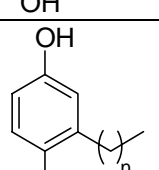
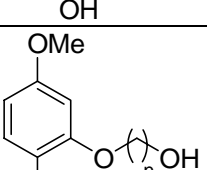
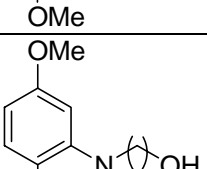
Produit testé	Nom du composé N°	ClogP	IC ₅₀ (mM) DPPH (éthanol)	IC ₅₀ (µM) ABTS (éthanol/eau 1/1)
Trolox®	Trolox®	3,09	0,23	600
	QFA <u>32, 42</u>	6,48 (n=12) 9,55 (n=18)	> 10	>10000
	Q₃FA	6,12 (n=12) 9,30 (n=18)	> 10	720
	Q₄FA	5,37 (n=12) 8,54 (n=18)	> 10	nd
	QFA16c	10,58	> 10	>10000
	<u>81, 82</u>	5,09 (n=12) 8,26 (n=18)	0,23	6
	<u>83</u>	9,19	1,53	6000
	O-QFA	4,57 (n=10) 7,74 (n=16)	> 10	nd
	N-QFA	4,55 (n=10) 7,73 (n=16)	> 10	nd

Tableau 1 : Pouvoir antioxydant de la bibliothèque de QFA vis-à-vis du radical DPPH et OH[•]. Chaque valeur est moyennée sur trois manipulations indépendantes. La SEM est d'environ ± 5%. nd : activité antioxydante détectable mais n'atteignant pas l'IC₅₀.

Les résultats obtenus avec le radical DPPH donnent certaines indications quant à l'activité antioxydante des QFA. En effet, les QFA, Q₃FA, Q₄FA et O/N-QFA ne sont pas capables de neutraliser le radical DPPH sous leur forme méthylée.

Les composés **81** et **82** ont, quant à eux, une IC₅₀ égale à celle du Trolox®. Ce résultat indique que, sous leur forme déméthylée, les QFA ont une activité antioxydante très importante. Par ailleurs, l'évaluation de l'IC₅₀ du composé **83** (dépourvu de la fonction hydroxyle terminale) indique une diminution de l'activité antioxydante d'un facteur supérieur à 6. Ce résultat indique que le groupement hydroxyle terminal est essentiel à l'activité antioxydante.

Ces premiers résultats intéressants nous ont menés à évaluer la capacité antioxydante de nos produits sur un test similaire. En effet, le test au DPPH, bien que très utilisé dans la littérature, est basé sur la neutralisation d'un radical stabilisé très encombré. De tels radicaux ne sont pas représentatifs du stress oxydant au sein du SNC. L'utilisation de radicaux peu ou pas encombrés serait quant à elle nettement plus représentative. De ce fait, nous nous proposons d'utiliser le test à l'ABTS, basé sur la neutralisation de radicaux hydroxyles.

Le test à l'ABTS est, pour sa part, bien plus concluant. Dans un premier temps, il nous indique que les Q₃FA et les Q₄FA, sous la forme méthylée, ont une activité antioxydante mesurable. En effet, les Q₃FA ont une activité comparable à celle du Trolox®, légèrement diminuée d'un facteur 1,2. Les Q₄FA ont, quant à eux, une activité antioxydante mesurable mais qui n'atteint pas l'IC₅₀ sur la gamme de concentrations utilisées. Il en est de même pour les O/N-QFA.

Les composés **81** et **82** ont une activité antioxydante très marquée, 100 fois supérieure à celle du Trolox®. Parallèlement à ceci, il est aussi très important de noter qu'en absence du groupement hydroxyle terminal (composé **83**), l'activité antioxydante est diminuée d'un facteur 1000 par rapport à son homologue ω-hydroxylé, et par conséquent diminuée d'un facteur 10 par rapport au Trolox®. Ce résultat des plus surprenants nous permet de conclure à propos de l'utilité et du rôle majeur de la fonction hydroxyle terminale sur l'activité antioxydante de nos composés.

C. Conclusion

Cette étude physicochimique de nos composés nous informe du rôle primordial du groupement hydroxyle terminal sur leur capacité à piéger les radicaux libres. En effet, ceci est visible aussi bien avec le test au DPPH qu'avec le test à l'ABTS, et montre une diminution de l'activité antioxydante respectivement d'un facteur 6 et d'un facteur 1000 lorsque l'on enlève cette fonction hydroxyle.

Cette étude nous permet également d'attribuer une activité antioxydante relativement importante aux composés méthylés tels que les Q₃FA et les Q₄FA. Si la déméthylation augmente le pouvoir antioxydant de nos composés, il est très probable que les homologues déméthylés des Q₃FA et Q₄FA soient fortement antioxydants. Finalement, les QFA sont, quant à eux, antioxydants uniquement sous leur forme déméthylée.

III. EFFET DES QFA SUR LA CROISSANCE NEURITIQUE

Les expériences biologiques sur les neurones ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire de « Physiologie Moléculaire de la Régénération Nerveuse » (INSERM U575) sous la direction du Dr. Dominique Bagnard.

A. Test biologique effectué

Nous utilisons un modèle *in vitro* de la croissance nerveuse. Il consiste à mettre en culture des neurones néocorticaux d'embryons de souris au 15^e jour de gestation. A ce stade du développement, le cortex cérébral n'est pas entièrement formé et de ce fait les explants utilisés sont principalement constitués de neurones.

Brièvement, le protocole expérimental consiste en la dissection d'embryons de souris pour prélever les explants de néocortex. Après dissociation enzymatique puis mécanique, les cellules sont mises en culture sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine pour une meilleure adhésion. Les neurones sont ensuite déposés à l'étuve pendant une nuit (37°C et 5% CO₂). Les cellules sont finalement incubées avec les composés à tester pendant 24h. Puis, elles sont fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps primaire anti-Smi312 (spécifiques des neurofilaments phosphorylés) puis un anticorps secondaire couplé à l'Alexa488. Les lamelles sont ensuite lavées puis montées sur lames avant d'être observées en microscopie à épifluorescence. Les champs photographiés contiennent une dizaine de neurones. La longueur neuritique est mesurée grâce à un logiciel informatique.

B. Screening de la bibliothèque de QFA

Nous avons, dans un premier temps, procédé à un screening complet de la bibliothèque de QFA (schéma 6).

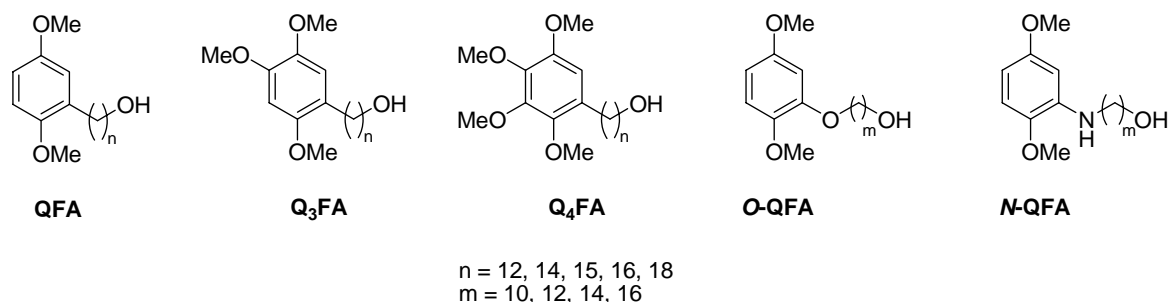


Schéma 6 : Composés testés sur la croissance axonale

La valeur de la croissance axonale est exprimée en pourcentage, 100% correspondant à la longueur axonale des neurones contrôles. Les résultats sont représentés dans le tableau 2.

Composé (10^{-9} M)	n	Croissance axonale (%)	ClogP
Contrôle (EtOH 0,1%)	∅	100	-0,23
tCFA15	15	150	8,03
QFA12	12	109	6,48
QFA14	14	110	7,54
QFA15	15	181	8,07
QFA16	16	120	8,60
QFA18	18	109	9,66
Q ₃ FA12	12	108	6,12
Q ₃ FA14	14	109	7,18
Q₃FA15	15	152	7,71
Q ₃ FA16	16	135	8,24
Q ₃ FA18	18	106	9,30
Q ₄ FA12	12	100	5,37
Q ₄ FA14	14	108	6,43
Q₄FA15	15	158	6,95
Q ₄ FA16	16	127	7,48
Q ₄ FA18	18	103	8,54
O-QFA10	10	122	4,57
O-QFA12	12	145	5,62
O-QFA14	14	165	6,68
O-QFA16	16	109	7,74
N-QFA10	10	100	4,55
N-QFA12	12	102	5,61
N-QFA14	14	105	6,67
N-QFA16	16	104	7,73

Tableau 2 : Effet des QFA sur la croissance axonale

La lecture de ce tableau indique bien que les composés les plus actifs sont ceux comportant quinze atomes de carbone sur la chaîne latérale ω -alcanol, à savoir le QFA15, le Q₃FA15 et le Q₄FA15. Parmi ces trois composés en tête de fil, celui qui ressort est le **QFA15**. En effet, ce dernier est capable de promouvoir la croissance axonale à 181% par rapport aux conditions contrôles.

Par ailleurs, une étude comparative des résultats obtenus nous permet de conclure quant à l'utilité de la liaison carbone-carbone entre le noyau antioxydant et la chaîne ω -alcanol. En effet, la comparaison de l'activité biologique mesurée pour le QFA15, le *O*-QFA14 (homologue *O*-alkylé du QFA15) et le *N*-QFA14 (homologue *N*-alkylé du QFA15) révèle que l'activité promotrice maximale est uniquement assurée par le QFA15.

Par la suite, nous étudierons uniquement le QFA15, composé possédant l'activité trophique la plus importante.

C. Activités du QFA15 sur les neurones

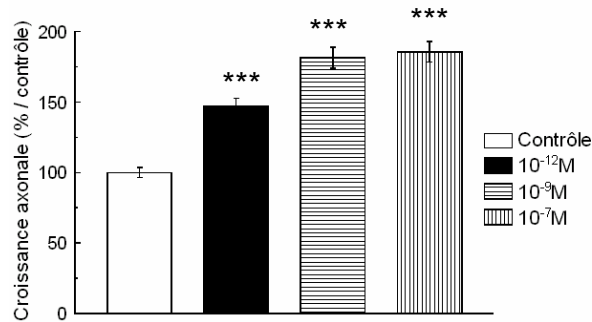
Lors de l'inflammation du SNC, les neurones ayant survécu ne peuvent pas traverser la « cicatrice gliale » susmentionnée pour réinnover les cibles. Cette incapacité est due à :

- une barrière chimique constituée de protéines telles que la Sema3A ou la myéline (Nogo, OMgp, MAG),
- une barrière physique constituée par la « cicatrice » elle-même.

De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'effet du QFA15 sur certains facteurs intervenant sur le site de cicatrisation, à savoir la survie neuronale et l'inhibition chimique.

1. Effet dose dépendant du QFA15

Dans un premier temps, il a fallu étudier la dose-dépendance de notre composé. Ainsi, le QFA15 a été testé sur le modèle cellulaire de la croissance axonale à des concentrations différentes. Nous avons ainsi pu dresser l'histogramme présenté sur le graphe 1.



Graphe 1 : Effet promoteur du QFA15 sur la croissance axonale. L'addition de QFA15 provoque une réponse dose dépendante. Les résultats sont présentés sous forme moyenne±SEM. ***p<0,001 vs contrôle.

Cette étude nous indique que le QFA15 est actif à des concentrations nanomolaires. En effet, il est capable de promouvoir la croissance axonale de près de 181% à une concentration de 1 nM. Au-delà de cette concentration, la longueur axonale n'est pas affectée davantage. Les photos présentées sur le schéma 7 montrent bien l'effet biologique du QFA15.

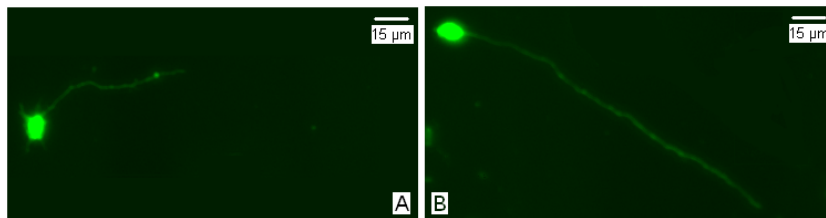
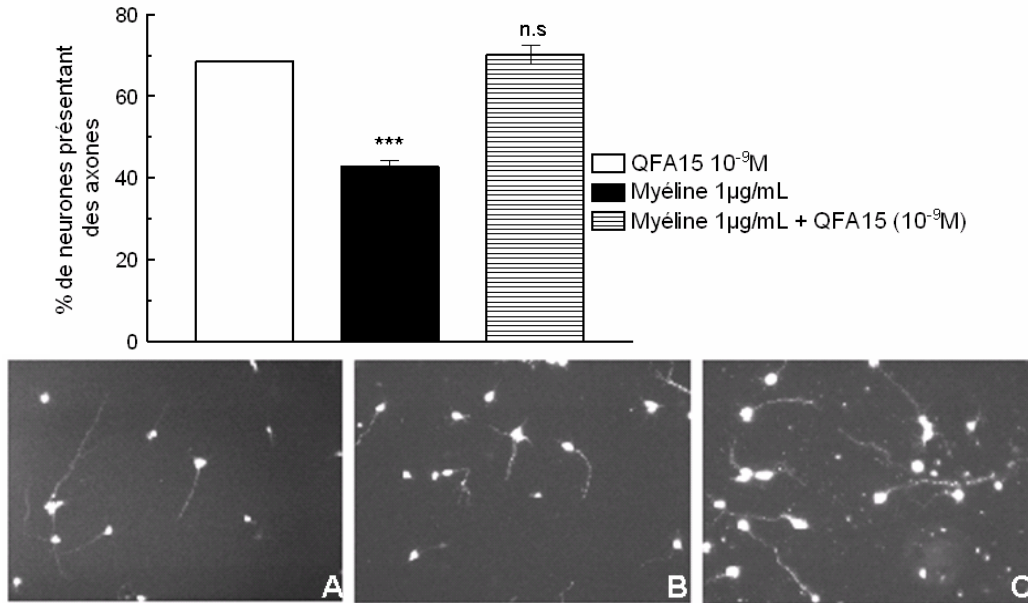


Schéma 7 : A. Neurone contrôle (0,1% EtOH) : $85 \pm 4 \mu\text{m}$ B. Neurone traité avec le QFA15 à 1nM : $154 \pm 7 \mu\text{m}$.

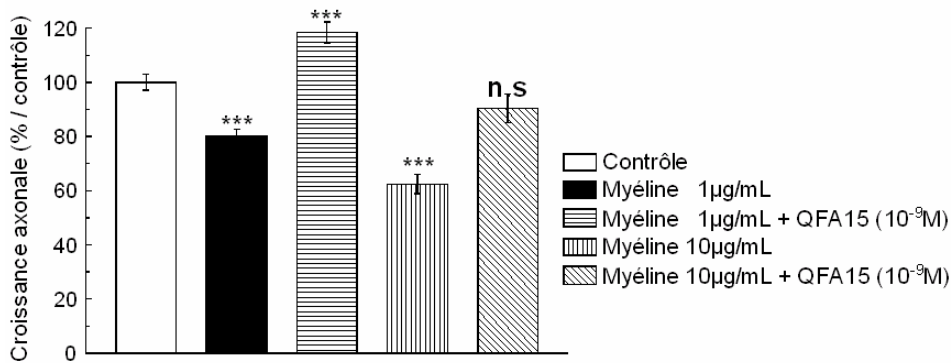
Par la suite, nous étudierons différentes propriétés biologiques du QFA15 en nous contentant d'effectuer les expériences à 1 nM de QFA15.

2. QFA15 et inhibition axonale

Nous avons par la suite voulu voir si l'effet promoteur du QFA15 est maintenu dans des conditions de forte inhibition, comme c'est le cas au sein de la « cicatrice gliale ». Nous avons alors testé l'effet du QFA15 en présence d'un mélange de protéines de myéline. Les résultats sont représentés sur les graphes 3 et 4.

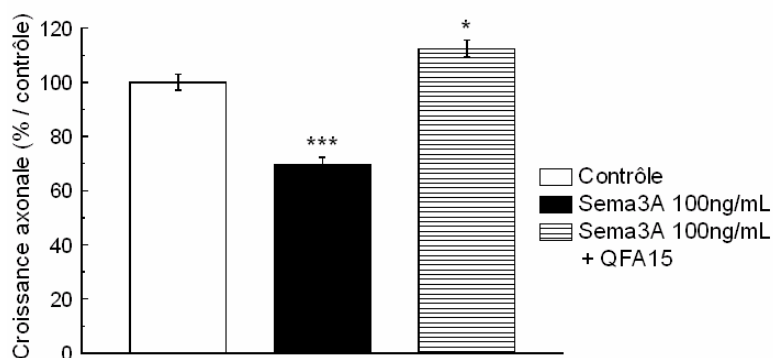


Graphe 3 : Effet promoteur du QFA15 sur des substrats myéliniques. Le QFA15 est capable de contrer l'effet de la myéline en augmentant le nombre de neurones présentant des axones. Les données sont présentées sous forme moyenne±SEM. *** $p < 0,001$ vs contrôle. ns, non significatif. Les photos représentent des neurones (A) contrôle, (B) 1 µg/mL myéline, (C) 1 µg/mL myéline + QFA15 1 nM.



Graphe 4 : Effet promoteur du QFA15 sur des substrats myéliniques. Le QFA15 est capable de contourner l'effet inhibiteur de la myéline en stimulant la croissance axonale. Les données sont représentées sous forme moyenne±SEM. *** $p < 0,001$ vs contrôle. ns, non significatif.

Les résultats obtenus nous permettent d'affirmer que le QFA15 est capable de contourner un des éléments inhibiteurs de la cicatrice gliale. En effet, l'inhibition de croissance engendrée par la myéline est de 20% et de 40% pour des concentrations respectives de 1 µg/mL et 10 µg/mL de myéline. Notre composé peut augmenter le nombre de neurones présentant des axones (~30%), mais aussi la longueur moyenne de ces axones (~40%). Ces résultats très encourageants nous ont amenés à étudier l'effet du QFA15 sur un autre inhibiteur de la cicatrice gliale, la Sema3A (Graphe 5).



Graph 5 : Effet promoteur du QFA15 sur sema3A. Le QFA15 est capable de contourner l'effet inhibiteur de la Sema3A en stimulant la croissance axonale pour restaurer des conditions contrôles. Les données sont représentées sous forme moyenne \pm SEM. *** $p < 0,001$, * $p < 0,1$ vs contrôle.

La réponse du QFA15 face à la Sema3A est identique à celle face à la myéline. En effet, des fortes doses de Sema3A diminuent la longueur axonale de près de 30%. La présence de QFA15 dans le milieu restaure une longueur axonale normale, de 40% supérieure à celle en milieu inhibiteur.

En conclusion, il semble que le QFA15 est capable, non seulement de promouvoir la croissance axonale sur des milieux inhibiteurs présents dans la cicatrice gliale, mais aussi d'augmenter, dans un même milieu inhibiteur, le nombre de neurones présentant des axones, les rendant ainsi capables d'innover les cibles.

3. Voie intracellulaire sollicitée

a. Tests biologiques effectués

Suite à l'effet trophique très prometteur du QFA15, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation intracellulaire que solliciterait ce dernier. Pour ce faire, nous avons mesuré la longueur axonale sur des neurones cultivés en présence d'inhibiteurs pharmacologiques. Ainsi, nous avons testé :

- des inhibiteurs de Tyrosine kinases (Genistein 10 μ M, Lavendustin 1 μ M),
- un inhibiteur de Cdk (Olomoucine 1 μ M),
- un inhibiteur de Ser/Thr-kinase (LiCl 1 mM),
- des inhibiteurs des MAPK (SB202190 10 μ M, PD98059 10 μ M),
- un inhibiteur de l'adénylyl-cyclase (MDL-12,330A 1 μ M),
- un inhibiteur de la guanylyl-cyclase (ODQ 1 μ M),
- un inhibiteur d'oxydo-réductase (EGCG 1 μ M).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

		Longueur axonale (en μm)	Longueur axonale avec QFA15 (μm)	Effet de croissance (%)
	Pas de traitement	96,00 \pm 5,15	173,83 \pm 6,82	81,07
Inhibiteurs Tyrosine kinases	Genistein	67,88 \pm 4,94	104,96 \pm 3,47	54,63
	Lavendustin	65,46 \pm 3,83	101,21 \pm 5,40	54,61
Inhibiteurs Ser/Thr Kinases	LiCl	68,19 \pm 3,87	95,18 \pm 4,34	39,58
Inhibiteurs MAP-kinases	SB202190	83,87 \pm 5,12	96,17 \pm 5,26	14,67
	PD98058	78,18 \pm 4,79	114,97 \pm 4,38	47,06
Inhibiteurs Nucléotides Cycliques	MDL-12,330A	63,51 \pm 3,06	50,38 \pm 5,91	-20,68
	ODQ	72,52 \pm 3,68	68,03 \pm 4,44	-6,19
Inhibiteurs Kinases Cycline-dependantes	Olomoucine	75,29 \pm 4,79	94,71 \pm 4,92	25,79
Inhibiteur Oxydo-réductase	EGCG	93,58 \pm 5,66	110,65 \pm 4,73	18,24

Tableau 3 : Elucidation des propriétés pharmacologiques du QFA15, Des neurones corticaux sont cultivés en présence de QFA15 à 1 nM et de différents inhibiteurs pharmacologiques, Les résultats sont présentés sous forme longueur axonale en $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$,

Cette étude nous révèle que l'effet biologique du QFA15 est maintenu, bien que diminué, en présence de nombreux inhibiteurs pharmacologiques. Seuls les inhibiteurs de l'adénylate cyclase (MDL-12,330A, traduisant une diminution intracellulaire d'AMPc) et de la guanilate cyclase (ODQ, traduisant une diminution intracellulaire de GMPc) annulent, voire même inversent, l'effet du QFA15, Cette constatation nous permet de conclure que l'activité du QFA-15 est dépendante des nucléotides cycliques intracellulaires.

b. Rôle des nucléotides cycliques dans la croissance et la régénération nerveuse

L'AMPc est un second messager généré par l'adénylate cyclase. Une fois présent dans la cellule, il agit en tant qu'activateur de la Protéine Kinase A (PKA). Cette dernière est capable de phosphoryler plusieurs cibles intracellulaires, générant ainsi des réponses diverses et variées.

Lors du développement, des taux élevés d'AMPc intracellulaire des neurones du SNC sont corrélés avec une grande capacité de régénération neuronale. Inversement, chez des individus *post-nataux*, les taux d'AMPc diminuent considérablement, ce qui va de pair avec une régénération inefficace. Suite à ces constatations, des tests *in vitro* d'application d'AMPc par micro-injection rendent aux neurones matures une bonne capacité de régénération.

Une régénération efficace des neurones lésés suppose une surexpression des gènes associés à la croissance. Parmi ceux-ci, nous trouvons les gènes codant pour les différents isoformes de la tubuline, constituant principal des microtubules⁴.

Dans le SNC, nous trouvons trois sous-types de alpha tubulines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 4$) et quatre sous-types de béta tubulines (βI , βII , βIII et βIV). L'injection d'un analogue stable de l'AMPC, le db-AMPC, stimule la surexpression des isoformes $\alpha 1$ et βIII . Or, des microtubules constitués de ces deux isoformes sont très stables et sont généralement présents dans des neurones post-mitotiques.

Il en découle qu'une séquence spécifique de signaux menant à la synthèse de dérivés stables de la tubuline serait à l'origine de l'effet promoteur de l'AMPC.

Il est également connu que des doses intracellulaires élevées d'AMPC sont capables de détourner la réponse neuronale face à la myéline. En effet, des neurones enrichis en AMPC ne reconnaissent plus la myéline en tant que facteur inhibiteur. Ceci pourrait être expliqué par l'inactivation de la GTPase Rho. En effet, une PKA active est capable de phosphoryler et donc d'inhiber Rho, et modifie ainsi la réponse du neurone face aux facteurs inhibiteurs tels que la myéline⁵.

