



HAL
open science

Synthèse et évaluation d'aurones sur des modèles de fibres de tau

Laurent Lunven

► **To cite this version:**

Laurent Lunven. Synthèse et évaluation d'aurones sur des modèles de fibres de tau. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV007 . tel-01442657

HAL Id: tel-01442657

<https://theses.hal.science/tel-01442657v1>

Submitted on 20 Jan 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laurent LUNVEN

Thèse dirigée par **Sabine CHIERICI**
Codirigée par **Ahcène BOUMENDJEL**
Coencadrée par **Marine PEUCHMAUR**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
et du **Département de Pharmacochimie Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Synthèse et évaluation d'aurones sur des modèles de fibres de tau

Thèse soutenue publiquement le **24 novembre 2016**,
devant le jury composé de :

M. Sylvain COTTAZ

Professeur, Université Grenoble Alpes, *Président du jury*

Mme. Isabelle GOSSE

Maître de Conférences, ENSCBP, *Rapporteur*

M. Jean-François HERNANDEZ

Directeur de Recherche, IBMM, *Rapporteur*

M. Marc LE BORGNE

Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1, *Examineur*

Mme. Sabine CHIERICI

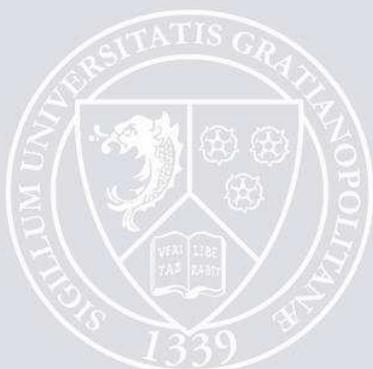
Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes, *Directeur de thèse*

M. Ahcène BOUMENDJEL

Professeur, Université Grenoble Alpes, *Co-directeur de thèse*

Mme. Marine PEUCHMAUR

Maître de Conférences, Université Grenoble Alpes, *Invitée*



Remerciements

Ces trois années de thèse m'ont amené à côtoyer beaucoup de personnes à Grenoble qui me laisseront un excellent souvenir de cette période de ma vie. Je tiens dans ces quelques lignes à remercier chaleureusement toutes ces personnes qui ont contribué à rendre cette expérience très enrichissante pour moi au niveau scientifique comme au niveau humain.

Avant toute chose, j'aimerais remercier les membres du jury, le Pr Marc Leborgne et le Pr Sylvain Cottaz, et particulièrement les rapporteurs, le Dr Isabelle Gosse et le Dr Jean-François Hernandez, pour avoir accepté de juger ces travaux de recherche. Merci également au Labex ARCANE pour avoir financé ces travaux de recherche et au Dr Serge Cosnier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes encadrants de thèse qui ont contribué au bon déroulement de ce projet, se sont toujours montrés très disponibles et m'ont permis d'affiner mes compétences scientifiques. Merci au Professeur Ahcène Boumendjel pour ses suggestions scientifiques et sa gentillesse au quotidien. Merci également au Dr Marine Peuchmaur pour son regard critique et ses conseils pratiques qui m'auront beaucoup fait progresser sur le plan scientifique. Enfin, j'aimerais remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr Sabine Chierici, pour son soutien tout au long de ce projet, sa bonne humeur au quotidien et son apport scientifique sur tous les aspects de ce projet.

J'aimerais également remercier tous mes collègues aussi bien au DCM qu'au DPM avec qui j'ai pu avoir des discussions intéressantes et constructives au cours de ces trois années. Merci en particulier à Thomas, Jean-François, Muriel, Nathalie, Nicolas, Yung, Basile, Serge, Alan, Fabien G et Jérôme, et en particulier Hugues pour son travail sur les images AFM et Romain pour son expertise sur les auronnes. Merci également aux personnes avec qui j'ai pu collaborer dans le cadre de ce projet, en particulier le Dr Marcelle Moulin ainsi que Mme Sandrine Bacot.

Je tiens bien sûr à remercier tous les doctorants, post-doctorants que j'ai eu la chance de côtoyer pendant mes trois années à Grenoble, ainsi que les stagiaires qui ont participé à ce projet de recherche. Merci à mes comparses du DPM, Florine, Flavia, Amel, Momo, Emma, Kim, Dounia, Sam, Luma, Vinicius, Ben, Cédric, Jeff, Julien, Elina, et bien sûr à ceux du DCM, Fabien G, Laureen, Carlo, Andrew, Marie, Solène, Caroline, Matt, Jamie, Déborah, Daniella, Eugénie, Benjamin L, Emeline, Maëlle et Mathilde. J'ai passé d'excellents moments avec vous, au labo comme en dehors, et j'ai beaucoup apprécié les nouvelles expériences et les voyages.

Enfin, je souhaite remercier ceux qui ont partagé ma passion du sport, en particulier Yung et Fabien T pour le tennis. Merci à Laureen, Sabine, Hugues et Fabien G pour m'avoir inclus dans leur valeureuse équipe de l'Ekiden. Et enfin, j'aimerais remercier toute l'équipe de foot du labo avec qui j'ai passé de très bons moments, Thomas, Alan, Andrew, Fabien T, Momo, Fabien G, David, Benjamin L, Quentin, Kamal... j'en oublie sûrement ! Merci à vous pour m'avoir permis de découvrir les joies du sport collectif et pour le beau parcours aux tournois inter-labos.

Merci à tous !

Table des matières

Avant-propos	13
Abréviations.....	15
Liste des acides aminés naturels	18
INTRODUCTION GENERALE	22
CHAPITRE 1 : Introduction bibliographique.....	26
I LA PROTEINE TAU ET LES FIBRES AMYLOIDES	26
I.1 Les fibres amyloïdes	26
I.1.1 Généralités	26
I.1.2 Méthodes de caractérisation des fibres amyloïdes	31
I.2 La protéine tau	33
I.2.1 Rôle physiologique	33
I.2.2 Fibrillation et propagation.....	35
I.3 Cas de la maladie d'Alzheimer.....	39
II INHIBITEURS DE LA FIBRILLATION DE TAU	43
II.1 Les benzothiazoles.....	44
II.2 Les phénothiazines, porphyrines et quinoxalines	45
II.3 Les aminothiényridazines.....	46
II.4 Les rhodanines et <i>N</i> -phénylamines	47
II.5 Les dérivés d'hydrazides.....	48
II.6 Les azaphilones.....	49
II.7 Les polyphénols et anthraquinones	50
III LES AURONES.....	53
III.1 Les aurones dans la nature.....	53
III.2 Applications thérapeutiques	54
III.3 Les aurones dans la maladie d'Alzheimer	56

CHAPITRE 2 : Criblage d'une chimiothèque d'aurones sur des modèles des fibres de tau	62
I MODELES PEPTIDIQUES DES FIBRES DE TAU.....	63
I.1 Etat de l'art sur les modèles peptidiques des fibres tau	63
I.1.1 La séquence N265-E338ΔR2 (« PHF43 ») du motif R3	64
I.1.2 La séquence V306-K311 (« PHF6 ») du motif R3	65
I.1.3 La séquence G273-L284 du motif R2.....	67
I.2 Modèles des fibres de tau : synthèse et étude	69
I.2.1 Le modèle AcPHF6.....	70
I.2.2 Le modèle R3	75
I.2.2.1 Mise au point des conditions de fibrillation.....	76
I.2.2.1.1 Test de fluorescence à la ThT	76
I.2.2.1.2 Dichroïsme circulaire et microscopie à force atomique.....	81
I.2.2.2 Validation du modèle R3	84
II CRIBLAGE D'UNE CHIMIOTHEQUE D'AURONES	87
II.1 Criblage à la thioflavine T	87
II.2 Propriétés spectroscopiques des aurones	92
II.2.1 Absorption des aurones	92
II.2.2 Fluorescence des aurones	93
CHAPITRE 3 : Synthèse et évaluation d'aurones polyhydroxylées et fonctionnalisées	100
I ETAT DE L'ART SUR LA BIOSYNTHESE ET LA SYNTHESE CHIMIQUE DES AURONES.....	100
I.1 Biosynthèse des aurones.....	101
I.1.1 Voie « PPO »	102
I.1.2 Voie « PRX ».....	104
I.2 Synthèse chimique des aurones.....	105
I.2.1 Synthèse à partir de chalcones substituées en position 2'	106
I.2.2 Synthèse par cyclisation d' <i>ortho</i> -alkynoylphénols et dérivés	109
I.2.3 Synthèse par couplage Suzuki-Miyaura.....	112

I.2.4 Synthèse par condensation entre une benzofuran-3(2*H*)-one et un benzaldéhyde 113

II SYNTHÈSE D'AURONES 115

II.1 Synthèse d'aurones polyhydroxylées 115

II.1.1 Synthèse directe d'aurones par condensation aldolique de précurseurs hydroxylés 116

II.1.1.1 Synthèse d'aurones polyhydroxylées en position 6 et 7 sur le cycle A... 117

II.1.1.2 Synthèse d'aurones polyhydroxylées en position 4 et 6 sur le cycle A... 117

II.1.2 Synthèse d'aurones par condensation aldolique de précurseurs protégés... 119

II.1.2.1 Synthèse d'aurones polyhydroxylées par l'intermédiaire d'aurones polyméthoxylées 119

II.1.2.2 Alternatives aux groupements méthoxyles..... 120

II.2 Synthèse d'aurones fonctionnalisées 122

II.2.1 Synthèse d'aurones fonctionnalisées par une triple liaison..... 123

II.2.1.1 Synthèse des précurseurs portant une triple liaison..... 124

II.2.1.2 Condensation aldolique des précurseurs portant une triple liaison 125

II.2.1.3 Ligation des aurones fonctionnalisées avec une triple liaison 127

II.2.1.3.1 Réaction de cycloaddition avec le modèle IX 129

II.2.1.3.2 Réaction de cycloaddition avec le peptide N₃PHF6..... 130

II.2.2 Synthèse d'aurones iodées..... 134

II.2.2.1 Tentatives d'iodation directe d'aurones 134

II.2.2.2 Synthèse d'aurones *via* des benzofuran-3(2*H*)-ones iodées..... 136

III EVALUATION DES AURONES..... 140

III.1 Cas des aurones polyhydroxylées..... 140

III.1.1 Tests à la ThT 140

III.1.2 Dichroïsme circulaire et microscopie à force atomique..... 145

III.2 Cas des aurones fonctionnalisées 153

III.2.1 Tests de fluorescence à la ThT..... 153

III.2.2 Cas du bioconjugué aurone-peptide	155
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	160
EXPERIMENTAL PROCEDURE	166
BIBLIOGRAPHIE.....	204

Figures

Figure 1.I.1. Structure de colorants se liant aux fibres amyloïdes	27
Figure 1.I.2. Fibrillation dans l'axe des liaisons hydrogènes	27
Figure 1.I.3. Fibrillogenèse de protéines solubles en fibres amyloïdes	30
Figure 1.I.4. Processus d'agrégation par suivi de fluorescence <i>in vitro</i>	31
Figure 1.I.5. Profil de structures secondaires en CD	32
Figure 1.I.6. Structure des six isoformes humaines de la protéine tau	34
Figure 1.I.7. Mutants de tau	36
Figure 1.I.8. Conformation « paper-clip » de la protéine tau en solution	37
Figure 1.I.9. Processus d'agrégation de la protéine tau	38
Figure 1.I.10. Propagation de la protéine tau pathologique	39
Figure 1.I.11. Cascade amyloïde	40
Figure 1.I.12. Progression des NFTs au sein du cerveau	41
Figure 1.I.13. Différentes approches thérapeutiques contre le dysfonctionnement de tau	42
Figure 1.II.1. Cibles thérapeutiques contre l'agrégation de la protéine tau	43
Figure 1.II.2. Familles d'inhibiteurs de la fibrillation de tau	44
Figure 1.II.3. Exemples de dérivés de benzothiazole	44
Figure 1.II.4. Structure du bleu de méthylène et de ses dérivés déméthylés	45
Figure 1.II.5. Exemples de porphyrines	46
Figure 1.II.6. Exemples de dérivés de quinoxaline	46
Figure 1.II.7. Exemples de dérivés d'aminothiényridazine	47
Figure 1.II.8. Exemples de dérivés de rhodanine et de <i>N</i> -phénylamine	48
Figure 1.II.9. Exemples de dérivés d'hydrazide	49
Figure 1.II.10. Exemples de dérivés d'azaphilone	50
Figure 1.II.11. Structure chimique des polyphénols	50
Figure 1.II.12. Exemples de polyphénols	51
Figure 1.II.13. Exemples de dérivés d'anthraquinone	52
Figure 1.III.1. Structure de flavonoïdes	53
Figure 1.III.2. Aurones et analogues avec des propriétés anti-inflammatoires	55

Figure 1.III.3. Aurones étudiées sur la fibrillation du peptide A β	57
Figure 1.III.4. Aurones radiomarquées	58
Figure 1.III.5. Marqueurs des NFTs de tau en phase clinique	59
Figure 2.I.1. Séquences des isoformes, des mutants, et des modèles peptidiques de fibres de tau	63
Figure 2.I.2. Exemples d'inhibiteurs de la fibrillation du modèle AcPHF6	67
Figure 2.I.3. Formation de fibres à partir du peptide G273-L284	68
Figure 2.I.4. Structures d'inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau	70
Figure 2.I.5. Fluorescence et CD du modèle AcPHF6 dans le tampon phosphate ou MOPS	71
Figure 2.I.6. AFM du modèle AcPHF6	71
Figure 2.I.7. Fluorescence et CD du modèle AcPHF6 avec des inhibiteurs	73
Figure 2.I.8. AFM du modèle AcPHF6 avec des inhibiteurs	73
Figure 2.I.9. Absorption de la curcumine et de la myricétine	74
Figure 2.I.10. Séquences peptidiques du modèle R3 et du modèle AcR3	76
Figure 2.I.11. Variation de fluorescence en fonction de la concentration de ThT ou de fibres	78
Figure 2.I.12. Fibrillation du modèle R3 dans le tampon phosphate	79
Figure 2.I.13. Fibrillation du modèle AcR3 dans le tampon phosphate	80
Figure 2.I.14. CD des modèles R3 et AcR3 dans le tampon phosphate	82
Figure 2.I.15. AFM des modèles R3 et AcR3 dans le tampon phosphate	83
Figure 2.I.16. Hélicité des fibres des modèles R3 et AcR3	83
Figure 2.I.17. Fluorescence et CD du modèle R3 avec des inhibiteurs	85
Figure 2.I.18. AFM du modèle R3 avec des inhibiteurs	85
Figure 2.II.1. Inhibition de fluorescence en présence de l'aurone 1o	88
Figure 2.II.2. Absorption des aurones du premier criblage	93
Figure 2.II.3. Fluorescence de l'aurone 1c	94
Figure 2.II.4. Fluorescence des aurones 1u et 1v	95
Figure 2.II.5. Fluorescence des aurones 2h et 2i	96
Figure 3.I.1. Structure et nomenclature des aurones et des chalcones.	101
Figure 3.II.1. Suivi chromatographique du radiomarquage de l'aurone 3g*	136
Figure 3.III.1. Absorption des aurones issues des différents criblages	142
Figure 3.III.2. Fluorescence de l'aurone 3b	143
Figure 3.III.3. Fluorescence des aurones 3g et 3h	144

Figure 3.III.4. Fluorescence de l'aurone 3l	144
Figure 3.III.5. Fluorescence des aurones 3i, 3j et 3k	145
Figure 3.III.6. CD des modèles AcPHF6 et R3 avec les aurones 3g, 3h, 3l et 3m	147
Figure 3.III.7. CD de la cinétique de fibrillation du modèle AcR3 avec les aurones 3l et 3m	148
Figure 3.III.8. CD des modèles AcPHF6 et R3 avec les aurones 3i, 3j et 3k	148
Figure 3.III.9. AFM du modèle AcPHF6 avec les aurones 3g, 3h et 3i	149
Figure 3.III.10. AFM du modèle R3 avec les aurones 3g, 3h, 3i, 3j, 3k, 3l et 3m	151
Figure 3.III.11. Absorbance et fluorescence des aurones 1s, 4f et 4g	154
Figure 3.III.12. Fluorescence, CD et AFM du bioconjugué et de l'aurone 4e	155

Schémas

Schéma 3.I.1. Biosynthèse des aurones	101
Schéma 3.I.2. Mécanisme de biosynthèse de l'auréusidine	102
Schéma 3.I.3. Mécanisme de biosynthèse de l'hispidol	104
Schéma 3.I.4. Voies de synthèse chimique des aurones	106
Schéma 3.I.5. Synthèse de flavonoïdes à partir de la 2'-hydroxychalcone	107
Schéma 3.I.6. Réaction de Wheeler	108
Schéma 3.I.7. Synthèse de flavonoïdes à partir de la 2'-hydroxy-6'-méthoxychalcone	109
Schéma 3.I.8. Synthèse d'aurone à partir de la 2'-halogénochalcone	109
Schéma 3.I.9. Synthèse préférentielle d'aurone ou de flavone en fonction du solvant	110
Schéma 3.I.10. Synthèse d'aurones et de flavones à partir d' <i>ortho</i> -alkynoylphénols	111
Schéma 3.I.11. Synthèse d'aurone à partir d'un intermédiaire 2-(1-hydroxyprop-2-ynyl)phénol	111
Schéma 3.I.12. Synthèse d'aurones ou de flavones par couplage Suzuki-Miyaura	112
Schéma 3.I.13. Synthèse d'aurones <i>via</i> une benzofuran-3(2H)-one et un benzaldéhyde	114
Schéma 3.II.1. Stratégies de synthèse utilisées pour l'obtention d'aurones polyhydroxylées	116
Schéma 3.II.2. Voie de synthèse de l'aurone polyhydroxylée 3a	116
Schéma 3.II.3. Voie de synthèse du précurseur 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one I	117
Schéma 3.II.4. Voie de synthèse des aurones 3b et 3c	117

Schéma 3.II.5. Voie de synthèse du précurseur 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one II	118
Schéma 3.II.6. Voie de synthèse des aurones 3d-3f	118
Schéma 3.II.7. Voie de synthèse du précurseur 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one III	119
Schéma 3.II.8. Voie de synthèse des aurones 3g-3m	120
Schéma 3.II.9. Tentatives de synthèse du précurseur 4,6-diacétoxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	121
Schéma 3.II.10. Voie de synthèse du précurseur 3,4,5-triacétoxybenzaldéhyde IV	121
Schéma 3.II.11. Condensation aldolique entre III et IV	121
Schéma 3.II.12. Rétrosynthèse de la ligation d'aurones avec une biomolécule	123
Schéma 3.II.13. Voie de synthèse de la 6-propargyloxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one V	124
Schéma 3.II.14. Voie de synthèse du 4-propargyloxybenzaldéhyde VI	124
Schéma 3.II.15. Fonctionnalisation de benzaldéhydes dihydroxylés par le bromure de propargyl	125
Schéma 3.II.16. Voie de synthèse du 4-formyl- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)benzamide VIII	125
Schéma 3.II.17. Voie de synthèse d'aurones <i>via</i> la 6-propargyloxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one V	126
Schéma 3.II.18. Voie de synthèse d'aurones <i>via</i> la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one II	126
Schéma 3.II.19. Tentatives de synthèse d'une aurone portant une fonction propargylamide	127
Schéma 3.II.20. Voie de synthèse du modèle azidoacétate d'éthyle IX	127
Schéma 3.II.21. Voie de synthèse du peptide N ₃ PHF6	128
Schéma 3.II.22. Ligation de l'aurone 4e avec le modèle IX et avec le peptide N ₃ PHF6	129
Schéma 3.II.23. Voie de synthèse des aurones 4d' et 4e'	129
Schéma 3.II.24. Voie de synthèse des bioconjugués	131
Schéma 3.II.25. Tentatives d'iodation de l'aurone 3g en présence de chloramine T	135
Schéma 3.II.26. Iodation de l'aurone 3g en présence d'Iodogène® sur support	135
Schéma 3.II.27. Iodation des aurone 3g , 3m et 4e en présence d'acide iodique et de diiode	136
Schéma 3.II.28. Iodation des benzofuranon-3(2 <i>H</i>)-ones dans l'éthanol	137
Schéma 3.II.29. Voie de synthèse des aurones iodées 4f-4g	137
Schéma 3.II.30. Condensation de la benzofuran-3(2 <i>H</i>)-one XII avec différents benzaldéhydes	138
Schéma 3.II.31. Voie de synthèse des aurones iodées 4h-4i	138

Tables

Table 1.I.1. Protéines formant des fibres amyloïdes extracellulaires	28
Table 1.I.2. Protéines formant des fibres amyloïdes intracellulaires	29
Table 2.II.1. Aurones polysubstituées et myricétine	89
Table 2.II.2. Dérivés d'aurones avec un motif indolye	90
Table 3.II.1. Conditions de cycloaddition des aurones 4d et 4e avec le modèle IX	130
Table 3.II.2. Conditions de cycloaddition des aurones 4d et 4e avec le peptide N3PHF6	132
Table 3.III.1. Aurones polyhydroxylées	144
Table 3.II.2. Aurones fonctionnalisées	153

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Université Grenoble Alpes sous la direction du Dr Sabine Chierici au sein de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires - I2BM » au Département de Chimie Moléculaire (CNRS-UMR 5250), ainsi que sous la supervision du Pr Ahcène Boumendjel et du Dr Marine Peuchmaur au sein de l'équipe « Chimie Médicinale – MedChem » au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire (CNRS-UMR 5063).

Publication

Laurent Lunven, Hugues Bonnet, Samir Yahiaoui, Wei Yi, Laurène Da Costa, Marine Peuchmaur, Ahcène Boumendjel, Sabine Chierici*, « Disruption of Fibers from the Tau Model AcPHF6 by Naturally Occurring Aurones and Synthetic Analogues », ACS Chemical Neuroscience, 2016, 7, 995-1003. DOI: 10.1021/acschemneuro.6b00102. *Couverture de l'édition de juillet 2016.*

Communication orale à un congrès

L. Lunven, H. Bonnet, A. Boumendjel, M. Peuchmaur, S. Chierici, « Evaluation of aurones interactions with tau aggregates in Alzheimer's disease », 23^{ème} Journées Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Lille, France (15-17/02/2016).

Communications par poster à des congrès

L. Lunven, H. Bonnet, A. Boumendjel, M. Peuchmaur, S. Chierici, « Evaluation of aurones interactions with tau aggregates in Alzheimer's disease », 3rd European Federation for Medicinal Chemistry Young Medicinal Chemist Symposium, Manchester, United Kingdom (01-02/09/2016).

L. Lunven, H. Bonnet, A. Boumendjel, M. Peuchmaur, S. Chierici, « Evaluation of aurones interactions with tau aggregates in Alzheimer's disease », Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Avignon, France (01-03/07/2015). *Prix du meilleur poster.*

L. Lunven, H. Bonnet, A. Boumendjel, M. Peuchmaur, S. Chierici, « Evaluation of aurones interactions with tau aggregates in Alzheimer's disease », Journée de Printemps de la section Rhône-Alpes de la Société Chimique de France, Lyon, France (11/06/2015).

L. Lunven, H. Bonnet, A. Boumendjel, M. Peuchmaur, S. Chierici, « Evaluation of aurones interactions with tau aggregates in Alzheimer's disease », 22^{ème} Journées Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique, Romainville, France (04-06/02/2015).

Participation à des congrès sans communication

5^{ème} Journées Scientifiques du Médicament « Drug design, protéines membranaires et membranes », Grenoble, France (12/06/2015).

4^{ème} Journées Scientifiques du Médicament « Biotechnologies pour la santé », Grenoble, France (19-20/06/2014).

15^{ème} Rencontres de Chimie Organique Biologique, Aussois, France (23-27/03/2014).

Journée Scientifique « Drug Screening : from Phenotypes to Molecular Modeling », Lyon, France (27/02/2014).