Le GMPc, quant à lui, est aussi un second messenger très important⁶. Généré par la guanilate cyclase, il agit en tant qu'activateur de différentes protéines kinases. Parmi celles-ci, nous trouvons la Protéine Kinase C (PKC) et la Kinase I dépendante du GMPc (cGKI). Ces kinases vont à leur tour phosphoryler des cibles diverses et variées. Il est à noter que le GMPc est aussi capable de réguler les taux intracellulaires d'AMPC par activation ou inhibition de phosphodiésterases dépendantes de l'AMPC.

Par ailleurs, il est connu qu'une augmentation des taux intracellulaires de GMPc est capable de modifier la réponse du neurone face à la Sema3A, la rendant ainsi activatrice de la croissance axonale⁷. Cette réponse peut être médiée par cGKI, bien que cette dernière ne fasse pas partie de la signalisation intracellulaire sollicitée par la Sema3A⁶.

c. Récapitulatif

Les résultats obtenus suggèrent que le QFA15 agit en tandem avec l'AMPC et le GMPc. Ceci permet aux neurones de ne plus reconnaître, ni la myéline, ni la Sema3A, comme inhibitrices de la croissance axonale. L'activités parallèles et croisées de ces deux seconds messagers nous permet de dresser un schéma récapitulatif de l'action du QFA15 dans le neurone (schéma 8).

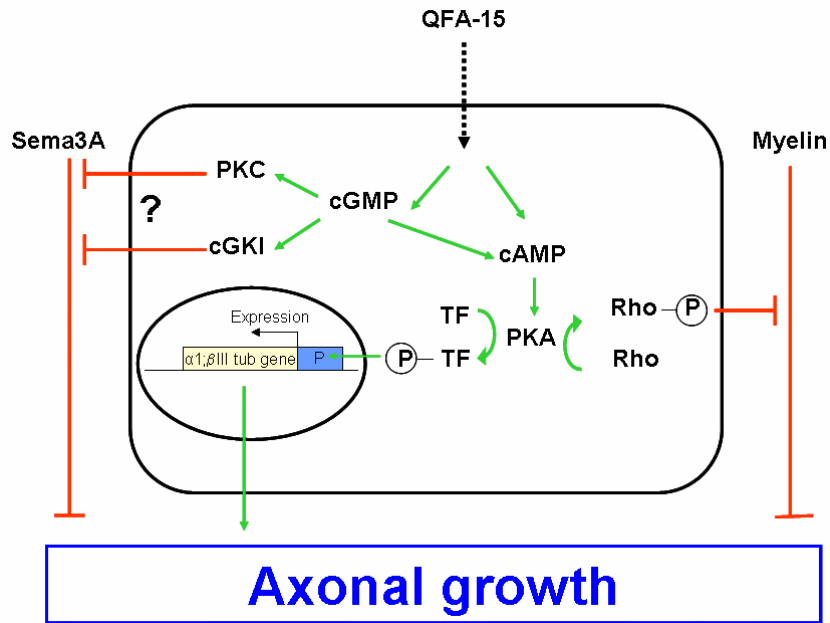


Schéma 8 : Proposition de mode d'action du QFA15. Par une cascade d'événements restant encore à élucider, le QFA15 agit parallèlement à l'AMPC et au GMPc. L'AMPC active la PKA qui va d'une part phosphoryler Rho, levant ainsi l'effet inhibiteur de la myéline. D'autre part, la PKA permet la phosphorylation de différents facteurs de transcription (TF). Ceux-ci entraînent une surexpression des gènes codants pour des isoformes stables de la tubuline. Les microtubules néoformés permettent une croissance axonale efficace. L'effet inhibiteur de la Sema3A est aussi levé par le QFA15, mais grâce au GMPc agissant sur la PKC ou la cGKI. Il régule aussi les taux intracellulaires d'AMPC.

IV. DISCUSSION

L'activité antioxydante très élevée obtenue pour les homologues déméthylés des QFA (composés **81** et **82**) nous a permis de conclure quant à leur capacité à neutraliser les radicaux libres oxygénés présents au sein de la zone de cicatrisation gliale. Cependant, cette activité antioxydante est annulée lorsque les QFA sont sous leur forme méthylée.

Les activités biologiques très prometteuses obtenues pour le QFA15 nous ont permis de le sélectionner comme composé de référence dans le cadre du modèle biologique étudié. Cependant, une question reste encore entière. Comment le QFA15, actif biologiquement sous sa forme méthylée, serait-il capable d'agir en tant qu'antioxydant ?

Deux cas de figures sont envisageables pour répondre à cette question. Dans un premier temps, il est important de noter que la cible cellulaire du QFA15, qu'elle soit intra- ou extracellulaire, n'est pas encore connue. Les études effectuées jusqu'ici nous ont uniquement permis de relier l'activité biologique du QFA15 à des variations du taux d'AMPC et de GMPc. En effet, que la cible principale soit intracellulaire ou extracellulaire, le raisonnement biologique demeure le même.

D'après le coefficient de partition octanol/eau de nos composés, il en découle que celui du QFA15 est de 8,07. Cette molécule très lipophile serait donc capable de diffuser à travers la membrane cellulaire accédant ainsi facilement dans le milieu intracellulaire. Dans la cellule, des enzymes spécialisées seraient capables de déméthyle le QFA15, lui rendant ainsi toute sa

capacité antioxydante. Par ailleurs, sous sa forme méthylé, il serait capable d'agir sur sa cible principale, de manière à promouvoir la croissance axonale des neurones lésés (schéma 9).

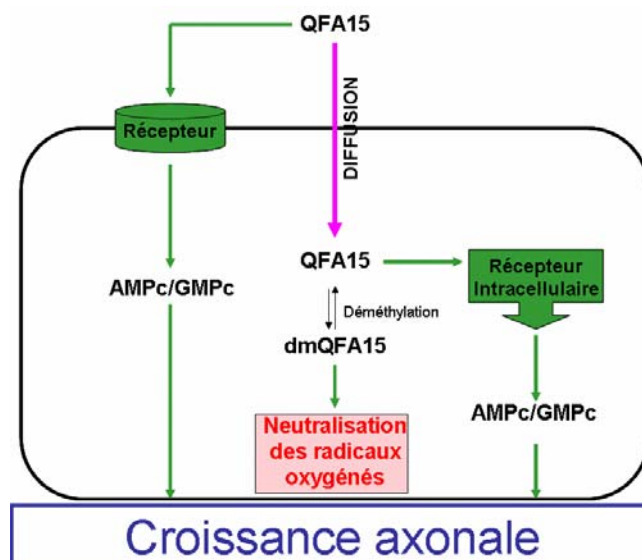


Schéma 9 : Mode d'action double du QFA15. Que sa cible moléculaire soit intra- ou extracellulaire, le QFA15 est capable de diffuser dans la cellule où il sera déméthylé par des enzymes intracellulaires spécialisées. Ainsi il sera capable de neutraliser les radicaux libres oxygénés présents au sein de la cicatrice gliale tout en maintenant sa capacité de promouvoir la croissance axonale.

Une autre question qui se soulève d'après cette étude, consiste en la métabolisation du QFA15 ainsi que son mode d'administration. En effet, le composé sous sa présente forme, très lipophile, aurait du mal à être administré notamment par voie systémique. De ce fait, la synthèse de dérivés plus hydrophiles tels que des dérivés phosphatés est envisagée. Le groupement phosphate ainsi greffé sur le composé serait pris en charge par des phosphatases sanguines ou même intracellulaires pour libérer le QFA15 sous sa forme active. Par ailleurs, des modifications sur la chaîne ω -alcanol (groupement fluor ou hydroxyle en position β par rapport à l'alcool terminal) permettraient de stabiliser davantage le composé, le rendant ainsi moins propice à la métabolisation et la dégradation cellulaire.

V. CONCLUSION

La capacité antioxydante de nos produits a été évaluée par deux tests différents qui nous ont permis de conclure sur l'activité neuroprotectrice de nos composés. Les QFA, sous leur forme déméthylée, ont une activité antioxydante 100 fois supérieure à celle du Trolox®. Le groupement hydroxyle terminal de la chaîne ω -alcanol contribue d'un facteur 1000 dans cette activité.

Suite au screening de notre bibliothèque de QFA, nous avons pu conclure que le composé portant quinze atomes de carbone sur la chaîne latérale, le QFA15, est le composé le plus actif

sur la croissance axonale à des concentrations nanomolaires. La liaison carbone-carbone entre la sous-unité antioxydante et la sous-unité neurotrophique (ω -alcanol) est importante pour cette forte activité.

L'étude du QFA15 sur des milieux inhibiteurs tels que la myéline et la Sema3A a révélé que le composé est capable de restaurer des longueurs axonales normales. Une étude pharmacologique plus poussée nous a permis de proposer un mécanisme d'action potentiel du QFA15 qui passerait par des voies sollicitant les nucléotides cycliques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Kwon, Y.; Mrksich, M. Dependence of the Rate of an Interfacial Diels-Alder Reaction on the Steric Environment of the Immobilized Dienophile: An Example of Enthalpy-Entropy Compensation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 806-812.
- (2) Bhatt, M. V.; El-Morey, S. S. Silicon Tetrachloride/Sodium Iodide as a Convenient and Highly Regioselective Ether Cleaving Reagent. *Synthesis* **1982**, 1048-1050.
- (3) Vickery, E. H.; Pahler, L. F.; Eisenbraun, E. J. Selective O-Demethylation of Catechol Ethers. Comparison of Boron Tribromide and Iodotrimethylsilane. *J. Org. Chem* **1979**, *44*, 4444-4446.
- (4) Liu, H. H.; Brady, S. T. cAMP, tubulin, axonal transport, and regeneration. *Exp. Neurol.* **2004**, *189*, 199-203.
- (5) Cui, Q.; So, K. F. Involvement of cAMP in neuronal survival and axonal regeneration. *Anat. Sci. Int.* **2004**, *79*, 209-212.
- (6) Schmidt, H.; Werner, M.; Heppenstall, P. A.; Henning, M.; More, M. I. et al. cGMP-mediated signaling via cGKIalpha is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol* **2002**, *159*, 489-498.
- (7) Song, H. J.; Ming, G. L.; He, Z.; Lehmann, M.; McKerracher, L. et al. Conversion of Neuronal Growth Cone Responses from Repulsion to Attraction by Cyclic Nucleotides. *Science* **1998**, *281*, 1515-1518.

Chapitre IV :
Synthèses
supportées

I. INTRODUCTION

Les résultats biologiques très prometteurs obtenus avec le QFA15, ainsi qu'avec d'autres molécules hybrides noyau antioxydant / ω -alcanol, synthétisées au laboratoire (schéma 1), nous ont permis de conclure quant à l'utilité de la chaîne ω -alcanol³ pour l'activité neurotrophique de nos composés.

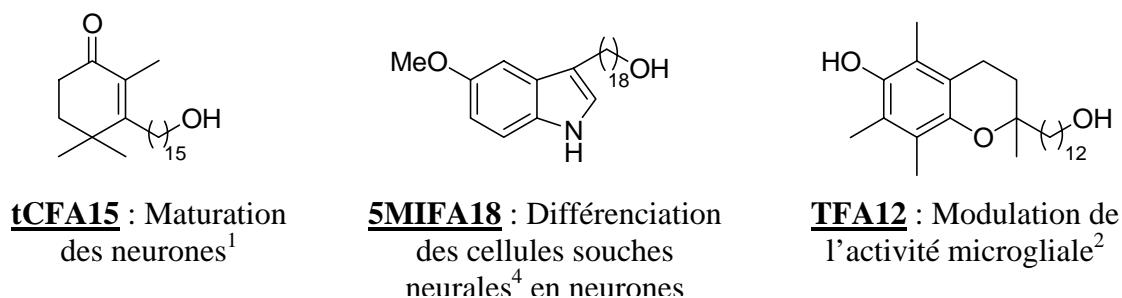


Schéma 1 : Composés hybrides ω -alcanols actifs au sein du SNC

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la synthèse combinatoire de produits hybrides similaires, en faisant varier le cycle aromatique. Ainsi, une résine appropriée, portant une chaîne ω -alcanol réactive réagirait avec une multitude de noyaux aromatiques antioxydants ou portant d'autres activités biologiques intéressantes (schéma 2). L'effet synergique de nos molécules hybrides étant déjà démontré, nous pouvons ainsi obtenir de nouvelles structures portant des activités biologiques similaires ou nouvelles. Un clivage de la résine, en fin de réaction, donnerait ainsi de nouveaux produits suffisamment purs pour être testés en milieu biologique.

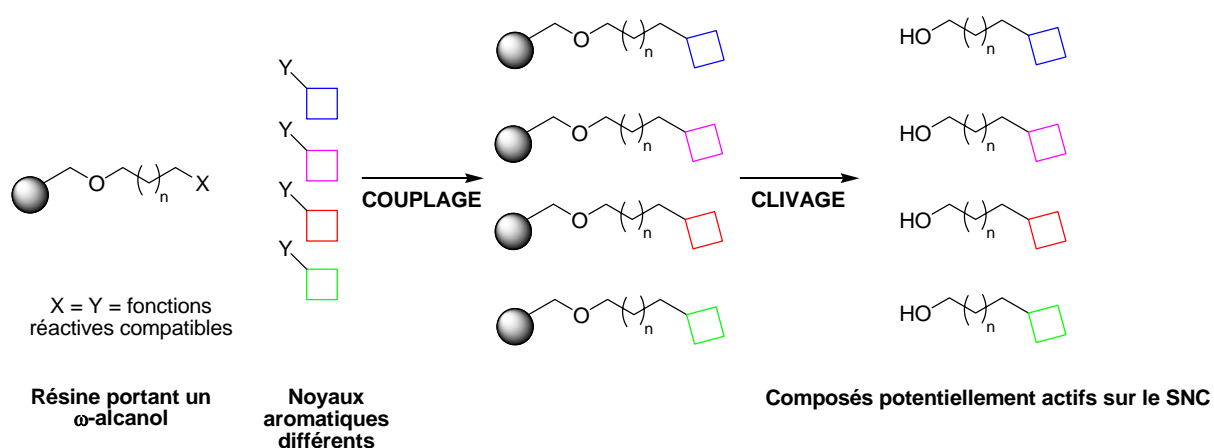


Schéma 2 : Principe de la synthèse parallèle pour l'obtention de composés hybrides neurotrophiques

Le but de ce travail n'est en aucun cas la synthèse de nouveaux composés hybrides. Il s'agit uniquement de mettre au point une synthèse supportée capable de subvenir aux besoins croissants de produits actifs. Nous nous sommes donc proposés d'effectuer dans un premier temps la synthèse du QFA15 sur support solide. L'étape clé étant un couplage de Sonogashira, nous avons tenté de substituer une résine par un alcyne vrai.

II. SYNTHÈSE SUPPORTÉE DES QFA C-ALKYLES

A. Rappels bibliographiques

Le couplage de Sonogashira effectué sur support solide est largement décrit dans la littérature depuis le début des années 90 et ce sur des résines de structures diverses et variées⁵ (schéma 3).

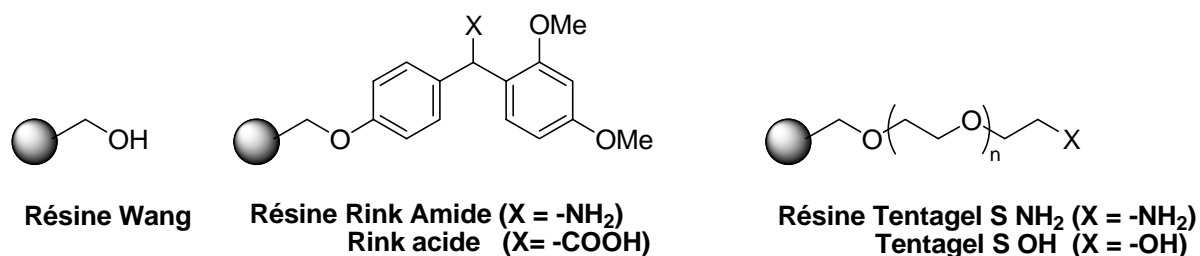


Schéma 3 : Résines couramment utilisées pour les couplages au palladium

Nous citerons trois exemples de couplage de Sonogashira effectués sur des résines différentes et donnant des produits structurellement différents.

Fancelli et coll.⁶ ont effectué la synthèse sur support solide de benzofuranes substitués en position 2 via un couplage de Sonogashira (schéma 4) et ce sur support Tentagel S OH.

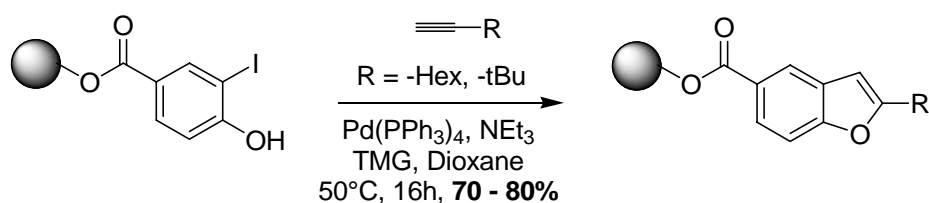


Schéma 4 : Couplage de Sonogashira sur support Tentagel S OH.

Malgré les rendements globaux moyens obtenus allant de 45% à 65%, la pureté des produits finaux avoisinait les 90%.

Dans une approche similaire, Zhang et coll.⁷ ont effectué la synthèse de différents indoles substitués en position 2 via un couplage de Sonogashira, et cette fois-ci sur une résine Rink amide (schéma 5).

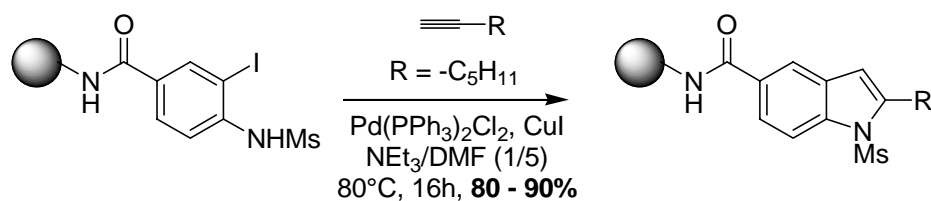


Schéma 5 : Couplage de Sonogashira sur résine Rink amide

Les rendements de couplage ainsi que la pureté des produits étaient compris entre 80% et 90%.

Enfin, l'équipe de Xu⁸ a décrit en 2001 un couplage similaire, en utilisant une résine Wang. Leur but était la synthèse d'inhibiteurs de la reverse transcriptase de HIV-1 (schéma 6).

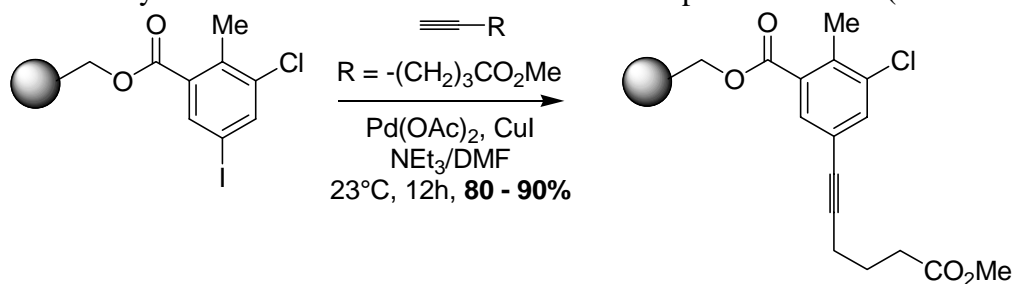


Schéma 6 : Couplage de Sonogashira sur résine Wang.

Il est important de noter que tout type de couplage au palladium est réalisable sur support solide à condition que la réaction de couplage soit préalablement mise au point en phase liquide.

Il est surprenant de voir que dans la littérature^{5,9,10} la plupart des couplages décrits mettent en jeu un aryl-halogénure supporté et un alcyne vrai libre. Dans notre cas, cette possibilité n'est pas envisageable. En effet, comme le présente le schéma 7, greffer des noyaux aromatiques différents sur une résine serait une trop grande dépense d'énergie et d'argent puisqu'il faudrait synthétiser une multitude de réactifs supportés.

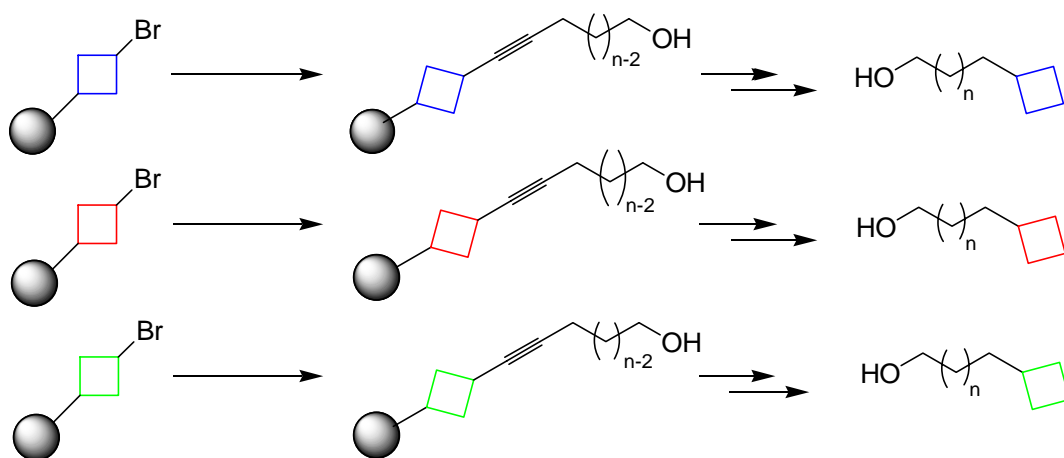


Schéma 7 : Synthèse parallèle utilisant des noyaux aromatiques supportés

A l'inverse, une synthèse parallèle avec la chaîne ω -alcanol supportée serait moins coûteuse et plus simple à mettre en œuvre puisque ce nous cherchons à faire varier la nature du noyau aromatique en conservant la chaîne ω -alcanol (schéma 8).

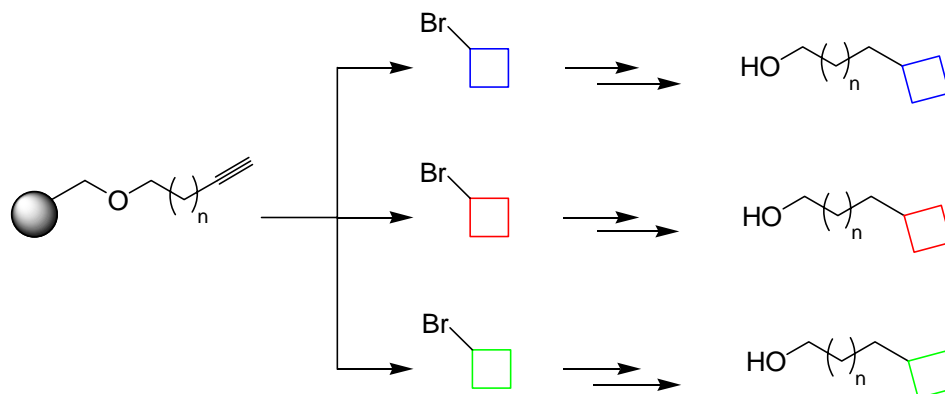


Schéma 8 : Synthèse parallèle utilisant des chaînes ω -alcanols supportées

B. Synthèse des QFA C-alkylés

1. Schéma rétrosynthétique

Nous nous sommes donc proposés de synthétiser le QFA15 sur support solide, par le biais d'un couplage de Sonogashira catalysé au Pd(0). Le couplage s'effectue entre le 1-bromo-2,5-diméthoxybenzène et l'alcyne vrai supporté (schéma 9).

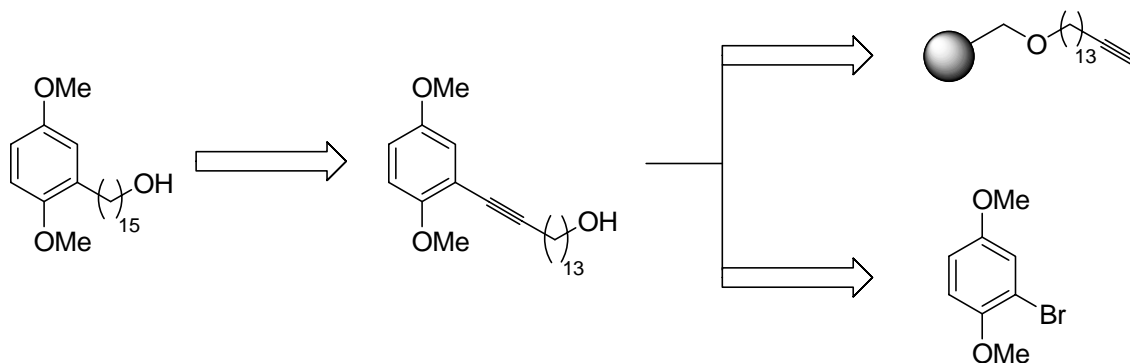


Schéma 9 : Schéma rétrosynthétique

Nous allons décrire dans un premier temps la synthèse de l'alcyne vrai supporté, puis le couplage de Sonogashira et enfin la coupure de la résine et la réduction de la triple liaison.

2. Synthèse de l'alcyne vrai supporté

Dans un premier temps, il a fallu mettre au point la réaction de couplage entre la résine Wang et le 1-bromo-tridecan-13-ol. Trois méthodes s'offraient à nous :

- l'utilisation du bromoalcool comme nucléophile en formant l'alcoolate,
- l'utilisation de la résine Wang comme nucléophile en formant l'alcoolate benzylique,
- la réaction de Mitsunobu.

a. Résine en tant que nucléophile

Pour effectuer cette réaction, nous avons formé l'alcoolate benzylique sur la résine Wang dans le THF avec de l'hydruure de sodium. Cet anion est ensuite mis en présence de bromoalcool et chauffé à reflux pendant 24h (schéma 10).

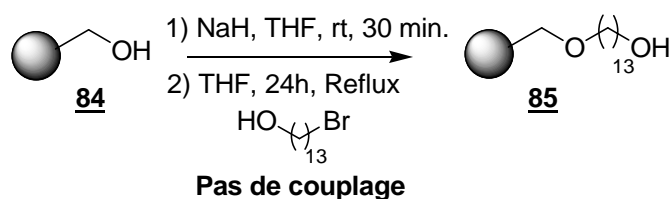


Schéma 10 : Utilisation de la résine Wang en tant que nucléophile

Cette même réaction effectuée dans le DMF a donné des résultats similaires. Ces résultats négatifs nous ont amenés à revoir la procédure de couplage.

b. Réaction de Mitsunobu

Une méthode couramment utilisée pour greffer des petites molécules sur la résine Wang consiste à effectuer un couplage de type Mitsunobu⁹. Cette réaction présentée sur le schéma 11 n'a pas donné de résultats satisfaisants puisque nous n'obtenons pas le produit de couplage.

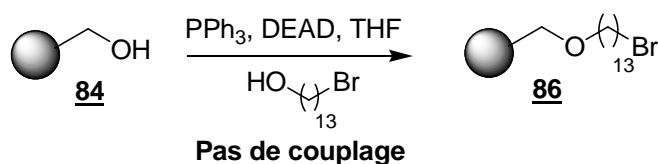


Schéma 11 : Couplage type Mitsunobu

c. Résine en tant qu'électrophile

Nos diverses tentatives mettant en jeu une résine de type nucléophile ayant échoué, nous avons essayé d'utiliser une résine électrophile de type Merrifield¹¹. Celle-ci est obtenue par bromation de la résine Wang dans le dichlorométhane (schéma 12).

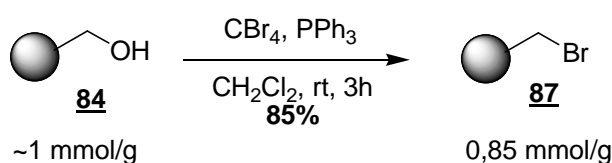


Schéma 12 : Synthèse de la résine de Merrifield

Le suivi de la réaction est assuré par infrarouge en visualisant la disparition de l'alcool. La charge de la résine de Merrifield obtenue est évaluée par analyse élémentaire en comparant avec la résine Wang de départ.

D'après les travaux de Hanessian¹², une autre façon d'obtenir des éthers à partir de la résine Wang, consiste à passer par un intermédiaire trichloroacétamdate de manière à activer la résine. Le couplage entre cette résine trichloroacétamdate et un alcool se fait simplement et avec de bons rendements en présence d'un acide de Lewis. L'application de cette méthode nous a permis d'obtenir notre résine activée avec un bon rendement de 67% (schéma 13).

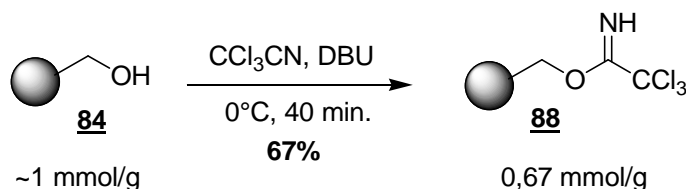


Schéma 13 : Activation de la résine Wang

Le couplage de notre bromoalcool sur les deux résines électrophiles ainsi obtenues, a été effectué avec succès (schéma 14).

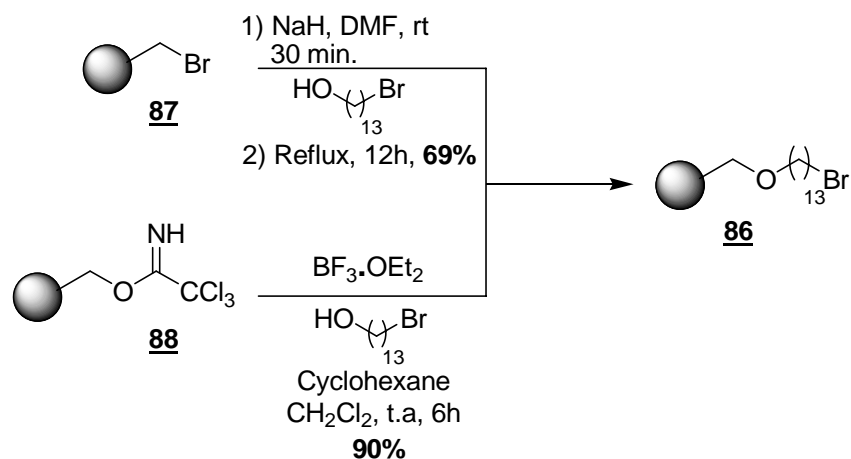


Schéma 14 : Couplage entre le 1-bromo-triden-13-ol et la résine électrophile

Ces deux méthodes d'obtention du bromoalcool voulu se sont révélées aussi efficaces l'une que l'autre, avec des rendements sur les deux étapes d'activation et de couplage avoisinant les 65% dans les deux cas.

Cependant si on considère la facilité de mise en place de la réaction, les réactifs utilisés et les temps de couplage, il apparaît que la voie la plus satisfaisante est celle mettant en œuvre l'activation de la résine Wang par un trichloroacétamdate.

3. Synthèse

Nous avons par la suite procédé à la synthèse du QFA15 comme décrite en solution (schéma 15).

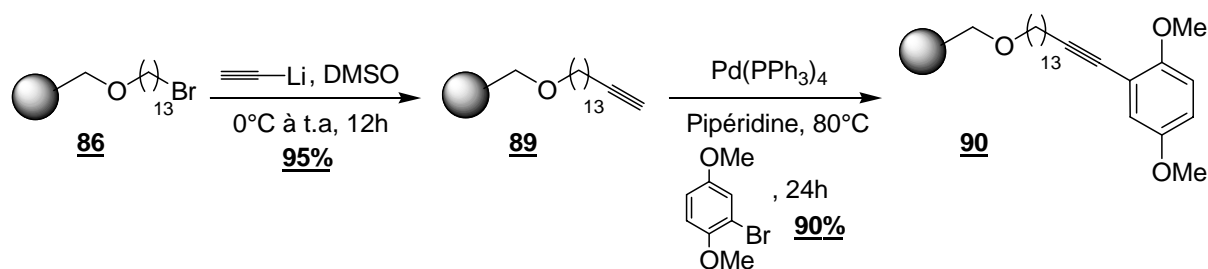


Schéma 15 : Synthèse supportée du QFA15

L'étape successive serait une hydrogénation catalytique qui permettrait non seulement la réduction de la triple liaison mais aussi le clivage de notre composé de la résine (schéma 16).

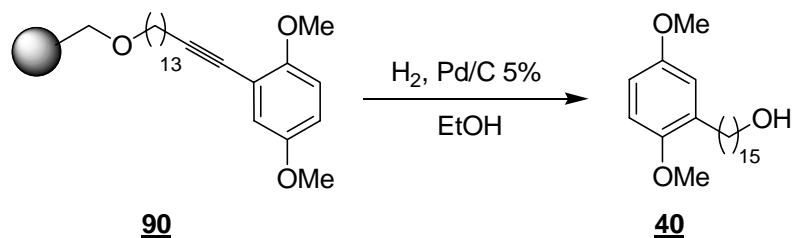


Schéma 16 : Hydrogénation catalytique sur le produit supporté

Malheureusement, nous n'avons jamais obtenu ni la réduction de la triple liaison, ni le clivage du produit. De plus, en fin de réaction, un lavage intense de la résine ne permet pas d'éliminer le catalyseur. Aussi, avons nous choisi de cliver le produit **90** de la résine avec de l'acide trifluoroacétique 10% dans le dichlorométhane. Une hydrogénation catalytique en solution nous a enfin permis d'obtenir le QFA15 avec un rendement global de 48% (schéma 16).

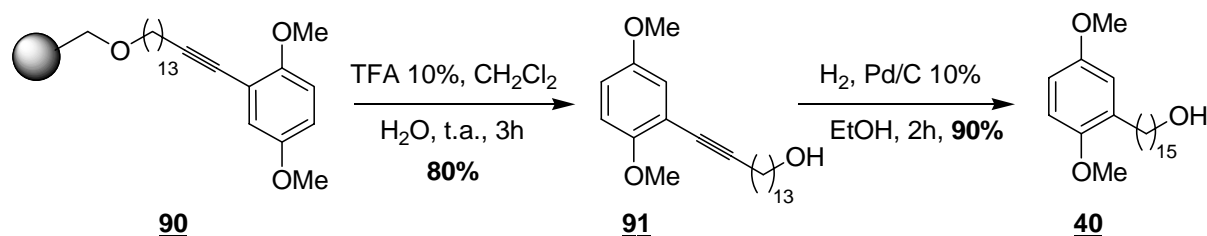


Schéma 16 : Coupure et hydrogénation

4. Récapitulatif

La synthèse du QFA15 a été effectuée en petite quantité sur la résine Wang. Il est important de noter que le rendement global de la synthèse supportée (37%) est comparable à celui de la synthèse en solution (51%) si l'on considère le nombre d'étapes plus élevé. Cette synthèse permettra d'obtenir par la suite de nouveaux composés hybrides.

III. SYNTHÈSE D'UN DERIVÉ ACIDE HYDROXAMIQUE

A. Propriétés biologiques des acides hydroxamiques

La fonction acide hydroxamique a une caractéristique chimique très utilisée en thérapeutique. En effet, un acide hydroxamique est capable de chélater des ions métalliques divalents tels que le Zn^{2+} ou le Mg^{2+} . Cette activité fait des dérivés des acides hydroxamiques de puissants inhibiteurs d'une famille de protéases, les métalloprotéases (MMPs).

Les MMPs sont des enzymes ubiquitaires dont le rôle est de digérer les protéines de la matrice extracellulaire des organismes supérieurs. Elles facilitent ainsi la mobilité cellulaire. De ce

fait, les MMPs ont été impliqués dans de nombreux processus pathologiques dont l'arthrite¹³, la croissance tumorale, la métastase¹⁴ et la sclérose en plaques¹⁵.

Un autre rôle important des ces acides hydroxamiques est leur capacité inhibitrice¹⁶ d'une classe d'enzymes appelée « histone désacétylases ». En bref, les histones sont des protéines basiques qui constituent, avec l'ADN qui s'enroule autour, le nucléosome. Cet enroulement se fait par attraction électrostatique entre les charges positives des résidus lysines des histones et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN. Une acétylation des résidus lysine des queues N-terminales des histones rompt cette attraction permettant ainsi un déroulement de l'ADN¹⁷. Les histones désacétylases (DHAC) ont pour rôle d'ôter les groupements acétates permettant de nouveau le compactage de l'ADN (schéma 17).

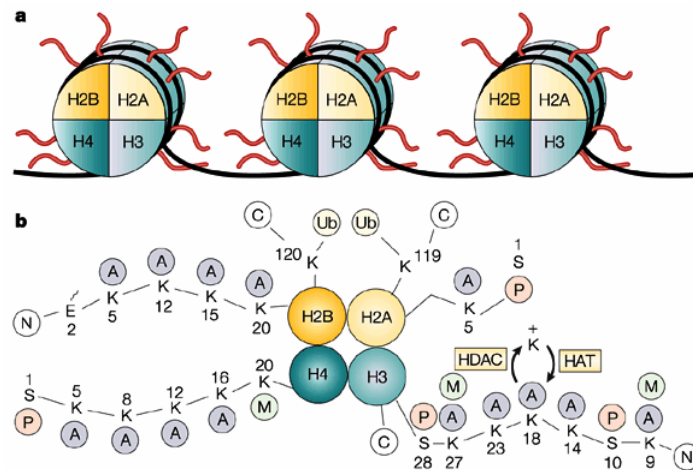


Schéma 17 : Représentation schématique des nucléosomes. a) Le nucléosome est constitué un complexe d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) représentés en deux exemplaires, et d'ADN qui s'enroule autour de l'octamère d'histones. b) Composition de la queue N-terminale des histones. Chaque histone est terminée par une queue N-terminale riche en résidus lysines (K). Ce sont des sites potentiels d'acétylation/désacétylation par les Histones AcétylTransférases (HAT) et les Histones Désacétylases (DHAC). L'acétylation neutralise les charges positives portées par les lysines. A : acétyl, M : méthyl, C : C-terminal, N : N-terminal, P : phosphate, Ub : ubiquitine.

Il a récemment été montré que certains acides hydroxamiques tels que le SAHA ou le M344 (schéma 18) ont la capacité de réguler l'activation microgliale¹⁸. Hockly et coll. ont aussi montré que le suberoylanilide hydroxamate (schéma 18) est capable d'améliorer le déficit moteur de souris atteintes par la maladie de Huntington¹⁹.

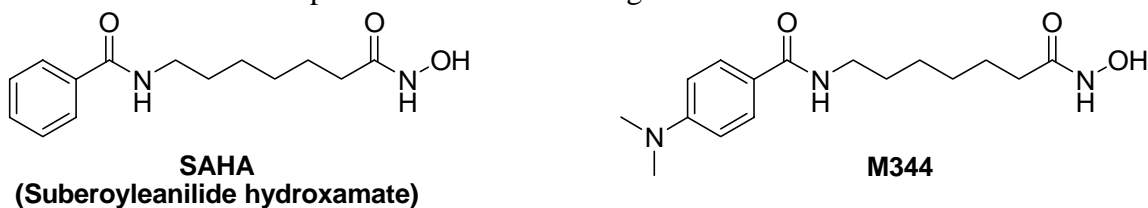


Schéma 18 : Hydroxamates actifs au sein du SNC

De même, l'inhibition des DHAC est actuellement en cours d'évaluation pour les traitements anti-cancéreux. En effet, l'acétylation des histones provoque un relâchement partiel de l'ADN constituant le nucléosome. Ce relâchement permet ainsi aux enzymes de la machinerie transcriptionnelle de la cellule d'atteindre certains promoteurs de gènes et permet ainsi l'expression de ceux-ci²⁰ (schéma 19).

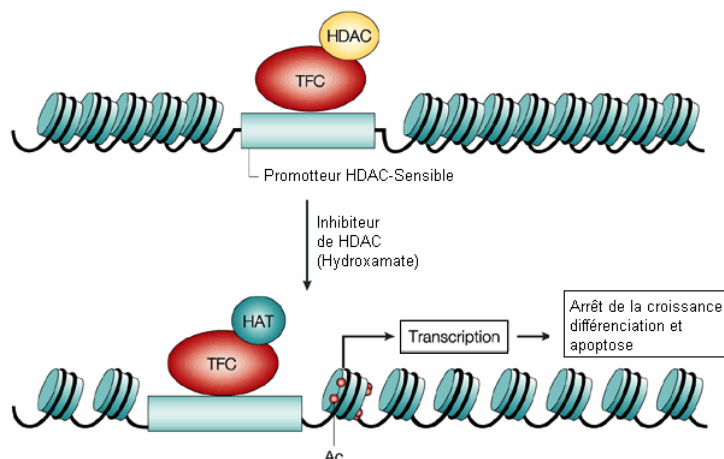


Schéma 19 : Mécanisme d'action possible des inhibiteurs de DHAC. Le relâchement de l'ADN provoqué par l'acétylation est à l'origine du recrutement de complexes de facteurs de transcription (TFC), ce qui entraîne une augmentation de la transcription. Ceci conduit à différents phénomènes cellulaires.

Il a ainsi été montré que l'inhibition des DHAC est à l'origine de l'arrêt de la croissance cellulaire et de la différenciation des cellules cancéreuses. Elle permet aussi de stimuler sur ces mêmes cellules le phénomène de mort cellulaire programmée, connue sous le nom d'apoptose.

La fonction active des inhibiteurs d'histones désacétylases étant la fonction acide hydroxamique terminale, nous nous sommes proposés de synthétiser un analogue du QFA15, le QFH15 (schéma 20), ayant en partie terminale cette fonction chélatrice des cations divalents.

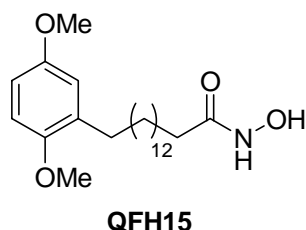


Schéma 20 : QFH15 : Quinol Fatty Hydroxamate

B. Rappels bibliographiques

La synthèse d'acide hydroxamique se fait en général à partir d'un acide carboxylique, activé ou pas, sur lequel est mise à réagir l'hydroxylamine. L'équipe d'Hanessian²¹ a effectué la synthèse de *N*-aryl sulfonyl homocystéine hydroxamate en tant qu'inhibiteur des MMPs (schéma 21). L'obtention de la fonction acide hydroxamique se fait avec des rendements moyens de 31 à 62%.

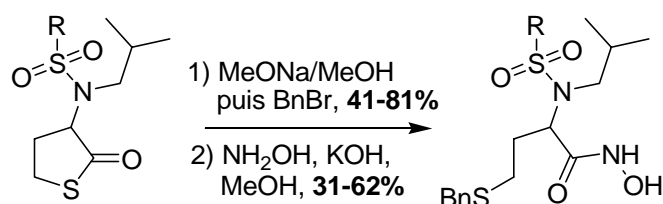


Schéma 21 : Synthèse d'hydroxamate à partir d'un ester méthylique

Une méthode simple pour obtenir des hydroxamates a été décrite par Sekar Reddy et coll.²². Celle-ci consiste en la synthèse d'un anhydride suivi de l'ajout d'hydroxylamine (schéma 22). L'hydroxamate est ainsi obtenu avec de bons rendements variant de 80 à 95%.

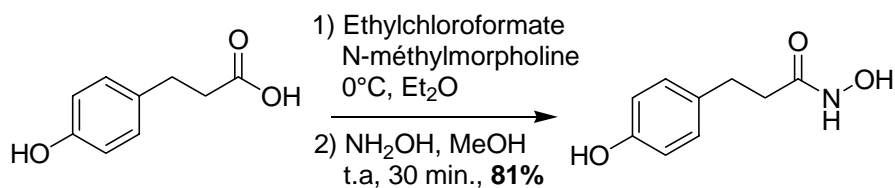


Schéma 22 : Méthode de Sekar Reddy

Une autre méthode très utilisée pour obtenir des acides hydroxamiques avec de bons rendements, consiste en l'utilisation d'une résine hydroxylamine. Comme le décrit Salvino et coll.²³, cette synthèse permet d'obtenir des acides hydroxamiques très différents (schéma 23).

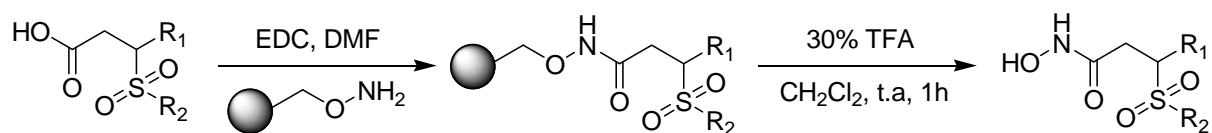


Schéma 23 : Synthèse d'acides hydroxamiques sur support solide

C. Synthèse effectuée

1. Oxydation de l'alcool primaire

Pour pouvoir synthétiser le QFH15, il faut avoir une fonction acide en remplacement de la fonction alcool terminale (schéma 24). Pour ce faire, la méthode la plus simple consiste en l'oxydation du QFA15.

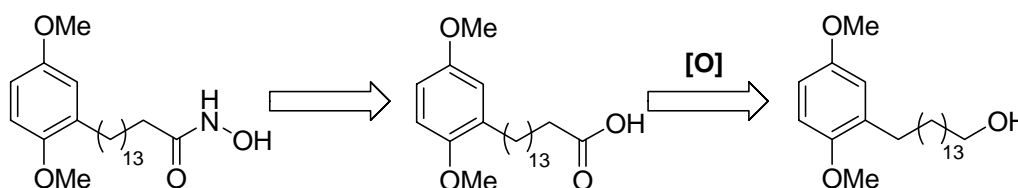


Schéma 24 : Rétrosynthèse

Dans cet objectif, nous pouvons procéder de deux façons différentes :

- soit oxyder l'alcool directement en acide,
- soit oxyder dans un premier temps l'alcool en aldéhyde puis l'aldéhyde en acide (schéma 25).

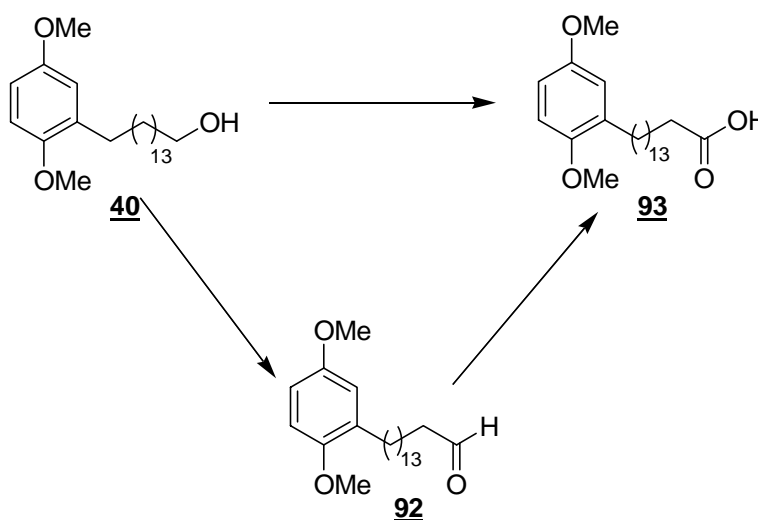


Schéma 25 : Oxydation du QFA15

a. Oxydation en une étape

Nous avons essayé d'oxyder le QFA15 directement en acide carboxylique en utilisant du pyridinium dichromate (entrée 1), du pyridinium dichromate supporté (entrée 2), du pyridinium chlorochromate (entrée 3) et du trichlorure de ruthénium²⁴ (entrée 4) (tableau 1).

Entrée	Substrat	Réactif	Solvant	Rendement
1	QFA15	PDC	DMF	Ø
2	QFA15	PV-PDC	DMF	Ø
3	QFA15	PCC	CH ₂ Cl ₂	25%
4	QFA15	RuCl ₃ , TCCA, nBu ₄ Br, K ₂ CO ₃	CH ₃ CN/H ₂ O	Dégradation

Tableau 1 : Oxydation du QFA15 directement en acide carboxylique

Aucun des essais effectués n'a donné les résultats escomptés. En effet, l'inactivité du PDC sur notre produit nous a conduit à utiliser le PCC qui a donné le produit voulu avec des rendements très faibles. Nous avons donc tenté d'oxyder le QFA15 avec du Ru(III) mais sans succès. Nous avons donc décidé de procéder en deux temps en passant par l'aldéhyde comme intermédiaire.

b. Oxydation en deux étapes

L'oxydation du QFA15 en aldéhyde a été réalisée sans problème par oxydation au TPAP/NMO (entrée 5) ou par oxydation de Swern (entrée 6) (tableau 2).