Abréviations

AA = acides aminés

ABC = transporteurs à ABC ou "ATP binding cassette"

Ac = acétyle

AD = maladie d'Alzheimer

ADN = acide désoxyribonucléique

AFM = microscopie à force atomique

AS = aurone synthase

Asc = ascorbate

ATP = adénosine triphosphate

ATPZ = aminothiényridazine

AUS = auréusidine synthase

BBB = barrière hémato-encéphalique

BOPCl = Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride

Bt = benzotriazole

Bu = butyle

CD = dichroïsme circulaire

DCC = *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DCM = dichlorométhane

DI = dose d'injection

DIC = *N,N'*-diisopropylcarbodiimide

DIEA = *N,N*-Diisopropyléthylamine

DMAP = 4-diméthylaminopyridine

DMF = *N,N*-diméthylformamide

DMSO = diméthylsulfoxyde

DPM = Département de Pharmacochimie Moléculaire

DTT = dithiothréitol

ECCG = épicatechin 3-gallate

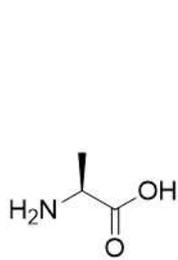
EDC = *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide

Equiv. = nombre d'équivalents

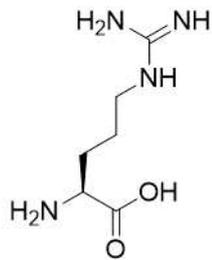
ESI = ionisation par électronébuliseur
Et = éthyle
Fmoc = 9-fluorenylmethoxycarbonyl
FTDP-17 = démence fronto-temporale liée au chromosome 17
HFIP = 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HPLC = chromatographie liquide à haute pression
HRMS = spectrométrie de masse à haute résolution
I2BM = ingénierie et interactions biomoléculaires
IC₅₀ = concentration inhibitrice médiane
IFF = insomnie fatale familiale
IL6 = interleukine 6
MAO = monoamine oxydase
MAP = protéine associée aux microtubules
MBHA = 4-Methylbenzhydramine
MCJ = maladie de Creutzfeldt-Jakob
Me = méthyle
MedChem = chimie médicinale
MOPS = acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique
MS = spectrométrie de masse
MT = microtubules
MW = micro-onde
NBS = *N*-bromosuccinimide
NFTs = dégénérescences neurofibrillaires
NMP = *N*-méthyl-2-pyrrolidone
NMR = résonance magnétique nucléaire
PAMPA = test de perméabilité de membrane artificielle
PBS = tampon phosphate salin
PET = tomographie par émission de positrons
PHC = 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone
PHFs = paires de filaments hélicaux
PolyQ = polyglutamine
PPO = polyphénol oxydase
PRX = peroxydase

PSP = paralysie supranucléaire progressive
PTH = phénylthiazolyhydrazide
PyBOP = (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
ROS = espèce réactive de l'oxygène
RP-HPLC = chromatographie liquide en phase inverse à haute pression
RT = room temperature
SPECT = tomographie par émission monophotonique
SPPS = synthèse peptidique en phase solide
ssNMR = résonance magnétique nucléaire en phase solide
Su = succinimide
TA = température ambiante
TBAI = tétrabutylammonium iodide
TBATB = tribromure de tétrabutylammonium
TBDMS = tétrabutyltriméthylsilyle
TBTU = tétrafluoroborate de O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium
tBu = tert-butyle
TEM = microscopie électronique en transmission
Tf = trifluorométhanesulfonate de méthyle
TFA = acide trifluoroacétique
THC = 2',4',6',4-tétrahydroxychalcone
THF = tétrahydrofurane
THPTA = Tris(3-hydroxypropylthiazolylmethyl)amine
ThS = thioflavine S
ThT = thioflavine T
TIS = triisopropylsilane
TMS = triméthylsilyle
TNF- α = facteur de nécrose tumorale α
TTN = trinitrate de thallium(III)

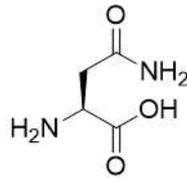
Liste des acides aminés naturels



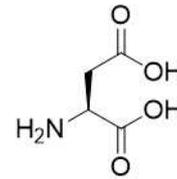
L-Alanine
(Ala / A)



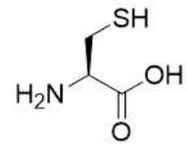
L-Arginine
(Arg / R)



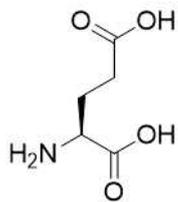
L-Asparagine
(Asn / N)



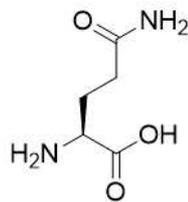
Acide L-Aspartique
(Asp / D)



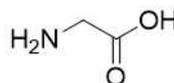
L-Cystéine
(Cys / C)



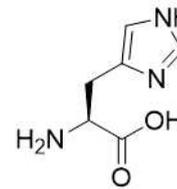
Acide L-Glutamique
(Glu / E)



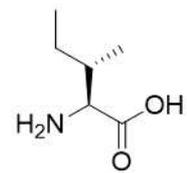
L-Glutamine
(Gln / Q)



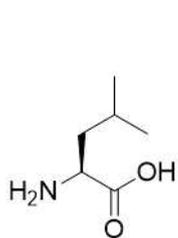
Glycine
(Gly / G)



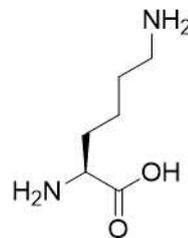
L-Histidine
(His / H)



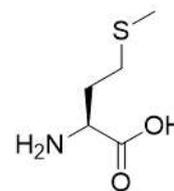
L-Isoleucine
(Ile / I)



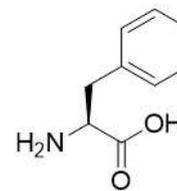
L-Leucine
(Leu / L)



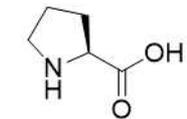
L-Lysine
(Lys / K)



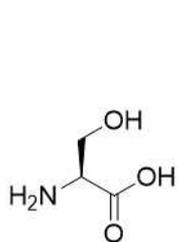
L-Méthionine
(Met / M)



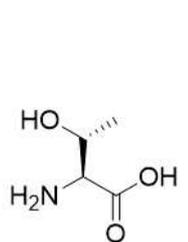
L-Phénylalanine
(Phe / F)



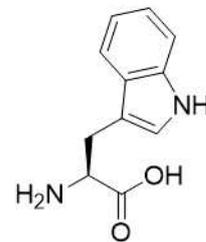
L-Proline
(Pro / P)



L-Sérine
(Ser / S)



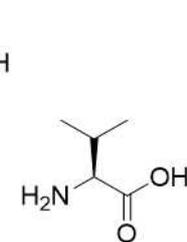
L-Thréonine
(Thr / T)



L-Tryptophane
(Trp / W)



L-Tyrosine
(Tyr / Y)



L-Valine
(Val / V)

Acides aminés **apolaires (ou hydrophobes)** et acides aminés polaires acides, **basiques** ou **neutres** à pH 7.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Ce projet de recherche a pour objet d'évaluer une famille de composés sur la fibrillation de la protéine tau. Il se situe donc dans le contexte des pathologies associées à la protéine tau, aussi appelées tauopathies. Parmi celles-ci figurent notamment la maladie d'Alzheimer qui représente aujourd'hui la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. Les tauopathies sont caractérisées par un dysfonctionnement de la protéine tau qui s'accumule et s'agrège dans le neurone sous forme de fibres insolubles (les dénégérescences neurofibrillaires) aboutissant à la mort cellulaire. Ces fibres amyloïdes sont constituées d'un assemblage supramoléculaire de filaments insolubles fortement organisés avec une structure très riche en feuillets β . La formation de fibres amyloïdes est un phénomène observé pour un nombre grandissant de protéines, telles que l' α -synucléine (maladie de Parkinson), le prion (maladie de Creutzfeldt-Jakob) ou encore la protéine tau et le peptide A β (maladie d'Alzheimer). Dans le cas des maladies neurodégénératives, la formation de ces fibres amyloïdes a été reliée à la mort neuronale et à une neurodégénérescence progressive.

Malgré des avancées considérables ces dernières années dans la compréhension du processus d'agrégation des protéines, la recherche d'un traitement efficace contre ce processus fait toujours défaut. Une des voies envisagées est l'utilisation de molécules organiques, mais à l'heure actuelle, peu de composés permettent de ralentir ou stopper la fibrillation de protéines et notamment de la protéine tau. Au début des années 1990, l'utilisation de tau recombinante ou de mutants de tau a permis d'obtenir des fibres amyloïdes *in vitro* semblables à celles observées *in vivo* dans le cerveau humain des patients atteints de neurodégénérescence. Outre une meilleure compréhension des séquences impliquées dans le mécanisme de fibrillation, ces mutants comme la protéine tau recombinante ont été largement utilisés comme modèles *in vitro* de la fibrillation pour la recherche de composés capables d'interférer avec le processus d'agrégation.

Dans ce contexte, ce projet de recherche a consisté dans un premier temps à développer un autre modèle de fibrillation utilisant une courte séquence peptidique de la protéine tau et à utiliser ce modèle pour évaluer l'effet inhibiteur potentiel d'une petite chimiothèque d'aurones sur la fibrillation de tau. Les aurones constituent une sous-classe de la famille des flavonoïdes, molécules de la catégorie des polyphénols retrouvées à l'état naturel. Peu abondantes, les aurones ont été peu étudiées jusqu'au début des années 2000. L'implication récente d'aurones peu substituées dans des travaux sur la maladie d'Alzheimer, notamment en tant que marqueur des plaques amyloïdes du peptide A β , ont conduit à évaluer ici l'activité de cette classe de composés sur la fibrillation de tau.

Cela a été réalisé par l'utilisation du modèle développé dans ce projet, ainsi qu'un autre modèle déjà développé dans la littérature.

Parmi les composés testés sur la fibrillation de tau dans la littérature, les polyphénols ont montré des activités intéressantes. Une des caractéristiques des composés agissant sur le processus d'agrégation, et plus particulièrement des polyphénols, est la possibilité de former des liaisons hydrogènes qui interfèrent avec l'assemblage des feuilletts β des fibres amyloïdes. Une seconde partie du projet a donc consisté à enrichir la chimiothèque d'aurones disponible en synthétisant de nouvelles aurones, en particulier des aurones polyhydroxylées, puis en évaluant leur activité sur la fibrillation des modèles de fibres de tau.

Ce document est agencé selon trois axes. Une première partie bibliographique relate les connaissances actuelles sur la structure des fibres amyloïdes et le mécanisme de leur fibrillation, en particulier dans le cas de la protéine tau et de la maladie d'Alzheimer, puis présente les familles de molécules inhibitrices de ce processus reportés dans la littérature, avant de décrire la classe des aurones. La seconde partie est focalisée sur les modèles de fibres de tau développés et utilisés dans ce projet, puis leur application pour le criblage de la chimiothèque d'aurones disponibles. Enfin, la dernière partie décrit la synthèse des nouvelles aurones et leur évaluation sur les modèles de fibres de tau.

CHAPITRE 1

CHAPITRE 1 : Introduction bibliographique

Les fibres de tau sont les constituants des dégénérescences neurofibrillaires (ou NFTs pour « neurofibrillary tangles ») retrouvées dans les tauopathies, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer (AD). Dans ce premier chapitre bibliographique, le processus de fibrillation des protéines amyloïdogènes comme tau est décrit dans un premier temps. Dans un second temps, un état de l'art est dressé sur les composés connus pour inhiber la fibrillation de la protéine tau. Enfin, la dernière partie de ce chapitre s'attache à décrire la classe des aurones et leur potentiel dans ce contexte.

I LA PROTEINE TAU ET LES FIBRES AMYLOIDES

Cette partie décrit en premier lieu les caractéristiques communes des fibres amyloïdes, puis celles des fibres de tau et enfin le processus de leur formation dans le cadre de l'AD.

I.1 Les fibres amyloïdes

I.1.1 Généralités

Les pathologies à amylose sont caractérisées par la formation de dépôts insolubles (agrégats) constitués de fibres amyloïdes. Ces dernières proviennent d'un repliement anormal d'une protéine circulante, soluble dans les conditions physiologiques (pH, force ionique), qui adopte une conformation menant à son agrégation et à la formation d'espèces neurotoxiques. Parmi ces pathologies figurent les maladies neurodégénératives pour lesquelles les fibres amyloïdes sont localisées au niveau du cerveau. Le terme amyloïde a été initialement introduit en 1854 par Rudolph Virchow sous le terme *corpora amylacea*, qu'il utilise pour décrire une formation macroscopique observée au niveau de tissus du cerveau.¹⁻² Virchow découvre alors que la *corpora amylacea* adopte une teinte bleue après traitement par de l'iode et violette après l'addition d'acide sulfurique. Ces observations le conduisent à conclure que la *corpora amylacea* est constituée de cellulose, non différenciée à l'époque de l'amidon, ce qui lui vaut le nom d'amyloïde, dérivé du grec *amidon* ou du latin *amylum*. Ce n'est qu'un siècle plus tard que l'évolution des techniques permet de montrer que

les fibres amyloïdes sont principalement constituées de protéines³ et qu'elles ont en commun une ultrastructure fibrillaire définie.⁴ Ce dernier constat est validé par des études de polarisation montrant que les fibres amyloïdes sont biréfringentes en présence de Rouge Congo⁵ (**Figure 1.I.1**), ce qui est révélateur d'une organisation structurale. D'autres travaux ont montré que les fibres amyloïdes peuvent de plus être détectées en microscopie de fluorescence par des colorants tels que la thioflavine T,⁶ le Rouge Congo⁷ ou, plus récemment, le Rouge Thiazine⁸ (**Figure 1.I.1**).

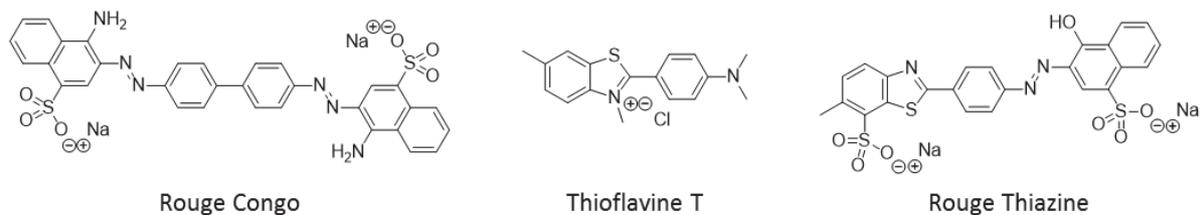


Figure 1.I.1. Structure de colorants se liant aux fibres amyloïdes.

Des études de microscopie électronique ont montré par la suite que les filaments constituant les fibres amyloïdes sont non ramifiés, ont un diamètre avoisinant 100 Å, sont associés par paires et séparés par un espace interfibrillaire.⁹⁻¹⁰ Enfin, une étude des fibres par diffraction aux rayons X a montré en 1968 que celles-ci sont organisées en feuillets β croisés.¹¹ Ces observations ont été corroborées depuis¹²⁻¹⁴ et servent toujours aujourd'hui à définir les fibres amyloïdes selon les caractéristiques suivantes :

- ☞ formation des fibres à partir d'une protéine circulante dans les tissus où les fibres sont observées,¹⁴
- ☞ affinité des fibres pour le Rouge Congo et biréfringence verte en lumière polarisée en présence de Rouge Congo,¹⁴
- ☞ organisation des fibres en feuillets β croisés sous diffraction aux rayons X.¹²⁻¹³ Ces feuillets β sont disposés perpendiculairement à l'axe de la fibre et reliés par des liaisons hydrogènes intermoléculaires étendues selon l'axe de la fibre (**Figure 1.I.2**).

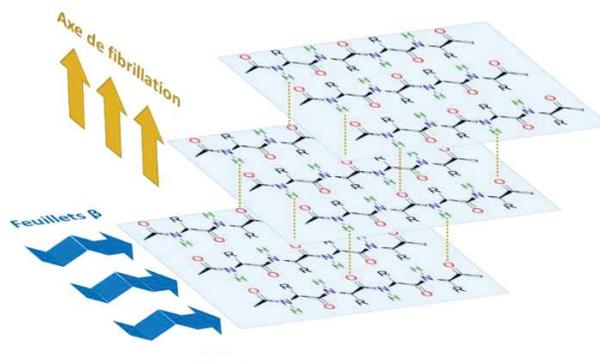


Figure 1.I.2. Fibrillation dans l'axe des liaisons hydrogènes.

De nombreuses pathologies caractérisées par la formation *in vivo* de fibres amyloïdes due au repliement anormal d'une protéine ou d'un peptide ont été identifiées.¹⁴⁻¹⁵ Elles sont présentes chez l'Homme comme chez l'animal (non décrit ici) et ont été récemment cliniquement classées en fonction de la protéine impliquée dans la formation des fibres amyloïdes (**Tables 1.1.1** et **1.1.2**).¹⁴ Ces pathologies peuvent être acquises au cours du temps ou héréditaires. Les agrégats sont généralement formés au niveau extracellulaire et peuvent être localisés au niveau des tissus d'un ou plusieurs organes ou de manière systémique. Parmi les protéines impliquées figurent notamment le prion, l'insuline, le lysozyme ou encore le peptide A β (**Table 1.1.1**).¹⁴

Table 1.1.1. Exemples de protéines formant des fibres amyloïdes extracellulaires et leur précurseur chez l'Homme. IFF : insomnie fatale familiale. MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob

Protéine amyloïde	Précurseur	Systémique (S) ou localisé (L)	Acquis (A) ou héréditaire (H)	Cible / Maladie
AA	(Apo) sérum amyloïde A	S	A	Tout sauf système nerveux central
A β	APP APP (mutation)	L L	A H	Système nerveux central
AFib	Fibrinogène α (mutation)	S	H	Reins (principalement)
ALys	Lysozyme (mutation)	S	H	Reins (principalement)
APrP	Protéine prion	L	A	MCJ, IFF, encéphalopathie spongiforme transmissible
AIAPP	Amyline	L	A	Îlots de Langerhans, insulinome
AIns	Insuline	L	A	iatrogénique
ALac	Lactoferrine	L	A	Cornée

D'autres protéines telles que l' α -synucléine ou la protéine tau forment des fibres amyloïdes au niveau intracellulaire, parfois appelées inclusions intracellulaires (**Table 1.1.2**), et présentent des caractéristiques identiques aux fibres amyloïdes. En particulier, les fibres de la protéine tau se lient au Rouge Congo, ce qui conduit à l'obtention d'une biréfringence verte en lumière polarisée, et forment des fibres structurées en feuillets β croisés sous diffraction aux rayons X.¹⁴

Table 1.1.2. Protéines formant des fibres amyloïdes intracellulaires.

Nom de l'inclusion	Protéine associée	Localisation	Pathologies
Corps de Lewy	α -synucléine	Neurones (intracytoplasmique)	Maladie de Parkinson
Corps de Huntington	Huntigine polyQ	Neurones (intranucléaire)	Maladie de Huntington
Corps de Hirano	Actine	Neurones	Troubles neurodégénératifs
Corps de Collins	Neuroserpine	Neurones	Démence présénile
Non spécifié	Ferritine	Neurones et autres	Troubles neurodégénératifs
Dégénérescences neurofibrillaires	Tau	Neurones (intracytoplasmique)	AD, démences fronto-temporales et autres

La formation de fibres amyloïdes à partir d'une protéine soluble est un processus complexe qui a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières décennies. Dans les différentes pathologies à amylose, un mécanisme similaire régit la transformation de protéines solubles généralement peu structurées en protofilaments insolubles riches en feuillets β , les protofilaments étant les unités constitutives des fibres amyloïdes. La différence observée au niveau de ces dépôts insolubles dans chaque pathologie résulte d'un assemblage supramoléculaire différent des protofilaments (filaments droits ou torsadés) en fibres amyloïdes matures.¹⁶ Le processus de fibrillation suit un mécanisme dit de « nucléation-élongation »^{15, 17} et se déroule selon trois phases : une phase de latence, une phase de croissance ou d'élongation et une phase d'équilibre (ou plateau) (**Figure 1.1.3**). Lors de la phase de latence, la protéine soluble adopte une conformation amyloïdogène et forme des petites unités amyloïdogènes instables qui s'associent pour former un noyau (nucléation), ce qui constitue la phase cinétiquement déterminante.¹⁸ Ce mécanisme est basé sur des études montrant que la phase de latence peut être diminuée par l'ajout de petits noyaux d'agrégation préformés (ou « seeds »).^{15, 19} Suite à la formation d'une masse critique de ces petits agrégats structurés en feuillets β , un processus rapide d'élongation se produit par association de nouvelles unités amyloïdogènes (phase d'élongation).¹⁵ Un nombre variable de feuillets β sont ainsi empilés pour former des protofilaments, unités constitutives des fibres amyloïdes mesurant entre 20 et 50 Å en moyenne.¹⁵⁻¹⁶ Plusieurs de ces protofilaments (deux à six en moyenne) peuvent s'associer de manière hélicoïdale et s'assemblent en parallèle lors de la phase d'élongation.^{10, 16} La dernière phase est obtenue lorsque la concentration de monomères est arrivée à un équilibre. Des fibres amyloïdes matures très stables sont alors formées par association latérale de plusieurs protofilaments, avec un diamètre de 60 à 120 Å en moyenne.¹⁶

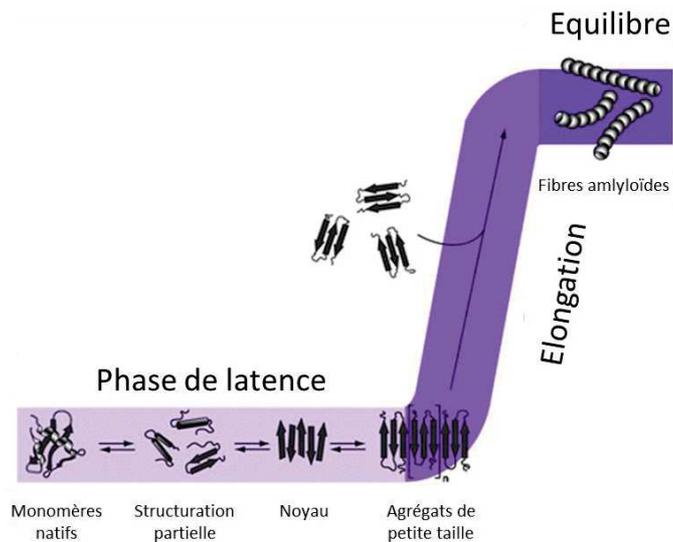


Figure 1.1.3. Fibrillogenèse de protéines solubles en fibres amyloïdes.²⁰

De nombreuses espèces instables et des agrégats intermédiaires sont formés au cours de la phase de latence. En particulier, la formation d'oligomères (deux à cinquante mères) intermédiaires a été mise en évidence dans un nombre croissant d'études.²¹⁻²⁸ Celles-ci pointent le rôle prépondérant des oligomères solubles dans la toxicité observée pour les pathologies à amylose, notamment dans l'AD. L'existence de ces oligomères met en avant la complexité du processus d'agrégation. Très récemment, Arosio *et al.* ont proposé un mécanisme d'agrégation complémentaire au processus du nucléation-élongation admis à travers des travaux focalisés sur la phase de latence.¹⁸ Parmi les procédés microscopiques intervenant au cours de la fibrillation, les auteurs incluent un phénomène de seconde nucléation également décrit dans d'autres travaux récents,²⁹⁻³⁰ ainsi qu'une possible fragmentation de fibres à partir de laquelle une nouvelle élongation peut se produire. Toutefois, les oligomères sont des espèces minoritaires tout au long du processus de fibrillation. En effet, l'étude d'Arosio *et al.*¹⁸ a montré que les espèces majoritaires au cours de la phase de latence sont les monomères, alors que les fibres amyloïdes sont les espèces majoritaires après la phase d'élongation. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de préciser la nature, le mécanisme de formation et le rôle (activité, toxicité) des agrégats intermédiaires formés durant la phase de latence.^{14, 31}

L'évolution des techniques de caractérisation a ainsi permis d'élucider en partie le mécanisme d'agrégation de protéines solubles en fibres amyloïdes. Jusqu'à présent, les études se sont davantage focalisées sur les fibres amyloïdes que sur les intermédiaires formés au cours de la phase de latence. A cet effet, plusieurs méthodes de caractérisation des fibres ont été développées.

I.1.2 Méthodes de caractérisation des fibres amyloïdes

Initialement, les fibres amyloïdes ont été caractérisées par diffraction aux rayons X¹¹ ainsi que par la capacité de quelques colorants, tels que la ThT⁶ et le Rouge Congo⁷ ou plus récemment le Rouge Thiazine⁸ (**Figure 1.1.1**), à se lier à ces fibres. Ces colorants ont été employés pour le diagnostic *post-mortem* des pathologies à amyloses en permettant la reconnaissance des dépôts amyloïdes. La ThT et parfois le Rouge Congo ont été depuis largement employés comme sondes fluorescentes pour suivre le processus d'agrégation *in vitro* de protéines en fibres amyloïdes.³²⁻³⁵ Ces tests de fluorescence sont particulièrement répandus car ils permettent la quantification des fibres amyloïdes. L'utilisation du Rouge Congo est cependant controversée dans ce registre du fait de son influence sur le processus d'agrégation,³⁶⁻³⁹ alors que la ThT n'a pas d'influence connue. Le principe du suivi du processus d'agrégation est le même pour ces deux sondes fluorescentes. La liaison du Rouge Congo aux fibres amyloïdes est caractérisée par un déplacement bathochrome de 480 nm (non lié) à 540 nm (lié) de son maximum d'absorption.³² De même, la liaison de la ThT à des fibres amyloïdes se manifeste par un déplacement bathochrome au niveau de ses spectres d'excitation – 350 nm (non lié) à 440 nm (lié) - et d'émission de fluorescence – 440 nm (non lié) à 490 nm (lié).³⁵ Au cours de la phase de latence, aucune fluorescence n'est observée, la sonde fluorescente ne reconnaissant pas les espèces présentes (monomères, dimères, oligomères). La sonde fluorescente se lie aux espèces riches en feuillets β (protofilaments) formées pendant la phase d'élongation, ce qui est illustré par une augmentation rapide de fluorescence jusqu'à l'obtention d'un équilibre correspondant à la maturation des fibres où la fluorescence n'augmente plus, donnant à la cinétique de fibrillation une allure sigmoïdale (**Figure 1.1.4**).