Entrée	Substrat	Réactif	Solvant	Rendement
5	QFA15	TPAP / NMO	CH ₂ Cl ₂	45%
6	QFA15	(COCl) ₂ , DMSO, NEt ₃	THF	95%

Tableau 2 : Oxydation du QFA15 en aldéhyde

L'oxydation du QFA15 par le tetrapropylammonium perruthénate²⁵ n'étant pas très efficace, nous avons opté pour une oxydation de Swern, ce qui nous a permis d'obtenir quasi quantitativement l'aldéhyde escompté.

Cependant, l'oxydation de l'aldéhyde en acide carboxylique nous a posé quelques problèmes puisque seuls des oxydants doux étaient envisageables, les oxydants forts pouvant réagir avec le cycle aromatique de l'aldéhyde comme observé plus haut. Les essais effectués sont présentés dans le tableau 3.

Entrée	Substrat	Réactif	Solvant	Rendement
7	QFA15	mCPBA	CH ₂ Cl ₂	55%
8	QFA15	Ag ₂ O, NaOH	H ₂ O	Dégradation
9	QFA15	PDC	MeOH/DMF	Dégradation
10	QFA15	PV-PDC	MeOH/DMF	∅
11	QFA15	Oxone [®]	CH ₃ CN	75%
12	QFA15	Oxone [®]	DMF	95%

Tableau 3 : Oxydation de l'aldéhyde en acide carboxylique

L'oxydation par le mCPBA²⁶ (entrée 7) nous a permis d'obtenir des quantités suffisantes d'acide carboxylique. Cependant, le rendement de 55% ainsi que les problèmes de purification rencontrés nous ont guidés vers des oxydations différentes. Nous avons ainsi tenté d'oxyder avec du Ag₂O en milieu basique²⁷ (entrée 8). Nous n'avons en effet obtenu que des produits de dégradation. L'utilisation de PDC²⁸ (entrée 9) a elle aussi conduit à une dégradation, alors que son homologue supporté est quant à lui inactif (entrée 10). Finalement, il s'est avéré que la méthode la plus efficace est l'utilisation d'Oxone^{®29} (KHSO₅) (entrée 11 et 12) puisqu'elle nous mène à une conversion quasi totale de l'aldéhyde en acide carboxylique.

2. Synthèse de la résine hydroxylamine

La synthèse de la résine hydroxylamine à partir de la résine Wang a été effectuée selon la description de Floyd et coll³⁰ (schéma 26).

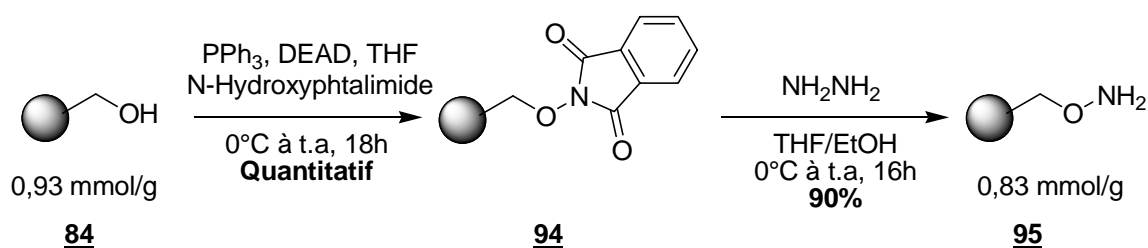


Schéma 26 : Synthèse de la résine hydroxylamine

Le composé **94** a été caractérisé par spectroscopie IR en notant les bandes caractéristiques du carbonyle à 1606 cm⁻¹ et 1727 cm⁻¹. La résine hydroxylamine **95** a également été caractérisée par IR où nous avons noté la disparition des bandes du carbonyle. La charge de la résine obtenue, ainsi que le rendement de la réaction, ont été quantifiés par analyse élémentaire.

3. Couplage – coupure

Nous avons ensuite procédé au couplage entre le composé **93** et la résine hydroxylamine **95**. Dans la littérature, cette réaction est réalisée en présence de EDC dans le DMF²³. Nous avons utilisé un agent de couplage plus efficace, le benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate ou BOP (schéma 27) en présence de DIEA selon les travaux de Seyer et coll³¹.

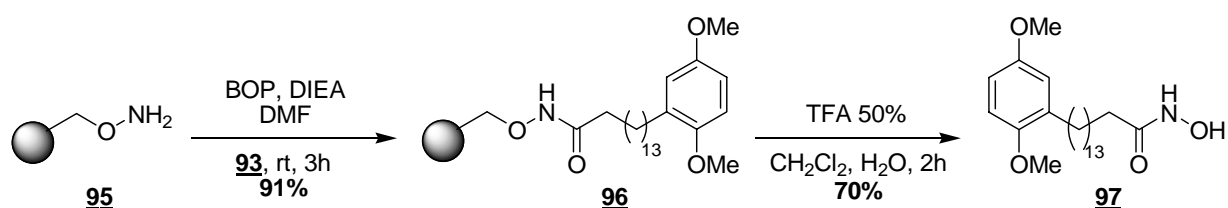


Schéma 27 : Synthèse du QFH15

La coupure de l'hydroxamate de la résine se fait en présence de TFA à 50% dans le dichlorométhane. Le produit **97** ainsi obtenu est caractérisé par RMN et spectrométrie de masse.

IV. CONCLUSION

Nous avons effectué la synthèse supportée du QFA15 en greffant un alcyne vrai de longueur de chaîne appropriée sur la résine Wang préalablement activée en trichloroacétamidate. Le couplage de Sonogashira, la coupure de la résine et l'hydrogénation catalytique n'ont posé aucun problème. Nous pouvons ainsi reproduire cette même synthèse en faisant varier la nature de l'arylbromure, ce qui nous permettrait d'obtenir facilement de nombreux composés neurotrophiques de nature différente.

Nous avons également mis au point la synthèse supportée de dérivés hydroxamates à partir du QFA15. Dans ce cas, une oxydation préalable de l' ω -alcanol en acide carboxylique est nécessaire. La synthèse de la résine hydroxylamine à partir de la résine Wang est alors suivie du couplage de l'acide carboxylique sur cette dernière, puis par une coupure en milieu acide de manière à générer l'hydroxamate escompté.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

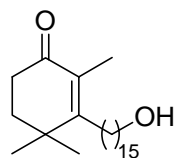
- (1) Girlanda-Junges, C.; Keyling-Bilger, F.; Schmitt, G.; Luu, B. Effect of cyclohexenonic long-chain fatty alcohols on neurite outgrowth. Study on structure-activity relationship. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7735-7748.
- (2) Muller, T.; Grandbarbe, L.; Morga, E.; Heuschling, P.; Luu, B. Tocopherol long chain fatty alcohols decrease the production of TNF-alpha and NO radicals by activated microglial cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 6023-6026.
- (3) Borg, J.; Toazara, J.; Hietter, H.; Henry, M.; Schmitt, G. et al. Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons. *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 406-410.
- (4) Coowar, D.; Bouissac, J.; Hanbali, M.; Paschaki, M.; Mohier, E. et al. Effects of indole fatty alcohols on the differentiation of neural stem cell derived neurospheres. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6270-6282.
- (5) Bräse, S.; Kirchoff, J. H.; Köbberling, J. Palladium-catalysed reactions in solid phase organic synthesis. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 885-939.
- (6) Fancelli, D.; Fagnola, M. C.; Soverino, D.; Bedeschi, A. Solid Phase Synthesis of 2-Substituted Benzofurans via the Palladium-catalysed Heteroannulation of Acetylenes. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2311-2314.
- (7) Zhang, H. C.; Brumfield, K. K.; Jaroskova, L.; Maryanoff, B. E. Facile Substitution of Resin-Bound Indoles via the Mannich Reaction. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4449-4452.
- (8) Xu, G. Z.; Loftus, T. L.; Wargo, H.; Turpin, J. A.; Buckheit, R. W. et al. Solid-Phase Synthesis of the Alkenyldiarylmethane (ADAM) Series of Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5958-5964.
- (9) Thompson, L. A.; Ellman, J. A. Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- (10) Sammelson, R. E.; Kurth, M. J. Carbon-Carbon Bond-Forming Solid-Phase Reactions. Part II. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 137-202.
- (11) James, I. W. Linkers for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- (12) Hanessian, S.; Xie, F. Polymer-bound p-alkoxybenzyl trichloroacetimidates: Reagents for the protection of alcohols as benzyl ethers on solid-phase. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 733-736.
- (13) Firestein, G. S.; Paine, M. M.; Littman, B. H. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis. Rheum.* **1991**, *34*, 1094-1105.
- (14) Pyke, C.; Ralfkiaer, E.; Huhtala, P.; Hurskainen, T.; Dano, K. et al. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 1336-1341.
- (15) Gijbels, K.; Galardy, R. E.; Steinman, L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 2177-2182.
- (16) Monneret, C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1-13.
- (17) Marks, P. A.; Rifkind, R. A.; Richon, V. M.; Breslow, R.; Miller, T. et al. Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies. *Nature Reviews, Cancer* **2001**, *1*, 194-202.

- (18) Suuronen, T.; Huuskonen, J.; Pihlaja, R.; Kyrylenko, S.; Salminen, A. Regulation of microglial inflammatory response by histone deacetylase inhibitors. *J. Neurochem.* **2003**, *87*, 407-416.
- (19) Hockly, E.; Richon, V. M.; Woodman, B.; Smith, D. L.; Zhou, X. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, *100*, 2041-2046.
- (20) Somech, R.; Izraeli, S.; Simon, A. J. Histone deacetylase inhibitors - a new tool to treat cancer. *Cancer Treatment Reviews* **2004**, *30*, 461-472.
- (21) Hanessian, S.; Moitessier, N.; Gauchet, C.; Viau, M. *N*-Aryl Sulfonyl Homocysteine Hydroxamate Inhibitors of Matrix Metalloproteinases: Further Probing of the S₁, S₁' and S₂' Pockets. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3066-3073.
- (22) Sekar Reddy, A.; Suresh Kumar, M.; Ravindra Reddy, G. A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6285-6288.
- (23) Salvino, J. M.; Mathew, R.; Kiesow, T.; Narensingh, R.; Mason, H. J. et al. Solid-phase synthesis of an arylsulfone hydroxamate library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1637-1640.
- (24) Yamaoka, H.; Moriya, N.; Ikunaka, M. A Practical RuCl₃-Catalyzed Oxidation Using Trichloroisocyanuric Acid As a Stoichiometric Oxidant under Mild Nonacidic Conditions. *Org. Proc. Res. & Dev.* **2004**, *8*, 931-938.
- (25) Ley, S. V.; Norman, J.; Griffith, W. P.; Marsden, S. P. Tetrapropylammonium Perruthenate, Pr₄N⁺RuO₄⁻, TPAP: A Catalytic Oxidant for Organic Synthesis. *Synthesis* **1994**, 639-666.
- (26) Lehtinen, C.; Nevalainen, V.; Brunow, G. Experimental and Computational Studies on Substituent Effects in Reactions of Peracid-Aldehyde Adducts. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9375-9382.
- (27) Baldwin, J. E.; Black, K. A. Complete kinetic analysis of thermal stereomutations among the eight 2,3-dideuterio-2-(methoxymethyl)spiro[cyclopropane-1,1'-indenes]. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1029-1040.
- (28) O'Connor, B.; Just, G. A new method for the conversion of aldehydes to methyl esters using pyridinium dichromate and methanol in dimethylformamide. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 3235-3236.
- (29) Travis, B. R.; Sivakumar, M.; Hollist, G. O.; Borhan, B. Facile Oxidation of Aldehydes to Acids and Esters with Oxone. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1031-1034.
- (30) Floyd, C. D.; Lewis, C. N.; Patel, S. R.; Whittaker, M. A Method for the Synthesis of Hydroxamic Acids on Solid Phase. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *36*, 8045-8048.
- (31) Seyer, R.; Aumelas, A.; Caraty, A.; Rivaille, P.; Castro, B. Repetitive BOP coupling (REBOP) in solid phase peptide synthesis. Luliberin synthesis as model. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 465-472.

Conclusion et perspectives

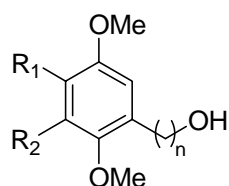
Les objectifs de ce travail de thèse étaient :

1. évaluer l'activité du tCFA15 sur un modèle de la croissance axonale,

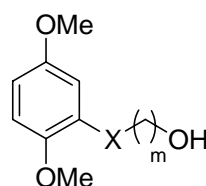


tCFA15

2. synthétiser une nouvelle classe de molécules hybrides quinol / ω-alcanol : les alcools gras quinoliques dont la structure est représentée ci-dessous :



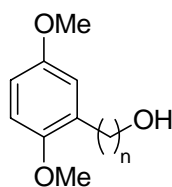
R₁, R₂ = H ou OMe
n = 12, 14, 15, 16, 18



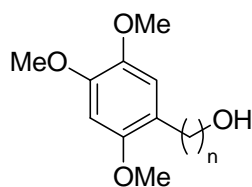
X = O ou NH
m = 10, 12, 14, 16

3. évaluer l'activité antioxydante de nos composés hybrides ainsi que leur capacité à induire une croissance axonale normale,
4. au vu des résultats biologiques très prometteurs obtenus, mettre au point une méthode de synthèse sur support solide pour obtenir de nouveaux composés portant des activités similaires.

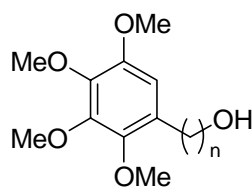
I. SYNTHESE ORGANIQUE



QFA



Q₃FA



Q₄FA

n = 12, 14, 15, 16, 18

Schéma 1 : Alcools gras quinoliques synthétisés

Trois séries d'alcools gras quinoliques C-alkylés (schéma 1) ont été synthétisés à partir des noyaux benzéniques poly-méthoxylés correspondants. La greffe de la chaîne ω-alcanol se fait par un couplage de Sonogashira entre l'arylbromure correspondant et l'alcyne vrai ω-hydroxybenzylé. Les aryl-bromures sont synthétisés par bromation des poly-

méthoxybenzènes correspondants. Les alcynes vrais quant à eux sont synthétisés à partir de diols monobromés puis benzylés sur le groupement hydroxy-terminal.

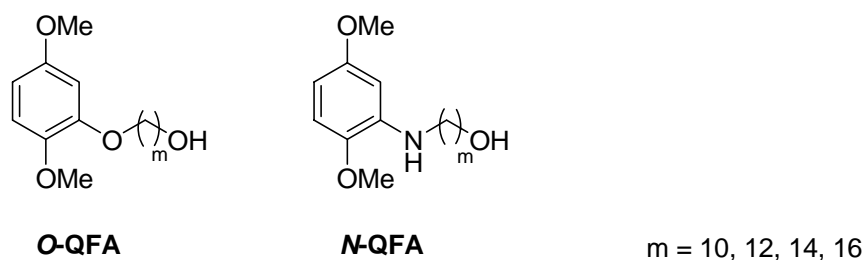


Schéma 2 : Alcools gras quinoliques O- et N-alkylés

Deux séries d'alcools gras quinoliques O/N-alkylés (schéma 2) ont été synthétisés à partir de phénol ou d'aniline diméthoxylés. La greffe de la chaîne ω -alcanol se fait par S_N2 avec des bromoalcools protégés ou pas.

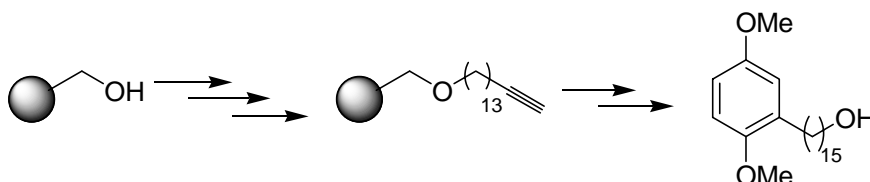


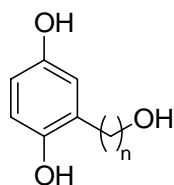
Schéma 3 : Synthèse supporté du QFA15

L'activité biologique particulièrement intéressante du QFA15, ainsi que celles d'autres composés hybrides synthétisés au laboratoire, nous a conduit à adapter notre synthèse sur support solide. De cette manière, nous pouvons obtenir une multitude de composés hybrides intéressants. Nous avons ainsi pu synthétiser le QFA15 à petite échelle (quantités suffisantes pour les tests biologiques) sur une résine Wang substituée par un alcyne vrai à 15 atomes de carbones.

II. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

Dans le but d'établir une relation structure activité, des tests d'évaluation de l'activité antioxydante et de la capacité à promouvoir la croissance axonale ont été effectués.

Les QFA, sous leur forme déméthylés (schéma 4), ont une activité antioxydante 100 fois supérieure à celle du Trolox®. Ceci confère à ces produits une grande capacité à contrer les radicaux libres, espèces néfastes pour les cellules nerveuses. La présence de la fonction hydroxyle terminale contribue à augmenter de 1000 fois l'activité neuroprotectrice de nos produits.



$$n = 12, 14, 15, 16, 18$$

Schéma 4 : QFA déméthylés

Parmi les composés testés sur le modèle *in vitro* de la croissance axonale, le QFA15 a montré l'activité la plus forte. Ses homologues O- ou N-alkylés ont des activités promotrices diminuées, ce qui suggère que la liaison carbone-carbone entre la sous unité trophique et la sous unité antioxydante est nécessaire à l'activité biologique. Ce composé est capable de promouvoir la croissance axonale de 181% par rapport aux conditions contrôles et ce à une concentration de 1 nM. En outre, il est capable de promouvoir cette même croissance sur des milieux très inhibiteurs.

Des études préliminaires du mode d'action du QFA15 ont montré que celui-ci agit en tandem avec les nucléotides cycliques intracellulaires. Ces observations permettent de dresser un schéma fonctionnel hypothétique quant à l'activité biologique du QFA15.

III. PERSPECTIVES

En chimie :

1. Synthétiser des analogues hydrosolubles du QFA15, notamment des analogues phosphorylés, pour les tests *in vivo*.
2. Synthétiser des analogues fluorescents ou radiomarqués du QFA15 en vue de sa localisation intracellulaire.

En biophysique :

1. Etudier l'interaction du QFA15 avec la membrane cellulaire, notamment par anisotropie de fluorescence.

En biologie :

1. Finir l'étude pharmacologique entamée sur le QFA15 pour mieux comprendre le mode d'action intracellulaire du composé
2. Conclure quant au mode d'action général des hybrides ω -alcanols au sein du SNC.

Partie expérimentale

Préparation des solvants et réactifs

Tous les solvants sont distillés sous argon sur un réactif approprié : benzophénone / sodium (THF, Et₂O), CaH₂ (CH₂Cl₂, NEt₃) ou achetés sur tamis moléculaire (DMF, DMSO). L'EtOH, la pipéridine et l'acétone sont utilisés sans distillation préalable.

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 flambé sous vide à l'aide d'un bec Bensen.

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 sous pression moyenne d'air comprimé (**chromatographie flash**).

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 fin de fusion.

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur plaques pré enduites de gel de silice 60F254 (épaisseur de la couche 0,25 mm). Après élution, les plaques sont révélées en UV (254 nm), à l'iode ou trempé dans une solution de vanilline (1 g/L) dans un mélange EtOH/H₂SO₄ (95/5, v/v), puis chauffées pendant quelques minutes sur une plaque chauffante (180-200°).

La rétention frontale (R_f) 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 ^1H)**

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Advance 300 (300 MHz) avec pour référence interne le résidu non deutéré du solvant utilisé (CDCl_3 : 7,26 ppm, CD_3OD : 3,34 ppm). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au signal du TMS. La description des spectres utilise les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé), dt (doublet détriplé). J est une constante de couplage exprimée en Hz.

- **Résonance magnétique nucléaire du carbone (RMN ^{13}C)**

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Advance 300 (75 MHz) avec pour référence interne le résidu non deutéré du solvant utilisé (CDCl_3 : 77,4 ppm, CD_3OD : 49,9 ppm). Les déplacements chimiques δ 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 ^{13}C vers le ^1H (séquence DEPT). Nous avons attribué les signaux par comparaisons 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.

- **Infra-rouge (IR)**

Les spectres sont réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer 881 FT-IR à partir de fines pastilles de KBr (confectionnées à partir d'une poudre homogène, contenant 1 mg du produit et 50 mg de KBr anhydre, compactée sous une presse). Les différentes absorptions (ν en cm^{-1}) sont déduites de ces spectres et les abréviations de leur intensité relative utilisées sont : s (strong : forte), m (medium : moyenne), w (weak : faible).

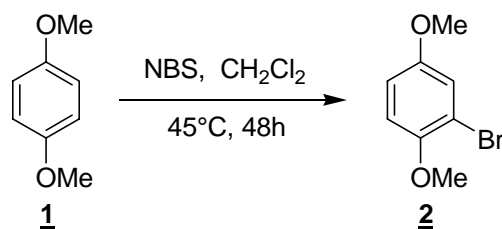
- **Ultra-Violet (UV)**

Les spectres sont obtenus sur un spectrophotomètre Safas Monaco, à l'aide de cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Le solvant utilisé est l'acétonitrile. De ces spectres sont déduites les longueurs d'ondes (λ en nm) ainsi que les coefficients d'extinction molaire (ϵ en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondants aux différents maxima des courbes.

- **Spectrométrie de masse**

Les spectres de masses sont mesurés sur un spectromètre MicroTOF Daltonics Electrospray et un spectromètre AutoSpecE FAB⁺ en introduction directe. Nous indiquons le pic moléculaire ainsi que sa masse exacte (HRMS).

Synthèse des QFA C-alkylés

2,5-diméthoxybromobenzène (2)

A une solution de *N*-bromosuccinimide (2,83 g ; 15,93 mmol ; 1,1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (72 mL) est ajouté le 1,4-diméthoxybenzène **1** (2,0 g ; 14,47 mmol, 1,0 éq.) puis le mélange est porté à reflux pendant 48h. Il est ensuite versé dans une solution saturée de NH₄Cl (100 mL) puis extrait 3 fois au CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (flash) (éluant hexane-AcOEt 9-1) pour donner 2,14 g d'une huile incolore.

Rendement : 68%

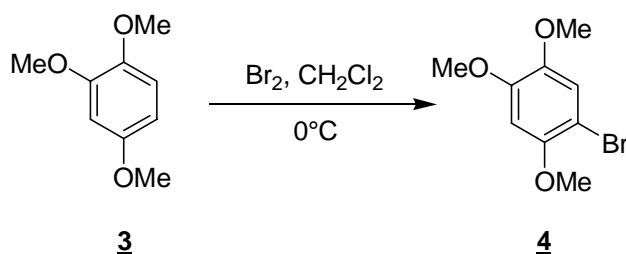
Formule brute : C₈H₉BrO₂

PM : 217,06

CCM : (hexane-AcOEt 9-1) R_f = 0,4

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,76 (s, 3H, -OCH₃), 3,85 (s, 3H, -OCH₃), 6,83 (d, 1H, J = 2,4 Hz, H-3); 6,84 (d, 1H, J = 1,2 Hz, H-6); 7,12 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, J = 1,2 Hz, H-4).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,9 (-OCH₃); 56,8 (-OCH₃); 111,9 (C-1); 112,9 (C-4); 113,7 (C-3); 119,0 (C-6); 150,3 (C-2); 154,0 (C-5).

2,4,5-triméthoxybromobenzène (4)

A une solution de 1,3,4-triméthoxybenzène (**3**) (2,5 g ; 14,86 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (100 mL), à 0°C, est ajoutée goutte à goutte une solution de dibrome (0,92 mL ; 17,83 mmol ; 1,2 éq.) dans du CH₂Cl₂ (29 mL). Le milieu réactionnel est agité 15 minutes à 0°C puis versé dans une solution saturée de Na₂SO₃ (150 mL) puis extrait 3 fois au CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄ puis évaporée. Le brut réactionnel est

Partie expérimentale

chromatographié sur gel de silice (flash) (éluant hexane-AcOEt 6-4) pour donner 3,60 g d'un solide blanc.

Rendement : 98%

Formule brute : $C_9H_{11}BrO_3$

PM : 247,09

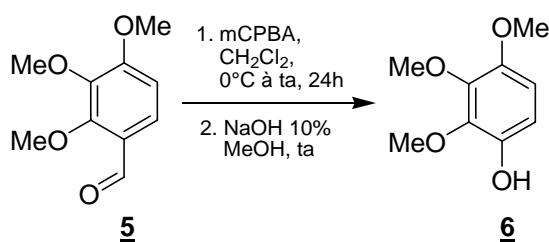
Point de fusion : 57-58°C

CCM : (hexane-AcOEt 9-1) $R_f = 0,4$

RMN-¹H (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 3,83 (s, 3H, -OCH₃), 3,86 (s, 3H, -OCH₃), 3,88 (s, 3H, -OCH₃), 6,56 (s, 1H, H-3), 7,03 (s, 1H, H-6).

RMN-¹³C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 55,2 (-OCH₃), 56,3 (-OCH₃), 57,2 (-OCH₃), 103,6 (C-3), 105,6 (C-1), 119,6 (C-6), 144,3 (C-5), 149,8 (C-4), 150,5 (C-2).

2,3,4-triméthoxyphénol (6)



A une solution de 2,3,4-triméthoxybenzène carboxaldéhyde (**5**) (5,0 g ; 25,48 mmol ; 1 éq.) dans du CH_2Cl_2 (180 mL), à 0°C, est ajouté par petites portions le mCPBA 77% (7,43 g ; 33,12 mmol ; 1,3 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. Il est ensuite versé dans une solution saturée de $Na_2S_2O_3$ (200 mL) et extrait 3 fois au CH_2Cl_2 . La phase organique est ensuite lavée successivement avec une solution saturée de $NaHCO_3$, de la saumure, puis séchée sur $MgSO_4$ et évaporée. Le résidu obtenu est dissout dans 10 mL de méthanol et une solution aqueuse de soude à 10% (50 mL) est ajoutée goutte à goutte. La solution est ensuite acidifiée à pH 2 avec HCl 37% puis extraite 3 fois à l'éther. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée pour donner 4,63 g d'une huile orange.

Rendement : 98 %

Formule brute : $C_9H_{12}O_4$

PM : 184,19

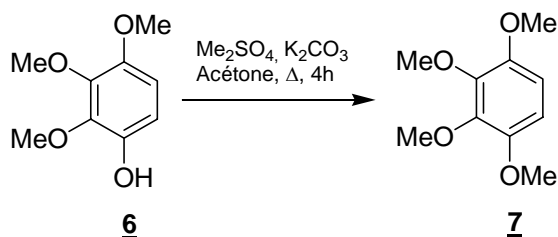
CCM : (heptane-Et₂O 5-5) $R_f = 0,3$

Partie expérimentale

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,80 (s, 3H, -OCH₃), 3,89 (s, 3H, -OCH₃), 3,95 (s, 3H, -OCH₃), 6,54 (d, J = 8,7 Hz, 1H, H-6), 6,62 (d, J = 8,7 Hz, 1H, H-5).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 56,6 (-OCH₃), 60,9 (-OCH₃), 61,2 (-OCH₃), 107,6 (C-5), 108,5 (C-6), 140,5 (C-1), 142,3 (C-3), 143,3 (C-2), 147,0 (C-4).

1,2,3,4-tetraméthoxybenzène (7)



A une solution de **6** (4,60 g ; 24,96 mmol ; 1 éq.) dans l'acétone (27 mL), sont ajoutés du K₂CO₃ (10,35 g ; 74,88 mmol ; 3 éq.) et du diméthylsulfate (7,1 mL ; 74,88 mmol ; 3 éq.) puis le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 4h. L'excès de diméthylsulfate est neutralisé en rajoutant du méthanol (15 mL) dans le milieu et en chauffant à reflux pendant 1 heure. Le milieu réactionnel est alors versé dans une solution saturée de NH₄Cl (100 mL), et extrait 3 fois à l'éther. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-Et₂O 55-45) pour donner 4,70 g de cristaux blancs.

Rendement : 95%

Formule brute : C₁₀H₁₄O₄

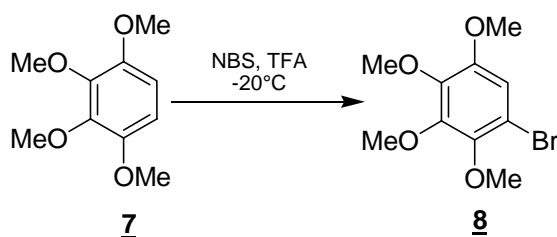
PM : 198,22

Point de fusion : 89-90°C

CCM : (hexane-Et₂O 55-45) R_f = 0,3

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,77 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 3,85 (s, 6H, 2 x -OCH₃), 6,52 (s, 2H, H-5 and H-6).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 56,4 (2 x -OCH₃), 61,2 (2 x -OCH₃) , 106,4 (C-5, C-6), 143,4 (C-2, C-3), 147,8 (C-1, C-4).

2,3,4,5-tetraméthoxy-bromobenzène (8)

A une solution de **7** (1,69 g ; 8,53 mmol ; 1 éq.) dans du TFA (7 mL) à -20°C est ajouté par petites portions du NBS (1,79 g ; 10,06 mmol ; 1,18 éq.). Le mélange est laissé revenir à température ambiante pendant 30 minutes. Il est alors versé dans de l'eau (20 mL) puis extrait 3 fois avec du CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-Et₂O 6-4) pour donner 1,28 g de cristaux blancs.

Rendement : 55%

Formule brute : C₁₀H₁₃O₄Br

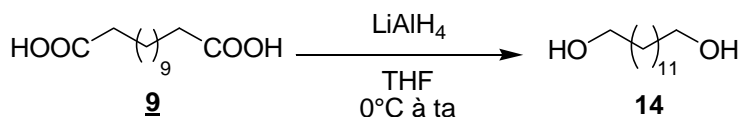
PM : 277,17

Point de fusion : 36-38°C

CCM : (heptane-Et₂O 6-4) R_f = 0,5

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,82 (s, 3H, -OCH₃), 3,83 (s, 3H, -OCH₃), 3,87 (s, 3H, -OCH₃), 3,93 (s, 3H, -OCH₃), 6,82 (s, 1H, H-6).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,5 (-OCH₃), 60,3 (-OCH₃), 60,4 (-OCH₃), 60,6 (-OCH₃), 106,5 (C-1), 109,7 (C-6), 141,7 (C-4), 144,2 (C-3), 147,2 (C-2), 149,3 (C-5).

1,13-tridécandiol (14)

A une solution d'acide 1,11-undecanedioïque (**9**) (2,5 g ; 10,23 mmol ; 1 éq.) dans du THF (150 mL) refroidie à 0°C, est additionnée par petites portions du LiAlH₄ (776,5 mg ; 20,48 mmol ; 2 éq.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 12h. Il est ensuite versé sur une solution saturée de tartrate de sodium (200 mL) puis extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée pour donner 2,07 g de cristaux blancs.

Partie expérimentale

Rendement : 94%

Formule brute : C₁₃H₂₈O₂

PM : 216,36

Point de fusion : 76-77°C

CCM : (heptane-AcOEt 1-9) R_f = 0,4

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,28 (s large, 18H, H-3 à H-11) ; 1,56 (qt, ³J=6,6 Hz, 4H, H-2 et H-12) ; 3,64 (t, ³J=6,6 Hz, 4H, H-1 et H-13).

RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃) δ : 26,5 (C-3 et C-11) ; 29,9 (C-4 à C-10) ; 33,7 (C-2 et C-12) ; 62,1 (C-1 et C-13).

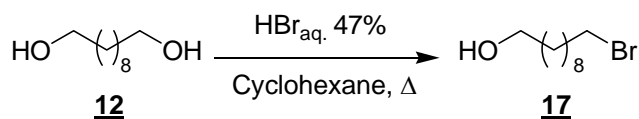
Les molécules **15** et **16**, analogues à **14** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le même protocole décrit pour **14**. Les quantités de réactifs utilisés dans chaque cas sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Diacide g (1 éq.) (mmol)	LiAlH ₄ mg (2 éq.) (mmol)	THF mL	Produit g (Rdt %)
14	10 2,5 (9,68)	734,7 (19,36)	150	15 2,04 (91%)
16	11 2,5 (9,82)	750,0 (19,79)	150	16 2,33 (92%)

Pour ces composés n = 14, 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 13, avec 2H et 6H en plus à 1,28 ppm et 1C ou 3C en plus à 29,9 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Point de fusion	R _f *
15 (14)	C ₁₄ H ₃₀ O ₂	230,39	86-87°C	0,4
16 (16)	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	258,44	90-91°C	0,3

* éluant pour la CCM : heptane-AcOEt 1-9

10-bromodécane-1-ol (17)

A une solution de 1,10-décane-1,10-diol (**12**) (4,0 g ; 22,95 mmol ; 1 éq.) dans du cyclohexane (100 mL) est ajouté HBr_{aq.} 47% [5,93 M] (58 mL ; 344,25 mmol ; 15 éq.). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 6h avant d'être extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est successivement neutralisée avec NaHCO₃, lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt 7-3) pour donner 4,88 g d'une huile incolore.

Rendement : 89%

Formule brute : C₁₀H₂₁BrO

PM : 237,18

CCM : (heptane-AcOEt 7-3) R_f = 0,4

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,28 (s large, 12H, H-3 à H-8) ; 1,57 (qt, J³=6,7 Hz, 2H, H-2) ; 1,86 (qt, J³=6,8 Hz, 2H, H-9) ; 3,41 (t, J³=6,8 Hz, 2H, H-10) ; 3,65 (t, J³=6,7 Hz, 2H, H-1).

RMN-¹³C (75MHz, CDCl₃) δ : 25,5 (C-3) ; 28,1 (C-8) ; 28,5 (C-7) ; 29,4 (C-4 à C-6) ; 32,7 (C-2 et C-10) ; 33,8 (C-9) ; 62,9 (C-1).

Les molécules **18**, **19**, **20** et **21**, analogues à **17** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le même protocole décrit pour **17**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Diol g (1 éq.) (mmol)	HBr _{aq.} 48% mL (15 éq.) (mmol)	Cyclohexane mL	Produit g (Rdt %)
12	13 2,0 (9,88)	25 (148,2)	25	18 1,96 (75%)
13	14 2,0 (9,24)	24 (138,6)	24	19 2,06 (80%)

Partie expérimentale

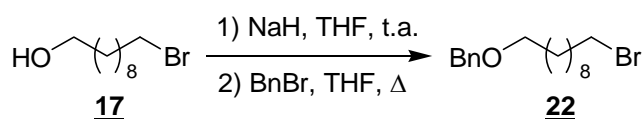
14	15 2,0 (8,68)	22 (130,2)	22	20 1,91 (75%)
16	16 4,0 (15,48)	40 (232,2)	40	21 3,89 (79%)

Pour ces composés n = 12, 13, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,28 ppm et 2C en plus à 29,4 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Point de fusion	Rf*
18 (12)	C ₁₂ H ₂₅ BrO	265,23	-	0,4
19 (13)	C ₁₃ H ₂₇ BrO	279,26	-	0,4
20 (14)	C ₁₄ H ₂₉ BrO	293,28	40-41°C	0,5
21 (16)	C ₁₆ H ₃₃ BrO	321,34	53-54°C	0,5

* éluant pour la CCM : heptane-AcOEt 7-3

1-((10-bromodécyl)oxy)méthyl)benzène (22)



A une solution de 10-bromodécyl-1-ol (**17**) (4,6 g ; 19,45 mmol, 1 éq.) dans du THF (20 mL) est ajouté du NaH (933,6 mg ; 38,9 mmol ; 2 éq.). Le milieu est agité 30 min. à température ambiante. Du bromure de benzyle (2,78 mL ; 23,4 mmol ; 1,2 éq.) est ensuite additionné et le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 24h. Le mélange est alors versé dans une solution saturée de NH₄Cl (50 mL) et extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice flash (éluant heptane-CH₂Cl₂ 8-2) pour obtenir 5,59 g d'une huile incolore.

Rendement : 88%

Partie expérimentale

Formule brute : C₁₇H₂₇BrO

PM : 327,30

CCM : (heptane-CH₂Cl₂ 8-2) R_f = 0,4

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 12H, H-3' à H-8'); 1,58 (qt, 2H, J = 7,3 Hz, H-2'); 1,85 (qt, 2H, J = 7,1 Hz, H-9'); 3,40 (t, 2H, J=7,1 Hz, H-10'); 3,46 (t, 2H, J=6,6 Hz, H-1'); 4,50 (s, 2H, H-7); 7,35 (m, 5H, H arom.).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 26,2 (C-3') ; 28,2 à 30,8 (C-2' à C-8') ; 32,8 (C-9') ; 34,1 (C-10') ; 70,5 (C-1') ; 72,9 (C-7) ; 127,5 (C-2) ; 127,6 (C-6) ; 128,3 (C-3 et C-5) ; 129,8 (C-4) ; 138,7 (C-1).

Les molécules **23**, **24**, **25** et **26**, analogues à **22** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le même protocole décrit pour **22**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Bromoalcool g (1 éq.) (mmol)	NaH mg (2 éq.) (mmol)	BnBr mL (1,2 éq.) (mmol)	THF mL	Produit g (Rdt %)
12	18 1,5 (5,66)	271,7 (11,32)	0,81 (6,80)	6	23 1,47 (73%)
13	19 1,92 (6,86)	329,3 (13,72)	0,98 (8,23)	7	24 1,82 (72%)
14	20 1,75 (5,97)	286,6 (11,94)	0,85 (7,16)	6	25 1,78 (78%)
16	21 3,50 (10,89)	522,7 (21,78)	1,56 (13,07)	11	26 3,76 (84%)

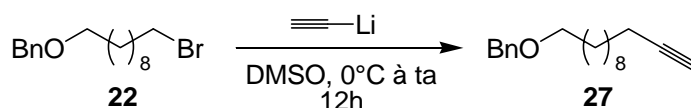
Pour ces composés n = 12, 13, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 28,2 et 30,8 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Partie expérimentale

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*
23 (12)	C ₁₉ H ₃₁ BrO	355,35	0,4
24 (13)	C ₂₀ H ₃₃ BrO	369,38	0,4
25 (14)	C ₂₁ H ₃₅ BrO	383,41	0,4
26 (16)	C ₂₃ H ₃₉ BrO	411,46	0,4

* éluant pour la CCM : heptane-CH₂Cl₂ 8-2

1-((dodéc-11-nyloxy)méthyl)benzène (27)



A une suspension d'acétylure de lithium (2,33 g ; 25,31 mmol ; 1,5 éq.) dans du DMSO (11 mL) à 0°C est additionnée une solution de **22** (5,52 g ; 16,87 mmol ; 1 éq.) dans du DMSO (8 mL). Le mélange est agité 12h à température ambiante. Il est ensuite versé sur une solution saturée de KCl (50 mL) puis extrait 3 fois à l'heptane. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée. Le brut est chromatographié sur gel de silice flash (éluant heptane-CH₂Cl₂ 75-25) pour donner 3,99 g d'une huile incolore.

Rendement : 86%

Formule brute : C₁₉H₂₈O

PM : 272,43

CCM : (heptane-CH₂Cl₂ 75-25) Rf = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,28 (s large, 12H, H-3' à H-8'); 1,52 (qt, 2H, J = 7,3 Hz, H-2'); 1,61 (qt, 2H, J = 7,0 Hz, H-9'); 1,94 (t, 1H, J = 2,5 Hz, H-12'); 2,18 (td, 2H, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 2,4 Hz, H-10'); 3,46 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-1'); 4,50 (s, 2H, H-7); 7,33 (m, 5H, H arom.).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 18,4 (C-10') ; 26,2 (C-3'); 28,5 à 29,7 (C-4' à C-9'); 35,8 (C-2'); 68,0 (C-12'); 70,5 (C-1'); 72,9 (C-7); 84,8 (C-11'); 127,5 (C-2 et C-6); 127,6 (C-4); 128,4 (C-3 et C-5); 138,7 (C-1).

Partie expérimentale

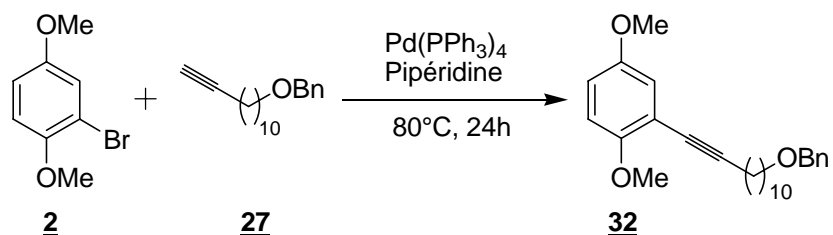
Les molécules **28**, **29**, **30** et **31**, analogues à **27** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le même protocole décrit pour **27**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Bromoalcool benzylé g (1 éq.) (mmol)	Acétylure de lithium g (1,5 éq.) (mmol)	DMSO mL	Produit g (Rdt %)
12	23 1,75 (4,93)	0,68 (7,40)	5,6	28 1,33 (90%)
13	24 1,21 (3,28)	0,45 (4,92)	4,2	29 0,92 (89%)
14	25 1,45 (3,78)	0,52 (5,67)	4,4	30 1,07 (86%)
16	26 4,1 (9,96)	1,83 (14,94)	11,5	31 2,95 (83%)

Pour ces composés n = 12, 13, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,28 ppm et 2C en plus entre 28,5 et 29,7 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*
28 (12)	C ₂₁ H ₃₂ O	300,48	0,4
29 (13)	C ₂₂ H ₃₄ O	314,50	0,4
30 (14)	C ₂₃ H ₃₆ O	328,53	0,4
31 (16)	C ₂₅ H ₄₀ O	356,58	0,4

* éluant pour CCM : heptane - CH₂Cl₂ 75-25

2-(12(benzyloxy)dodéc-1-ynyl)-1,4-diméthoxybenzène (32)

A une solution de **2** (434,1 mg ; 2 mmol ; 1 équ.) dans de la pipéridine (3 mL) est ajouté du Pd(PPh₃)₄ (161,8 mg ; 0,14 mmol ; 7 mol %). Le mélange est chauffé à 80°C. Une solution de **27** (1,1 g ; 4,0 mmol ; 2 équ.) dans de la pipéridine (3 mL) est alors additionnée. Le milieu réactionnel est agité 24h à 80°C. Il est ensuite versé sur une solution saturée de NH₄Cl (20 mL) puis extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié (éluant heptane-AcOEt 95-5) sur gel de silice pour donner 612,9 mg d'une huile incolore.

Rendement : 75%

Formule brute : C₂₇H₃₆O₃

PM : 408,57

CCM : (heptane-AcOEt 95-5) R_f = 0,3

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 12H, H-5' à H-10'); 1,42 (qt, 2H, J = 7,2 Hz, H-4'); 1,62 (qt, 2H, J = 7,1 Hz, H-11'); 2,45 (t, 2H, J = 6,9 Hz, H-3'); 3,46 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-12'); 3,75 (s, 3H, -OCH₃); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 4,50 (s, 2H, H-7''); 6,77 (s, 1H, H-3); 6,78 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H-6); 6,92 (dd, 1H, J³ = 2,1 Hz, J⁴ = 1,2 Hz, H-5); 7,33 (m, 5H, H-2'' to H-6'').

RMN-¹³C : (75 MHz ; CDCl₃) δ : 19,8 (C-3'); 28,8 (C-4') ; 28,9 à 29,8 (C-5' à C-11'); 55,7 (-OCH₃) ; 55,4 (-OCH₃); 70,5 (C-12'); 72,8 (C-7''); 82,2 (C-1'); 94,8 (C-2'); 111,9 (C-2); 113,7 (C-6); 114,6 (C-5); 118,4 (C-3); 127,4 (C-4''); 127,6 (C-2'' et C-6''); 128,3 (C-3'' et C-5''); 138,7 (C-1''); 153,2 (C-4); 154,3 (C-1).

IR (KBr) : 2338 (s -C≡C-), 3052 (s C-H arom.), 2998, 2902 (w C-H), 2890 (m -OCH₃), 1602 (m, C=C), 1494 (m C-H), 1270 (s C-O), 1038 (m C-O).

Les molécules **33**, **34**, **35** et **36**, analogues à **32** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le même protocole décrit pour **32**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

Partie expérimentale

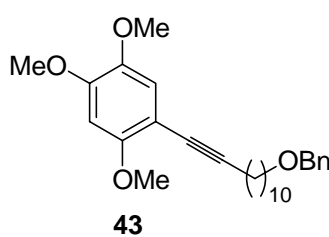
n	<u>Alcyne vrai</u> g (2 éq.) (mmol)	<u>Aryl-bromure</u> mg (1 éq.) (mmol)	Pd(PPh ₃) ₄ mg (7 mol%) (mmol)	Pipéridine mL	<u>Produit</u> g (Rdt %)
12	<u>28</u> 1,11 (3,69)	<u>2</u> 400,5 (1,85)	149,2 (0,13)	5,6	<u>33</u> 1,19 (79%)
13	<u>29</u> 0,63 (2,00)	<u>2</u> 217,1 (1,00)	80,9 (0,07)	3,0	<u>34</u> 0,36 (80%)
14	<u>30</u> 0,83 (2,53)	<u>2</u> 274,6 (1,27)	102,9 (0,089)	3,8	<u>35</u> 0,53 (90%)
16	<u>31</u> 1,00 (2,80)	<u>2</u> 303,9 (1,40)	113,3 (0,1)	4,2	<u>36</u> 0,61 (88%)

Pour ces composés n = 12, 13, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

<u>Produit</u> (n)	Formule brute	PM	Rf*
<u>33</u> (12)	C ₂₇ H ₃₆ O ₃	408,57	0,3
<u>34</u> (13)	C ₃₀ H ₄₂ O ₃	450,65	0,3
<u>35</u> (14)	C ₃₁ H ₄₄ O ₃	464,68	0,2
<u>36</u> (16)	C ₃₃ H ₄₈ O ₃	492,73	0,2

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 95-5

1-(12(benzyloxy)dodéc-1-ynyl)-2,4,5-triméthoxybenzène (43)



Partie expérimentale

Le composé **43** est obtenu selon la méthode décrite pour le composé **32**.

- 1-((dodéc-11-ynoxy)méthyl)benzène (**27**) (0,93 g ; 3,4 mmol ; 2 éq.)
- 2,4,5-triméthoxybromobenzène (**4**) (420,05 mg ; 1,7 mmol ; 1 éq.)
- Pd(PPh₃)₄ (138,7 mg ; 0,12 mmol ; 7 mol%)
- Pipéridine (5,2 mL)

Rendement : 85%

Formule brute : C₂₈H₃₈O₄

PM : 438,60

CCM : (heptane-AcOEt 5-5) R_f = 0,5

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 12H, H-5' à H-10'); 1,42 (qt, 2H, J = 7,2 Hz, H-4'); 1,62 (qt, 2H, J = 7,1 Hz, H-11'); 2,45 (t, 2H, J = 6,9 Hz, H-3'); 3,46 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-12'); 3,75 (s, 3H, -OCH₃); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 3,87 (s, 3H, -OCH₃); 4,50 (s, 2H, H-7''); 6,77 (s, 1H, H-3); 6,52 (s, 1H, H-3); 6,92 (s, 1H, H-6); 7,33 (m, 5H, H-2'' to H-6'').

RMN-¹³C : (75 MHz ; CDCl₃) δ : 19,8 (C-3''); 28,8 (C-4') ; 28,9 à 29,8 (C-5' à C-11') ; 55,4 (-OCH₃) ; 55,7 (-OCH₃); 56,0 (-OCH₃); 70,5 (C-12'); 72,8 (C-7''); 82,2 (C-1'); 94,8 (C-2'); 111,9 (C-2); 113,7 (C-6); 114,6 (C-5); 118,4 (C-3); 127,4 (C-4''); 127,6 (C-2'' et C-6''); 128,3 (C-3'' et C-5''); 138,7 (C-1''); 153,2 (C-4); 154,3 (C-1).