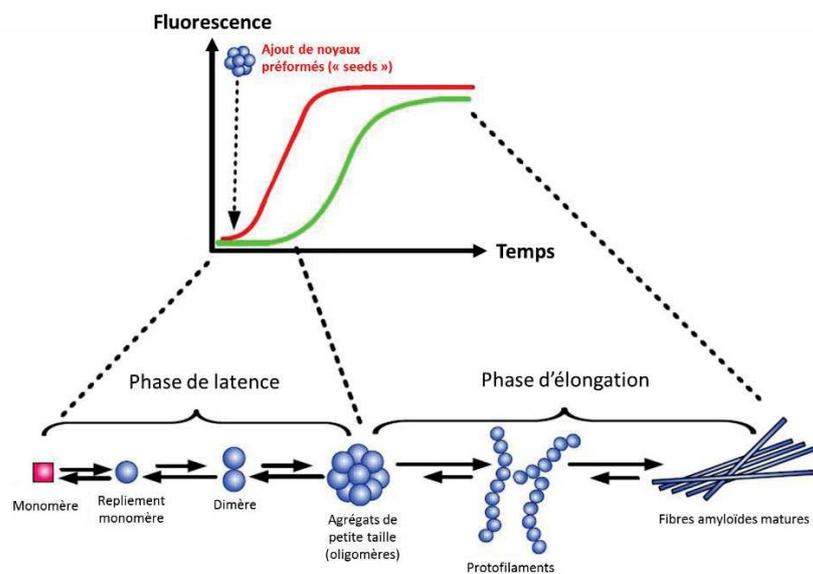


Figure 1.1.4. Processus d'agrégation par suivi de fluorescence *in vitro*.⁴⁰

D'autres méthodes couramment utilisées telles que le dichroïsme circulaire (CD) et la microscopie électronique en transmission (TEM) ou à force atomique (AFM) permettent de caractériser les fibres amyloïdes. Depuis les premiers travaux de Cohen *et al.* en 1959,⁴ la TEM est souvent utilisée pour observer les fibres amyloïdes. Plus récente, la microscopie à force atomique (AFM) permet de visualiser les fibres amyloïdes en trois dimensions avec une précision de l'ordre du nanomètre.⁴¹ Par ailleurs, l'utilisation du CD est issue des travaux de Benditt *et al.*⁴² qui étudient en 1970 l'interaction du Rouge Congo avec des fibres amyloïdes issues du foie et des reins. Les auteurs montrent notamment que cette interaction est synonyme d'une organisation structurale des fibres, ce qui corrobore les travaux précédents d'Eanes *et al.* stipulant que les fibres amyloïdes sont majoritairement constituées de feuillets β .¹¹ Différents profils peuvent être observés en CD en fonction de la structure désordonnée ou au contraire organisée (feuillets β ou hélices α) de la protéine (**Figure 1.1.5**).⁴³ Les feuillets β sont par exemple caractérisés par une ellipticité négative en dessous de 220 nm et une ellipticité positive en dessous de 200 nm. Il est à noter que l'analyse qualitative du CD peut être limitée dans le cas de protéines possédant un mélange de conformations (hélices α , feuillets β ou parties non structurées), comme l'illustrent les fibres amyloïdes de la protéine tau qui présentent un profil non structuré en CD, bien qu'elles soient constituées d'une partie riche en feuillets β (environ 40 %). De plus, Micsonai *et al.* ont très récemment souligné la complexité de l'analyse quantitative en CD dans le cas de structures riches en feuillets β due à leur diversité spectrale (torsion des feuillets β et orientation parallèle ou anti-parallèle de ceux-ci).⁴⁴

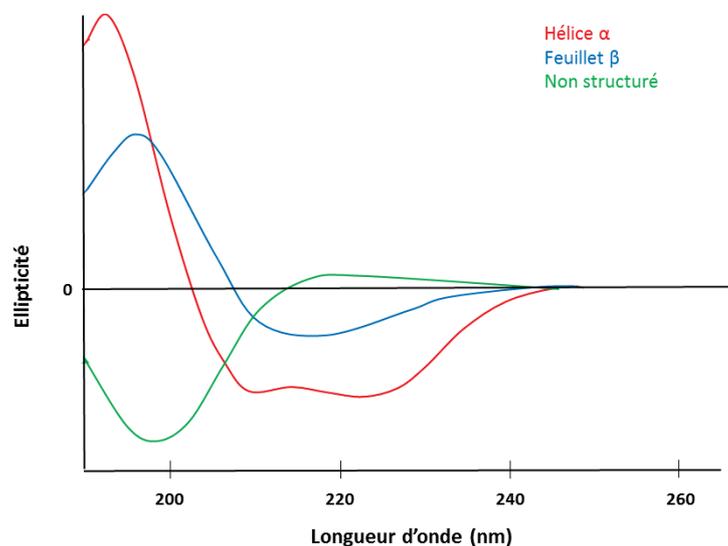


Figure 1.1.5. Profil de structures secondaires en CD (adapté de Brahms *et al.*).⁴³

Enfin, des techniques récentes ont permis une caractérisation structurale plus approfondie des fibres amyloïdes et de leurs intermédiaires. Parmi ces techniques figurent notamment la résonance magnétique nucléaire en phase solide (ssNMR),⁴⁵⁻⁴⁷ la modélisation,⁴⁸ ou très récemment

la spectrométrie de masse (MS).⁴⁹ L'ensemble de ces techniques a permis d'accroître les connaissances sur le processus d'agrégation des fibres amyloïdes de manière générale, mais ne seront pas décrites ici.

I.2 La protéine tau

La protéine tau, pour « tubulin associated unit », est le principal élément des fibres amyloïdes intracellulaires constituant les dégénérescences neurofibrillaires (ou NFTs pour « neurofibrillary tangles ») retrouvées dans plusieurs pathologies appelées tauopathies.⁵⁰ Les NFTs sont ainsi systématiquement présentes dans l'AD⁵¹ ou dans des démences telles que la démence fronto-temporale liée au chromosome 17 (FTDP-17),⁵² la démence pugilistique,⁵³ le syndrome de Guam,⁵⁴ les dégénérescences cortico-basales,⁵⁵ le syndrome de Down,⁵⁶ le syndrome parkinsonien post-encéphalitique⁵⁷ ou la paralysie supranucléaire progressive (PSP).⁵⁸ Les NFTs sont aussi parfois retrouvées dans certaines maladies rares, dans la maladie de Pick⁵⁹ ou dans le cas du vieillissement.⁶⁰ La plupart des connaissances sur la protéine tau ont été mises en exergue ces dernières années dans le cas de l'AD. L'étiologie de cette pathologie a été pendant longtemps attribuée au peptide A β formant des plaques amyloïdes localisées à l'extérieur des neurones. Cependant, le manque de résultats des thérapies ciblant la fibrillation du peptide A β , ainsi qu'un nombre de troubles neurodégénératifs (maladie de Pick, PSP, FTDP-17) marqués par la présence d'inclusions de tau en absence de dépôts d'A β , a mené ces dernières années à reconsidérer le rôle de la protéine tau.

I.2.1 Rôle physiologique

L'ensemble des connaissances sur la structure de la protéine tau et son rôle dans la cellule ont été décrits dans de nombreuses revues au cours des dernières années.⁶¹⁻⁶³ Tau est une protéine structurale qui appartient à la catégorie des protéines associées aux microtubules (MAP). La protéine tau est constituée de deux régions principales (**Figure 1.I.6**) : un domaine de projection (M1-Y197) et un domaine de liaison aux microtubules (S198-L441). Le domaine de projection est principalement composé de résidus acides. Il n'est pas en contact avec la surface des microtubules et interagit avec différentes membranes, kinases ou protéines du cytosquelette. Le domaine de liaison aux microtubules est principalement constitué de résidus basiques et d'une région C-terminale neutre. Cette asymétrie de charges donne à la protéine tau un caractère dipolaire crucial pour l'interaction

de tau avec les microtubules et autres partenaires, ainsi que pour son repliement et son agrégation. Le domaine de liaison aux microtubules est constitué de trois à quatre motifs de répétition (R1 à R4) d'une trentaine d'acides aminés chacun, encodés par les exons 9 à 12, et entourés de part et d'autre d'une région riche en proline d'une quarantaine d'acides aminés. Les motifs de répétition promeuvent l'auto-assemblage des hétérodimères α/β de tubuline en microtubules en se liant à leur surface par l'intermédiaire des régions riches en proline avoisinantes.

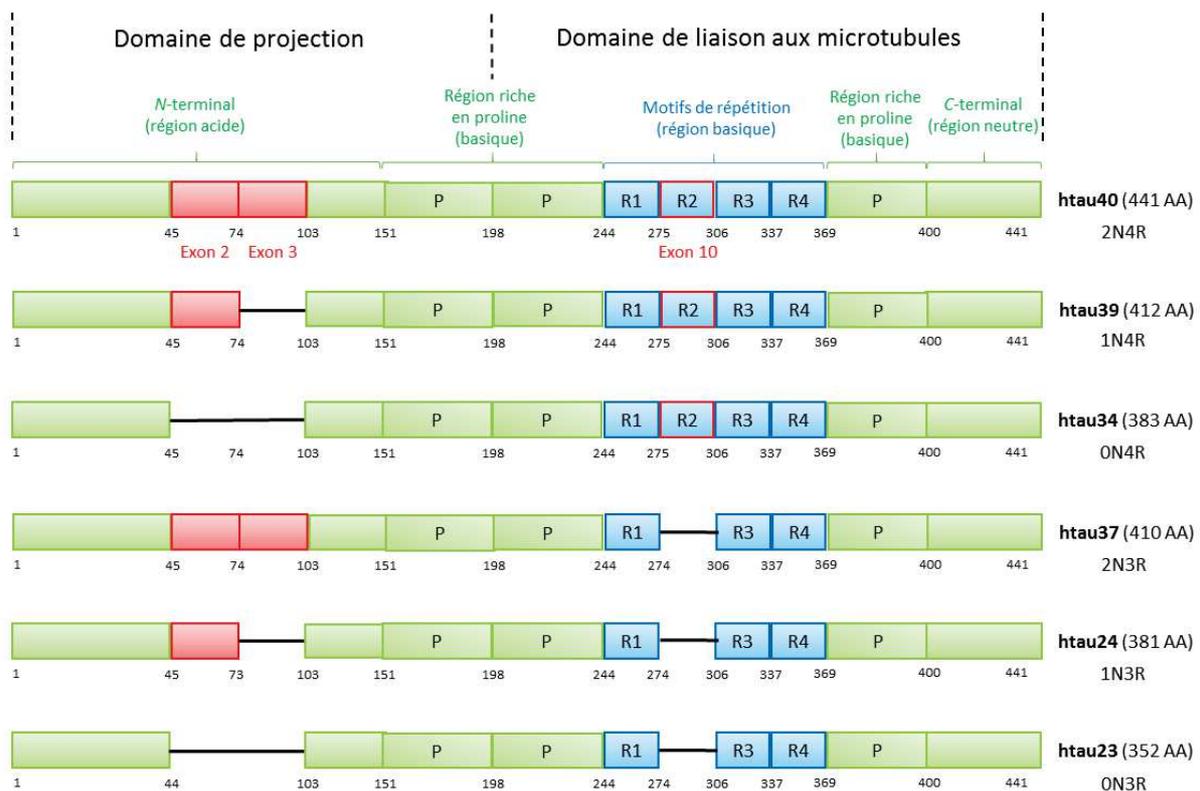


Figure 1.I.6. Structure des six isoformes humaines de la protéine tau. P = région riche en prolines.

Chez l'Homme, le gène codant pour la protéine tau est localisé au niveau du chromosome 17q21.31. L'épissage alternatif de l'ARN messager de ce gène conduit à la production de six isoformes protéiques, composées de 352 à 441 acides aminés, et qui diffèrent en composition selon la présence des séquences protéiques codées par les exons 2, 3 et 10.⁵⁰ Trois des six isoformes ne possèdent pas de motif de répétition R2, motif codé par l'exon 10 (tau-3R ou 10-), alors que celui-ci est présent dans les autres isoformes (tau-4R ou 10+). Les isoformes tau-3R sont préférentiellement formées au stade fœtal, alors que les six isoformes de tau sont présentes chez l'adulte. Les six isoformes sont retrouvées dans les NFTs de cerveaux atteints par l'AD. Les isoformes se différencient également par la présence de deux séquences d'une trentaine de résidus codés par les exons 2 et 3 : ON ou 2-3- en absence des deux séquences, 1N ou 2+3- pour une séquence, et 2N ou 2+3+ pour deux séquences.

A l'état fœtal, la protéine tau est plus courte (tau-3R) et répartie de manière globale au niveau des neurones au sein du système nerveux central. Pendant la maturation neuronale, les isoformes plus longues de tau (tau-4R) sont davantage exprimées et sont principalement localisées dans la partie axonale des neurones selon un gradient proximal-distal.⁶¹ Les isoformes longues (tau-4R) interagissent plus fortement avec les microtubules que les isoformes courtes (tau-3R). Au niveau de la cellule, la protéine tau supporte l'assemblage et la stabilisation des microtubules qui servent de voie pour le transport axonal de vésicules, neurofilaments et organelles, telles que les mitochondries. La protéine tau peut affecter la dynamique de polymérisation des microtubules, leurs propriétés mécaniques (rigidité), leurs modifications post-transcriptionnelles et peut également interagir avec la membrane plasmique des neurones ou servir de point d'accroche à des enzymes. De plus, la protéine tau agit au niveau des synapses, où elle interagit avec des complexes de transmission post-synaptique, régule la proportion de récepteurs du glutamate dans les épines dendritiques et influence le transport des mitochondries synaptiques.⁶⁴ Le mauvais repliement de cette protéine observé dans les tauopathies l'empêche de s'associer aux microtubules et d'assurer ces diverses fonctions. Ces dysfonctionnements, ajoutés à la formation d'espèces toxiques sous forme soluble ou agrégée au niveau des neurones et des synapses, conduisent à la destruction neuronale et à la dégénérescence associée.

Le dysfonctionnement (mauvais repliement et agrégation) de la protéine tau est lié à différentes modifications post-transcriptionnelles. La plus importante est la modification de son état de phosphorylation, tau présentant 85 sites de phosphorylation potentiels au niveau de ses résidus sérine, thréonine et tyrosine.⁶⁵ La protéine dans son état pathologique est excessivement phosphorylée, ce qui limite son association aux microtubules et perturbe le transport axonal. Parmi les autres modifications post-transcriptionnelles figurent l'acétylation, la glycosylation, la glycation, la nitration, l'oxydation, la polyamination, la sumoylation et l'ubiquitination. Ces modifications peuvent influencer l'état de phosphorylation de tau et précèdent la formation des dégénérescences neurofibrillaires. Cependant, leur impact au niveau du processus est encore peu décrit et ne sera pas discuté ici.

1.2.2 Fibrillation et propagation

Le mécanisme de formation de fibres amyloïdes à partir de la protéine tau soluble *in vivo* a été longtemps méconnu, dû en particulier aux difficultés d'obtenir ces fibres *in vitro*. Les fibres amyloïdes de la protéine tau s'assemblent *in vivo* sous la forme de paires de filaments hélicaux (PHFs).

En 1992, Mandelkow *et coll.* étudient la formation de PHFs *in vitro* à partir de la protéine tau recombinante surexprimée chez *Escherichia coli*, ainsi que de mutants de la protéine.⁶⁶ En particulier, les auteurs décrivent la formation de PHFs dans des conditions acides (pH 5,0 à 5,5) à partir de deux mutants de tau, K11 (Q244-Y394) et K12 (Q244-Y394ΔV275-S305 ou Q244-Y394ΔR2), correspondant aux motifs de répétition de la protéine et d'une partie de la séquence en C-terminal (**Figure 1.1.7**). Les auteurs notent également que, contrairement à ces mutants, la protéine tau recombinante ne forme pas de PHFs dans ces conditions. Par la suite, Mandelkow *et coll.* parviennent à former des PHFs à partir de la protéine tau recombinante en l'incubant plusieurs jours à 37 °C dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4 en présence d'héparine, un inducteur polyanionique.⁶⁷ Dans ces mêmes conditions, les mutants K18 (Q244-E372) et K19 (Q244-E372ΔR2),⁶⁷ successeurs de K11 et K12 sans la séquence en C-terminal (**Figure 1.1.8**), forment également des PHFs en seulement quelques dizaines d'heures, alors que les isoformes htau23 et htau40 de la protéine tau recombinante nécessitent plusieurs jours.⁶⁷ Ces études ont permis de prouver que la région des motifs de répétition du domaine d'association aux microtubules est impliquée dans la fibrillation. De plus, le développement des mutants K18 et K19 a permis de montrer que seule cette région est nécessaire pour la formation de fibres. De même, la comparaison des mutants K11 et K18 avec les mutants K12 et K19 respectivement montre que le motif de répétition R2 n'est pas nécessaire à la fibrillation.

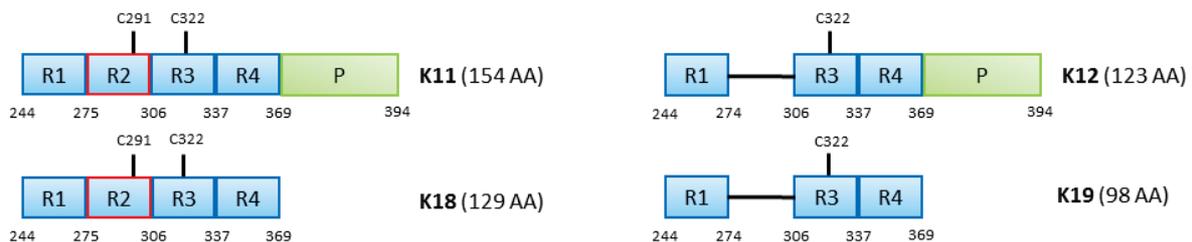


Figure 1.1.7. Mutants de tau développés par Mandelkow *et coll.*⁶⁶⁻⁶⁷

Par ailleurs, l'utilisation des différents mutants (K11 et K12, puis K18 et K19) a permis de mettre en avant la formation de dimères préalablement à la formation de PHFs *via* un pont disulfure intermoléculaire impliquant la cystéine C322 du motif de répétition R3 (**Figure 1.1.7**).⁶⁶⁻⁶⁷ En effet, dans le cas du mutant K19, la fibrillation est ralentie en présence d'un réducteur comme le dithiothréitol (DTT), ce qui souligne que la formation de ponts disulfures intermoléculaires conduisant à des dimères promeut l'agrégation. Inversement, la formation de ponts disulfures intramoléculaires entre les cystéines C291 (motif R2) et C322 (motif R3) inhibe l'agrégation, comme en atteste la formation plus rapide de PHFs pour le mutant K18 en présence de DTT. Ceci suggère également que dans une conformation plus compacte, la protéine est moins encline à agréger. Des études ultérieures ont confirmé que la protéine tau tend à adopter en solution une conformation repliée en épingle (ou

« paper clip »), où les extrémités *N*-terminale et *C*-terminale se replient et recouvrent la région d'association aux microtubules (**Figure 1.1.8**). Ainsi, cette région est soit associée aux microtubules, soit recouverte par les extrémités *N*-terminale et *C*-terminale, ce qui aurait un rôle protecteur en empêchant cette région d'être exposée.⁶⁸ Enfin, des travaux de Margittai *et al.* ont montré que les séquences G272-S289 et G303-S320 issues des motifs de répétition R2 et R3 respectivement peuvent également former des fibres. Les auteurs montrent en particulier par résonance paramagnétique électronique que ces séquences forment des fibres avec des feuillets β organisés en parallèle. De plus, ce phénomène est étendu au sein du domaine d'association aux microtubules. En revanche, cette organisation serait limitée à ce domaine. En effet, les auteurs ont montré que les résidus 400-404 présents en *C*-terminal, à l'extérieur du cœur des fibres, ne sont pas structurés. En conclusion, Margittai *et al.* suggèrent que le cœur des fibres de la protéine tau sont constituées de feuillets β parallèles, alors que les parties hors du domaine de liaison aux microtubules restent globalement non structurées.

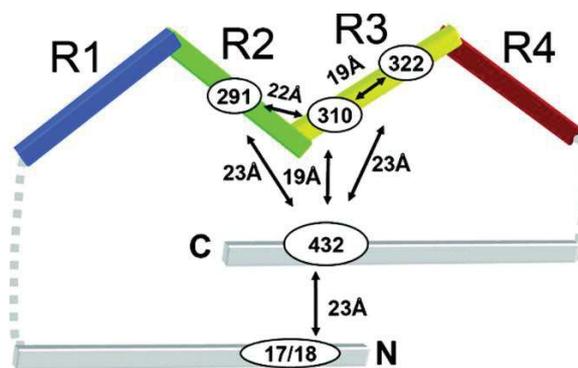


Figure 1.1.8. Conformation « paper-clip » de la protéine tau en solution.⁶⁸

Au sein du processus d'agrégation, différents intermédiaires ont été postulés et coexisteraient donc entre la protéine sous forme de dimères et les PHFs (**Figure 1.1.9**). Outre les oligomères solubles intermédiaires figurent des oligomères granulaires de tau insolubles qui précèdent la formation des PHFs, bien que le mécanisme de leur formation est toujours incertain.⁶⁹⁻⁷⁰ L'ensemble de ces intermédiaires conduit à la formation de PHFs, puis à celle des NFTs. Bien que la toxicité des différents intermédiaires et agrégats soit toujours discutée,⁷¹ la plupart des études récentes pointent la toxicité accrue des oligomères solubles intermédiaires,⁷²⁻⁷³ alors que la formation des NFTs pourraient être une tentative de neuroprotection de l'organisme.

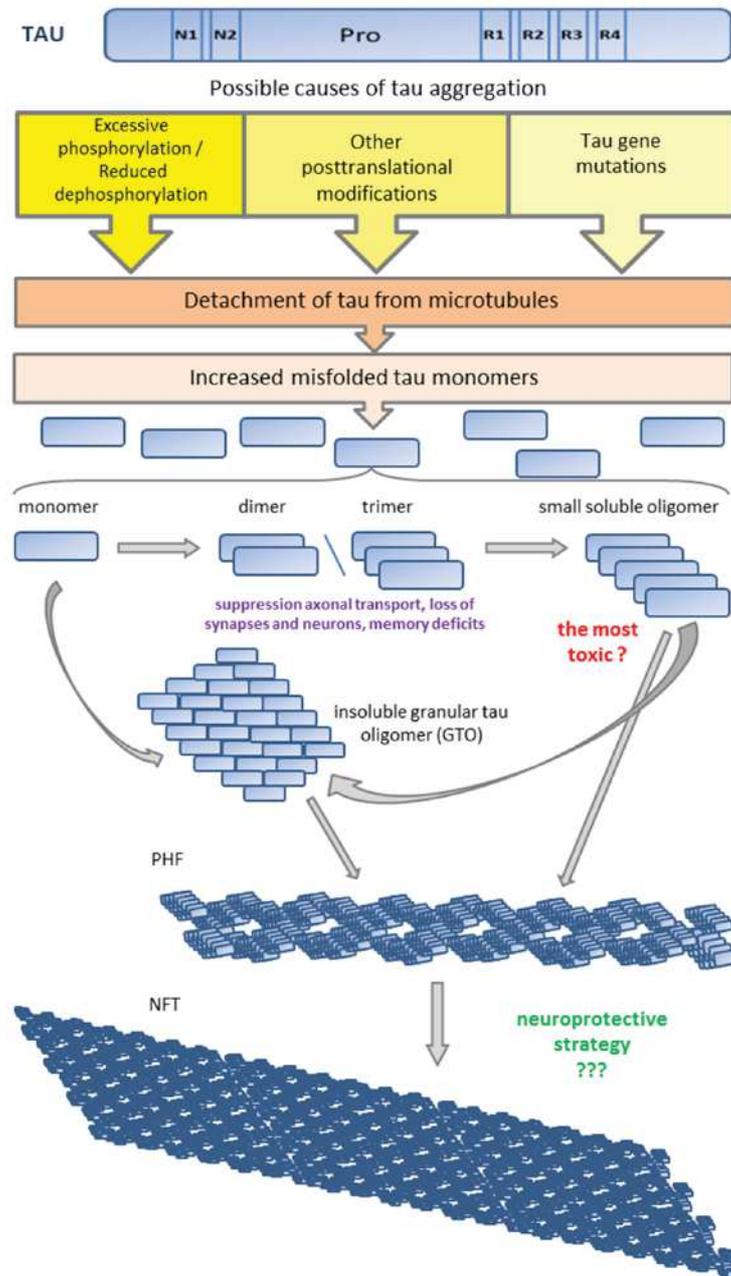


Figure 1.1.9. Processus d'agrégation de la protéine tau.⁶²

Enfin, des études récentes ont montré que la progression des tauopathies peut être reliée à la propagation de la protéine tau,^{65, 74-76} bien que le mécanisme soit encore débattu. La protéine tau, présente majoritairement au niveau intracellulaire, peut être relarguée en partie au niveau extracellulaire dans des conditions physiologiques dépendant des niveaux de calcium intracellulaires. Dans le cas des tauopathies, la quantité de tau extracellulaire retrouvée dans le fluide céphalo-rachidien est plus importante, ce qui est attribué à un dérèglement des niveaux de calcium intracellulaires.⁷⁷ L'excès de protéine tau extracellulaire activerait également son endocytose en augmentant la quantité de calcium intracellulaire par stimulation de récepteurs muscariniques, processus dépendant de l'état de phosphorylation de la protéine tau.⁷⁸⁻⁷⁹ L'endocytose est ainsi

proposée comme voie de propagation de la protéine tau, particulièrement sous forme de monomères ou de petits oligomères, alors que d'autres voies telle que la macropinocytose pour de plus larges agrégats ou l'intervention d'exosomes sont également suggérées (Figure 1.1.10).^{65, 80}

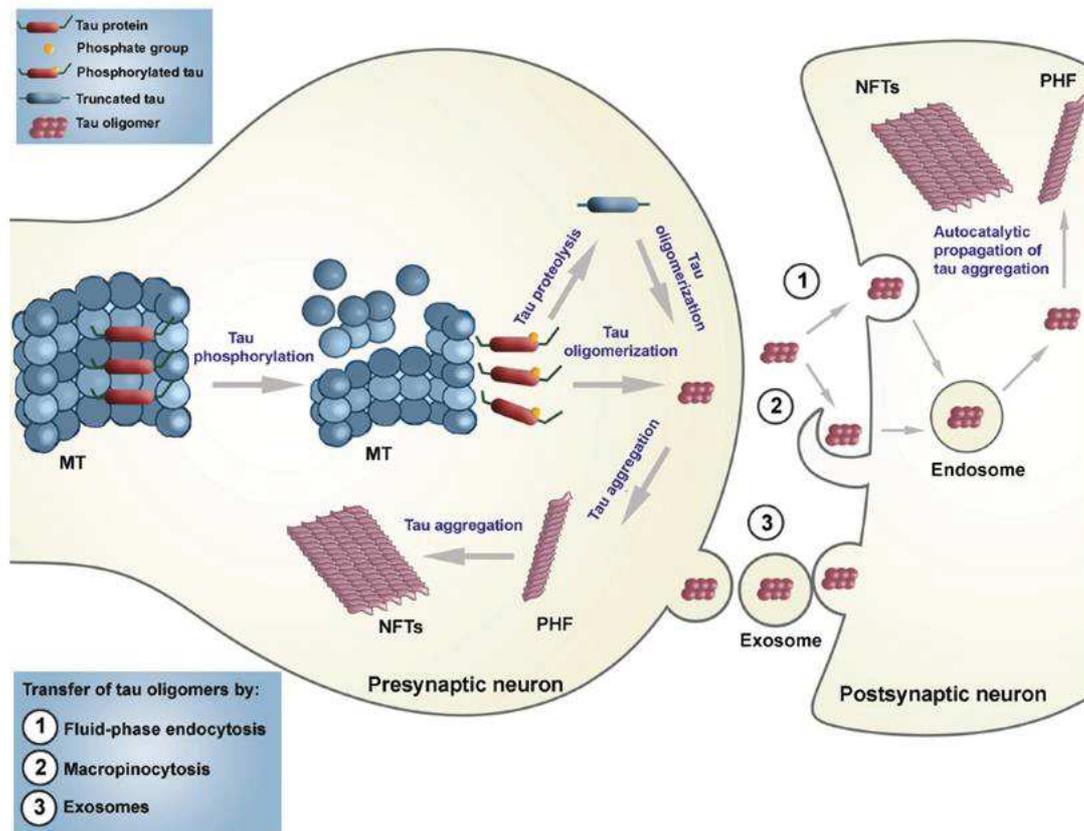


Figure 1.1.10. Propagation de la protéine tau pathologique via des noyaux préformés (« seeds »).⁶⁵
 MT = microtubules.