IR (KBr) : 2338 (s -C≡C-), 3052 (s C-H arom.), 2998, 2902 (w C-H), 2890 (m -OCH₃), 1602 (m, C=C), 1494 (m C-H), 1270 (s C-O), 1038 (m C-O).

Les molécules **44**, **45**, **46** et **47**, analogues à **43** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenus en suivant le protocole décrit pour **43**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	<u>Alcyne vrai</u> g (2 éq.) (mmol)	<u>Aryl-bromure</u> mg (1 éq.) (mmol)	Pd(PPh ₃) ₄ mg (7 mol%) (mmol)	Pipéridine mL	<u>Produit</u> g (Rdt %)
12	28 1,00 (3,33)	4 411,2 (1,67)	135,2 (0,12)	5,0	44 0,61 (78%)
13	29 1,00 (3,18)	4 392,9 (1,59)	128,6 (0,11)	4,8	45 0,57 (75%)

Partie expérimentale

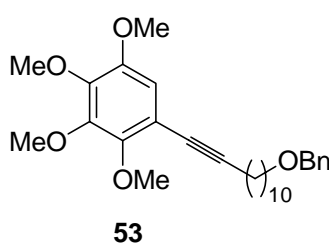
14	30 1,00 (3,03)	4 376,0 (1,52)	123,0 (0,106)	4,6	46 0,56 (75%)
16	31 1,00 (2,80)	4 345,9 (1,40)	113,3 (0,1)	4,2	47 0,56 (76%)

Pour ces composés n = 12, 13, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 28,9 et 29,8 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*
44 (12)	C ₃₀ H ₄₂ O ₄	466,65	0,4
45 (13)	C ₃₁ H ₄₄ O ₄	480,68	0,3
46 (14)	C ₃₂ H ₄₆ O ₄	494,71	0,3
47 (16)	C ₃₄ H ₅₀ O ₄	522,76	0,3

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 75-25

1-(12-(benzyloxy)dodéc-1-ynyl)-2,3,4,5-tétraméthoxybenzène (53)



Le composé **53** est obtenu selon la méthode décrite pour le composé **32**.

- 1-((dodéc-11-ynyloxy)méthyl)benzène (**27**) (1,00 g ; 3,67 mmol ; 2 éq.)
- 2,3,4,5-triméthoxybromobenzène (**8**) (510,0 mg ; 1,84 mmol ; 1 éq.)
- Pd(PPh₃)₄ (212,6 mg ; 0,18 mmol ; 10 mol%)
- Pipéridine (5,6 mL)

Rendement : 78%

Partie expérimentale

Formule brute : C₂₉H₄₀O₅

PM : 468,62

CCM : (heptane-Et₂O 7-3) Rf = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃), δ : 1,26 (s large, 12H, H-5' à H-10'); 1,61 (qt, 4H, J = 6,0 Hz, H-4' et H-11'); 2,43 (t, 2H, J = 7,1 Hz, H-3'); 3,45 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-12'); 3,80 (s, 3H, -OCH₃); 3,86 (s, 6H, 2 x -OCH₃); 3,90 (s, 3H, -OCH₃); 4,94 (s, 2H, H-7''); 6,63 (s, 1H, H-6); 7,33 (m, 5H, H-2'' à H-6'').

RMN-¹³C : (75 MHz ; CDCl₃) δ : 19,6 (C-3'); 26,2 (C-10'); 28,8 à 29,8 (C-4' à C-9'); 35,5 (C-11'); 56,1 (2 x -OCH₃); 61,3 (-OCH₃); 61,4 (-OCH₃); 70,5 (C-12'); 72,9 (C-7''); 76,2 (C-1'); 94,0 (C-2'); 110,3 (C-1); 112,8 (C-6); 127,5 (C-2'' et C-6''); 127,6 (C-4''); 128,3 (C-3'' et C-5''); 137,3 (C-1''); 138,7 (C-4 et C-3); 143,2 (C-5); 149,2 (C-2).

IR (KBr) : 3066 (s C-H arom.), 2996, 2915 (w C-H), 2844 (m -OCH₃), 2372 (s -C≡C-), 1610 (m C=C), 1522 (m C-H), 1212 (s C-O), 1028 (m C-O).

Les molécules **54**, **55**, **56** et **57**, analogues à **53** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **53**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	<u>Alcyne vrai</u> g (2 éq.) (mmol)	<u>Aryl-bromure</u> mg (1 éq.) (mmol)	Pd(PPh ₃) ₄ mg (10 mol%) (mmol)	Pipéridine mL	<u>Produit</u> g (Rdt %)
12	28 0,70 (2,33)	8 324,3 (1,17)	135,2 (0,12)	3,6	54 0,42 (72%)
13	29 0,91 (2,88)	8 400,0 (1,44)	166,4 (0,14)	4,4	55 0,56 (76%)
14	30 1,30 (3,96)	8 549,0 (1,98)	228,8 (0,198)	6,0	56 0,78 (75%)
16	31 1,03 (2,88)	8 400,0 (1,44)	166,4 (0,14)	4,4	57 0,56 (71%)

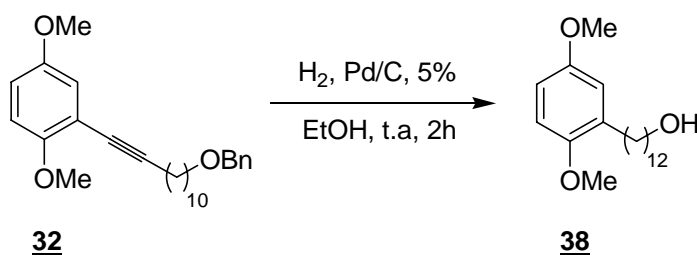
Partie expérimentale

Pour ces composés n = 12, 13, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 28,8 et 29,8 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*
54 (12)	C ₃₁ H ₄₄ O ₅	496,68	0,4
55 (13)	C ₃₂ H ₄₆ O ₅	510,70	0,3
56 (14)	C ₃₃ H ₄₈ O ₅	524,73	0,3
57 (16)	C ₃₅ H ₅₂ O ₅	552,78	0,3

* éluant pour CCM : heptane-Et₂O 7-3

12-(2,5-diméthoxyphényl)dodécan-1-ol (38)



A une solution de 2-(12(benzyloxy)dodéc-1-ynyl)-1,4-diméthoxybenzène (**32**) (554.1 mg, 1.36 mmol, 1 eq.) dans de l'EtOH (3 mL), est ajouté du Pd/C 5% (60 mg). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante sous atmosphère de H₂ pendant 12h. Il est ensuite filtré sur célite et le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt 6-4) pour donner 403,7 mg d'une huile incolore.

Rendement : 92%

Formule brute : C₂₀H₃₄O₃

PM : 322,48

CCM : (heptane-AcOEt 6-4) Rf = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 16H, H-3' à H-10'); 1,56 (qt, 4H, J = 6,9 Hz, H-2' et H-11'); 2,57 (t, 2H, J = 7,7 Hz, H-12'); 3,64 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-1'); 3,76 (s, 3H, -

Partie expérimentale

OCH₃); 3,77 (s, 3H, -OCH₃); 6,67 (dd, 1H, J³ = 8,7 Hz, J⁴ = 3,0 Hz, H-4); 6,72 (d, 1H, J⁴ = 3,0 Hz, H-6); 6,76 (d, 1H, J³ = 8,7 Hz, H-3).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,7 (C-3'); 29,4 à 29,9 (C-4' à C-11'); 30,3 (C-12') ; 32,8 (C-2'); 55,6 (-OCH₃); 56,0 (-OCH₃); 63,1 (C-1'); 110,5 (C-4); 111,2 (C-3); 116,2 (C-6); 132,7 (C-1); 151,8 (C-2); 153,4 (C-5).

IR (KBr) : 3312 (s O-H), 3056 (w =C-H), 2994, 2898 (s C-H), 2840 (m -OCH₃), 1492 (m C-H), 1460 (m C-H), 784 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 192 nm (ε 169380).

MS (ESI⁺) m/z : 323,3 (M + H⁺).

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₂₀H₃₅O₃ 323,2581, trouvée 323,2575.

Les molécules **39**, **40**, **41** et **42**, analogues à **38** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **38**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Produit de couplage mg (1 éq.) (mmol)	Pd/C 5% mg (10% m/m)	EtOH mL	Produit g (Rdt %)
14	33 359,2 (0,88)	35,9	1,8	39 0,25 (80%)
15	34 321,5 (0,71)	32,2	1,5	40 0,21 (80%)
16	35 522,1 (1,12)	52,2	2,3	41 0,36 (85%)
18	36 592,1 (1,20)	59,2	2,5	42 0,40 (82%)

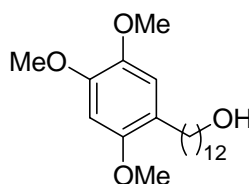
Pour ces composés n = 14, 15, 16 et 18 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 29,4 et 29,9 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Partie expérimentale

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*	Point de fusion	UV (acétonitrile) λ_{\max} (ϵ)	MS (ESI ⁺) m/z (M+H ⁺)	HRMS (ESI ⁺) Trouvée (calculée)
39 (14)	C ₂₂ H ₃₈ O ₃	350,54	0,4	-	192 (169380)	351,3	351,2884 (351,2880)
40 (15)	C ₂₃ H ₄₀ O ₃	364,56	0,4	42-43°C	192 (169380)	365,3	365,3056 (365,3050)
41 (16)	C ₂₄ H ₄₂ O ₃	378,59	0,3	40-41°C	192 (169380)	379,3	379,3205 (379,3207)
42 (18)	C ₂₆ H ₄₆ O ₃	406,64	0,3	48-49°C	192 (169380)	407,3	407,3522 (407,3520)

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 6/4

12-(2,4,5-triméthoxyphényl)dodécan-1-ol (48)



48

Le composé **48** est obtenu selon la méthode décrite pour le composé **38**.

- 1-(12(benzyloxy)dodéc-1-ynyl)-2,4,5-triméthoxybenzène (**43**) (0,65 g ; 1,49 mmol ; 1 éq.)
- Pd/C 5% (65,0 mg ; 10% m/m)
- Ethanol (3 mL)

Rendement : 82%

Formule brute : C₂₁H₃₆O₄

PM : 352,51

CCM : (heptane-AcOEt 6-4) Rf = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 16H, H-3' à H-10'); 1,56 (qt, 4H, J = 6,8 Hz, H-2' et H-11'); 2,53 (t, 2H, J = 7,7 Hz, H-12'); 3,63 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-1'); 3,79 (s, 3H, -OCH₃); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 3,87 (s, 3H, -OCH₃); 6,51 (s, 1H, H-3); 6,87 (s, 1H, H-6).

Partie expérimentale

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,7 (C-3') ; 29,4 à 29,6 (C-4' à C-11') ; 30,4 (C-12') ; 32,8 (C-2') ; 56,2 (-OCH₃) ; 56,5 (-OCH₃) ; 56,7 (-OCH₃) ; 63,1 (C-1') ; 98,0 (C-3) ; 114,1 (C-6) ; 123,1 (C-1) ; 142,8 (C-5) ; 147,4 (C-2) ; 151,4 (C-4).

IR (KBr) : 3422 (s O-H), 3010 (w =C-H), 2976, 2906 (s C-H), 2844 (m -OCH₃), 1608 (m C=C), 1524 (m C-H), 1460 (m C-H), 724 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 192 nm (ε 166930).

Point de fusion : 53-54°C.

MS (FAB⁺) m/z : 352,3 (M + H⁺).

HRMS (FAB⁺) m/z : calculée pour C₂₁H₃₆O₄ 352,2614, trouvée 352,2626.

Les molécules **49**, **50**, **51** et **52**, analogues à **48** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **48**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Produit de couplage mg (1 éq.) (mmol)	Pd/C 5% mg (10% m/m)	EtOH mL	Produit g (Rdt %)
14	44 618,8 (1,31)	61,9	2,6	49 0,42 (85%)
15	45 670,9 (1,40)	67,1	2,8	50 0,47 (85%)
16	46 604,5 (1,22)	60,5	2,5	51 0,40 (81%)
18	47 560,5 (1,07)	56,1	2,2	52 0,37 (80%)

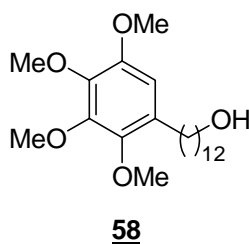
Pour ces composés n = 14, 15, 16 et 18 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 29,4 et 29,6 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Partie expérimentale

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*	Point de fusion	UV (acétonitrile) λ_{\max} (ϵ)	MS (FAB ⁺) m/z (M ⁺)	HRMS (FAB ⁺) Trouvée (calculée)
49 (14)	C ₂₃ H ₄₀ O ₄	380,56	0,4	47-48°C	192 (166930)	380,3	380,2928 (380,2927)
50 (15)	C ₂₄ H ₄₂ O ₄	394,59	0,4	54-55°C	192 (166930)	394,3	394,3090 (394,3083)
51 (16)	C ₂₅ H ₄₄ O ₄	408,61	0,4	55-57°C	192 (166930)	408,3	408,3243 (408,3240)
52 (18)	C ₂₇ H ₄₈ O ₄	436,67	0,4	63-64°C	192 (166930)	436,3	436,3560 (436,3553)

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 6-4

12-(2,3,4,5-tétraméthoxyphényl)dodécan-1-ol (58)



Le composé **58** est obtenu selon la méthode décrite pour le composé **38**.

- 1-(12-(benzyloxy)dodéc-1-ynyl)-2,3,4,5-tétraméthoxybenzène (**53**) (0,66 g ; 1,41 mmol ; 1 éq.)
- Pd/C 5% (66,0 mg ; 10% m/m)
- Ethanol (2,8 mL)

Rendement : 92%

Formule brute : C₂₂H₃₈O₅

PM : 382,53

CCM : (heptane-AcOEt 6-4) Rf = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,25 (s large, 16H, H-3' à H-10'); 1,53 (qt, 4H, J = 6,8 Hz, H-2' and H-11'); 2,52 (t, 2H, J = 7,9 Hz, H-12'); 3,61 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-1'); 3,76 (s, 3H, -OCH₃); 3,79 (s, 3H, -OCH₃); 3,84 (s, 3H, -OCH₃); 3,90 (s, 3H, -OCH₃); 6,41 (s, 1H, H-6).

Partie expérimentale

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,7 (C-3'); 29,4 à 31,0 (C-4' à C-12'); 32,8 (C-2'); 56,2 (4 x -OCH₃); 61,1 (C-1'); 107,4 (C-6); 119,3 (C-1); 130,8 (C-4); 140,8 (C-3); 149,1 (C-2 et C-5).

IR (KBr) : 3448 (s O-H), 3028 (w =C-H), 2996, 2904 (s C-H), 2842 (m -OCH₃), 1584 (m C=C), 1492 (m C-H), 1464 (m C-H), 718 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 192 nm (ε 169050), 210 nm (ε 79030).

MS (ESI⁺) m/z : 383,3 (M + H⁺).

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₂₂H₃₉O₅ 383,2792, trouvée 383,2788.

Les molécules **59**, **60**, **61** et **62**, analogues à **58** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **58**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Produit de couplage mg (1 éq.) (mmol)	Pd/C 5% mg (10% m/m)	EtOH mL	Produit g (Rdt %)
14	54 344,4 (0,69)	34,4	1,5	59 0,26 (93%)
15	55 509,8 (1,00)	51,0	2,1	60 0,36 (85%)
16	56 731,7 (1,39)	73,2	2,8	61 0,54 (88%)
18	57 522,0 (0,95)	52,2	2,1	62 0,40 (90%)

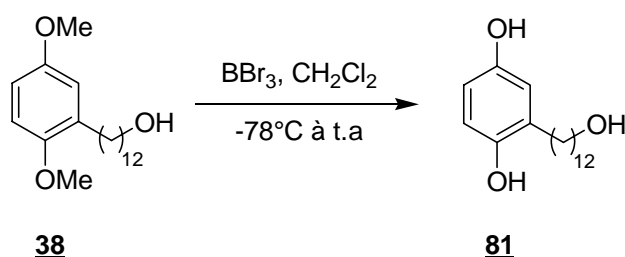
Pour ces composés n = 14, 15, 16 et 18 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,25 ppm et 2C en plus entre 29,4 et 31,0 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Partie expérimentale

Produit (n)	Formule brute	PM	R _f *	Point de fusion	UV (acétonitrile) λ _{max} (ε)	MS (ESI ⁺) m/z (M+H ⁺)	HRMS (ESI ⁺) Trouvée (calculée)
59 (14)	C ₂₄ H ₄₂ O ₅	410,59	0,4	-	192 (169050) 210 (79030)	411,3	411,3108 (411,3105)
60 (15)	C ₂₅ H ₄₄ O ₅	424,61	0,4	-	192 (169050) 210 (79030)	425,3	425,3265 (425,3262)
61 (16)	C ₂₆ H ₄₆ O ₅	438,64	0,5	-	192 (169050) 210 (79030)	439,3	439,3433 (439,3418)
62 (18)	C ₂₈ H ₅₀ O ₅	466,69	0,6	52-53°C	192 (169050) 210 (79030)	467,3	467,3735 (467,3731)

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 6-4

2-(12-hydroxydodécyl)benzène-1,4-diol (81)



A une solution de 12-(2,5-diméthoxyphényl)dodécane-1-ol (**38**) (50,0 mg ; 0,16 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (1 mL) à -78°C est ajouté du BBr₃ (0,15 mL ; 1,55 mmol ; 10 éq.). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 heure à température ambiante puis refroidi à -78°C. 5 mL d'eau sont additionnés. Le mélange est ensuite extrait 3 fois avec de l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée pour donner 43,0 mg de cristaux blancs.

Rendement : 94%

Partie expérimentale

Formule brute : $C_{18}H_{30}O_3$

PM : 294,43

CCM : (heptane-AcOEt 5-5) Rf = 0,5

RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD) δ : 1,29 (s large, 16H, H-3' à H-10'); 1,50 (qt, 4H, J = 6,0 Hz, H-2' and H-11'); 2,49 (t, 2H, J = 7,6 Hz, H-1'); 3,53 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-12'); 4,85 (s, 3H, -OH); 6,42 (dd, 1H, J³ = 8,5 Hz, J⁴ = 3,0 Hz, H-5); 6,51 (d, 1H, J⁴ = 3,0 Hz, H-3); 6,56 (d, 1H, J³ = 8,5 Hz, H-6).

RMN-¹³C (75MHz, CD₃OD) δ : 25,5 (C-10'); 29,2 à 29,6 (C-2' à C-9'); 29,8 (C-1'); 32,2 (C-11'); 61,6 (C-12'); 112,4 (C-5); 115,2 (C-6); 116,2 (C-3); 129,9 (C-2); 147,6 (C-1); 149,5 (C-4).

Point de fusion : 97-98°C.

IR (KBr) : 3258 (s O-H), 3030 (w =C-H), 2918 (s C-H), 1458 (m C-H), 1196 (s C-O), 722 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 178 nm (ϵ 8200), 198 nm (ϵ 32520).

MS (ESI⁺) m/z : 295,3 (M+H⁺)

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour $C_{18}H_{31}O_3$ 295,2507, trouvée 295,2510.

La molécule **82**, analogue à **81** mais avec une chaîne plus longue, est obtenue en suivant le protocole décrit pour **81**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	QFA mg (1 éq.) (mmol)	BBr ₃ mL (10 éq.) (mmol)	CH ₂ Cl ₂ mL	Produit mg (Rdt %)
18	42 50,0 (0,12)	0,12 (1,23)	1,0	82 42,6 (91%)

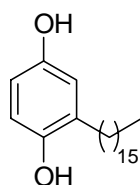
Partie expérimentale

Pour le composé $n = 18$ les spectres RMN- ^1H et RMN- ^{13}C sont similaires à ceux obtenus pour $n = 12$, avec à chaque fois 12H en plus à 1,29 ppm et 6C en plus entre 29,2 et 29,6 ppm correspondant aux CH_2 supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*	Point de fusion	UV (acétonitrile) λ_{max} (ϵ)	MS (ESI $^+$) m/z (M+H $^+$)	HRMS (ESI $^+$) Trouvée (calculée)
82 (18)	$\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_3$	378,59	0,5	103-105°C	178 (8200) 198 (32520)	379,3	379,3213 (379.3207)

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 5-5

2-hexadécylbenzène-1,4-diol (83)



83

Le composé **83** est obtenu selon la méthode décrite pour le composé **81**.

- 2-hexadécyl-1,4-diméthoxybenzène (50 mg ; 0,14 mmol ; 1 éq.)
- BBr_3 (0,13 mL ; 1,38 mmol ; 10 éq.)
- CH_2Cl_2 (1,0 mL)

Rendement : 95%

Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_2$

PM : 334,54

CCM : (heptane-AcOEt 5-5) Rf = 0,5

RMN- ^1H : (300 MHz, CD_3OD) δ : 0,88 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz, H-16'); 1,27 (s large, 26H, H-3' to H-15'); 1,50 (qt, 2H, $J = 6,6$ Hz, H-2'); 2,49 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-1'); 4,83 (s, 2H, -OH); 6,43 (dd, 1H, $J^3 = 8,5$ Hz, $J^4 = 3,3$ Hz, H-5); 6,51 (d, 1H, $J^4 = 3,3$ Hz, H-3); 6,56 (d, 1H, $J^3 = 8,5$ Hz, H-6).

RMN- ^{13}C : (75 MHz, CD_3OD) δ : 13,2 (C-16'); 22,4 (C-15'); 22,9 (C-1') ; 29,1 à 29,7 (C-3' to C-13'); 31,7 (C-2' and C-14'); 112,4 (C-5); 115,3 (C-6); 116,2 (C-3); 130,0 (C-2); 147,6 (C-1); 149,5 (C-4).

Partie expérimentale

Point de fusion : 108-109°C.

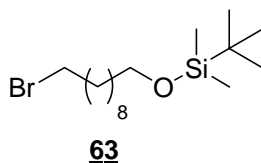
IR (KBr) : 3258 (s O-H), 3030 (w =C-H), 2918 (s C-H), 1458 (m C-H), 1196 (s C-O), 722 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 178 nm (ϵ 8200), 198 nm (ϵ 32520).

MS (ESI⁺) m/z : 335,3 (M+H⁺)

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₂₂H₃₉O₂ 335,2945, trouvée 335,2960.

Synthèse des QFA N/O-alkylés

(10-bromodécyl)(tert-butyl)diméthylsilane (63)

A une solution de 10-bromodécane-1-ol (**17**) (4,0 g ; 16,88 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (100 mL), sont ajoutés l'imidazole (1,72 g ; 25,3 mmol ; 1,5 éq.) et le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (3,8 g ; 25,3 mmol ; 1,5 éq.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4h puis versé sur une solution saturée de NH₄Cl (150 mL). Après trois extractions au CH₂Cl₂, la phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice flash (éluant heptane-AcOEt 7-3) pour donner 5,28 g d'une huile incolore.

Rendement : 89%

Formule brute : C₁₆H₃₅BrOSi

PM : 351,44

CCM : (heptane-AcOEt 7-3) R_f = 0,8

RMN-¹H : (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0,05 (s, 6H, H-3') ; 0,89 (s, 9H, H-2') ; 1,28 (s large, 12H, H-3 à H-8) ; 1,54 (qt, 2H, J = 6,6Hz, H-2) ; 1,84 (qt, 2H, J = 6,9Hz, H-9) ; 3,39 (t, 2H, J = 6,9Hz, H-10) ; 3,59 (t, 2H, J = 6,6Hz, H-1).

RMN-¹³C : (CDCl₃, 75 MHz) δ : -5,2 (C-3') ; 18,4 (C-1') ; 25,6 à 25,9 (C-2' et C-3) ; 28,2 (C-8) ; 28,7 (C-7) ; 29,1 à 29,4 (C-4 à C-6) ; 32,8 (C-9) ; 32,9 (C-2) ; 33,0 (C-10) ; 63,2 (C-1).