Ces mécanismes de fibrillation et de propagation de la protéine tau pourraient être communs aux différentes tauopathies.

I.3 Cas de la maladie d'Alzheimer

Bien que la protéine tau soit impliquée dans de nombreuses pathologies (tauopathies), la majorité des études portant sur cette protéine ont été réalisées jusqu'ici dans le cadre de l'AD. Cette pathologie tire son nom d'un neurologue allemand, le Dr Aloïs Alzheimer, qui en 1906 identifia *post-mortem* des dépôts amyloïdes dans le cerveau humain d'une patiente, Auguste Deter. Bien que cette maladie ait été identifiée il y a plus d'un siècle, aucun traitement ne permet aujourd'hui de ralentir ou d'arrêter la dégénérescence neuronale chez les patients atteints. De plus, des outils permettant le

diagnostic de cette pathologie, telles que l'imagerie, sont toujours en phase de développement.⁸¹ Le diagnostic de l'AD est aujourd'hui encore principalement confirmé *post-mortem*. Nonobstant, cette pathologie touche principalement la population âgée avec un nombre de personnes atteintes estimé à environ 50 millions dans le monde, une personne âgée sur neuf étant atteinte de démence au-delà de 65 ans et une sur trois au-delà de 85 ans.⁸² L'AD est considérée comme la sixième cause de décès dans le monde et comme la maladie neurodégénérative prédominante (60 à 80 % des cas).

Jusqu'ici, les recherches portant sur l'AD se sont davantage concentrées sur le rôle du peptide A β , qui forme des amas de fibres amyloïdes extraneuronales, et l'ont considéré comme principal responsable de la neurodégénérescence observée chez les patients atteints. Ce processus, connu sous le nom de « cascade amyloïde » ou « hypothèse amyloïde » (**Figure 1.I.11**) est initié au sein du système nerveux central par l'accumulation de deux peptides A β amyloïdogènes (A β_{40} et A β_{42}), issus de la mauvaise coupure d'une protéine membranaire (APP pour « amyloid precursor protein »). Par simplification, ces deux peptides A β_{40} et A β_{42} sont mentionnés par la suite sous le terme « peptide A β ». A l'instar d'autres fibres amyloïdes extraneuronales, le peptide s'auto-assemble et forme des agrégats, dont la forme finale représente un amas de plaques amyloïdes extraneuronales, aussi appelées plaques séniles. Selon cette hypothèse amyloïde, la génération du peptide A β amyloïdogène serait également responsable d'autres processus observés pendant la neurodégénérescence, en particulier la phosphorylation excessive de la protéine tau.

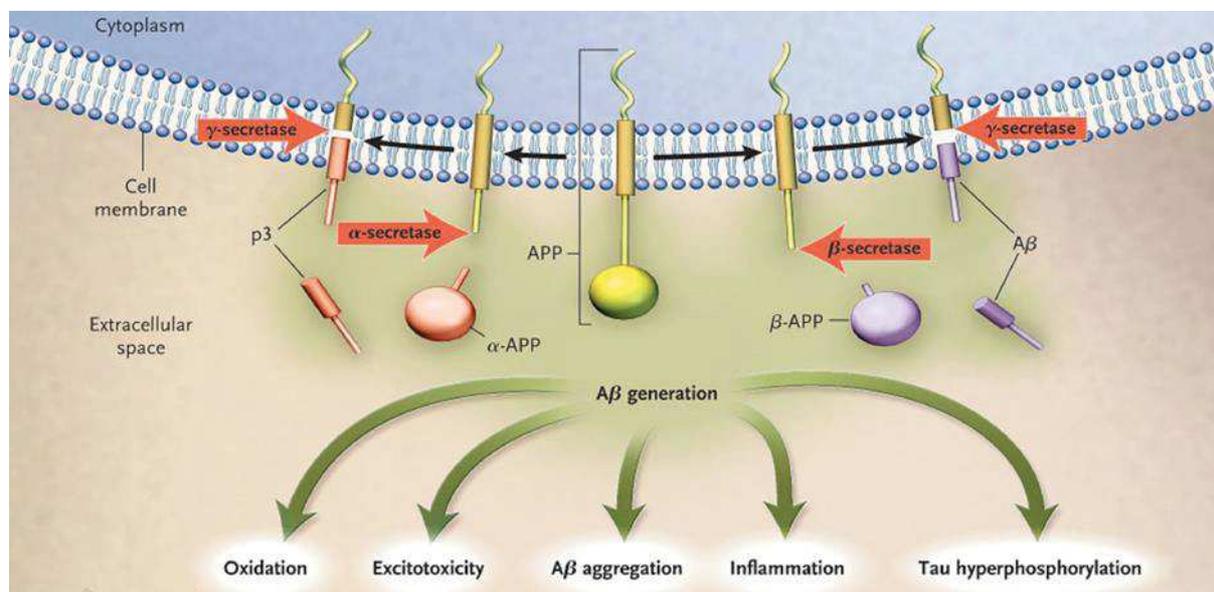


Figure 1.I.11. Cascade amyloïde : neurodégénération induite par la formation du peptide A β .⁸³

Cependant, l'échec des différentes approches portant sur l'inhibition de la fibrillation du peptide A β , associé à la présence de fibres amyloïdes intraneuronales de la protéine tau dans de nombreuses pathologies, a conduit ces dernières années à recentrer les débats sur le rôle de la

protéine tau dans l'AD. Ces considérations s'appuient notamment sur le fait que le dysfonctionnement de la protéine tau menant à la formation de NFTs est en meilleure corrélation avec les symptômes cliniques de l'AD que la fibrillation du peptide A β , notamment les stades précoces de cette pathologie.⁸⁴ La progression topographique des NFTs de tau a d'abord été introduite par Braak et Braak en 1991 et classée selon six phases en corrélation avec les symptômes cliniques de l'AD,⁸⁵ puis classée en dix phases par Delacourte *et al.* quelques années plus tard (**Figure 1.I.12**).⁸⁶ Depuis 2011, trois phases permettent de décrire l'AD : une phase préclinique caractérisée par des changements au niveau cérébral sans symptôme clinique ou physique notable, une phase de pré-démence caractérisée par des troubles cognitifs modérés avec peu d'impact sur le quotidien, puis une phase de démence marquée par d'importants troubles de la mémoire et comportementaux qui perturbe le quotidien.⁸⁷

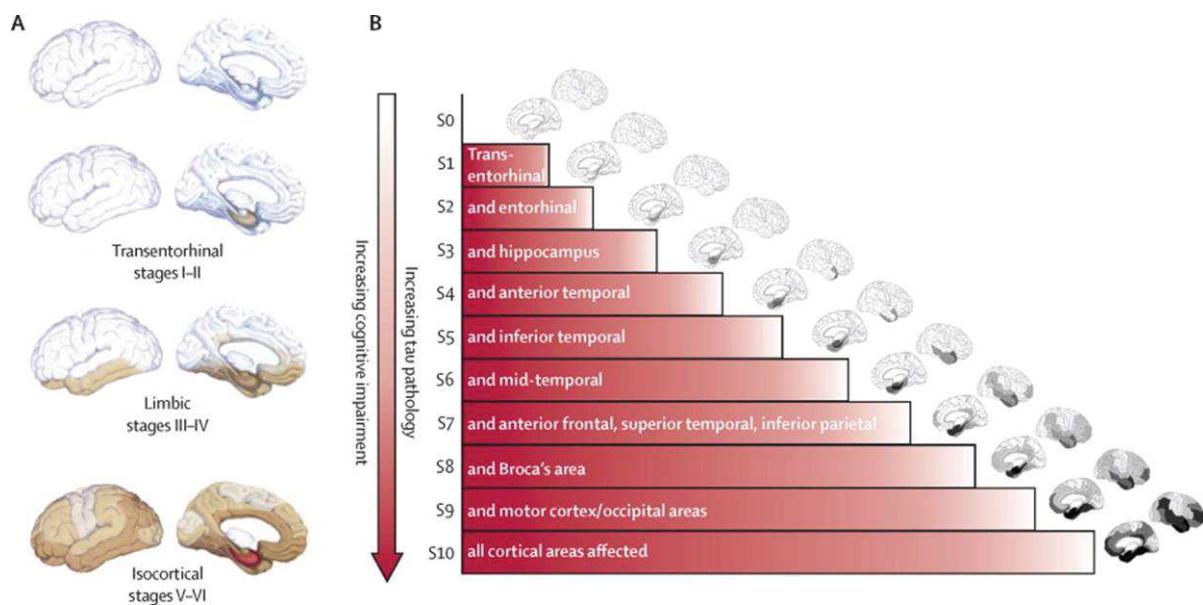


Figure 1.I.12. Progression des NFTs⁸¹ au sein du cerveau selon (A) Braak et Braak⁸⁵ et (B) Delacourte et al.⁸⁶

Par ailleurs, il a été montré que le dysfonctionnement de la protéine tau en absence du peptide A β est suffisant pour induire la neurodégénérescence chez la souris,⁷⁹ alors que le peptide A β semble nécessiter la présence de la protéine tau pour avoir une toxicité *in vitro* et *in vivo*.⁸⁴ La protéine tau semble ainsi avoir un rôle primordial dans la neurotoxicité observée dans l'AD, en particulier pour les stades précoces.

Différentes approches thérapeutiques pour remédier au dysfonctionnement de la protéine tau sont actuellement à l'étude (**Figure 1.I.13**).⁷⁹ Basée sur les conséquences du détachement de la protéine tau des microtubules (déficience du transport axonal, dysfonctionnement synaptique), une première approche porte sur la recherche d'agents permettant la stabilisation des microtubules.⁸⁸ Parmi ces agents figurent des composés avec une activité anti-mitotique,⁸⁹ tels que le paclitaxel ou

l'épothilone, ainsi que le davunétide qui permet de maintenir et stabiliser le réseau microtubulaire. Une seconde approche porte sur l'inhibition du processus d'agrégation de la protéine tau.⁹⁰⁻⁹¹ La complexité de cette stratégie porte sur l'existence parallèle de multiples espèces (monomères, dimères, oligomères, PHFs, NFTs) avec des différents degrés de toxicité. Plusieurs familles de composés ont été identifiées par des criblages *in vitro* ou par des tests cellulaires.^{71, 92-95} Cependant, peu d'études décrivent à l'heure actuelle l'efficacité de ces composés *in vivo*. En outre, la protéine tau est présente en quantité plus importante dans les cerveaux de patients atteints de l'AD que chez les patients non atteints de démence, ce qui suggère qu'un niveau trop élevé de la protéine tau pourrait être toxique pour les neurones.⁹⁰ A cet effet, des travaux ont été réalisés afin de diminuer le taux de la protéine, notamment à travers la régulation de l'expression du gène de tau ou par une augmentation de l'élimination de la protéine. Ce dernier aspect est actuellement étudié à travers les deux principaux systèmes de clairance protéolytique (systèmes ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome),⁹⁶ ainsi que par une stratégie d'immunothérapie de la protéine tau pathologique.⁹⁷ Enfin, une dernière approche porte sur la diminution de la quantité de tau extracellulaire, ce qui permettrait de réduire la propagation de la pathologie.

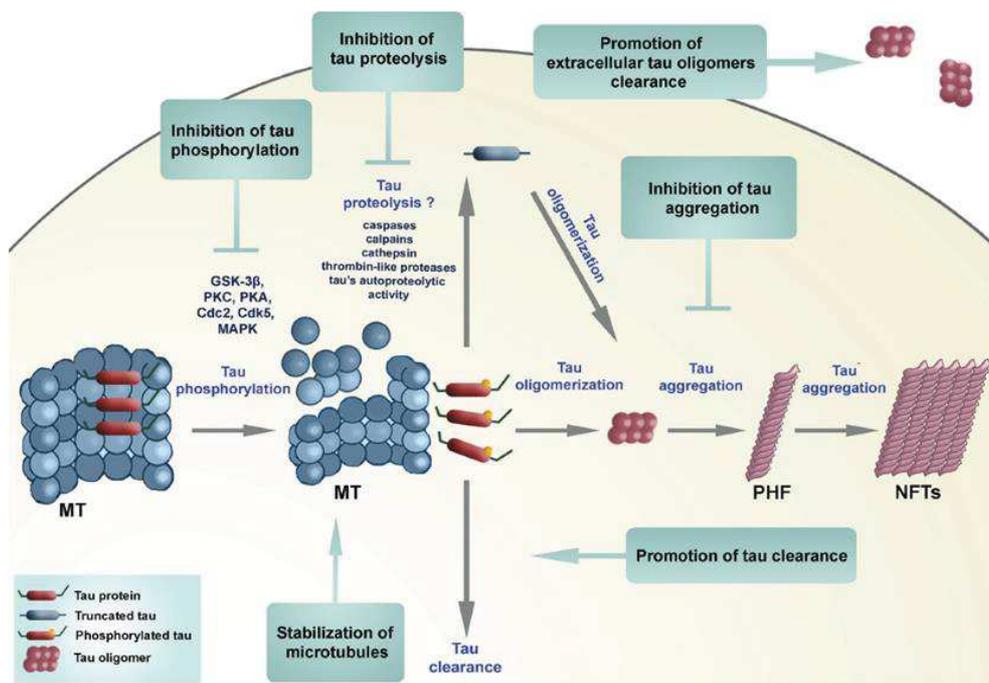


Figure 1.I.13. Différentes approches thérapeutiques contre le dysfonctionnement de la protéine tau.⁶⁵

L'approche utilisée dans ce projet porte sur l'inhibition de l'agrégation de la protéine tau, en particulier de la formation des fibres amyloïdes (PHFs, NFTs). La deuxième partie de ce chapitre dresse en conséquence un état de l'art des inhibiteurs connus de la fibrillation de la protéine tau.

II INHIBITEURS DE LA FIBRILLATION DE TAU

Plusieurs stratégies sont actuellement à l'étude pour inhiber le processus d'agrégation de la protéine tau (**Figure 1.II.1**).⁹⁰ Une première approche vise à limiter la phosphorylation excessive de tau en modulant l'activité des kinases impliquées. Une autre stratégie consiste à empêcher le mauvais repliement de la protéine ou rétablir sa conformation physiologique par l'utilisation de molécules chaperones. Une troisième approche vise à inhiber la fibrillation et en particulier la formation des différents agrégats (oligomères, PHFs). Enfin, une stratégie plus récente consiste à promouvoir la formation d'agrégats moins toxiques et incapables de former des fibres par elongation (« off-pathway oligomers »). Dans ce projet, l'approche étudiée porte sur l'inhibition de la fibrillation de tau.

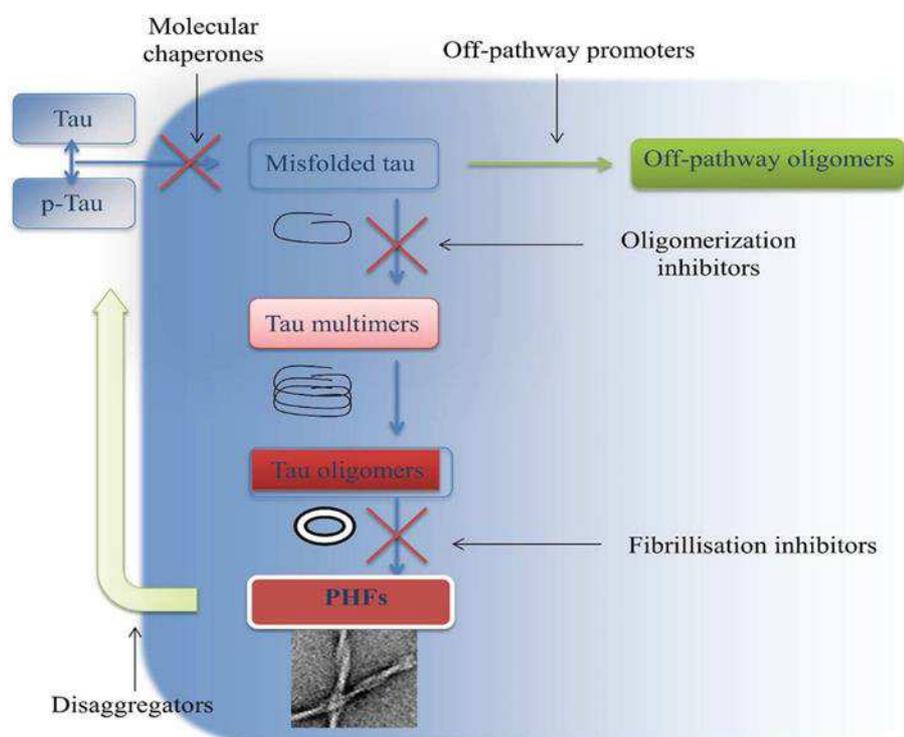


Figure 1.II.1. Cibles thérapeutiques contre l'agrégation de la protéine tau.⁹⁰

Dans un but thérapeutique contre l'AD, de nombreuses familles de molécules ont été évaluées comme inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau au cours des dernières années.^{93-95, 98-100} Il est à noter cependant que ces inhibiteurs ne sont généralement pas sélectifs de la protéine tau, la plupart de ces familles ayant également montré un caractère inhibiteur sur la fibrillation du peptide A β . Parmi les différentes classes d'inhibiteurs décrites jusqu'à présent figurent principalement des composés aromatiques.

Dans cette partie seront présentées les principales familles de composés (**Figure 1.II.2**). Dans la suite de ce document, la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) des composés décrits sera

rapportée en parallèle de la concentration de protéine utilisée dans les tests correspondants. L'IC₅₀ représente la concentration à laquelle le paramètre biologique mesuré, ici la fibrillation, est diminué de moitié.

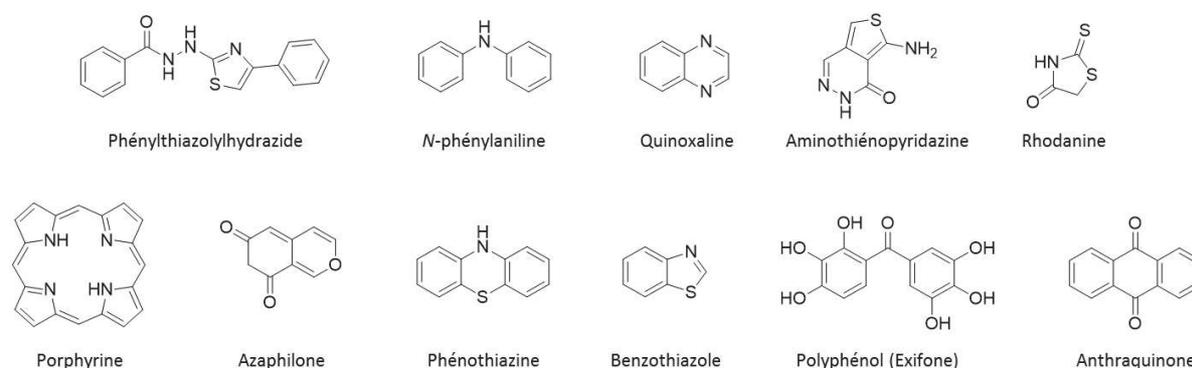


Figure 1.II.2. Familles d'inhibiteurs de la fibrillation de tau.

II.1 Les benzothiazoles

Les dérivés de benzothiazole présentent généralement une bonne affinité pour les fibres amyloïdes.^{90, 93, 98} L'exemple le plus connu de cette classe de composés est la ThT, utilisée comme sonde de reconnaissance des feuilletts β des fibres amyloïdes.³⁵ Bien que partiellement élucidé, le mécanisme de liaison de la ThT et de ses dérivés aux fibres amyloïdes a toutefois permis de souligner que les molécules planaires, telles que les composés aromatiques, peuvent s'intercaler au niveau des feuilletts β .¹⁰¹ La ThT et plusieurs de ses dérivés ne sont pas actifs sur la fibrillation de la protéine tau.⁹³ Cependant, quelques dérivés de benzothiazole, dont le composé N744 (IC₅₀ = 0,3 μ M pour htau40 à 4 μ M), ont illustré le potentiel inhibiteur de fibres de cette famille.¹⁰² Ces composés dont N744 (**Figure 1.II.3**) présentent de plus une meilleure affinité pour les fibres de tau que la ThT, ce qui est attribué au caractère étendu de leur aromaticité.^{90, 98}

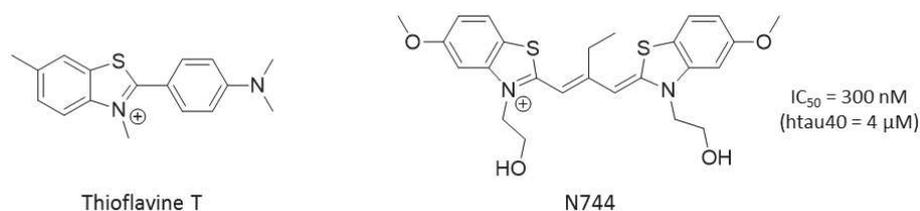


Figure 1.II.3. Exemples de dérivés de benzothiazole.

II.2 Les phénothiazines, porphyrines et quinoxalines

Dès 1996, Wishik *et al.* montrent que certaines phénothiazines sont capables d'empêcher l'interaction entre plusieurs protéines de tau.¹⁰³ Les auteurs s'appuient notamment sur le bleu de méthylène (**Figure 1.II.4**), historiquement utilisé en clinique pour ses applications variées (colorant, anti-dépressant ou anti-malarique).¹⁰⁴ Le bleu de méthylène inhibe la formation de la liaison tau-tau avec une constante d'inhibition de 3,4 μM (tau à 0,489 μM). Les auteurs notent également une plus grande efficacité de ses dérivés déméthylés, l'azure A (0,108 μM) et l'azure B (0,112 μM). Une étude ultérieure de Taniguchi *et al.* regroupant plusieurs composés de la classe des phénothiazines montre également que la quinacrine moutarde, une acridine, inhibe la fibrillation de htau39 (22 μM) avec une IC_{50} de 3,1 μM , proche de celle de l'azure A (2,6 μM) et de l'azure B (1,9 μM).⁹³ L'activité de ces composés est également attribuée à la structure planaire et aromatique, la perte de celle-ci menant à une inhibition faible.^{93, 98} Des travaux récents d'Akoury *et al.* suggèrent également que l'activité des phénothiazines, en particulier du bleu de méthylène et de ses dérivés déméthylés, provient de leur action oxydante au niveau des cystéines, transformant les fonctions sulfures en acides sulféniques, sulfoniques ou sulfoniques, ce qui stabilise la protéine tau sous forme de monomère en l'empêchant de former des dimères.¹⁰⁵ Les effets du bleu de méthylène sur les fonctions cognitives sont actuellement testés en phase II clinique sur des patients âgés sains ou atteints de troubles cognitifs modérés.¹⁰⁶

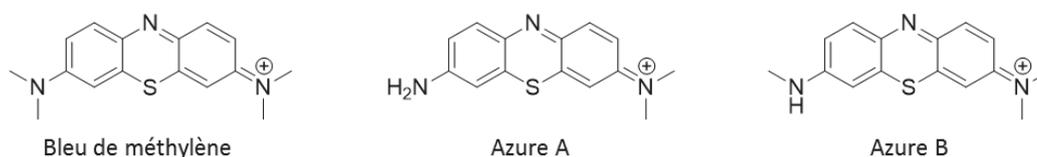


Figure 1.II.4. Structure du bleu de méthylène et de ses dérivés déméthylés.

Taniguchi *et al.* ont également testé plusieurs porphyrines contre la fibrillation du peptide A β et de la protéine tau.⁹³ Si celles-ci sont généralement plus actives sur la fibrillation du peptide A β , certaines porphyrines présentent cependant une activité de l'ordre du micromolaire sur la fibrillation de tau (**Figure 1.II.5**). De plus, contrairement aux autres familles de composés testés et malgré une activité moindre (IC_{50} = 67 μM pour htau39 à 22 μM), seule la phtalocyanine est capable de désassembler les filaments de tau.

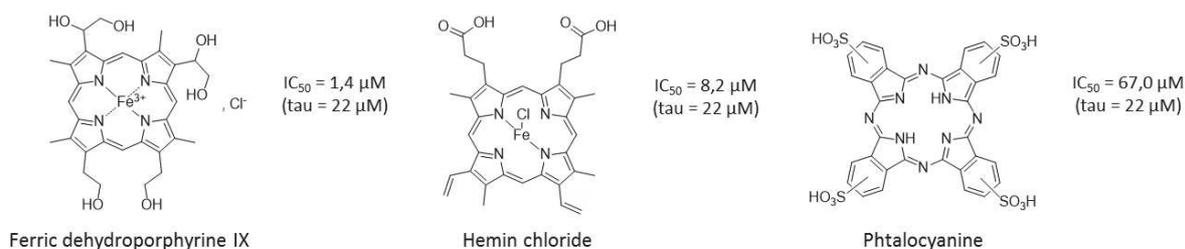


Figure 1.II.5. Exemples de porphyrines.

Enfin, Crowe *et al.* ont réalisé un criblage à haut débit d'environ 51 000 molécules sur la fibrillation du mutant K18 (20 μM) de tau en présence de DTT.¹⁰⁷ Ce criblage a permis d'identifier une dizaine de composés actifs. Cependant, plusieurs de ces composés se sont avérés être des faux-positifs. En effet, un second test effectué en absence de DTT a révélé que plusieurs de ces composés (dérivés de porphyrine et d'antraquinone) étaient inactifs, suggérant que leur mode d'action n'est pas spécifique de la fibrillation de tau, mais plutôt de la génération de peroxydes *via* le DTT. Parmi les composés dont l'activité est indépendante de la présence de DTT figurent les deux quinoxalines 113F08 et 330B06 avec une IC_{50} de l'ordre du micromolaire.

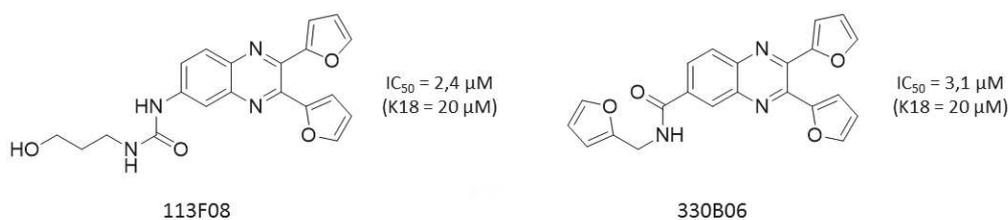


Figure 1.II.6. Exemples de dérivés de quinoxaline.

II.3 Les aminothiényropyridazines

Une autre étude de criblage quantitatif à haut débit par Crowe *et al.* a permis d'isoler une famille de composés, les aminothiényropyridazines (ATPZs), capable d'inhiber la formation de filaments de tau en utilisant le mutant K18.⁷¹ Des études ultérieures de relation structure-activité ont permis d'obtenir plusieurs autres dérivés d'ATPZ avec une activité de l'ordre du micromolaire et des propriétés pharmacologiques plus favorables pour l'utilisation de ces composés *in vivo*.^{99, 108} En particulier, le composé C (**Figure 1.II.7**) présente une activité ($IC_{50} = 2,5 \mu M$) et une solubilité améliorées (supérieure à 200 μM), la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique et une faible toxicité pour une injection quotidienne de 50 mg/kg chez la souris.

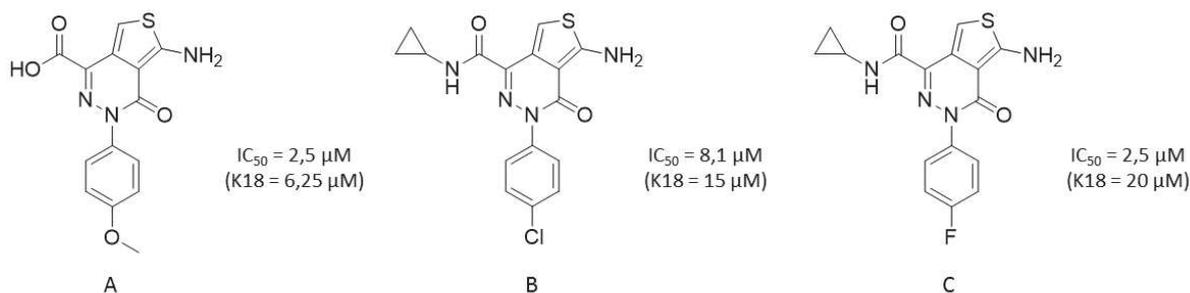


Figure 1.II.7. Exemples de dérivés d'aminothiényropyridazine (ATPZ).

Crowe *et al.* suggèrent initialement que les dérivés d'ATPZ se lient aux monomères et empêchent la multimérisation préalable à la formation de fibres amyloïdes matures. Des études plus récentes proposent que l'activité des dérivés d'ATPZ est liée à la prévention des ponts disulfures au niveau des cystéines de la protéine tau,¹⁰⁰ à l'instar du bleu de méthylène, mais aussi à la séquestration des oligomères ou la promotion d'agrégats moins toxiques (« off-pathway oligomers », **Figure 1.II.1**).⁹⁰

II.4 Les rhodanines et N-phénylaminés

Bulic *et al.* ont étudié l'activité d'une vingtaine de composés de la famille des rhodanines sur la fibrillation de tau à travers le mutant K19.^{90, 109} Les propriétés de ce châssis sont encore peu connues, mais il est considéré comme un bioisostère d'un acide carboxylique, capable de former des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions de Van der Waals. Bulic *et al.* montrent par ailleurs que l'ajout de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes (nitro, phénol, acide carboxylique, sulfonates, sulfonamides) accroissent l'activité de ces composés, de même que les groupements aromatiques (interactions hydrophobes). Les rhodanines mises en avant (**Figure 1.II.8**) dans ces travaux sont capables d'inhiber le processus de fibrillation avec une IC_{50} inférieure au micromolaire, mais également de désassembler les fibres dans des tests cellulaires. Ceux-ci sont réalisés chez la souris dans des modèles cellulaires de neuroblastome (modèles cellulaires de tauopathies) exprimant le mutant K18 de tau où les fibres amyloïdes sont révélées en présence de thioflavine S (ThS). En particulier, la rhodanine BB14 (**Figure 1.II.8**) permet de diminuer la toxicité observée en présence de fibres amyloïdes et possède elle-même une faible toxicité cellulaire (2 à 8 %). De plus, elle présente un profil pharmacologique viable : biodisponibilité de 100 %, concentration plasmatique de 4 $\mu g/mL$ après 1,7 h d'administration orale d'une dose de 50 mg, demi-vie plasmatique de 102 min. Ajouté au fait que les rhodanines ont peu d'impact sur l'association de htau40 aux microtubules,¹⁰⁹ ces données sont encourageantes pour l'utilisation thérapeutique de cette famille contre la fibrillation de la protéine tau.

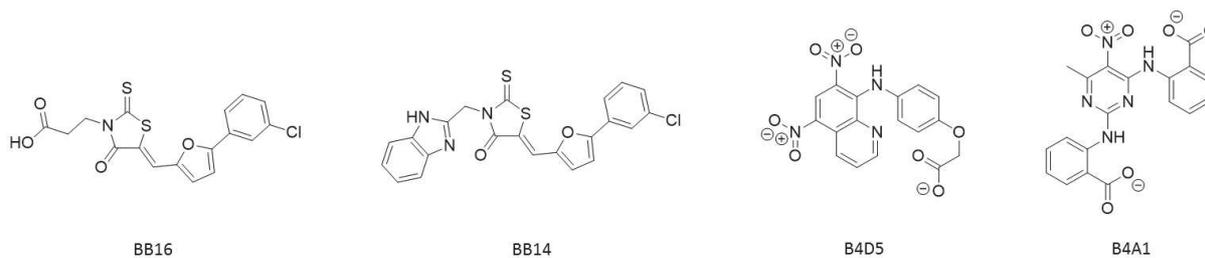


Figure 1.II.8. Exemples de dérivés de rhodanine (BB16 et BB14) et de *N*-phénylamine (B4D5 et B4A1).

Par ailleurs, la classe des *N*-phénylamines a été mise en avant à travers une étude basée sur les mêmes modèles cellulaires de tauopathies.¹¹⁰ Les *N*-phénylamines actives ont une IC_{50} de l'ordre de la dizaine de micromolaire, l'activité étant notablement amoindrie pour des composés adoptant une conformation non planaire, due à la rotation possible autour de la liaison C-N.⁹⁰ En particulier, le composé B4A1 (**Figure 1.II.8**) incubé pendant cinq jours diminue de 70 % le signal de la ThS et conduit à une cytotoxicité amoindrie. Similairement aux autres familles d'inhibiteurs considérées jusqu'ici, l'interaction des *N*-phénylamines décrites avec les fibres amyloïdes est principalement due aux liaisons hydrogènes, à travers les substituants nitrates et carboxylates, ainsi qu'aux interactions hydrophobes avec les cycles aromatiques.

II.5 Les dérivés d'hydrazides

Un criblage virtuel de ligands a mené à l'identification de phénylthiazolyhydrazides (PTHs) comme inhibiteurs de l'agrégation de tau.¹¹¹ La synthèse d'une cinquantaine de dérivés de PTHs a permis de montrer que ce châssis est important pour l'activité. Ceci est illustré en particulier par le composé Bsc3094 (**Figure 1.II.9**) capable d'inhiber l'agrégation du mutant K19 (10 μ M) de tau avec une IC_{50} de 1,6 μ M, ainsi que de désassembler les fibres.¹¹² Les auteurs ont de plus montré que ce composé pouvait se lier au mutant K18 de tau avec une constante de dissociation de 62 μ M et suggèrent que cette liaison est formée à travers les interactions hydrophobes des noyaux aromatiques, ainsi que par liaisons hydrogènes. Une étude plus récente a montré que des dérivés comportant une fonction hydrazide et un motif pyrogallol inhibent l'agrégation de la protéine tau plus efficacement que celle du peptide A β , comme illustré par le composé BSc3504 (**Figure 1.II.9**) qui a une IC_{50} de 0,970 μ M.¹¹³

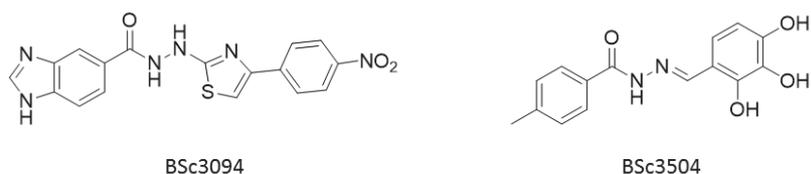


Figure 1.II.9. Exemples de dérivés d'hydrazide.

Autrement employé pour ses propriétés analgésiques, antibactériennes ou antifongiques, l'utilisation *in vivo* du châssis thiazolyhydrazide peut cependant être problématique.⁹⁰ En effet, celui-ci peut subir sous l'action des cytochromes P450 une coupure oxydante au niveau du thiazole et de l'hydrazine. De plus, la coupure de la liaison N-N de l'hydrazine peut potentiellement mener à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces éléments soulignent la nécessité d'études plus poussées pour l'utilisation *in vivo* de cette classe de composés.

II.6 Les azaphilones

Une étude très récente de Paranjape *et al.* a décrit le potentiel inhibiteur des azaphilones sur la fibrillation de tau.⁹⁵ Celles-ci représentent une classe de métabolites fongiques avec diverses propriétés pharmacologiques (antimicrobienne, antifongique, anti-oxydante, anti-inflammatoire).¹¹⁴ Dans ces travaux, une série de onze dérivés d'azaphilone incubés à 200 μM inhibent la formation de filaments de tau (2 μM). Plusieurs de ces composés mènent à la formation d'agrégats amorphes non reconnus par des anticorps qui se lient aux espèces toxiques de tau. Les auteurs suggèrent que les agrégats amorphes observés présentent une conformation différente des oligomères insolubles toxiques et ne servent pas de noyau (« seeds ») pour la formation de filaments (« off-pathway oligomers », **Figure 1.II.1**). Parmi ces composés, quatre dérivés d'azaphilones (**Figure 1.II.10**) permettent de plus de désassembler les agrégats de tau *in vitro* avec une IC₅₀ de 56 à 216 μM . Cependant, cette activité modérée est associée à une capacité d'inhiber partiellement l'association de la protéine tau aux microtubules. Néanmoins, ces travaux ont permis d'identifier un nouveau châssis prometteur contre la fibrillation de la protéine tau, capable en particulier d'inhiber la formation de filaments et de stabiliser des espèces oligomères intermédiaires non amyloïdogènes et moins toxiques. Cependant, il existe à ce jour peu d'information sur les propriétés pharmacocinétiques (biodisponibilité) de cette famille.

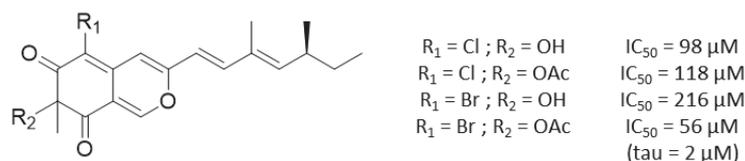


Figure 1.II.10. Exemples de dérivés d'azaphilone.

II.7 Les polyphénols et anthraquinones

La classe des polyphénols est très variée, ceux-ci étant définis par la présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyles sur des cycles aromatiques. Ces composés sont retrouvés dans la nature au niveau des plantes supérieures (baies, curcuma, thé) et peuvent être catégorisées en trois familles selon leur structure chimique (**Figure 1.II.11**) : les dérivés de flavonoïdes (myricétine, quercétine), d'acides phénoliques (acide coumarique, acide caféique) ou de stilbènes (curcumine, resvératrol).⁹⁸

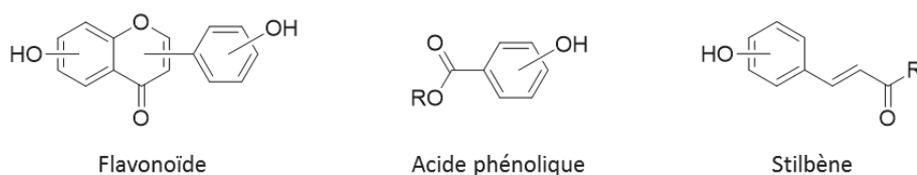


Figure 1.II.11. Structure chimique des polyphénols.

De nombreux polyphénols ont présenté une activité inhibitrice sur la fibrillation de différentes protéines amyloïdes, telles que l'AIAPP, l' α -synucléine, l'A β ou tau.^{93, 115-119} Parmi les différentes familles de composés testées par Taniguchi *et al.*, les polyphénols sont parmi les plus efficaces à inhiber la fibrillation du peptide A β et de la protéine htau39, notamment l'épicatéchin 3-gallate (ECCG), la myricétine et l'exifone (**Figure 1.II.12**) avec des IC_{50} de 1,8 μM , 1,2 μM et 3,3 μM respectivement pour une concentration de htau39 de 22 μM .⁹³ Ces composés ont également montré une activité neuroprotective, notamment à travers leurs propriétés anti-oxydantes.¹²⁰⁻¹²¹ La myricétine, l'exifone ainsi que la curcumine (**Figure 1.II.12**) ont récemment été utilisées dans une étude *in silico* visant à expliquer le mécanisme d'inhibition de la formation des fibres amyloïdes par les polyphénols.¹²² Cette étude a notamment souligné l'importance de la structure plane des inhibiteurs, ainsi que la contribution des liaisons hydrogènes, qui sont fortement présentes chez les polyphénols.

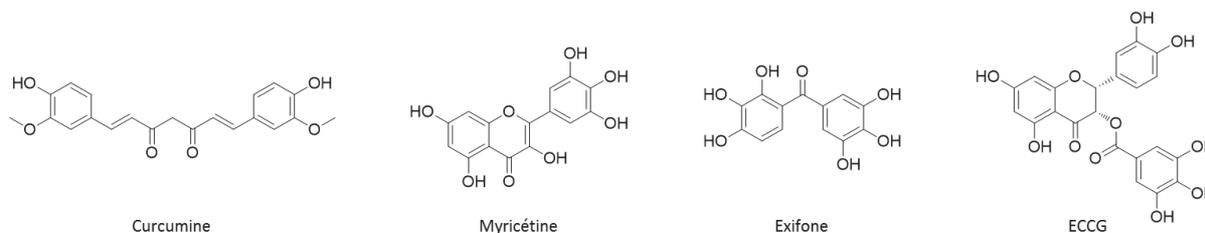


Figure 1.II.12. Exemples de polyphénols.

La curcumine, un des composants principaux de la *Curcuma longa*, est utilisée dans l'alimentation et comme remède traditionnel en Asie en vertu de ses bienfaits thérapeutiques (antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tumoral). Ces dernières années, la curcumine a également été investiguée dans le cas de l'AD.¹²³ En effet, la curcumine peut interférer avec l'agrégation de fibres amyloïdes, notamment en prévenant l'oligomérisation et la formation des dépôts amyloïdes d'Aβ *in vivo* chez la souris.¹²⁴ De plus, la curcumine ainsi que plusieurs de ses dérivés ont été investigués pour une utilisation en imagerie pour le radiomarquage de plaques amyloïdes.¹²⁵ Ces travaux présentent notamment un dérivé de curcumine prometteur pour l'imagerie des plaques amyloïdes. Plus récemment, une étude *in vivo* a mis en avant que la curcumine diminue chez la souris le niveau de dimères solubles de tau et permet d'améliorer les troubles comportementaux chez la souris.¹²⁶ Par ailleurs, une approche de fluorescence très récente basée sur la curcumine a également été étudiée pour l'imagerie de fibres amyloïdes de tau dans des modèles cellulaires.¹²⁷ En particulier, un dérivé de curcumine a montré un changement notable de sa fluorescence en présence des fibres de tau. Malgré ces travaux encourageants, les études cliniques utilisant la curcumine se sont cependant avérées infructueuses pour le moment. L'échec de ces études est principalement associé à des essais sur des stades trop avancés de la pathologie, ainsi qu'à la faible biodisponibilité de la curcumine (faibles solubilité et absorption).¹²⁸ Actuellement, les effets de la curcumine en tant que complément alimentaire sont néanmoins étudiés en phase II clinique sur des patients atteints de troubles cognitifs modérés.¹²⁹

Des dérivés de la famille des anthraquinones ont également été utilisés pour l'inhibition de l'agrégation de tau et ses mutants.⁹⁴ Ces composés sont des analogues de quinones, forme oxydée des polyphénols. Ces composés peuvent être sujets à l'action d'agents réducteurs tels que le DTT, comme souligné par Crowe *et al.*,¹⁰⁷ ce qui peut affecter leur activité et conduire à la présence de faux-positifs en présence de DTT. Néanmoins, plusieurs dérivés d'anthraquinone (**Figure 1.II.13**) ont montré, en absence de DTT, une capacité à inhiber la formation de filaments de tau (htau23) et ses mutants (K18 et K19) avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire. De plus, ces composés peuvent désassembler les PHFs formés à partir des mutants de tau (K18 et K19), ainsi que de htau23 (cas de l'émodine),⁹⁴ et ils n'interfèrent pas avec l'activité d'association de tau aux microtubules. Il est à noter

cependant que l'activité de ces anthraquinones particulières peut être associée à leur caractère polyphénol. De plus, l'utilisation *in vivo* des anthraquinones pourrait être limitée du fait de leurs propriétés pharmacologiques peu désirables (faible perméabilité intestinale, toxicité), mais également de leur cytotoxicité, celles-ci étant notamment utilisés comme agents cytostatiques intercalants dans les thérapies anti-cancéreuses.⁹⁰

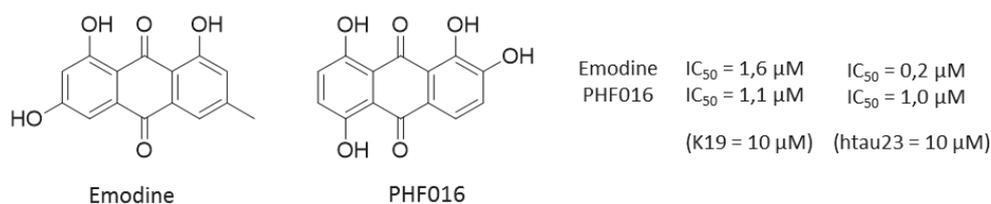


Figure 1.II.13. Exemples de dérivés d'anthraquinone.

Les composés agissant sur la fibrillation de la protéine tau possèdent donc plusieurs caractéristiques communes. Ils présentent en grande majorité une structure aromatique plane. Au travers des différentes études présentées ici, la rigidité des composés inhibiteurs semble en effet être un élément clé, l'activité de ceux-ci diminuant généralement dès lors que leur structure permet davantage de flexibilité. Les fibres de tau étant constituées d'un cœur hydrophobe, les structures aromatiques permettent d'interagir avec ce cœur par le biais d'interactions de Van der Waals. Cette caractéristique permettrait notamment aux inhibiteurs de s'intercaler entre plusieurs feuilletts β et empêcherait l'association de ceux-ci. En outre, les inhibiteurs décrits ci-dessus ont la possibilité de former plusieurs liaisons hydrogènes, ce qui semble être déterminant pour leur activité, comme l'illustrent particulièrement les polyphénols. En effet, de nombreuses études ont décrit la capacité des polyphénols à interférer avec l'agrégation de différentes protéines amyloïdes, en particulier les flavonoïdes (myricétine, quercétine, ECGG). En conséquence, la dernière partie de ce chapitre est focalisée sur les aurones, molécules aromatiques planes de la famille des flavonoïdes, qui n'ont pas été jusqu'ici investiguées dans le cadre de la fibrillation de tau.

III LES AURONES

Les aurones sont des composés d'origine naturelle peu exploités jusqu'à l'orée des années 2000. Depuis quelques années cependant, ces composés font l'objet de nombreuses investigations qui leur prêtent un nombre croissant d'applications thérapeutiques.¹³⁰⁻¹³⁵ Cette dernière partie décrit la place des aurones dans le règne végétal, leurs différentes applications thérapeutiques associées ainsi que leur rôle émergent dans l'AD.

III.1 Les aurones dans la nature

Les aurones représentent une sous-classe de la famille des flavonoïdes, dont la structure et la distribution dans la nature a fait l'objet d'une revue d'Iwashina en 2000.¹³⁶ Les flavonoïdes sont constitués de nombreuses autres sous-classes, notamment les flavones, flavanones, flavonols, isoflavones ou encore les chalcones, ces dernières représentant le précurseur naturel des aurones.¹³⁷ Les flavonoïdes se trouvent exclusivement dans le règne végétal et sont composés d'une quinzaine de carbones organisés en deux cycles aromatiques (cycles A et B) reliés par un pont de trois carbones (**Figure 1.III.1**), celui-ci pouvant former un troisième cycle (cycle C). Ils sont fréquemment substitués par des fonctions hydroxyles, méthoxyles, méthyles ou glycosyles. Ces derniers substituants sont les plus abondamment retrouvés, en particulier pour les aurones présentes dans les vacuoles des fleurs, feuilles et racines.

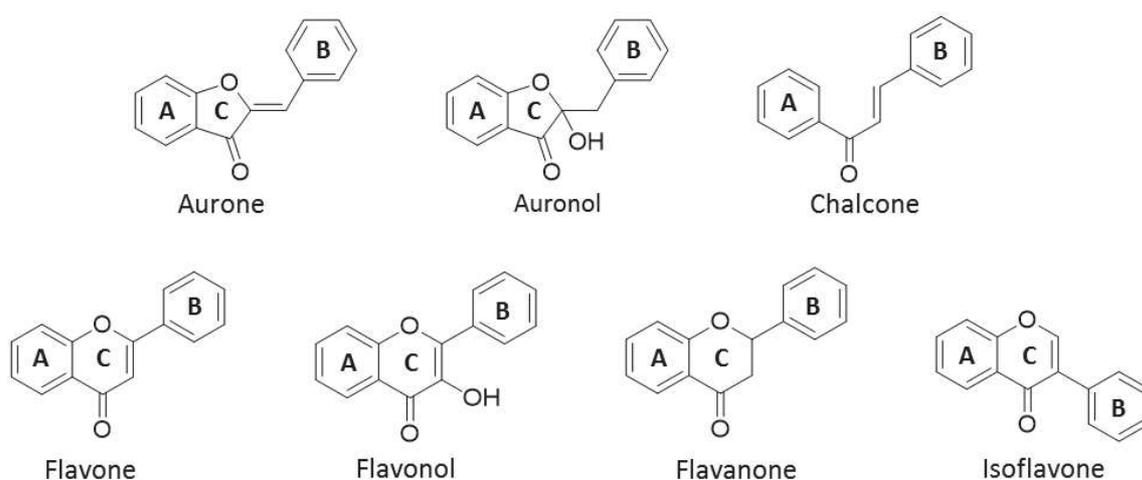


Figure 1.III.1. Structure de flavonoïdes.

Les aurones, ou (Z)-2-benzylidènebenzofuran-3(2H)-ones, ne représentent qu'une partie mineure des flavonoïdes et sont peu abondantes dans la nature. A l'heure actuelle, seule une centaine d'aurones a été isolée. Iwashina décrit en 2000 la distribution de flavonoïdes dans les plantes et reporte un total de 27 types d'aurones O-glycosylées, ainsi que 18 types d'aurones non-glycosylées, dont 11 d'auronols, forme hydratée des aurones (**Figure 1.III.1**). Les aurones glycosylées solubles en milieu aqueux sont responsables de la pigmentation jaune des fleurs (*Dahlia variabilis*, *Antirrhinum majus*). L'existence d'aurones dans les algues *Spatoblossum variable* a également été décrite depuis.¹³⁸⁻¹⁴⁰

III.2 Applications thérapeutiques

Initialement étudiées pour leur propriété à pigmenter les fleurs ornementales, les aurones ont gagné dernièrement un intérêt considérable au sein de la communauté scientifique, comme l'illustre leur nombre grandissant dans les études à visée thérapeutique. La diversité de leurs applications thérapeutiques a été l'objet d'une revue de Haudecoeur *et al.* en 2012.¹⁴¹ La partie ci-dessous expose quelques études illustrant différentes applications thérapeutiques des aurones.

A l'image d'autres flavonoïdes, les aurones ont des propriétés anti-oxydantes, comme montré par Detsi *et al.*¹³⁰ Cette caractéristique est importante dans de nombreuses pathologies, notamment le cancer, les maladies neurodégénératives ou inflammatoires, dans lesquelles la formation d'espèces ROS est fortement augmentée et conduit à la modification de molécules biologiques, telles que les lipides, les protéines ou l'ADN. Detsi *et al.* décrivent également l'activité inhibitrice d'aurones méthoxylées sur une lipoxygénase de soja. Les lipoxygénases sont des enzymes qui modulent chez l'Homme la biosynthèse de médiateurs pro inflammatoires. Des inhibiteurs de ces enzymes, tels que les aurones, présentent en conséquence un intérêt dans le cadre des maladies inflammatoires et des allergies. Le caractère anti-inflammatoire des aurones a été également illustré par Shin *et al.* dans des travaux portant sur la production d'espèces pro-inflammatoires (monoxyde d'azote et prostaglandine E₂) dans des modèles cellulaires.¹³¹ Shin *et al.* décrivent notamment des dérivés hydroxylés ou méthoxylés de sulfurétine (**Figure 1.III.2**), une aurone naturelle, et montrent que ceux-ci sont capables d'inhiber la production de monoxyde d'azote et de prostaglandine E₂ avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire à la dizaine de micromolaire. Une autre étude de Bandgar *et al.* a également montré le caractère anti-inflammatoire (contre TNF- α et IL6) d'analogues 2,2-bisaminométhylés d'aurones (**Figure 1.III.2**), ainsi que leurs propriétés anti-bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus vulgaris*) et anti fongiques (*Aspergillus*

fumigatus, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viridie*, *Candida albicans* et *Penicillium chrysogenum*).¹⁴² Ces études permettent en particulier de souligner la diversité d'action du châssis aurone.