Les molécules **64**, **65** et **66**, analogues à **63** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **63**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

Partie expérimentale

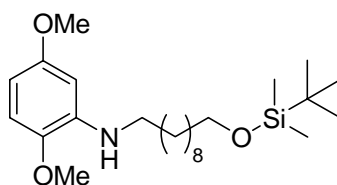
n	Bromoalcool g (1 éq.) (mmol)	TBDMS-Cl g (1,5 éq.) (mmol)	Imidazole g (1,5 éq.) (mmol)	CH ₂ Cl ₂ mL	Produit g (Rdt %)
12	18 3,22 (13,60)	3,06 (20,4)	1,39 (20,4)	85	64 4,64 (90%)
14	20 0,64 (2,10)	0,45 (3,20)	0,21 (3,20)	20	65 0,75 (88%)
16	21 1,00 (3,12)	0,70 (4,67)	0,32 (4,67)	25	66 1,42 (95%)

Pour ces composés n = 12, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,28 ppm et 2C en plus entre 29,1 et 29,4 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*
64 (12)	C ₁₈ H ₃₉ OBrSi	379,13	0,8
65 (14)	C ₂₀ H ₄₃ OBrSi	407,13	0,8
66 (16)	C ₂₂ H ₄₇ OBrSi	435,13	0,8

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 7-3

N-(10-(tert-butylidiméthylsilyloxy)décyl)-2,5-diméthoxybenzèneamine (67)



67

A une solution de 2,5-diméthoxyaniline (0,44 g ; 2,85 mmol ; 1 éq.) dans du THF (28 mL) refroidie à 0°C, est ajouté goutte à goutte le nBuLi (1,80 mL ; 2,85 mmol ; 1 éq.), suivi du composé **63** (1,00 g ; 2,85 mmol ; 1 éq.) et du 1,4-dioxane (0,26 mL ; 2,99 mmol ; 1,05 éq.).

Partie expérimentale

Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C pendant 14h avant d'être versé sur une solution saturée de NH₄Cl (50 mL) et extrait 3 fois au CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt 9-1) pour donner 0,72 g d'une huile incolore.

Rendement : 60%

Formule brute : C₂₄H₄₅NO₃Si

PM : 423,70

CCM : (heptane-AcOEt 7-3) R_f = 0,5

RMN-¹H : (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0,03 (s, 6H, H-3'') ; 0,88 (s, 9H, H-2'') ; 1,26 (S large, 12H, H-3' à H-8') ; 1,49 (qt, 2H, J = 6,6Hz, H-9') ; 1,63 (qt, 2H, J = 7,2Hz, H-2') ; 3,08 (t, 2H, J = 7,2Hz, H-1') ; 3,58 (t, 2H, J = 6,6Hz, H-10') ; 3,74 (s, 3H, -OCH₃) ; 3,78 (s, 3H, -OCH₃) ; 6,14 (dd, 1H, ³J = 8,7Hz, ⁴J = 2,4Hz, H-4) ; 6,24 (d, 1H, ⁴J = 2,4 Hz, H-6) ; 6,64 (d, 1H, ³J = 8,7 Hz, H-3).

RMN-¹³C : (CDCl₃, 75 MHz) δ : -5,7 (C-3'') ; 18,1 (C-1'') ; 25,6 à 25,8 (C-2'' et C-8') ; 27,1 (C-3') ; 28,7 (C-4') ; 29,1 à 29,7 (C-4' à C-7') ; 33,2 (C-9') ; 45,2 (C-1') ; 55,9 (2 × -OCH₃) ; 64,3 (C-10') ; 97,8 (C-6) ; 103,3 (C-4) ; 115,9 (C-3) ; 137,2 (C-2) ; 139,5 (C-1) ; 153,5 (C-5).

Les molécules **68**, **69** et **70**, analogues à **67** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **67**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	Bromoalcool silylé g (1,0 éq.) (mmol)	2,5- diméthoxyaniline g (1,0 éq.) (mmol)	nBuLi (M) mL (1,0 éq.) (mmol)	1,4-dioxane mL (1,05 éq.) (mmol)	THF mL	Produit g (Rdt %)
12	64 0,38 (2,64)	0,40 (2,64)	(1,2M) 2,20 (2,64)	0,24 (2,77)	26	68 0,75 (63%)
14	65 0,50 (1,23)	0,19 (1,23)	(1,2M) 1,02 (1,23)	0,11 (1,29)	12	69 0,34 (58%)
16	66 0,46 (2,30)	0,35 (2,30)	(1,0M) 2,30 (2,30)	0,20 (2,42)	23	70 0,63 (54%)

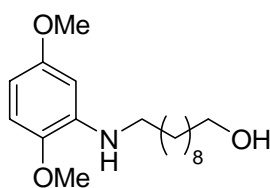
Partie expérimentale

Pour ces composés n = 12, 14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 29,1 et 29,7 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*
68 (12)	C ₂₆ H ₄₉ O ₃ NSi	451,76	0,5
69 (14)	C ₂₈ H ₅₃ O ₃ NSi	479,81	0,5
70 (16)	C ₃₀ H ₅₇ O ₃ NSi	507,86	0,5

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 7-3

10-(2,5-diméthoxyphénylamino)décan-1-ol (71)



71

Une solution de **67** (0,46g ; 1,09 mmol ; 1 éq.) dans une solution de TBAF 1M dans du THF (1,31 mL ; 1,31 mmol ; 1,2 éq.) est agitée à température ambiante pendant 4h. Le milieu réactionnel est versé dans une solution saturée de NH₄Cl (5 mL) puis extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice flash (éluant heptane-AcOEt 6-4) pour donner 0,32 g de cristaux blancs.

Rendement : 95%

Formule brute : C₁₈H₃₁NO₃

PM : 309,44

CCM : (heptane-AcOEt 7-3) Rf = 0,3

RMN-¹H : (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,26 (s large, 12H, H-3 à H-8) ; 1,52 (qt, 2H, J = 6,6Hz, H-2) ; 1,63 (qt, 2H, J = 6,9Hz, H-9) ; 3,05 (t, 2H, J = 6,9Hz, H-10) ; 3,60 (t, 2H, J = 6,6Hz, H-1) ; 3,72 (s, 3H, -OCH₃) ; 3,76 (s, 3H, -OCH₃) ; 4,48 (s large, 1H, NH) ; 6,10 (dd, 1H, J³ = 8,4Hz, J⁴ = 2,8Hz, H-4') ; 6,19 (d, 1H, J⁴ = 2,8Hz, H-6') ; 6,61 (d, 1H, J⁴ = 8,4Hz, H-3').

Partie expérimentale

RMN-¹³C : (CDCl₃, 75 MHz) δ : 25,7 (C-3) ; 27,1 (C-8) ; 29,4 à 29,8 (C-4 à C-7) ; 45,4 (C-10) ; 55,9 (2 × -OCH₃) ; 62,9 (C-1) ; 97,7 (C-6') ; 103,7 (C-4') ; 116,1 (C-3') ; 137,0 (C-2') ; 139,3 (C-1') ; 153,8 (C-5').

Point de fusion : 53-54°C.

IR (KBr) : 3568 (s O-H), 3374 (s N-H), 3094 (w =C-H), 2992, 2948 (s C-H), 2848 (m -OCH₃), 1534 (m C-H), 1168 (m C-N), 1214 (m C-O), 718 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 210 nm (ε 259356), 246 nm (ε 90517).

MS (ESI⁺) m/z : 310,3 (M + H⁺).

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₁₈H₃₂NO₃ 310,2377, trouvée 310,2380.

Les molécules **72**, **73** et **74**, analogues à **71** mais avec des chaînes plus longues, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **71**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	<u>N-QFA silylé</u> mg (1 éq.) (mmol)	TBAF (1M/THF) mL	<u>Produit</u> mg (Rdt %)
12	<u>68</u> 241,9 (0,54)	0,6	<u>72</u> 169,5 (93%)
14	<u>69</u> 305,0 (0,64)	0,7	<u>73</u> 217,6 (93%)
16	<u>70</u> 142,2 (0,28)	0,3	<u>74</u> 103,6 (94%)

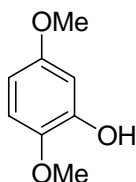
Pour ces composés n = 12,14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 29,4 et 29,8 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Partie expérimentale

Produit (n)	Formule brute	PM	Rf*	Point de fusion	UV (acétonitrile) λ_{\max} (ϵ)	MS (ESI ⁺) m/z (M+H ⁺)	HRMS (ESI ⁺) Trouvée (calculée)
72 (12)	C ₂₀ H ₃₅ NO ₃	337,50	0,3	61-63°C	210 (259356) 246 (90517)	338,3	338,2701 (338,2690)
73 (14)	C ₂₂ H ₃₉ NO ₃	365,55	0,3	68-70°C	210 (259356) 246 (90517)	366,3	366,2831 (366,2847)
74 (16)	C ₂₄ H ₄₃ NO ₃	393,60	0,3	76-78°C	210 (259356) 246 (90517)	394,3	394,3322 (394,3316)

* éluant pour CCM : heptane-AcOEt 7-3

2,5-diméthoxyphénol (75)



75

A une solution de 2,5-diméthoxybenzène carboxaldéhyde (5,0 g ; 30,09 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (215 mL) à 0°C est ajouté par petites portions le mCPBA 77% (8,78 g ; 39,12 mmol ; 1,3 éq.). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. Il est ensuite versé dans une solution saturée de Na₂S₂O₃ (250 mL) et extrait 3 fois au CH₂Cl₂. La phase organique est ensuite successivement lavée avec une solution saturée de NaHCO₃ et de la saumure, puis séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu obtenu est dissous dans 10 mL de méthanol et une solution aqueuse de soude à 10% (50ml) est additionnée goutte à goutte. La solution est ensuite acidifiée à pH 2 avec HCl 37% puis extraites 3 fois à l'éther. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄ puis évaporée pour donner 4,41 g d'une huile orange.

Rendement : 95 %

Partie expérimentale

Formule brute : $C_8H_{10}O_3$

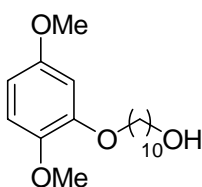
PM : 154,16

CCM : (heptane-Et₂O 5-5) R_f = 0,3

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,75 (s, 3H, -OCH₃) ; 3,84 (s, 3H, -OCH₃) ; 6,37 (dd, 1H, J³ = 8,7 Hz, J⁴ = 3,0 Hz, H-4) ; 6,56 (d, 1H, J⁴ = 3,0 Hz, H-6) ; 6,76 (d, 1H, J³ = 8,7 Hz, H-3).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,6 (-OCH₃); 56,6 (-OCH₃); 101,7 (C-6); 104,2 (C-4); 111,5 (C-3); 141,0 (C-2); 146,4 (C-1); 154,6 (C-5).

10-(2,5-diméthoxyphénoxy)décan-1-ol (76)



76

A une solution de 2,5-diméthoxyphénol (**75**) (400,0 mg ; 2,59 mmol ; 1 éq.) dans de l'acétone (43 mL), sont successivement ajoutés du K₂CO₃ (3,58 g ; 25,9 mmol ; 10 éq.) et une solution de 10-bromodécan-1-ol (**17**) (675,7 mg ; 2,85 mmol ; 1.1 éq.) dans de l'acétone (2 mL). Le milieu réactionnel est agité à reflux pendant 24h avant d'être versé dans une solution saturée de NH₄Cl. La phase organique est extraite trois fois avec de l'Et₂O, lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (éluant CH₂Cl₂ 100%) pour donner 522,61 mg de cristaux blancs.

Rendement : 65%

Formule brute : $C_{18}H_{30}O_4$

PM : 310,43

CCM : (heptane-AcOEt 6-4) R_f = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 12H, H-3 à H-8); 1,54 (qt, 2H, J = 6,9 Hz, H-2); 1,81 (qt, 2H, J = 7,2 Hz, H-9); 3,63 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-1); 3,76 (s, 3H, -OCH₃); 3,81 (s, 3H, -OCH₃); 3,97 (t, 2H, J = 6,9 Hz, H-10); 6,38 (dd, 1H, J³ = 8,7 Hz, J⁴ = 2,8 Hz, H-4'); 6,50 (d, 1H, J⁴ = 2,8 Hz, H-6'); 6,78 (d, 1H, J³ = 8,7 Hz, H-3').

Partie expérimentale

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,7 (C-3); 25,9 to 29,5 (C-4 à C-9); 32,8 (C-2); 55,6 (-OCH₃); 56,8 (-OCH₃); 63,1 (C-1); 68,9 (C-10); 101,6 (C-6'); 103,0 (C-4'); 112,6 (C-3'); 143,8 (C-2'); 149,6 (C-1'); 154,3 (C-5').

Point de fusion : 67-68°C.

IR (KBr) : 3540 (s O-H), 3084 (w =C-H), 2970, 2912 (s C-H), 2848 (m -OCH₃), 1508 (m C-H), 1220 (m C-O), 720 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{max} : 192 nm (ε 162310).

MS (ESI⁺) m/z : 311,2 (M + H⁺).

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₁₈H₃₁O₄ 311,2217, trouvée 311,2211.

Les molécules **77**, **78** et **79**, analogues à **76** mais avec des chaînes plus loges, sont obtenues en suivant le protocole décrit pour **76**. Les quantités de réactifs utilisés sont indiquées dans le tableau suivant.

n	2,5-diméthoxyphénol mg (1 éq.) (mmol)	Bromoalcool mg (1,1 éq.) (mmol)	K ₂ CO ₃ g (10 éq.) (mmol)	Acétone mL	Produit mg (Rdt %)
12	75 400,0 (2,59)	18 755,9 (2,85)	3,58 (25,90)	45	77 613,7 (70%)
14	75 400,0 (2,59)	20 835,9 (2,85)	3,58 (25,90)	45	78 617,1 (65%)
16	75 400,0 (2,59)	21 915,8 (2,85)	3,58 (25,90)	45	79 633,6 (62%)

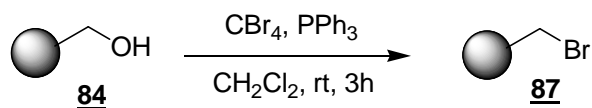
Pour ces composés n = 12,14 et 16 les spectres RMN-¹H et RMN-¹³C sont similaires à ceux obtenus pour n = 10, avec à chaque fois 4H en plus à 1,26 ppm et 2C en plus entre 25,9 et 29,5 ppm correspondant aux CH₂ supplémentaires.

Partie expérimentale

<u>Produit</u> (n)	Formule brute	PM	Rf*	Point de fusion	UV (acétonitrile) λ_{max} (ϵ)	MS (ESI ⁺) m/z (M+H ⁺)	HRMS (ESI ⁺) Trouvée (calculée)
<u>77</u> (12)	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	338,48	0,4	77-78°C	192 (162310)	339,2	339,2526 (339,2530)
<u>78</u> (14)	C ₂₂ H ₃₈ O ₄	366,53	0,4	79-81°C	192 (162310)	367,3	367,2848 (367,2843)
<u>79</u> (16)	C ₂₄ H ₄₂ O ₄	394,59	0,3	85-86°C	192 (162310)	395,3	395,3159 (395,3156)

* éluant pour CCM : CH₂Cl₂ 100%

Synthèse supportée

Résine Merrifield (87)

A une suspension de résine Wang (**84**) (500,0 mg ; 0,5 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (5 mL), agitée pendant 30 minutes à température ambiante, est ajoutée goutte à goutte une solution de CBr₄ (547,19 mg ; 1,65 mmol ; 3éq.) et de PPh₃ (427,54 mg ; 1,63 mmol ; 3 éq.) dans du CH₂Cl₂ (8 mL). Le milieu réactionnel est agité 3h à température ambiante. La résine est ensuite filtrée, lavée 4 fois au CH₂Cl₂ et 2 fois à l'Et₂O puis séchée sous vide. 527,7 mg de résine Merrifield est obtenue.

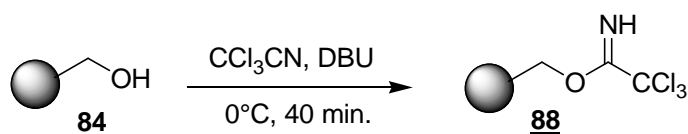
Rendement : 85%

IR (KBr) : 3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 694 (m C-Br). Disparition complète de la bande à ~3500 (s -OH).

Analyse élémentaire mesurée : C (88,67) H (7,23) N (1,19) (après substitution du -Br par -NHMe)

Rq : La réaction de substitution du -Br par le -NHMe est quantitative. La charge de la résine en N est équivalente à la charge de résine en -Br.

Charge : 0,85 mmol/g

Résine Trichloroacétamidate (88)

A une suspension de résine Wang (**84**) (1,5 g ; 1,5 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (20 mL) agitée pendant 30 minutes à température ambiante, sont ajoutés le CCl₃CN (3,1 mL) et le DBU (0,21 mL). Le milieu réactionnel est agité à 0°C pendant 40 minutes. La résine est ensuite lavée 5 fois au CH₂Cl₂, 5 fois au DMSO, 5 fois au THF et 3 fois au CH₂Cl₂, puis séchée sous vide. 1,66 g de résine trichloroacétamidate sont obtenus.

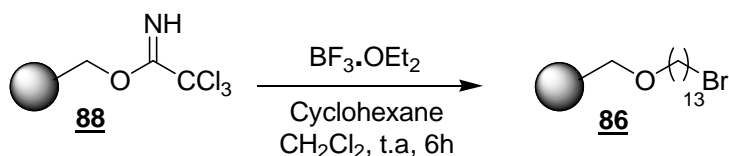
Rendement : 67%

IR (KBr) : Disparition de la bande à ~3500 (-OH)
3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 1664 (s -C=N)

Analyse élémentaire mesurée : C (80,63) H (6,51) N (0,94)

Charge : 0,67 mmol/g

Résine Wang substituée au 13-bromotridécaneol (86) :



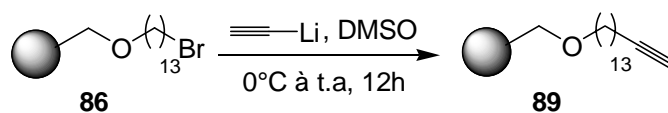
A une suspension de résine trichloroacétamide (**88**) (1,0g ; 0,67 mmol ; 1 éq.) dans 20 mL de cyclohexane, sont successivement ajoutés une solution de 13-bromotridécaneol (**19**) (0,37 g ; 1,34 mmol ; 2 éq.) dans du CH₂Cl₂ (20 mL) et du BF₃.OEt₂ (46,9 μL ; 0,34 mmol ; 0,5 éq.) et le milieu est agité à température ambiante pendant 6h. La résine est alors lavée 5 fois au CH₂Cl₂, 5 fois au DMSO, 5 fois au DMF et 5 fois au CH₂Cl₂ puis séchée sous vide. 980,0 mg de résine **86** sont obtenus.

Rendement : 90%

IR (KBr) : Disparition de la bande à ~1664 (C=N)

3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 1196 (s C-O) ; 691 (s C-Br).

Résine Wang substituée au 11-dodécyn-1-ol (89) :

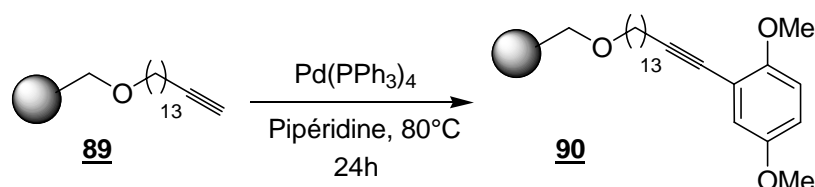


A une suspension de **86** (900,0 mg ; 0,60 mmol ; 1 éq.) dans du DMSO (4 mL) agitée pendant 30 minutes à température ambiante, est ajouté l'alcynure de lithium (110,04 mg ; 1,20 mmol ; 2 éq.) à 0°C. Le milieu réactionnel est agité durant 12h à température ambiante. Le résine est ensuite lavée 5 fois au CH₂Cl₂, 3 fois au KCl saturé, 5 fois au MeOH, 5 fois à l'eau, 5 fois au THF, 5 fois au CH₂Cl₂ et 2 fois à l'Et₂O, puis séchée sous vide. 823,7 mg de la résine **89** sont obtenus.

Rendement : 95%

IR (KBr) : Disparition de la bande à ~691 (C-Br)

3342 (s ≡C-H) ; 3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 1196 (s C-O).

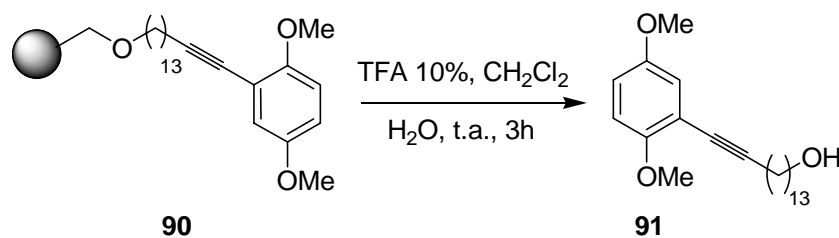
Résine Wang substituée au 15-(2,5-diméthoxyphényl)pentadéc-14-yn-1-ol (90)

A une solution de 2,5-diméthoxy-1-bromobenzène (**2**) (81,12 μL ; 0,54 mmol ; 2 éq.) dans de la pipéridine (2 mL) est additionné du $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (57,8 mg ; 0,05 mmol ; 10 mol%). Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C jusqu'à dissolution du catalyseur puis la résine **89** (400,0 mg ; 0,27 mmol ; 1 éq.) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à 80°C pendant 24h. La résine est ensuite lavée 5 fois au CH_2Cl_2 , 5 fois au DMSO, 5 fois au DMF, 5 fois à l'eau, 5 fois à l' Et_2O et 5 fois au CH_2Cl_2 puis séchée sous vide. 393,08 mg de résine **90** sont obtenus.

Rendement : 90%

IR (KBr) : Disparition de la bande à 3342 ($\equiv\text{C-H}$)

3025 (s $=\text{CH}$) ; 2923 (s $-\text{CH}$) ; 2890 (m $-\text{OCH}_3$) ; 2338 (s $-\text{C}\equiv\text{C}-$) ; 1602 (m, $\text{C}=\text{C}$) ; 1196 (s C-O), 1036 (m C-O).

15-(2,5-diméthoxyphényl)pentadéc-14-yn-1-ol (91)

A une suspension de résine **90** (370 mg ; 0,25 mmol ; 1 éq.) dans du CH_2Cl_2 (12 mL), agitée 30 minutes à température ambiante, est ajouté du TFA (1,2 mL) (10% v/v). Le milieu réactionnel est agité pendant 3h à température ambiante. La résine est ensuite filtrée et le filtrat évaporé. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt 6-4) pour donner 72,10 mg de cristaux blancs.

Rendement : 80%

Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3$

PM : 360,53

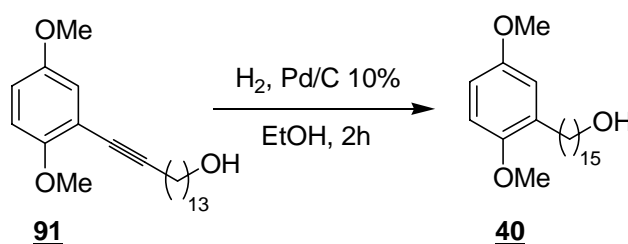
CCM : (heptane-AcOEt 6-4) $R_f = 0,4$

Partie expérimentale

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 18H, H-5' à H-13'); 1,42 (qt, 2H, J = 7,2 Hz, H-4'); 1,62 (qt, 2H, J = 7,1 Hz, H-14'); 2,45 (t, 2H, J = 6,9 Hz, H-3'); 3,46 (t, 2H, J = 6,8 Hz, H-15'); 3,75 (s, 3H, -OCH₃); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 6,77 (s, 1H, H-3); 6,78 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H-6); 6,92 (dd, 1H, J³ = 2,1 Hz, J⁴ = 1,2 Hz, H-5).

RMN-¹³C : (75 MHz ; CDCl₃) δ : 19,8 (C-3'); 28,8 (C-4') ; 28,9 à 29,8 (C-5' à C-14'); 55,7 (-OCH₃) ; 55,4 (-OCH₃); 70,5 (C-15'); 82,2 (C-1'); 94,8 (C-2'); 111,9 (C-2); 113,7 (C-6); 114,6 (C-5); 118,4 (C-3); 153,2 (C-4); 154,3 (C-1).