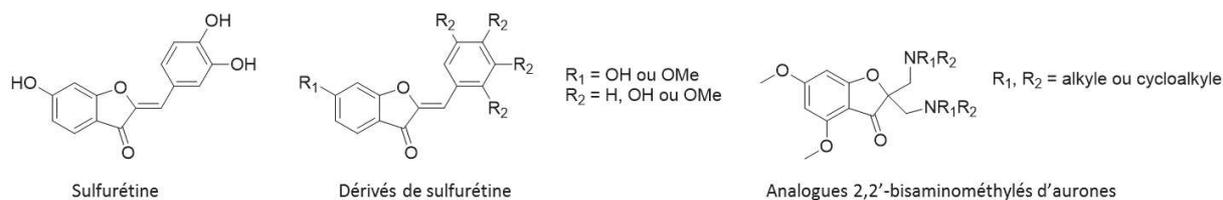


Figure 1.III.2. Aurones et analogues avec des propriétés anti-inflammatoires.

Certaines aurones ont de plus été investiguées pour leur activité antiparasitaire, notamment contre les parasites *Leishmania* ainsi que *Plasmodium falciparum* (paludisme). Kayser *et al.* montrent une activité antileishmaniale plus prononcée pour des aurones telles que la sulfurétine (**Figure 1.III.2**) portant des fonctions hydroxyles.¹⁴³ Les auteurs suggèrent que cette activité peut être associée au caractère plus hydrophile de ces aurones. Kayser *et al.* estiment de plus que l'activité des aurones sur différentes enzymes de parasites est liée à leur structure planaire, facteur important mis en avant par ailleurs sur des études similaires basées sur des chalcones, proposant alors un mécanisme d'action et des sites communs entre les aurones et leur précurseur naturel. Une étude plus récente a confirmé l'activité antileishmaniale du châssis aurone chez *Leishmania infantum*, un parasite intracellulaire, avec cette fois des aurones méthoxylées plus hydrophobes.¹³² Ces travaux décrivent la capacité des aurones à inhiber la croissance du parasite avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire, similaire à la référence (Amphotéricine B), et soulignent par ailleurs la faible cytotoxicité de ces aurones sur des cellules de mammifère. L'activité antipaludique du châssis aurone ainsi que sa faible cytotoxicité ont également été mis en avant dans une étude très récente portant sur le parasite *Plasmodium falciparum*. Des aurones possédant des substituants basiques ont ainsi montré des IC₅₀ de l'ordre du micromolaire.¹³³

Les aurones ont également été associées à une activité anti-tumorale et antivirale. En effet, une étude de Lawrence *et al.* montre que des aurones polyméthoxylées sont capables d'inhiber la croissance cellulaire de la lignée cancéreuse K562 avec une IC₅₀ de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomolaires.¹⁴⁴ Une autre étude décrit l'activité inhibitrice d'aurones contre la sirtuine 1, une histone déacétylase impliquée dans la résistance accrue au stress et à l'apoptose de cellules cancéreuses.¹³⁴ En particulier, une aurone monohydroxylée inhibe l'activité enzymatique de la sirtuine 1 avec une IC₅₀ de 1 µM. Par ailleurs, une étude de Sim *et al.* a décrit la capacité des aurones à moduler l'efflux de drogues par l'intermédiaire des transporteurs ABC (pour « ATP-binding cassette »). Ces transporteurs sont impliqués dans la résistance de nombreux organismes (cellule, micro-organisme, virus) aux traitements thérapeutiques, notamment dans le cas de cellules cancéreuses. Des aurones

polyméthoxylées permettent la modulation de l'activité des protéines d'efflux ABCB1 et ABCG2. Enfin, la capacité antivirale d'analogues d'aurones a été très récemment illustrée par l'inhibition de l'activité de la polymérase NS5B impliquée dans la réplication du virus de l'hépatite C.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ Ces composés inhibent l'activité polymérase de NS5B avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire.

Dernièrement, l'activité des aurones a été étudiée sur les tyrosinases.^{135, 147-148} Chez les mammifères, les tyrosinases sont impliquées dans la biosynthèse de la mélanine. Plusieurs pathologies sont corrélées à des troubles liés à la mélanine, notamment les mélanomes, certaines lésions épidermiques sévères ou encore la maladie de Parkinson. En conséquence, l'inhibition des tyrosinases est un enjeu grandissant qui représente un facteur de contrôle sur la production de mélanine. Les aurones semblent avoir des rôles divergents sur les tyrosinases très dépendants de leur structure. En particulier, une aurone dihydroxylée sur le cycle B inhibe l'activité d'une tyrosinase fongique, alors que des aurones monohydroxylées sur le cycle B activent cette même tyrosinase.

L'ensemble de ces études permettent de souligner la diversité des cibles sur lesquelles le châssis aurone peut agir.

III.3 Les aurones dans la maladie d'Alzheimer

Les propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires des aurones pourraient être mises à profit dans le cadre de maladies neurogénératives telles que l'AD. Des travaux très récents ont mis en avant l'activité inhibitrice de plusieurs aurones méthoxylées¹⁴⁹ et hydroxylées¹⁵⁰ sur la monoamine oxydase B. Cette enzyme est reliée à la paroi externe des mitochondries et est impliquée dans la dégradation de monoamines endogènes et exogènes, notamment les neurotransmetteurs (sérotonine, dopamine, noradrénaline) qui en font une cible d'intérêt dans la maladie de Parkinson et l'AD. Dans ces travaux, les aurones permettent d'inhiber sélectivement l'action de la monoamine oxydase B par rapport à la monoamine oxydase A avec une activité de l'ordre de la dizaine de micromolaires pour les aurones méthoxylées et inférieure au micromolaire pour les aurones hydroxylées. De plus, les composés hydroxylés dans l'étude de Li *et al.* présentent une forte activité anti-oxydante.¹⁵⁰ En outre, les auteurs ont étudié les propriétés de chélation de deux aurones D et E représentant respectivement la série hydroxylée et la série méthoxylée (**Figure 1.III.3**). Cette étude suggère que les aurones peuvent chélater différents métaux (Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ et Al³⁺), ce qui représente un intérêt thérapeutique important, les métaux Cu²⁺ et Fe³⁺ étant notamment impliqués dans la fibrillation du peptide Aβ.¹⁵¹ De surcroît, ces aurones ont une structure adéquate pour franchir la

barrière hémato-encéphalique (BBB pour « blood-brain barrier »). Cette donnée est déterminée par un test de perméabilité membranaire artificielle (PAMPA-BBB, pour « parallel artificial membrane permeation assay of the blood-brain barrier ») où le paramètre mesuré, la perméabilité effective P_e , doit être supérieure à $4,0 \times 10^{-6}$ cm/s.¹⁵² Les deux aurones D et E étudiées présentent une P_e de 6,68 et $7,24 \times 10^{-6}$ cm/s. Cette capacité à passer la BBB a été également constatée dans les travaux de Liew *et al.* avec des P_e supérieures à 10×10^{-6} cm/s pour des séries d'aurones hydroxylées et méthoxylées portant également des fonctions amines.¹⁵³ Plusieurs aurones décrites dans cette étude permettent par ailleurs d'inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase, ce qui pourrait restaurer la fonction cholinergique dont le dysfonctionnement est relié au déclin cognitif des patients atteints de l'AD. Enfin, Li *et al.* ont évalué la capacité des deux séries d'aurones hydroxylées et méthoxylées à inhiber la formation de fibres d'A β par des tests de fluorescence basés sur la ThT.¹⁵⁰ Les composés hydroxylés (25 μ M) mènent à une inhibition de 77 % à 99 % de la fluorescence de la ThT dans des tests d'agrégation du peptide A β_{42} (25 μ M), alors que les dérivés méthoxylés (25 μ M) présentent une inhibition de fluorescence variant de 40 à 53 %.

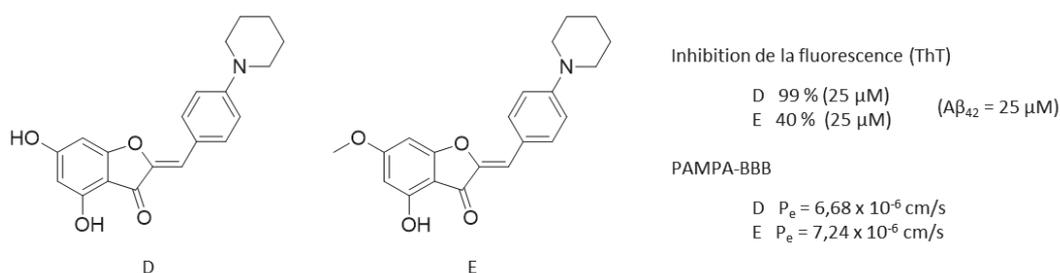


Figure 1.III.3. Aurones très récemment étudiées sur la fibrillation du peptide A β .¹⁵⁰

Par ailleurs, l'interaction des aurones¹⁵⁴⁻¹⁵⁵ avec les fibres d'A β a été soulignée par plusieurs études d'Ono *et coll.* Pour ces travaux, les auteurs développent en particulier la synthèse d'aurones radiomarquées à l'iode [¹²⁵I] sur le cycle A et portant une fonction amine sur le cycle B (**Figure 1.III.4**).¹⁵⁴ Ces aurones se lient aux agrégats d'A β *in vitro* avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire. De plus, ces aurones sont capables de se lier aux plaques amyloïdes sur des coupes du cerveau de souris transgéniques. Elles co-localisent en effet avec des anticorps spécifiques des plaques amyloïdes. De surcroît, une étude de biodistribution *in vivo* chez la souris saine montre que ces aurones radiomarquées présentent une haute pénétration cérébrale seulement deux minutes après injection, 1,89 à 4,57 % de la dose d'injection par gramme de cerveau (DI/g), et rapidement éliminées, 0,26 à 0,49 % DI/g après trente minutes. L'autoradiographie des coupes cérébrales *ex vivo* après injection chez la souris saine des aurones radiomarquées suggère peu de liaisons non spécifiques des aurones *in vivo*. Comparé aux données obtenues par ailleurs sur les flavones,¹⁵⁶ cette étude montre que l'utilisation d'aurones *in vivo* pour le marquage des fibres amyloïdes d'A β est

prometteuse, les aurones iodomarquées présentant notamment des meilleures propriétés pharmacocinétiques (élimination plus rapide) que les flavones. Ono *et al.* ont également utilisé une aurone similaire marquée cette fois avec du technétium [^{99m}Tc] sur le cycle A et avec une amine sur le cycle B (**Figure 1.III.4**).¹⁵⁵ Le marquage au technétium est notablement utilisé en imagerie pour la tomographie par émission monophotonique (SPECT), du fait de sa production facile, des rayons γ émis aisément détectables et de sa durée de demi-vie ($t_{1/2} = 6$ h) compatible avec la localisation biologique en imagerie. L'aurone complexée avec le [^{99m}Tc] présente une absorption au niveau du cerveau de 0,79 % DI/g après deux minutes, ce qui est inférieur à l'aurone équivalente iodomarquée (1,89 % DI/g après deux minutes), mais est également rapidement éliminée (0,11 % ID/g après une heure).

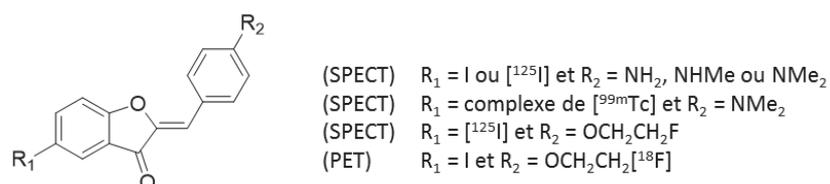


Figure 1.III.4. Aurones radiomarquées pour l'imagerie des plaques amyloïdes du peptide $\text{A}\beta$.

Dernièrement, une étude d'Ono *et coll.* a décrit la synthèse d'une aurone comportant à la fois un iode et un fluor (**Figure 1.III.3**), ce qui permet son utilisation en tant que marqueur en SPECT, mais aussi pour la tomographie par émission de positrons (PET).¹⁵⁷ L'iode [^{125}I] est utilisé en SPECT, technique davantage présente en routine dans les infrastructures cliniques, alors que le fluor [^{18}F] permet l'utilisation de la PET qui a une sensibilité supérieure à la SPECT. Ono *et coll.* montrent notamment dans ces travaux que la présence à la fois d'un iode et d'un fluor sur le squelette de l'aurone ne modifie pas sa fixation aux plaques amyloïdes. En particulier, l'aurone présente une affinité avec les agrégats d' $\text{A}\beta$ *in vitro* et se fixe aux plaques amyloïdes sur des coupes de cerveau de souris transgéniques (Tg2576), mais aussi sur des coupes de cerveau humain de patients atteints de l'AD. Enfin, l'aurone radiomarquée à l'iode ou au fluor radioactifs présente une forte pénétration cérébrale chez la souris (2,34 % DI/g et 3,66 % DI/g après deux minutes, respectivement) et une élimination rapide (0,19 % DI/g et 1,75% DI/g après une heure, respectivement).

Les études portant sur les aurones n'ont en revanche pas exploré le rôle de ces composés sur l'agrégation de la protéine tau ou sur l'imagerie des NFTs. A l'heure actuelle, il n'existe aucun marqueur qui soit sélectif des NFTs. Le développement de tels marqueurs présente un potentiel important car il pourrait permettre, en association avec des marqueurs des plaques amyloïdes du peptide $\text{A}\beta$, d'assurer le diagnostic de patients atteints de l'AD. Très récemment, des revues portant sur le développement de marqueurs de NFTs ont souligné les difficultés liées à leur utilisation.^{81, 158} Dans le cas de l'AD, ces marqueurs doivent avoir une forte affinité pour les NFTs de la protéine tau

avec peu de liaisons non spécifiques, ainsi qu'être sélectifs des NFTs par rapport aux plaques amyloïdes du peptide A β , ce dernier étant présent au niveau cellulaire dans des concentrations supérieures à la protéine tau. Les marqueurs doivent également comporter des isotopes radioactifs ayant une demi-vie suffisamment longue, passer la BBB et la membrane cellulaire sans être métabolisés. De plus, les six isoformes de la protéine tau présentent des conformations ultrastructurales différentes et forment des fibres amyloïdes colocalisées avec celles du peptide A β . Le développement de ces marqueurs représente donc un défi important aujourd'hui. Plusieurs familles de molécules ont été récemment testées en phase clinique comme marqueurs de NFTs (**Figure 1.III.5**), mais présentent des propriétés pharmacocinétiques insuffisantes (rétention trop longue, perte de l'isotope radioactif).

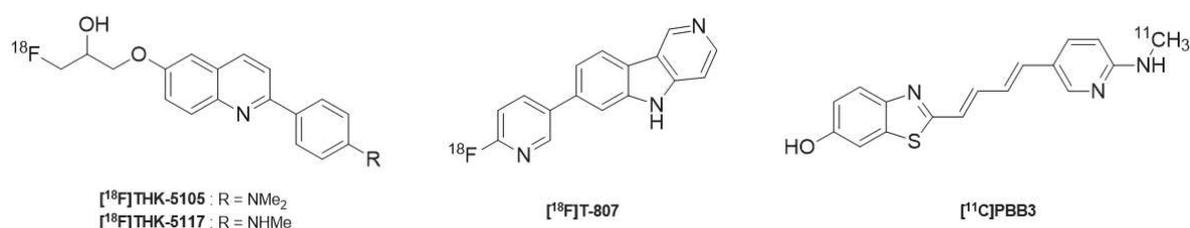


Figure 1.III.5. Marqueurs des NFTs de tau en phase clinique.

Cependant, aucune activité des aurones n'a été reportée sur la fibrillation de la protéine tau. Néanmoins, l'utilisation des aurones dans le cadre de l'AD présente un potentiel diagnostique et thérapeutique important. Le diagnostic de l'AD est toujours à l'heure actuelle effectué par des tests neuropsychologiques et par élimination d'autres troubles neurodégénératifs, bien que l'évolution des techniques d'imagerie et la présence de potentiels marqueurs des fibres soit prometteuse. Au niveau thérapeutique, les seuls traitements existants à ce jour ne permettent que d'alléger les symptômes de la pathologie, notamment dans le cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase qui améliorent la cognition. L'utilisation des aurones constitue donc une approche prometteuse, notamment du fait de leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires, leur capacité à passer la BBB, leur influence sur les espèces interagissant avec les neurotransmetteurs ainsi que sur la fibrillation du peptide A β . En conséquence, ce projet de recherche a pour objectif de synthétiser et d'évaluer des dérivés polyhydroxylés d'aurones sur les fibres de tau.

CHAPITRE 2

CHAPITRE 2 : Criblage d'une chimiothèque d'aurones sur des modèles des fibres de tau

En parallèle de leur contribution à la compréhension du processus d'auto-assemblage et de fibrillation *in vivo* de la protéine, la protéine tau recombinante (htau40, htau 23) et ses mutants (K11, K12, K18 et K19) ont été utilisés dans le cadre d'une vaste recherche d'inhibiteurs de la fibrillation de tau. Cependant, l'expression chez *E. coli* de la protéine tau ou de ses mutants ne permet de produire que de faibles quantités de ceux-ci, de l'ordre de la dizaine de milligrammes au maximum, ce qui est un facteur limitant. De plus, la formation de fibres *in vitro* à partir de la protéine tau ou de ses mutants est un processus souvent long, notamment dans le cas de la protéine tau recombinante où la fibrillation peut prendre plusieurs jours.⁶⁷ Une approche alternative et complémentaire repose sur l'utilisation de fragments peptidiques plus courts, dont les séquences sont issues des motifs de répétition de la protéine tau, qui sont capables de s'agréger *in vitro* pour former des fibres organisées en feuillets β .¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ Ces fragments constituent donc des modèles « peptidiques » des fibres de tau.

Dans ce chapitre, un état de l'art sur les modèles peptidiques des fibres de tau décrits dans la littérature est dressé dans un premier temps, ainsi que les deux modèles peptidiques utilisés et développés dans ce projet. Le premier correspond au modèle hexapeptidique AcPHF6 issu de la séquence VQIVYK, noyau de la fibrillation de tau. Celui-ci a déjà été utilisé dans la littérature pour évaluer la capacité inhibitrice de molécules organiques sur la fibrillation.¹⁶¹⁻¹⁶² Le second modèle est basé sur une séquence peptidique de 22 acides aminés comprenant le motif VQIVYK et a été développé dans le cadre de ce projet.¹⁶³ Ces deux modèles ont d'abord été validés par l'utilisation d'inhibiteurs connus de la fibrillation de tau. Dans un second temps, les deux modèles ont servi d'outil de criblage d'une chimiothèque d'aurones disponible au laboratoire.

I MODELES PEPTIDIQUES DES FIBRES DE TAU

I.1 Etat de l'art sur les modèles peptidiques des fibres de tau

Les modèles peptidiques des fibres de tau sont issus des motifs de répétition du domaine de liaison aux microtubules de la protéine tau (**Figure 2.I.1**), ce domaine étant aussi responsable du caractère amyloïdogène de la protéine. Parmi ceux-ci, les motifs R2 et R3 sont particulièrement impliqués dans la fibrillation de la protéine, bien que le motif R2 ne soit pas forcément nécessaire à celle-ci. En effet, l'isoforme fœtale htau23 ne possédant pas ce motif peut néanmoins former des fibres amyloïdes. Cependant, les isoformes 4R de tau contenant le motif R2 ont une capacité accrue à fibriller. En conséquence, les différents modèles peptidiques développés dans la littérature correspondent à une partie de la séquence des motifs R2 ou R3.

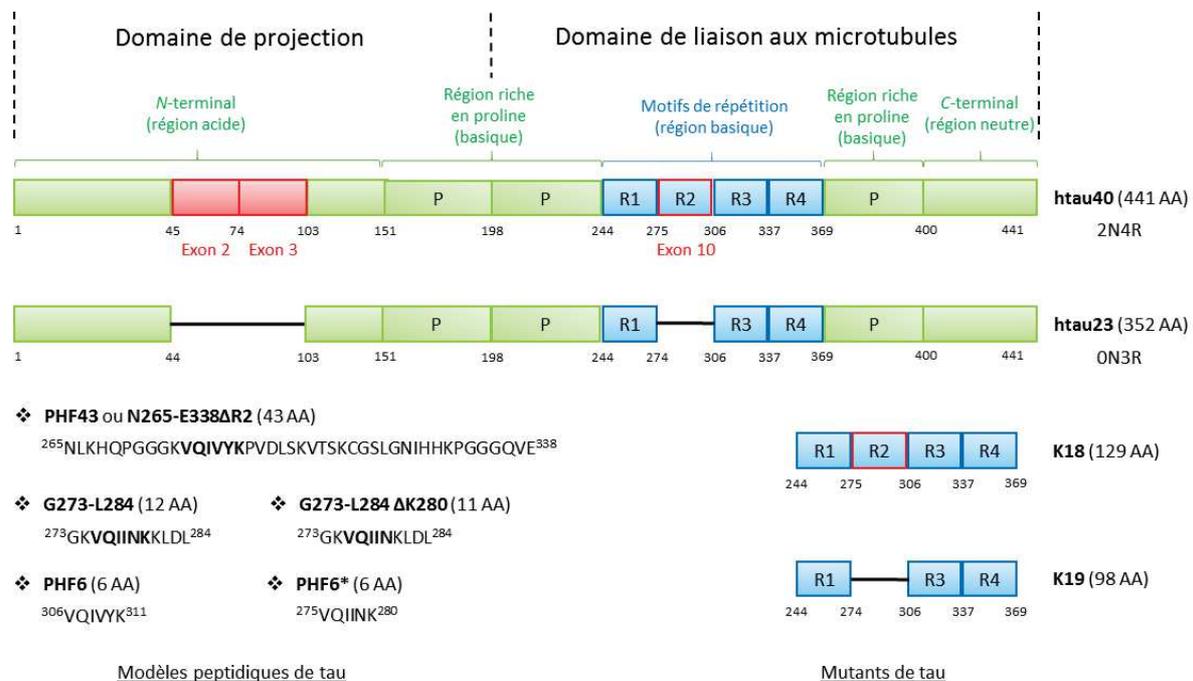


Figure 2.I.1. Séquences des isoformes htau 40 et htau 23, des mutants K18 et K19 et des modèles peptidiques des fibres de tau (adapté des travaux de Mandelkow *et coll.*).^{50, 61, 63, 67, 159-160} AA = acides aminés. P = région riche en proline. R = motif de répétition.

I.1.1 La séquence N265-E338ΔR2 (« PHF43 ») du motif R3

En 2000, von Bergen *et al.* montrent qu'une petite partie de la séquence de tau, appelée PHF43, est capable de promouvoir l'assemblage *in vitro* de la protéine tau recombinante htau23 en PHFs.¹⁵⁹ Ce peptide de 43 acides aminés, obtenu par protéolyse du mutant K19 de tau, est principalement constitué du motif de répétition R3 (V306-V337) précédé des dix derniers résidus du motif de répétition R1 et correspond à la séquence N265-E338ΔR2 (**Figure 2.I.1**). Les auteurs montrent que ce peptide est capable de s'auto-assembler rapidement en filaments. A l'image de la protéine tau, la fibrillation de ce peptide est favorisée par des cofacteurs anioniques tels que l'héparine ainsi que par la formation de dimères. En effet, la fibrillation est ralentie pour le peptide incubé en milieu réducteur (DTT), ce qui suggère que la formation de dimères, par l'intermédiaire d'un pont disulfure intermoléculaire au niveau de la cystéine 322, est un facteur pro-agrégant. Contrairement à la protéine tau et ses mutants, la séquence PHF43 s'organise en filaments droits, ceux-ci ne présentant pas l'hélicité observée pour les paires de filaments hélicaux (PHFs) de tau. Cependant, les auteurs montrent que cette séquence intervient au cœur du processus de fibrillation. En effet, la présence de PHF43 catalyse la formation de PHFs pour l'isoforme fœtale htau23. (**Figure 2.I.1**) Par ailleurs, les auteurs ont étudié par la méthode « SPOT » l'interaction de PHF43 marqué à l'iode [¹²⁵I] avec différentes séquences peptidiques de 15 résidus accrochées à une membrane de cellulose, ces séquences étant issues des domaines de répétition R1 à R4 de la protéine tau. Cette recherche a permis de mettre en avant un hexapeptide nommé PHF6 et, dans une moindre mesure, un hexapeptide nommé PHF6*, qui représentent respectivement les séquences ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ et ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ localisées au début de la séquence des motifs de répétition R3 et R2 (**Figure 2.I.1**). Ces deux motifs se lient fortement à PHF43 représentent les seuls endroits de la séquence de tau à avoir une structure fortement organisée en feuillets β. Les auteurs associent cela aux contraintes stériques provoquées par la présence des résidus V, I, Y et Q fortement « inductifs de feuillets β » et à l'absence de résidus « casseurs de feuillets β » comme P et E.¹⁶⁴ De plus, la délétion d'un des résidus du motif PHF6 empêche la fibrillation du mutant K19 et de la protéine htau23,¹⁵⁹ ainsi que du mutant K18 et de la protéine htau40.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Le motif PHF6 joue donc un rôle prédominant dans la fibrillation de tau, plus important que le motif PHF6* qui n'est présent que dans trois des six isoformes de tau (isoformes 3R). Les six isoformes comprenant le motif PHF6 sont d'ailleurs toutes capables de fibriller en PHFs.

L'analyse par CD de la structure des fibres de htau23, de son mutant K19, ainsi que des séquences peptidiques PHF43 et PHF6 a montré des différences notables de structuration. Pour htau23, le profil obtenu après fibrillation correspond à une population majoritairement non structurée en présence comme en absence d'héparine, alors que le profil du mutant K19 et des

séquences peptidiques plus courtes est modifié en présence d'héparine et tend vers un profil de feuillets β . Ceci est appuyé par le fait qu'en présence de 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE), un inducteur d'hélice, le signal en CD est davantage modifié pour les fibres de la protéine htau23 et du mutant K19 que pour les séquences peptidiques plus courtes (PHF43 et PHF6), ce qui suggère que ces dernières sont davantage structurées que htau23 ou K19. Ces travaux ont ainsi permis d'expliquer comment des protéines non structurées en solution peuvent s'agréger sous forme de fibres par la structuration d'une partie seulement de leur séquence. D'autre part, les auteurs ont mis en avant que la séquence peptidique PHF43 est capable de s'agréger plus rapidement que la protéine tau ou ses mutants. Les auteurs proposent en particulier l'utilisation de PHF43 comme outil d'étude de la formation de PHFs, mais également pour la recherche d'inhibiteurs de la formation des PHFs. En effet, comme l'assemblage en PHFs des molécules de tau semble régi par interaction de leurs motifs PHF6 (motif inclus dans PHF43), les auteurs postulent que des composés interagissant avec ce motif pourraient prévenir l'association tau-tau menant à la formation de PHFs. Des études ultérieures ont confirmé que la séquence PHF6 est impliquée au niveau de la phase de nucléation et module les interactions intermoléculaires entre plusieurs molécules de tau.¹⁶⁷ Plusieurs courtes séquences de la protéine peuvent également interagir avec PHF6 et réguler l'étape de nucléation, en particulier PHF6* qui la promeut.^{160, 168} Si à ce jour aucune étude utilisant PHF43 comme outil de criblage n'a été reportée, cette séquence a servi de base pour la conception du modèle PHF6 décrit ci-après.

I.1.2 La séquence V306-K311 (« PHF6 ») du motif R3

En 2004, Goux *et al.* montrent que des peptides dérivés du motif PHF6 peuvent former des fibres *in vitro*.¹⁶¹ Les auteurs montrent notamment que des fragments de trois à six résidus de la séquence PHF6, portant une fonction amide en C-terminal et acétylés en N-terminal, peuvent former des filaments droits en TEM, dans le tampon MOPS à pH 7,2 ou dans l'eau, avec une conformation en feuillets β croisés capable de se lier à la ThS. Les filaments de ces fragments s'organisent de manière parallèle pour les peptides Ac-VQIVYK-NH₂ (AcPHF6) et Ac-VYK-NH₂ ou antiparallèle pour les peptides Ac-IVYK-NH₂ (AcPHF4) et Ac-QIVYK-NH₂ (AcPHF5), la cinétique de fibrillation étant la plus rapide pour le peptide AcPHF6. Contrairement aux fragments plus courts, le peptide AcPHF6 est majoritairement organisé en feuillets β , comme le suggère son profil en CD, alors que la séquence PHF6 est caractérisée par un profil non structuré. De plus, Goux *et al.* notent qu'un mélange des peptides AcPHF6 et Ac-VYK-NH₂ permet d'observer la formation de filaments organisés en hélice similaires aux PHFs (environ 8 à 20 nm de largeur, hélicité de 80 nm). En conséquence, les auteurs suggèrent que le cœur de la structure de PHF6 est localisé au niveau des résidus VYK et, plus généralement, que de très courtes

séquences amphiphiles de tau peuvent initier la phase de nucléation. La formation de fibres sous forme de PHFs pourrait par contre être attribuée à la participation d'autres résidus internes ou externes aux domaines de répétition.¹⁶⁹ Néanmoins, les travaux de Goux *et al.* permettent de montrer que le peptide AcPHF6 est capable de former des filaments dans l'eau en quelques minutes, ce qui diffère des peptides plus grands (PHF43), mutants de tau (K18 et K19) ou de la protéine tau pour lesquels la fibrillation est plus longue et nécessite la présence d'inducteurs, ce qui suggère que la fibrillation est régulée par des effets de charges.

Depuis, des études ont été réalisées afin de déterminer le mécanisme d'agrégation du peptide AcPHF6 et les différents facteurs pouvant l'influencer. A cet effet, des travaux de Li *et al.* basés sur des simulations décrivent le processus d'auto-assemblage des oligomères du peptide AcPHF6.¹⁷⁰ Ces travaux mettent en avant la formation de divers petits agrégats métastables solubles jusqu'à l'obtention d'agrégats de taille et conformation stables. Ces derniers riches en feuillets β présentent de nombreuses interactions hydrophobes et s'organisent selon un mélange de brins parallèles et anti parallèles. Les oligomères observent alors une période d'équilibre préalablement à la phase d'élongation où la taille des agrégats augmente rapidement. La présence accrue dans les agrégats de taille croissante de feuillets β organisés avec des brins en parallèle suggère que la réorganisation des feuillets β sous cette forme intervient au cours de la période d'équilibre et est une étape limitante préalable à l'élongation des agrégats. D'autres études ont permis de mettre en avant le rôle stabilisant de feuillets β de la tyrosine 310 (Y310) dans la fibrillation.¹⁷¹⁻¹⁷² De plus, en comparant la fibrillation du peptide AcPHF6 et de son homologue phosphorylé sur Y310, Inoue *et al.* ont montré par TEM et par des tests de fluorescence à la ThT que la phosphorylation de ce résidu est un promoteur de la fibrillation du peptide *in vitro*.¹⁷² Une étude récente a décrit un phénomène similaire pour la phosphorylation de résidus proches du motif PHF6*.¹⁷³ Ces données tendent à confirmer l'importance de l'état de phosphorylation de la protéine tau pour son agrégation.

Contrairement au modèle PHF43, le modèle PHF6 a été utilisé récemment comme outil pour la recherche de divers inhibiteurs de la fibrillation (**Figure 2.1.2**).^{162, 174-177} Zheng *et al.* présentent un peptide macrocyclique contenant lui-même la séquence PHF6 et capable d'inhiber la fibrillation du modèle AcPHF6 (étude par fluorescence à la ThS).¹⁷⁴⁻¹⁷⁵ Les auteurs attribuent l'inhibition de ce peptide à l'insertion d'une surface hydrophobe entre les couches de feuillets β . En effet, la mutation des résidus V306 et I308 par des résidus moins hydrophobes conduit à la perte de l'activité inhibitrice de ce macrocycle. Une autre étude *in silico* a montré qu'un hexapeptide constitué d'acides aminés non naturels (D-TLKIVW) serait capable d'inhiber la formation de fibres de PHF6, mais également des mutants K12 et K19 de tau.¹⁷⁶ Cette séquence complémentaire de la séquence VQIVYK s'y associe et empêche l'élongation en fibres amyloïdes. Enfin, des travaux récents suggèrent que des petites

molécules aromatiques sont susceptibles d'interférer avec l'agrégation du motif PHF6.^{162, 177} A cet effet, Mohamed *et al.* décrivent en 2013 des dérivés de nitrocatéchol capables d'inhiber l'agrégation du modèle AcPHF6.¹⁶² Dernièrement, Frenkel-Pinter *et al.* ont présenté un hybride naphthoquinone-tryptophane capable d'inhiber l'agrégation du peptide PHF6 *in vitro*, ainsi que de réduire les dépôts de tau hyperphosphorylée et la neurotoxicité observée *in vivo* dans un modèle transgénique de *Drosophile* exprimant la protéine tau humaine.¹⁷⁷

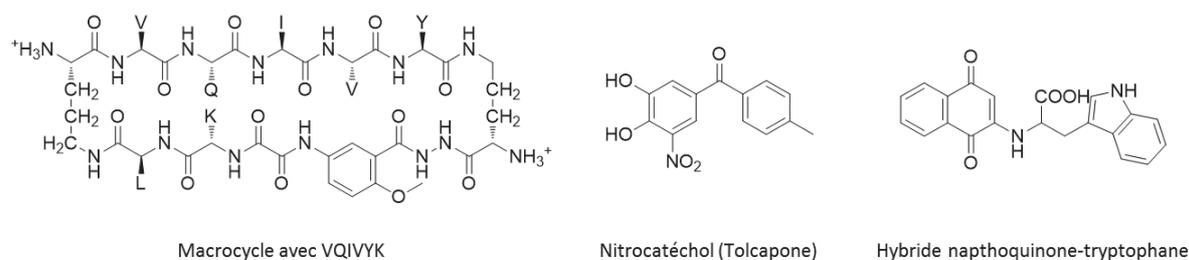


Figure 2.1.2. Exemples d'inhibiteurs de la fibrillation du modèle AcPHF6.

I.1.3 La séquence G273-L284 du motif R2

En 2001, von Bergen *et al.* utilisent un fragment peptidique de 12 acides aminés, représentant la séquence G273-L284 et incluant la séquence ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ (PHF6*) du motif de répétition R2 (**Figure 2.1.1**).¹⁶⁰ Ils montrent que ce peptide centré autour du motif PHF6* est capable de s'agréger en fibres en présence d'héparine, bien que ces fibres ne soient pas structurées en PHFs, à l'image de la séquence PHF43. Par ailleurs, cette étude met en avant la contribution de la lysine 280 dans l'agrégation. La délétion de ce résidu (Δ K280) permet en effet d'observer la formation d'agrégats pour le peptide G273-L284, à la fois en présence et en absence d'héparine.

Récemment, Shea *et coll.* ont utilisé le peptide G273-L284 de R2 et son mutant G273-L284 Δ K280 afin de caractériser le processus d'auto-assemblage de ces peptides, en particulier dans les premières étapes d'agrégation.¹⁷⁸ Les auteurs soulignent notamment le rôle de l'organisation spatiale des peptides dans la fibrillation, mais également l'impact de l'environnement de ceux-ci sur leur repliement.¹⁷⁹ Ils montrent que les peptides présentent préférentiellement une conformation majoritairement compacte dans leur état monomérique en équilibre avec une conformation plus étendue. Cette conformation étendue est plus abondante pour le mutant Δ K280 que pour le peptide naturel. Les auteurs expliquent cela par la formation de ponts salins entre l'asparagine 283 et la lysine 274, cette dernière étant en compétition avec la lysine 280 dans le peptide G273-L284. Ils postulent que deux phénomènes d'agrégation se déroulent en parallèle à partir des dimères de peptide, soit par

élongation lente à partir de la forme compacte, soit par élongation rapide à partir de la forme étendue (**Figure 2.1.3**). Ces résultats confirment la tendance déjà observée par von Bergen *et al.* chez le mutant K18 présentant la mutation $\Delta K280$ et qui est capable de fibriller plus rapidement que K18.¹⁶⁰ En outre, Shea *et coll.* démontrent que l'héparine se lie aux espèces en conformation étendue, ce qui explique le caractère pro-agrégant de cet inducteur polyanionique sur la fibrillation. En particulier, les auteurs mettent en avant que l'héparine se lie très fortement à la région PHF6* et postulent que ce mécanisme intervient également dans le cas de la protéine tau.

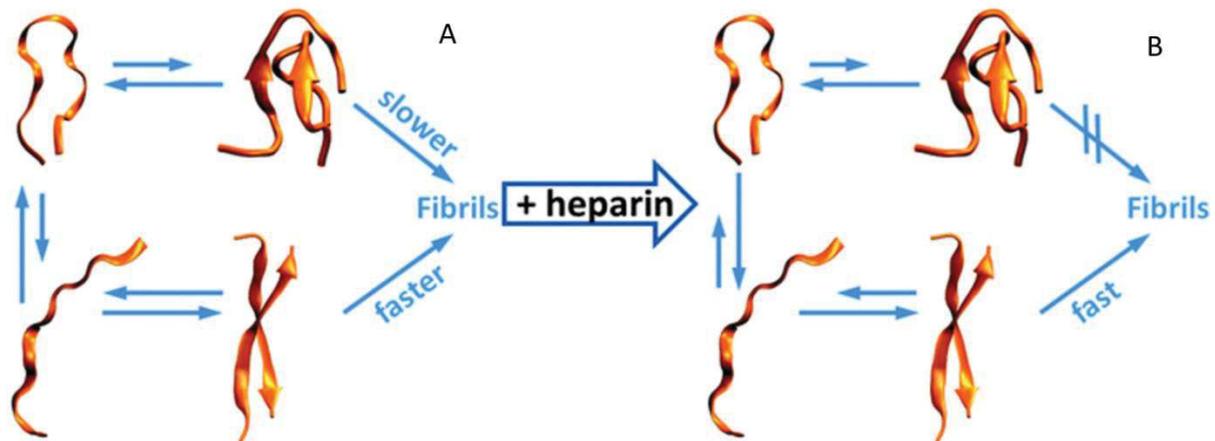


Figure 2.1.3. Formation de fibres à partir du peptide G273-L284 issu de R2 en (A) présence et (B) absence d'héparine.¹⁷⁸

La formation *in vitro* de fibres de tau par l'intermédiaire de modèles synthétiques issus de la séquence de la protéine tau a ainsi permis de mettre en évidence différents paramètres influençant l'auto-assemblage de la protéine tau ou de ses séquences amyloïdogènes. Les effets de charge semblent particulièrement importants dans la fibrillation des séquences amyloïdogènes de la protéine tau, y compris dans le cas du motif PHF6 capable de former seul des fibres. Ces effets de charge, en particulier la phosphorylation, interviennent notamment dans le repliement pathogène de la protéine et de ses plus courtes séquences amyloïdogènes mais peuvent également favoriser la phase d'élongation, à l'image de l'héparine. Par ailleurs, les motifs PHF6 et PHF6* sont essentiels dans l'adoption d'une conformation en feuillets β de la protéine tau, mais également dans la formation de dimères de tau où ils interviennent au niveau de l'association des deux monomères de tau. Ces motifs ont donc un rôle prépondérant dans la formation d'agrégats insolubles de tau et *in fine* dans la propagation de la protéine tau pathogène.

Ces études ont de plus permis de montrer que les séquences AcPHF6 et PHF43 toutes deux issues du motif de répétition R3 pouvaient être utilisées comme modèles des fibres de tau pour

étudier l'effet de molécules organiques sur la fibrillation. En effet, si AcPHF6 a déjà été utilisé dans ce contexte, PHF43 en a montré le potentiel. Cela a conduit à utiliser dans le cadre de ce projet le modèle AcPHF6 et à développer un autre modèle issu de la séquence PHF43.

1.2 Modèles des fibres de tau : synthèse et étude

Dans l'objectif de tester une série d'aurones comme inhibiteurs potentiels de la fibrillation de tau, le premier modèle employé dans ce projet de recherche est le modèle AcPHF6. Ce dernier déjà illustré dans la littérature comme outil de recherche d'inhibiteurs potentiels^{161-162, 175-176} est basé sur la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, cœur hydrophobe des fibres de tau. L'utilisation de ce modèle de fibrillation présente plusieurs intérêts. Il est capable d'une part de former des fibres *in vitro* selon un processus similaire à celui de la protéine tau native. D'autre part, la fibrillation de cet hexapeptide peut s'effectuer en quelques minutes en milieu aqueux tamponné (pH 7,2 à 7,4), ce qui contraste avec la protéine tau native qui nécessite jusqu'à plusieurs jours et la présence d'inducteurs pour former des fibres *in vitro*. De plus, la séquence VQIVYK qui constitue ce modèle est spécifique de la protéine tau. Par conséquent, des composés capables d'interagir avec cette séquence sont susceptibles d'interagir en particulier avec la protéine tau plutôt qu'avec le peptide A β , autre protagoniste de fibres amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer.

Le second modèle peptidique utilisé a été synthétisé dans l'équipe I2BM (Département de Chimie Moléculaire) au cours de la thèse du Dr. Dufour soutenue en 2013,¹⁶³ mais il n'a été mis au point et développé comme modèle de fibrillation qu'au cours de ce projet. Ce modèle est constitué de 22 acides aminés en grande partie issus du motif de répétition R3 impliqué dans le processus de fibrillation et retrouvé dans le modèle PHF43 décrit dans la littérature.^{88, 159} Par simplification, il sera dénommé « modèle R3 » par la suite.

La formation de fibres pour ces deux modèles a été caractérisée par fluorescence en utilisant la ThT comme sonde fluorescente, mais également par CD et par AFM. Des inhibiteurs de tau (**Figure 2.1.4**) décrits dans la littérature ont ensuite été utilisés pour valider ces modèles comme outil de recherche de nouveaux inhibiteurs.

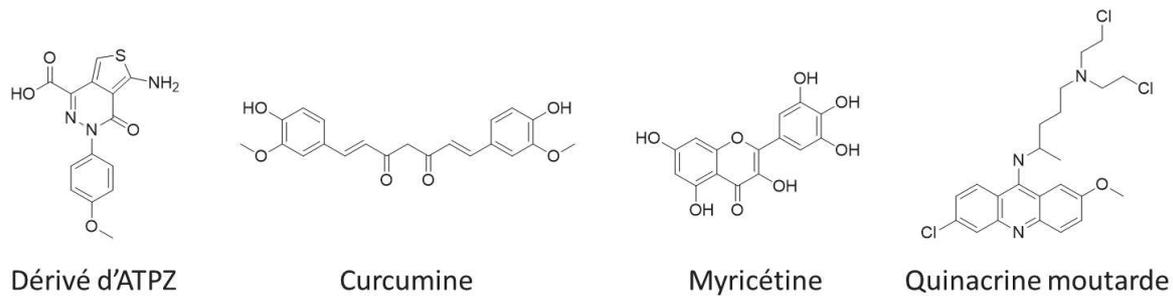


Figure 2.1.4. Structures d'inhibiteurs de la fibrillation de la protéine tau.

I.2.1 Le modèle AcPHF6

Les conditions de fibrillation décrites dans la littérature^{161-162, 174} ont dû être adaptées de manière à obtenir des résultats reproductibles, la fibrillation étant suivie par l'augmentation de la fluorescence des sondes (thioflavine) dans des microplaques à 96 puits. Plusieurs paramètres ont donc été ajustés : le type de plaque, le tampon de fibrillation et la sonde fluorescente. En effet, pour les tests en plaques en présence de thioflavine (ThS ou ThT), de fortes variations de fluorescence ont été observées lors de la cinétique de fibrillation du peptide dans les microplaques en polystyrène. Ce phénomène n'a pas été observé pour des microplaques en polypropylène noir qui se sont avérées plus adaptées pour ces études de fluorescence. Ainsi, une cinétique de fibrillation a pu être observée de manière reproductible en adaptant les conditions décrites.^{161-162, 174} De même, si dans la littérature la fibrillation du motif AcPHF6 s'effectue dans 20 mM de tampon MOPS en présence de ThS, l'incubation du peptide AcPHF6 dans ces conditions n'a pas permis d'obtenir un signal de fluorescence très intense (**Figure 2.1.5.A**). Dans ce projet, l'utilisation du tampon phosphate et de la ThT (excitation à 440 nm, émission à 480 nm) a été préférée selon les conditions suivantes : 50 mM de tampon phosphate pour une concentration de 100 μ M de peptide et de 10 μ M de ThT. En effet, un manque de reproductibilité en présence de ThS couplé à sa nature peu définie (mélange de composés) ont conduit à privilégier la ThT comme sonde fluorescente. Une concentration de 50 mM de tampon a été privilégiée, une concentration moins importante étant synonyme de fluorescence moins marquée dans le test en plaque (**Figure 2.1.5.A**). Ceci a été confirmé en CD où une signature de feuillets β (bandes positive vers 198 nm et négative vers 218 nm) moins intense a été observée en présence de 20 mM de tampon phosphate, alors que celle-ci n'est pas observée en présence du tampon MOPS (**Figure 2.1.5.B**).

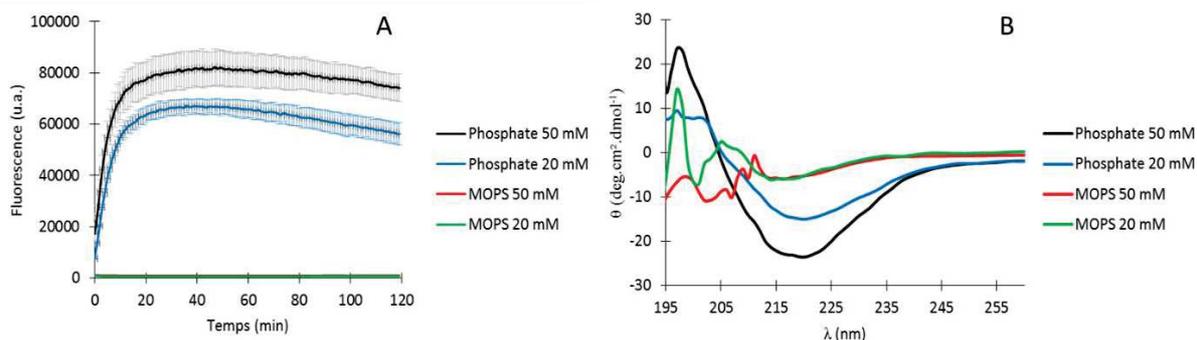


Figure 2.1.5. (A) Test de fluorescence en plaque et (B) CD après 24 h de fibrillation du peptide AcPHF6 à 100 μM dans le tampon phosphate 50 mM (noir) et 20 mM (bleu) ou dans le tampon MOPS 50 mM (rouge) et 20 mM (vert).

Les tests de fluorescence en plaque ont été réalisés au moins en triplicatas pour chaque condition. La fibrillation suit une cinétique d'ordre 1 avec un plateau atteint au bout d'une vingtaine de minutes, similairement aux cinétiques de fibrillation décrites dans le MOPS.¹⁶² L'absence de phase de latence est associée à l'agrégation très rapide du peptide AcPHF6 en milieu aqueux.

Enfin, les fibres du modèles AcPHF6 ont été caractérisées par AFM après 2 h (**Figure 2.1.6.A**) et 24 h (**Figures 2.1.6.B et C**) d'incubation dans les conditions de fibrillation. Après 2 h, un réseau de courtes fibres entremêlées est formé alors qu'après 24 h, un mélange de fibres courtes (environ 5 nm de largeur, 60 nm de longueur et 2 nm de hauteur) et de longues fibres matures (environ 18 nm de largeur, 450 nm de longueur et 8 nm de hauteur) est observé. Ces fibres plus longues peuvent s'enrouler ensemble (**Figure 2.1.6.C**), similairement aux PHFs de tau.¹⁶¹

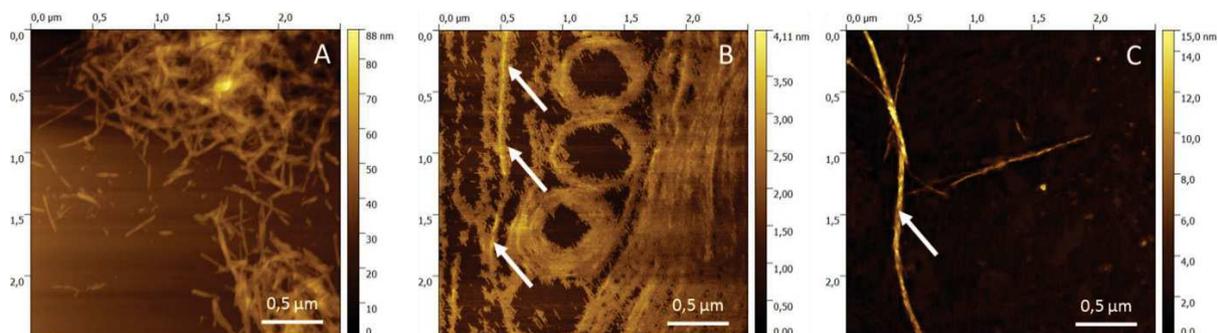


Figure 2.1.6. Images AFM du modèle AcPHF6 incubé à 100 μM pendant (A) 2 h et (B et C) 24 h dans le tampon phosphate 50 mM.

Afin de valider le peptide AcPHF6 comme modèle de fibrillation pour la recherche d'inhibiteurs dans les conditions utilisées ici, celui-ci a été incubé en présence d'inhibiteurs connus de la fibrillation de tau : un dérivé d'aminothiényridazines (ATPZ), ainsi que des polyphénols tels que la curcumine et la myricétine (**Figure 2.1.4**).^{71, 93, 122} A ce jour, les inhibiteurs de la fibrillation de tau

reportés dans la littérature sont peu spécifiques : ils sont généralement également actifs sur les fibres amyloïdes d'A β . En 2009, Crowe *et al.* décrivent le caractère inhibiteur de composés de la famille des ATPZ.⁷¹ Les auteurs notent en particulier que cette famille de composés est plus efficace pour inhiber la fibrillation de tau que d'A β . L'ATPZ évaluée sur le modèle AcPHF6 dans ce projet présente dans les travaux de Crowe *et al.* une IC₅₀ de 2,5 μ M sur le mutant K18 de tau utilisé à une concentration de 6,25 μ M. Par ailleurs, la curcumine a fait l'objet de nombreuses études portant sur l'AD, en particulier sur l'agrégation du peptide A β *in vitro*. Yang *et al.* décrivent initialement que la curcumine est capable d'inhiber la formation des oligomères et des fibres d'A β *in vitro* et *in vivo* chez la souris transgénique.¹²⁴ Outre son activité sur la fibrillation d'A β , la curcumine présente un potentiel thérapeutique dans l'AD de par ses propriétés d'inhibition de la phosphorylation de tau mais aussi son activité anti-oxydante et anti-inflammatoire.¹²³ Enfin, Mohamed *et al.* ont récemment montré dans un test de fluorescence à la ThS que la curcumine est capable d'inhiber partiellement la fibrillation du peptide AcPHF6.¹⁶² Très récemment, Berhanu *et al.* ont étudié le mécanisme d'inhibition de l'agrégation des fibres amyloïdes de tau par des polyphénols à travers l'étude des interactions *in silico* entre la séquence VQIVYK et la curcumine, ainsi qu'avec la myricétine.¹²² Cette dernière est un flavonol naturel décrit comme capable d'inhiber la formation de fibres d'A β (15 μ M) avec une IC₅₀ de 0,9 μ M et de tau (22 μ M) avec une IC₅₀ de 1,2 μ M.⁹³ Berhanu *et al.* mettent notamment en avant le rôle de la planarité et des interactions hydrophobes apportés par les composés aromatiques, ainsi que l'importance des liaisons hydrogènes au sein des polyphénols.