15-(2,5-diméthoxyphényl)pentadécane-1-ol (40)



A une solution de 15-(2,5-diméthoxyphényl)pentadéc-14-yn-1-ol (**91**) (60,00 mg ; 0,17 mmol ; 1 éq.) dans de l'EtOH (1mL), est ajouté du Pd/C 5% (6,0 mg, 10% m/m). Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère de H₂ pendant 2h. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite et le filtrat évaporé sous vide. Le brut réactionnel est chromatographié sur gel de silice (éluant heptane-AcOEt 6-4) pour donner 55,78 mg de cristaux blancs.

Formule brute : C₂₃H₄₀O₃

PM : 364,56

CCM : (heptane-AcOEt 6-4) R_f = 0,4

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,26 (s large, 22H, H-3' à H-13'); 1,56 (qt, 4H, J = 6,9 Hz, H-2' et H-14'); 2,57 (t, 2H, J = 7,7 Hz, H-15'); 3,64 (t, 2H, J = 6,6 Hz, H-1'); 3,76 (s, 3H, -OCH₃); 3,77 (s, 3H, -OCH₃); 6,67 (dd, 1H, J³ = 8,7 Hz, J⁴ = 3,0 Hz, H-4); 6,72 (d, 1H, J⁴ = 3,0 Hz, H-6); 6,76 (d, 1H, J³ = 8,7 Hz, H-3).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,7 (C-3'); 29,4 to 29,9 (C-4' à C-14'); 30,3 (C-15') ; 32,8 (C-2'); 55,6 (-OCH₃); 56,0 (-OCH₃); 63,1 (C-1'); 110,5 (C-4); 111,2 (C-3); 116,2 (C-6); 132,7 (C-1); 151,8 (C-2); 153,4 (C-5).

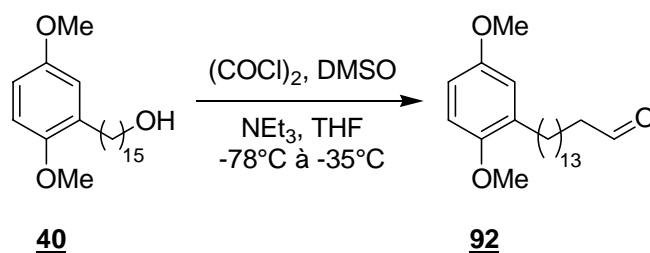
IR (KBr) : 3312 (s O-H), 3056 (w =C-H), 2994, 2898 (s C-H), 2840 (m -OCH₃), 1492 (m C-H), 1460 (m C-H), 784 (w C-H).

UV (acétonitrile) : λ_{\max} : 192 nm (ϵ 169380).

MS (ESI⁺) m/z : 323,3 (M + H⁺).

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₂₀H₃₅O₃ 323,2581, trouvée 323,2575.

15-(2,5-diméthoxyphényl)pentadécanal (92)



A une solution du chlorure d'oxalyle (181,8 mg ; 1,44 mmol ; 1,05 éq.) dans du THF (2,3 mL), est ajouté, à -78°C, du DMSO (107,2 μ L ; 1,51 mmol ; 1,1 éq.) et le mélange est agité pendant 3 minutes à -35°C. Le milieu réactionnel est ensuite ramené à -78°C, et une solution de **40** (500,0 mg ; 1,37 mmol, 1 éq.) dans du THF (4,6 mL) est additionnée. Le milieu est agité 15 minutes à -35°C avant d'ajouter NEt₃ (1,14 mL ; 8,22 mmol ; 6 éq.). Le milieu est à nouveau agité pendant 1 heure à 0°C. Le mélange est ensuite versé sur une solution saturée de NH₄Cl (30 mL) puis extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée. Le brut est chromatographié sur gel de silice flash (éluant heptane-AcOEt 9-1) pour donner 471,2 mg de cristaux blancs.

Rendement : 95%

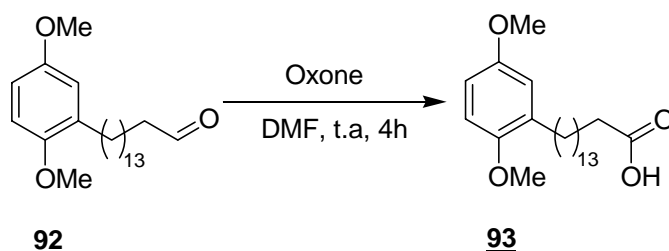
Formule brute : C₂₃H₃₈O₃

PM : 362,55

CCM : (heptane-AcOEt 9-1) R_f = 0,5

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,25 (s large, 20H, H-4 à H-13) ; 1,59 (qt, 4H, J = 7,3Hz, H-3 et H-14) ; 2,42 (td, 2H, J = 7,3 Hz, J = 1,9 Hz, H-2) ; 2,56 (t, 2H, J = 7,3 Hz, H-15) ; 3,76 (s, 3H, -OCH₃) ; 3,77 (s, 3H, -OCH₃) ; 6,67 (dd, 1H, J³ = 8,7 Hz, J⁴ = 3,1 Hz, H-4') ; 6,72 (d, J⁴ = 3,1 Hz, H-6') ; 6,76 (d, J³ = 8,7 Hz, H-3') ; 9,76 (t, 1H, J = 1,9 Hz, -CHO).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,2(C-3) ; 26,2 (C-15) ; 29,2 à 29,4 (C-2, C-5 et C-13) ; 29,5 à 30,1 (C-6 à C-12) ; 44,1 (C-2) ; 55,8 (-OCH₃) ; 56,7 (-OCH₃) ; 112,8 (C-4') ; 113,2 (C-6') ; 115,7 (C-3') ; 126,6 (C-1') ; 150,3 (C-2') ; 154,2 (C-5') ; 203,6 (C-1).

Acide 15-(2,5-diméthoxyphényl)pentadécanoïque (93)

A une solution de **92** (450,2 mg ; 1,24 mmol ; 1 éq.) dans le DMF (10 mL) est ajouté l'Oxone® (763,41 mg ; 1,2 mmol ; 1 éq.). Le mélange réactionnel est agité 4h à température ambiante. Il est ensuite versé sur 30 mL d'eau puis extrait 3 fois à l'Et₂O. La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO₄, filtrée puis évaporée pour donner 470,2 mg de cristaux blancs.

Rendement : 99%

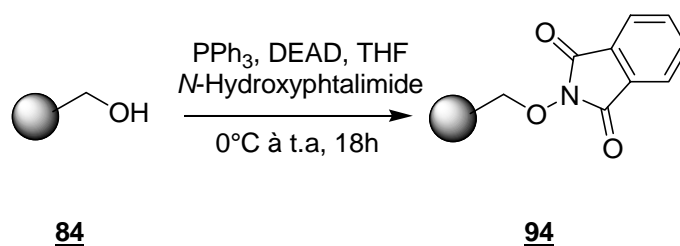
Formule brute : C₂₃H₃₈O₄

PM : 378,55

CCM : (heptane-AcOEt 8-2) R_f = 0,2

RMN-¹H : (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,25 (s large, 20H, H-4 à H-13) ; 1,59 (qt, 4H, J = 7,3Hz, H-3 et H-14) ; 2,27 (t, 2H, J = 7,3 Hz, H-2) ; 2,56 (t, 2H, J = 7,3 Hz, H-15) ; 3,76 (s, 3H, -OCH₃) ; 3,77 (s, 3H, -OCH₃) ; 6,67 (dd, 1H, J³ = 8,7 Hz, J⁴ = 3,1 Hz, H-4') ; 6,72 (d, J⁴ = 3,1 Hz, H-6') ; 6,76 (d, J³ = 8,7 Hz, H-3') ; 10,95 (s, 1H, -COOH).

RMN-¹³C : (75 MHz, CDCl₃) δ : 24,7 (C-3) ; 26,2 (C-15) ; 29,0 (C-4) ; 29,2 (C-13) ; 29,4 à 30,3 (C-5 à C-12) ; 31,5 (C-14) ; 37,1 (C-2) ; 55,9 (-OCH₃) ; 56,2 (-OCH₃) ; 112,3 (C-4') ; 113,5 (C-6') ; 116,1 (C-3') ; 126,8 (C-1') ; 150,2 (C-2') ; 153,8 (C-5') ; 178,5 (C-1).

Résine N-hydroxyphthalimide (94)

A une suspension de résine Wang (500,0 mg ; 0,47 mmol ; 1 éq.) dans du THF (8 mL), agitée à température ambiante pendant 30 minutes, est ajouté du N-hydroxyphthalimide (227,6 mg ;

Partie expérimentale

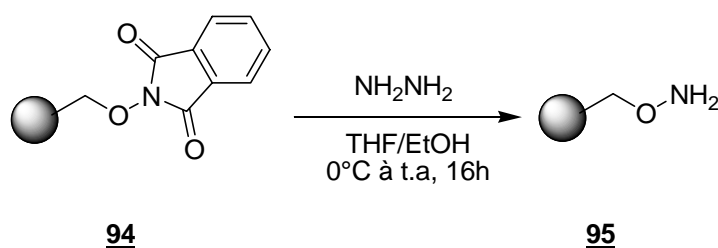
1,40 mmol ; 3 équ.) puis le PPh₃ (365,9 mg ; 1,40 mmol ; 3 équ.). Après dissolution des réactifs, le DEAD (242,9 mg ; 1,40 mmol ; 3 équ.) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité pendant 18h à température ambiante. La résine est ensuite filtrée puis lavée 5 fois au THF, 5 fois au DMF, 5 fois au CH₂Cl₂, 5 fois au MeOH et 5 fois au CH₂Cl₂, puis séchée sous vide. 575,0 mg de résine **94** sont obtenus.

Rendement : 99%

IR (KBr) : Disparition de la bande à ~3500 (-OH)

3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 1727 (s -C=O) ; 1606 (s -C=O) ; 1123 (w amine tertiaire).

Résine hydroxylamine (95)



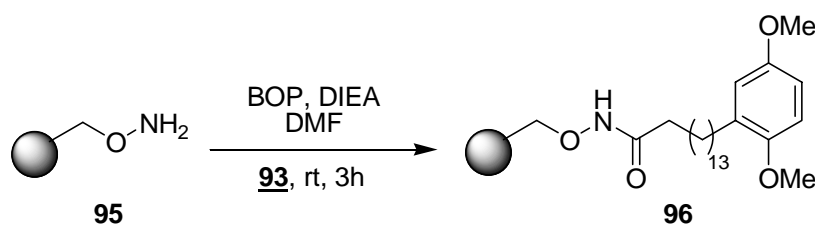
A une suspension de **94** (2,32 g ; 2,15 mmol ; 1 équ.) dans un mélange EtOH/eau 1/1 (16mL), ramené à 0°C, est ajoutée l'hydrazine (2,53 mL ; 81,34 mmol ; 37,66 équ.) puis le milieu est agité à température ambiante pendant 16h. La résine est ensuite filtrée puis lavée 3 fois au DMF, 3 fois au CH₂Cl₂, 2 fois au MeOH, 5 fois au CH₂Cl₂ puis séchée sous vide. 1,84 g de résine **95** sont obtenus.

Rendement : 90%

IR (KBr) : 3025 (s =CH) ; 3024 (s -NH₂) ; 2923 (s -CH) ; 1603 (m -NH₂) ; 819 (w -NH₂) ; 696 (w N-O). Disparition complète des bandes du carbonyle.

Analyse élémentaire mesurée : C (87,71) H (7,48) N (1,16)

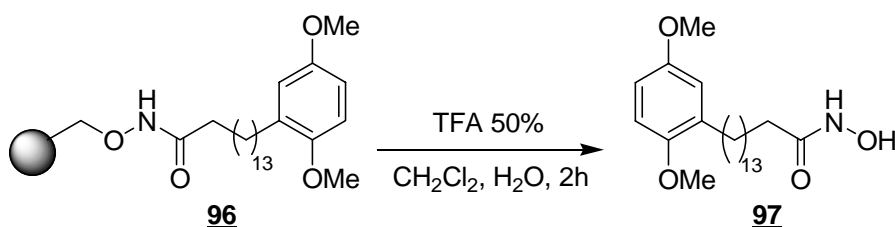
Charge : 0,83 mmol/g

Résine substituée au 15-(2,5-diméthoxyphényl)-N-hydroxypentadécanamide (96)

A une suspension de résine **95** (870,0 mg ; 0,72 mmol ; 1 éq.) dans du DMF (5 mL), agitée pendant 30 minutes à température ambiante, sont ajoutés une solution de **93** (410,0 mg ; 1,08 mmol ; 1,5 éq.) et le BOP (4,8 mg ; 1,08 mmol ; 1,5 éq.) dans le DMF (3 mL). La DIEA (420,1 mg ; 3,25 mmol ; 4,5 éq.) est ensuite additionnée et le mélange est agité à température ambiante pendant 4h. La résine est ensuite filtrée puis lavée 6 fois au DMF, 3 fois au CH₂Cl₂ et 3 fois à l'Et₂O. Elle est ensuite séchée sous vide pour donner 1,15 g de résine **96**.

Rendement : 91%

IR (KBr) : 3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 2840 (m -OCH₃) ; 1684 (s C=O) ; 696 (w N-O).

15-(2,5-diméthoxyphényl)-N-hydroxypentadécanamide (97)

A une suspension de **96** (1,14 g ; 0,95 mmol ; 1 éq.) dans du CH₂Cl₂ (15 mL) est ajouté du TFA (15 mL ; 50% v/v). Le milieu réactionnel est agité pendant 2h à température ambiante. La résine est ensuite filtrée et le brut est évaporé et séché sous vide pour donner 261,7 mg de cristaux blancs.

Rendement : 70%

Formule brute : C₂₃H₃₉NO₄

PM : 393,56

CCM : (heptane-AcOEt 8-2) R_f = 0,2

RMN-¹H : (300 MHz, CD₃OD) δ : 1,25 (s large, 20H, H-4 à H-13) ; 1,59 (qt, 4H, J = 7,3Hz, H-3 et H-14) ; 2,27 (t, 2H, J = 7,3 Hz, H-2) ; 2,56 (t, 2H, J = 7,3 Hz, H-15) ; 3,76 (s, 3H, -

Partie expérimentale

OCH₃) ; 3,77 (s, 3H, -OCH₃) ; 4,86 (s, 2H, -NH/-OH) ; 6,67 (dd, 1H, J = 8,7 Hz, J = 3,1 Hz, H-4') ; 6,72 (d, J = 3,1 Hz, H-6') ; 6,76 (d, J = 8,7 Hz, H-3').

RMN-¹³C : (75 MHz, CD₃OD) δ : 24,7 (C-3) ; 26,2 (C-15) ; 29,0 (C-4) ; 29,2 (C-13) ; 29,4 à 30,3 (C-5 à C-12) ; 31,6 (C-14) ; 37,1 (C-2) ; 55,7 (-OCH₃) ; 56,1 (-OCH₃) ; 112,5 (C-4') ; 113,4 (C-6') ; 116,1 (C-3') ; 126,9 (C-1') ; 150,2 (C-2') ; 153,8 (C-5') ; 168,9 (C-1).

IR (KBr) : 3469 (w -OH) ; 3356 (w -NH) ; 3025 (s =CH) ; 2923 (s -CH) ; 2840 (m -OCH₃) ; 1684 (s C=O) ; 696 (w N-O).

MS (ESI⁺) m/z : 394,3 (M + H⁺).

HRMS (ESI⁺) m/z : calculée pour C₂₃H₄₀NO₄ 394,2786, trouvée 394,2775.

Analyses
physicochimiques et
biologiques

TESTS D'ANTI-OXYDATION

Test au DPPH

Les composés à tester, ainsi que le Trolox®, sont solubilisés dans l'éthanol de manière à obtenir des solutions à 10 mM. Par des dilutions en cascade, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 10 mM à 1 µM. Ensuite, 100 µL de chaque solution sont mélangés à 100 µL d'une solution éthanolique de DPPH à 400 µM, sur une plaque ELISA 96 puits. Le mélange obtenu est agité puis la densité optique de chaque solution est mesurée à 550 nm. La capacité de chaque composé à réduire le radical DPPH est déterminée par la diminution de l'absorbance (DO) à 550 nm, par rapport à des conditions contrôles (EtOH pur).

Test à l'ABTS

Les composés à tester, ainsi que le Trolox®, sont solubilisés dans l'éthanol de manière à obtenir des solutions à 10 mM. Par des dilutions en cascades, nous obtenons une gamme de concentrations allant de 10 mM à 1 µM. Ensuite, 180 µL d'un mélange eau-éthanol 1-1 sont ajoutés sur une plaque ELISA 96 puits, suivis de 30 µL d'une solution aqueuse d'ABTS à 1 mM, 30 µL d'une solution aqueuse de Fe₂SO₄ à 0,5 mM, 30 µL de chaque composé à tester à des concentrations différentes puis 30 µL d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 100 mM. Les mélanges obtenus sont agités à température ambiante, à l'abri de l'air pendant 45 minutes, puis la valeur de l'absorbance à 405 nm est mesurée. La capacité de réduire les radicaux hydroxyles de chacun des composés est déterminée par la diminution de l'absorbance à 405 nm. La solution contrôle est composée d'éthanol pur.

BIOLOGIE

Les composés sont solubilisés dans l'éthanol à 10⁻²M puis dilués dans le milieu de culture aux concentrations désirées. Les conditions contrôles consistent en l'utilisation d'éthanol pur à 0,1%.

Culture des neurones du SNC

Des hémisphères cérébraux de fœtus de souris (15^e jour de gestation) sont disséqués dans du GBSS supplémenté au glucose, de manière à isoler les néocortex. Les cellules nerveuses sont dissociées par la trypsine suivie d'une agitation mécanique. Elles sont ensuite déposées sur des lamelles en verres recouvertes de poly-L-lysine 1 µg/mL, à raison de 200000 cellules par lamelle et par puit. Elles sont ensuite incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO₂ dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, glutamine 2 mM, 1 g/L glucose, 10% serum foetal de veau, penicillin/streptomycin). Après 24h, le milieu est remplacé par du milieu défini (DMEM, 2 mM glutamine, 1 g/L glucose, 16 µg/mL putrescine, 52 ng/mL selenium, 10

Partie expérimentale

µg/mL transferrine, 5 µm/mL insuline et 3 ng/mL progésterone) et les composés à tester sont rajoutés aux concentrations désirées. Les cellules sont à nouveau incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO₂.

Immunomarquage et analyse morphométrique

Après 24h, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (PFA) dans du tampon phosphate (PBS : Phosphate Saline Buffer) pendant 10 minutes. Après 5 lavages au PBS, les cellules sont perméabilisées par traitement au méthanol 100% pendant 5 minutes. Après 5 lavages au PBS, les cellules sont marquées pendant 2 heures avec un anticorps anti-phospho-neurofilaments (Smi312, Sternberger Monoclonal, Lutherville, MD, USA) dilué au 1/400 dans une solution de Serum-albumine bovine (BSA) à 3% dans du PBS. Après cinq lavages, le marquage secondaire se fait pendant 45 minutes avec un anticorps couplé à l'Alexa488 dilué au 1/200 dans du PBS. Après deux derniers lavages au PBS, les lamelles sont lavées à l'eau déminéralisée (Millipore) et montées sur des lames avec de l'aquapolytont.

Des photos sélectionnées au hasard (agrandissement ×20) sont prises avec un microscope Axiovert 200 (Zeiss France, Le Pecq, France) équipé d'une caméra numérique (CoolSnap fx, Roper Scientific, Evry, France). La longueur axonale de chaque neurone est déterminée à l'aide d'un logiciel informatique analyseur d'image (UTHSCSA Image Tool 3.0). 20 champs, au minimum, sont étudiés pour chaque condition expérimentale.

Myéline, Séma3A et inhibiteurs de signalisations cellulaires

La myéline et la Séma3A sont purifiées selon les méthodes décrites respectivement par Norton et al.¹ et Bagnard et al.², respectivement. Les Tyrosine kinase, kinase dépendantes des cyclin, serine/thréonine kinase, ERK1/2 et p38 MAPK, oxydo-reductase, adénylate et guanylate cyclase sont bloqués par les inhibiteurs suivants : genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone; 345838, Calbiochem, San Diego, CA, USA), lavendustin A (428150, Calbiochem), olomoucine (2-[2-hydroxyéthylamino]-6-benzylamino-9-méthylpurine; 494620, Calbiochem), LiCl, 2'-amino-3'-méthoxyflavone (513000, Calbiochem), 4-[4-fluorophényl]-2-[4-hydroxyphényl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole (559388), epigallocatechin gallate (EGCG; E4143, Sigma), chlorhydrate de *cis-N*-(2-phénylcyclopentyl)-azacyclotridéc-1-èn-2-amine (M-182, Sigma) et 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (03636, Sigma). Ces inhibiteurs sont utilisés aux concentrations suivantes donnant un effet inhibiteur maximal : 1 µM [olomoucine, lavendustin, EGCG et chlorhydrate de *cis-N*-(2-phénylcyclopentyl)-azacyclotridéc-1-èn-2-amine, 10 µM (genistein, 2'-amino-3'-méthoxyflavone, 4-[4-fluorophényl]-2-[4-hydroxyphényl]-5-[4-pyridyl]-1H-imidazole et 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) et 1 mM (LiCl). Ces concentrations sont celles donnant l'effet inhibiteur maximal. Des concentrations supérieures à celles décrites plus haut sont souvent cytotoxiques.

Statistics

Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM. La signification statistique est déterminée par ANOVA unilatéral suivie d'un test de Student (KyPlot version 2.0 beta 13). Les différences sont considérées significatives à $p < 0.05$. Chaque condition expérimentale est testée dans trois expériences indépendantes.

- (1) Norton, W. T.; Poduslo, S. E. Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.* **1973**, *21*, 749-757.
- (2) Bagnard, D.; Vaillant, C.; Khuth, S. T.; Dufay, N.; Lohrum, M. et al. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 3332-3341.

Communications Scientifiques

Publications

1. Hanbali, M. ; Bernard, F. ; Berton, C. ; Gatineau, G. ; Perraut, M. ; Aunis, D. ; Luu, B. ; Bagnard, D. Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound. *J. Neurochem*, **2004**, 90(6), 1423-1431.
2. Coowar, D.; Bouissac, J.; Hanbali, M.; Paschaki, M.; Mohier, E.; Luu, B. Effects of indol fatty alcohols on the differentiation of neural stem cell derived neurospheres. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47(25), 6270-6282.
3. Hanbali, M. ; Vela-Ruiz, M. ; Bagnard, D. ; Luu, B. Effects of quinol fatty alcohols on axonal growth in the presence of naturally occurring inhibitory substrates. *J. Med. Chem.* (Soumis).
4. Muller, T. ; Coowar, D. ; Hanbali, M. ; Granbarbe, L. ; Morga, E. ; Heuschling, P. ; Luu, B. Improved Synthesis of Tocopherol Fatty Alcohols and Analogs : Microglial Activation Modulators. (En preparation).

Brevet

1. Luu, Bang ; Bagnard, Dominique ; Hanbali, Mazen. Hydroquinone long chain fatty alcohols and medicaments containing them. Japanese Patent. Accepté.

Communication par affiche

1. Mazen Hanbali, Marta Vela-Ruiz, Dr. Bang Luu. Composés hydroquinoniques neurotrophiques/antioxydants : synthèse et étude biologique. Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Luxembourg, Juin 2004.
2. M. Hanbali, C. Berton, G. Gatineau, M. Perraut, D. Bagnard, B. Luu. Neutralising the growth inhibitory property of Sema3A and myelin proteins using a synthetic neurotrophic factor. EMBO Semaphorin meeting, Cargese, Corse, Juin 2003.
3. M. Hanbali, C. Berton, G. Gatineau, M. Perraut, D. Bagnard, B. Luu. Towards a new therapy for curing brain lesions ? Neurex, Bâle, Mars 2003.
4. Mazen HANBALI, Djalil COOWAR, Dr. Guy DUPORTAIL, Dr. Bang LUU. Etude de l'interaction des alcools gras indoliques avec la membrane cellulaire. 3rd Sigma-Aldrich Symposium for Young Chemists, Obernai, France, Octobre 2002.

Communication orale

1. Hanbali, Mazen ; Bagnard, Dominique ; Luu, Bang. « Synthèse de composés hybrides hydroquinone / ω -alkanol. Etude physicochimique et biologique » Séminaire d'Etude de Chimie Organique, SECO 42, Urrugne, France, Mai 2005.