L'incubation du modèle AcPHF6 à 100 μ M dans le tampon phosphate à 50 mM en présence de ces trois inhibiteurs à une concentration de 100 μ M, soit à un ratio peptide/inhibiteur 1:1, résulte en une diminution notable de la fluorescence de la ThT (**Figure 2.1.7.A**). L'ATPZ diminue la fluorescence de 56 %, alors que la curcumine et la myricétine diminuent la fluorescence de 90 et 95 % respectivement. En CD, l'incubation pendant 24 h du peptide AcPHF6 en présence de ces inhibiteurs de tau conduit à un profil caractéristique de structures en feuillets β similaire au profil du peptide AcPHF6 incubé seul (**Figure 2.1.7.B**). Enfin, l'AFM révèle qu'en présence d'ATPZ et de curcumine, un réseau intense de fibres est formé, alors qu'en présence de myricétine, de rares fibres courtes sont observées en présence de petits agrégats sphériques (**Figure 2.1.8**).

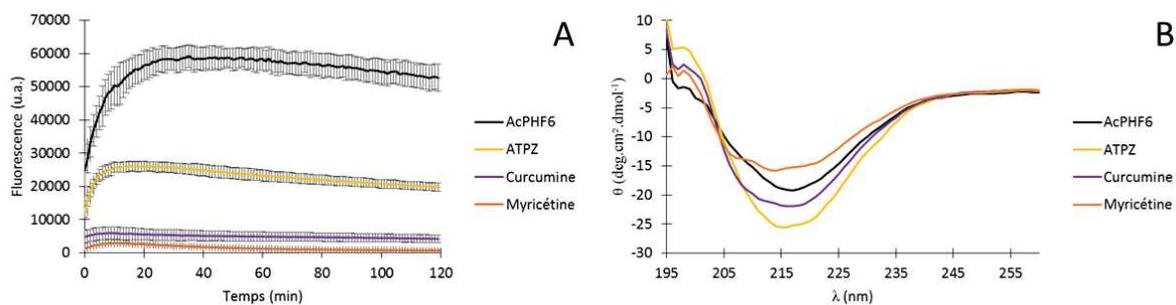


Figure 2.1.7. (A) Test de fluorescence en plaque et (B) CD après 24 h de fibrillation dans le tampon phosphate 50 mM du modèle AcPHF6 seul (noir) et en présence d'ATPZ (jaune), de curcumine (violet) ou de myricétine (orange) à 100 μ M.

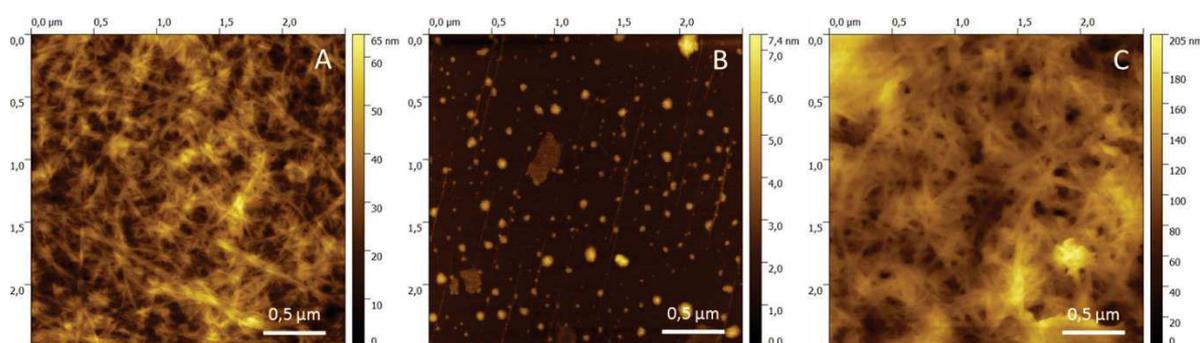


Figure 2.1.8. Images AFM du peptide AcPHF6 incubé à 100 μ M pendant 24 h dans le tampon phosphate 50 mM en présence de 100 μ M de (A) ATPZ, (B) myricétine et (C) curcumine.

La myricétine montre une activité inhibitrice sur le modèle AcPHF6 caractérisée en AFM (**Figure 2.1.8.B**) par une faible présence de fibres et la présence d'agrégats qui sont structurés en feuillet β , comme l'atteste le profil obtenu en CD (**Figure 2.1.7.B**). Ceci est en accord avec la littérature où la myricétine est décrite comme un inhibiteur de la fibrillation de tau,⁹³ ainsi que dans le cas du peptide A β où elle semble inhiber plutôt la phase d'élongation des fibres que la phase d'oligomérisation.¹⁸⁰ Pour la curcumine en revanche, si le test de fluorescence à la ThT semble montrer une inhibition de la formation des fibres du peptide AcPHF6, le profil en CD (**Figure 2.1.7.B**) et l'AFM (**Figure 2.1.8.C**) ne corroborent pas cet effet inhibiteur. Il est important de noter que l'inhibition de la fluorescence de la ThT observée dans le test en plaques (**Figure 2.1.7.A**) n'est pas forcément synonyme d'inhibition de la fibrillation. En effet, les composés testés peuvent entrer en compétition avec la ThT et l'empêcher de se fixer aux fibres amyloïdes, ou encore la substituer, ce qui résulte aussi en une diminution de fluorescence.^{39, 181} Ces composés auraient alors un comportement de sonde plutôt que d'inhibiteur des fibres. C'est pourquoi l'utilisation de techniques complémentaires comme le CD et de l'AFM, qui permettent respectivement de donner la structure dominante ainsi que de visualiser l'allure des fibres ou agrégats formés, est essentielle afin de différencier une sonde (fibres en AFM et profil de feuillets β en CD) d'un inhibiteur (pas de fibres en AFM, présence ou non de feuillets β en

CD). Il est à noter cependant que certains composés peuvent agir à la fois comme sonde et comme inhibiteur, comme cela a été décrit dans la littérature.³⁹ Le curcumine a d'ailleurs un effet inhibiteur sur la formation des fibres amyloïdes A β , mais également la capacité de se lier à ces fibres.¹⁸² Les résultats obtenus en CD et AFM vont dans ce sens pour la curcumine qui n'est pas capable de prévenir la formation des fibres du peptide AcPHF6 et tendrait plutôt à se fixer aux fibres sur un site voisin de celui de la ThT. Une conclusion similaire peut être tirée pour le cas de l'ATPZ. En effet, si l'ATPZ interagit avec le peptide AcPHF6, cette interaction n'est caractérisée que par une inhibition partielle de fluorescence dans le test en plaque (**Figure 2.1.7.A**), ce qui est confirmé en CD avec un profil de feuillets β (**Figure 2.1.7.B**), ainsi qu'en AFM avec une forte présence de fibres (**Figure 2.1.8.A**). Ces données suggèrent que l'ATPZ n'est pas capable d'inhiber la fibrillation du modèle AcPHF6. En revanche, elles n'excluent pas que ce composé pourrait agir en tant que sonde, à l'image de la curcumine.

Néanmoins, un autre aspect doit être contrôlé avant de conclure sur l'interaction des composés testés sur les fibres au regard des tests de fluorescence à la ThT. En effet, les composés absorbant dans la gamme des longueurs d'onde utilisées pour détecter la ThT liée aux fibres (excitation à 440 nm et émission à 480 nm), peuvent être responsables d'interférences spectroscopiques.^{39, 181, 183} Ce phénomène peut conduire à des faux-positifs dans le test en plaque. Cela peut être le cas en particulier des polyphénols. Une étude de Hudson *et al.* a ainsi montré que l'inhibition de fibres amyloïdes (κ -caséine et A β) par la curcumine est biaisée par ses propriétés spectroscopiques intrinsèques dans des tests de fluorescence utilisant la ThT.¹⁸¹ A une concentration de 100 μ M, concentration utilisée dans le test en plaque, mais aussi à 10 μ M, la curcumine absorbe fortement à 440 et à 480 nm, ce qui n'est pas le cas de la myricétine (**Figure 2.1.9**). Cela implique que l'inhibition de fluorescence de la ThT observée dans le test en plaque peut résulter avant tout de ses propriétés d'absorption même si cela n'exclut pas l'interaction de la curcumine avec les fibres.

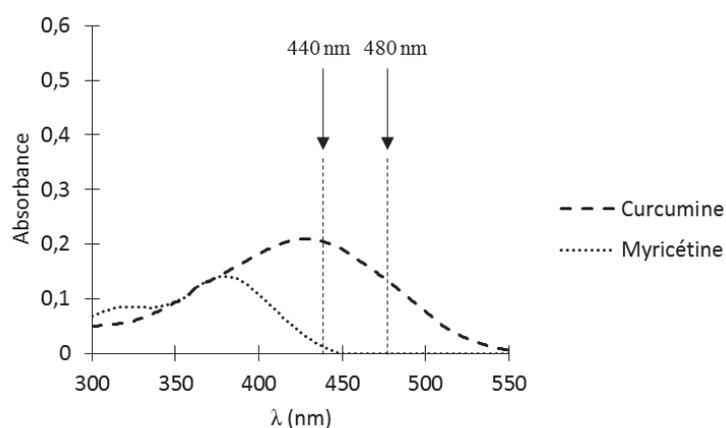


Figure 2.1.9. Absorption de la curcumine (traits) et de la myricétine (points) à 10 μ M.

Outre l'absorption des composés testés, la fluorescence propre émise par ces composés pourrait également biaiser l'analyse des tests de fluorescence. La fluorescence observée dans les puits de mesure résulterait alors de la combinaison de la fluorescence émise par la ThT ainsi que celle émise par les composés exogènes. Néanmoins, cette fluorescence propre aux composés testés est prise en compte dans les puits de contrôle du test en plaque et est soustraite à la valeur de fluorescence mesurée dans les puits de mesure.

Ces résultats montrent que le modèle AcPHF6 est un bon modèle de fibrillation dans les conditions développées, mais aussi qu'il peut être utilisé pour la recherche d'inhibiteurs de la protéine tau. Cependant, il est à noter qu'une diminution de la fluorescence dans le test à la ThT n'est pas toujours synonyme d'inhibition de la formation de fibres, comme en atteste les résultats obtenus pour l'ATPZ et la curcumine. Ceci souligne la nécessité de combiner ce test avec d'autres techniques, telles que le CD et l'AFM. Néanmoins, ce test étant facile à mettre en œuvre pour suivre la fibrillation du peptide AcPHF6, il sera utilisé dans la suite de ce projet comme premier outil de criblage de composés potentiellement inhibiteurs de la fibrillation de tau.

I.2.2 Le modèle R3

Le modèle R3 ou G271-G323ΔR2 (**Figure 2.I.10**) a été optimisé au cours de ce projet, mais il avait été synthétisé au laboratoire préalablement à ces travaux.¹⁶³ La détermination de la séquence peptidique de ce modèle a été basée sur les travaux de Daebel *et al.*¹⁸⁴ En étudiant le cœur des PHFs par RMN en phase solide sur le mutant K19 de tau, les auteurs ont montré que la partie rigide du cœur des fibres est constituée des résidus V306-S324 du motif de répétition R3. Le modèle R3 inclut cette séquence tau₃₀₆₋₃₂₃, qui comprend le motif VQIVYK ainsi que la cystéine 322 qui revêt une importance particulière dans la fibrillation de tau, notamment dans la formation de dimères au début du processus d'agrégation.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Les résidus ²⁷¹G²⁷⁴GGGK²⁷⁴ en N-terminal correspondent à la fin de la séquence du motif de répétition R1. Enfin, un bras oxyamine a été greffé en N-terminal par l'intermédiaire de l'acide aminoxyacétique. Cette fonction a été ajoutée lors des travaux de thèse précédents afin de pouvoir lier la séquence peptidique à un châssis moléculaire par lien oxime.¹⁶³ Dans le cadre de ce projet, la fonction oxyamine a été bloquée en présence d'acétone pour former le modèle de fibrillation R3. Une alternative visant à simplifier la synthèse du peptide R3 a consisté à simplement acétyler la séquence en N-terminal. Cette modification a conduit à la formation du peptide qui sera dénommé par la suite « modèle AcR3 » par simplification (**Figure 2.I.10**).

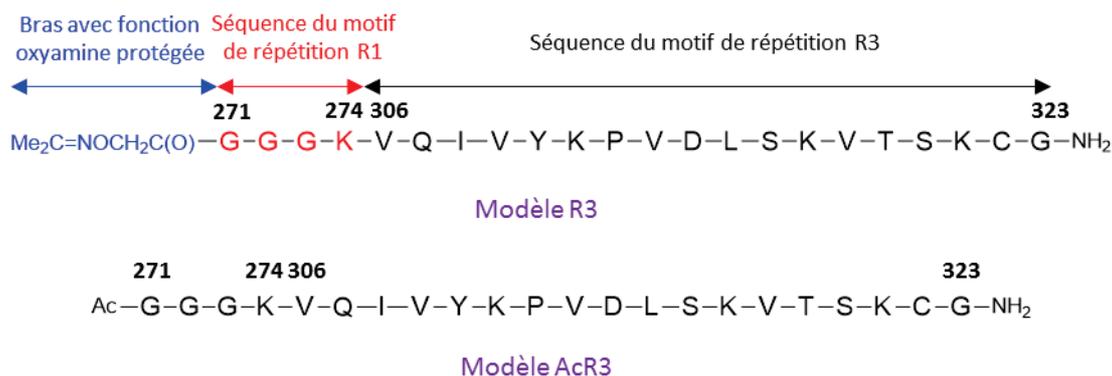


Figure 2.I.10. Séquences peptidiques du modèle R3 et du modèle AcR3.

Ces deux peptides ont été obtenus par synthèse peptidique en phase solide (SPPS) automatisée selon la stratégie de protection Fmoc/tBu standard. Le résidu G323 en C-terminal est fixé par couplage sur une résine Rink Amide, puis des cycles de déprotection et de couplage permettent l'assemblage itératif des autres résidus jusqu'à G271 en N-terminal. La différence entre le modèle R3 et le modèle AcR3 se fait au niveau de la fixation sur G271 de la fonction oxyamine ou du groupement acétate. Outre la simplification de synthèse, le modèle AcR3 a été développé afin de s'affranchir des problèmes liés à la purification de la fonction oxyamine fortement réactive.

La mise au point des conditions de fibrillation pour ces deux peptides a été réalisée dans un premier temps. Pour ce faire, les fibres formées par ces deux peptides ont été caractérisées par fluorescence, CD et AFM. Dans un second temps, l'activité d'inhibiteurs connus de tau sur la fibrillation de ces peptides a été étudiée.

I.2.2.1 Mise au point des conditions de fibrillation

I.2.2.1.1 Test de fluorescence à la ThT

Les travaux de thèse du Dr Dufour ont permis d'observer des fibres en AFM structurellement similaires à celles de la protéine htau40 à partir du peptide R3.¹⁶³ Ces fibres ont été obtenues après incubation de R3 à 100 μM pendant une semaine à 37 °C dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4 en présence d'héparine (ratio héparine/protéine ou peptide 1:4) et en absence de DTT à 1 mM. La fibrillation de ce peptide peut également être réalisée dans le tampon phosphate 50 mM (pH 7,4), où elle est caractérisée par une phase d'élongation d'environ 15 h dans le test de fluorescence en plaque utilisant la ThT comme sonde et par un profil de feuillet β en CD. Dans ce projet, la fibrillation du peptide R3 a été effectuée dans le tampon phosphate 50 mM, afin de limiter d'une part les effets de

sels potentiellement présents dans le PBS, et d'autre part de pouvoir comparer avec la fibrillation du peptide AcPHF6 réalisée dans le même tampon. De plus, les conditions de fibrillation ont été optimisées par la modification de différents paramètres, notamment les concentrations d'héparine et de ThT utilisées, ainsi que la présence ou l'absence de DTT.

La concentration de ThT à utiliser a été déterminée par le suivi de la formation des fibres à partir de 100 μM de peptide R3 dans le tampon phosphate 50 mM pour différentes concentrations de ThT. La fluorescence observée au maximum du plateau dans le test en plaque a été reportée sous la forme d'un histogramme pour des concentrations de ThT variant de 1 à 100 μM (**Figure 2.I.11.A**). Celle-ci est la plus élevée à 40 μM de ThT. A des concentrations inférieures de ThT, le maximum de fluorescence observé est moins important, ce qui vient probablement du fait que tous les sites de fixation de la ThT sur les fibres ne sont pas occupés. Pour une concentration supérieure à 40 μM , le maximum de fluorescence observé diminue également. Ce phénomène déjà reporté dans la littérature peut être attribué à une extinction de la fluorescence entre molécules de ThT liées et libres.¹⁸⁸ La ThT libre en excès recouvrirait alors la ThT liée et empêcherait son excitation, résultant en une fluorescence moins importante. De plus, la ThT est capable de former des micelles à une concentration supérieure à 4 μM , c'est-à-dire dans les conditions usuelles des tests d'agrégation de fibres amyloïdes.¹⁸³ Les micelles peuvent alors incorporer des molécules hydrophobes et diminuer leur concentration effective dans le test de fluorescence. En outre, une étude récente suggère que l'utilisation de la ThT en quantité sub-stoechiométrique par rapport au peptide amyloïde est idéale.³⁹ Dans ces conditions, la ThT ne perturbe pas l'auto-assemblage des amyloïdes. En conséquence, la fibrillation du modèle R3 a été réalisée dans ce projet avec une concentration de 10 μM de ThT afin de permettre la comparaison avec la fibrillation du peptide AcPHF6. Il est à noter que la fluorescence observée est notablement inférieure dans le cas de la fibrillation du peptide R3 par rapport à celle du peptide AcPHF6. Ceci pourrait être dû au fait que la ThT se lie moins facilement au cœur hydrophobe des fibres du peptide R3, celui-ci étant probablement plus enfoui que pour les fibres du peptide AcPHF6.

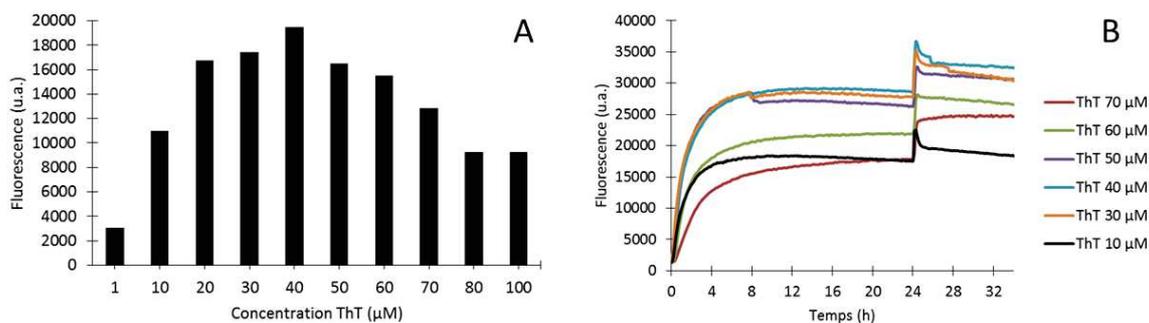


Figure 2.I.11. (A) Maximum de fluorescence observée au plateau en fonction de la concentration de ThT. **(B)** Variation de fluorescence après ajout de fibres préformées (100 µM) incubées pendant 24 h.

Afin de vérifier que dans la gamme de concentration utilisée, les sites de fixation de la ThT ne sont pas saturés, des fibres de R3 (100 µM) préformées au préalable pendant 24 h à 37 °C ont été ajoutées sur des fibres assemblées en parallèle dans les mêmes conditions dans le test en plaque (**Figure 2.I.11.B**). Aux diverses concentrations de ThT, cet ajout est accompagné d'une augmentation spontanée de la fluorescence suivie d'un autre plateau. L'augmentation de fluorescence peut être expliquée par la liaison des molécules de ThT libres se fixant aux fibres ajoutées au milieu. La présence d'un excès de ThT libre est nécessaire pour permettre de détecter également des composés agissant en tant que promoteurs de la fibrillation, ce qui provoquerait une augmentation de la fluorescence. Cette gamme de concentrations de ThT devrait donc permettre l'étude de composés ayant soit un rôle d'inhibiteur, soit de promoteur de la fibrillation.

Par ailleurs, la contribution de l'héparine à la fibrillation de R3 a également été étudiée (**Figure 2.I.12.A**). Une cinétique de fibrillation similaire est observée pour des concentrations de 10 à 100 µM d'héparine. Pour des concentrations inférieures, l'allure de la courbe de fibrillation est différente avec des phases d'initiation et d'élongation (avant d'atteindre le plateau) plus longues et un maximum de fluorescence atteint au plateau supérieur. Ainsi, pour des concentrations de 10 à 100 µM d'héparine, les phases d'initiation et d'élongation sont d'environ 1 h chacune, alors que pour 1 µM d'héparine, la phase d'initiation est d'environ 2 h et la phase d'élongation de 4 h. En absence d'héparine, la phase d'initiation seule dure entre 6 et 8 h. Cette étude a également été réalisée dans un milieu réducteur en présence de DTT (**Figure 2.I.12.B**), où des profils similaires à l'étude précédente (**Figure 2.I.12.A**) sont obtenus. Dans cette étude également, des concentrations de 10 à 100 µM en héparine présentent un profil proche, alors que les phases d'initiation et d'élongation sont considérablement allongées pour des concentrations inférieures en héparine. En absence d'héparine notamment, la phase d'initiation dure environ 16 h. Ainsi, la fibrillation du modèle R3 est plus lente dans un milieu réducteur en présence de DTT (1 mM), en particulier pour des faibles concentrations d'héparine. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le DTT empêche la formation des ponts disulfures

intermoléculaires au niveau de la cystéine 322, ce qui confirmerait leur rôle dans le processus d'auto-assemblage des fibres (promoteurs de la fibrillation), comme cela a été illustré dans la littérature pour la protéine tau et son mutant K19.⁶⁷

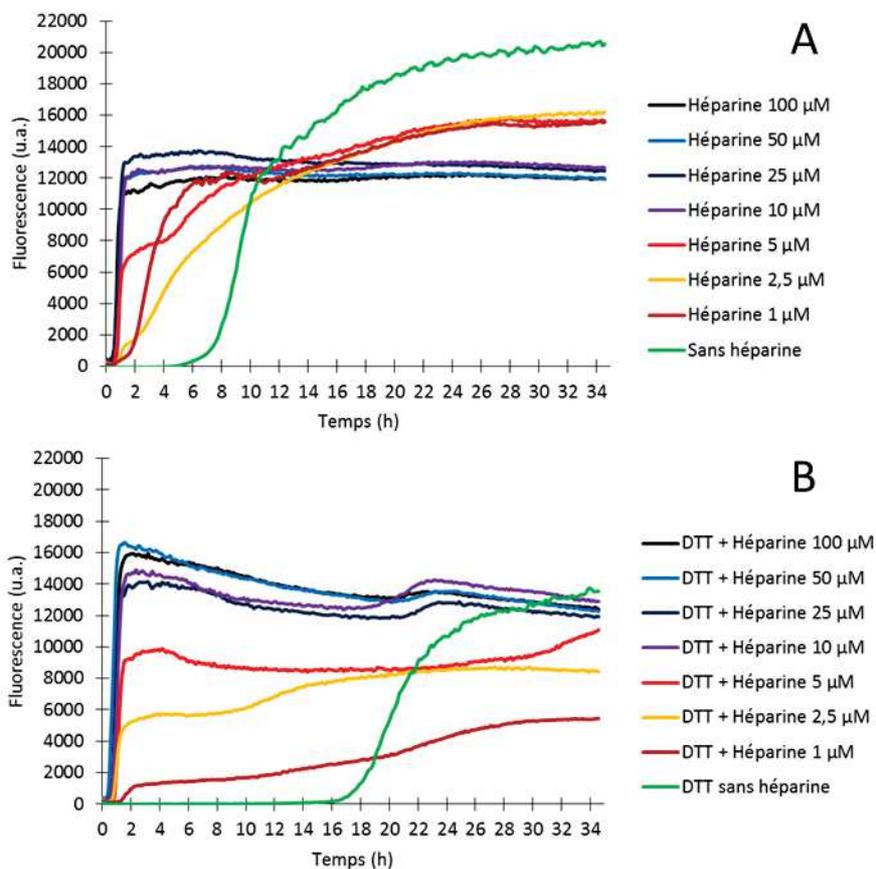


Figure 2.I.12. Fibrillation du modèle R3 (100 µM) dans le tampon phosphate (50 mM) avec 10 µM de ThT et 0 à 100 µM d'héparine en (A) absence ou en (B) présence de DTT (1 mM).

Les mêmes études ont été réalisées sur le peptide Acr3 (100 µM) dans le tampon phosphate (50 mM). Le peptide Acr3 a été incubé en absence (**Figure 2.I.13.A**) et en présence (**Figure 2.I.13.B**) de DTT avec des concentrations de 0 à 100 µM d'héparine menant à des constats similaires aux deux études précédentes. La phase d'élongation du peptide Acr3 semble cependant plus lente que celle du peptide R3 avec des différences plus marquées au niveau de maximum de fluorescence au plateau, celles-ci s'échelonnant de manière décroissante avec les concentrations d'héparine. A l'image de la fibrillation du peptide R3, la durée de la phase d'initiation est notablement augmentée à des concentrations faibles d'héparine ou sans héparine. De même, la présence de DTT augmente considérablement la phase de latence pour des faibles concentrations d'héparine.

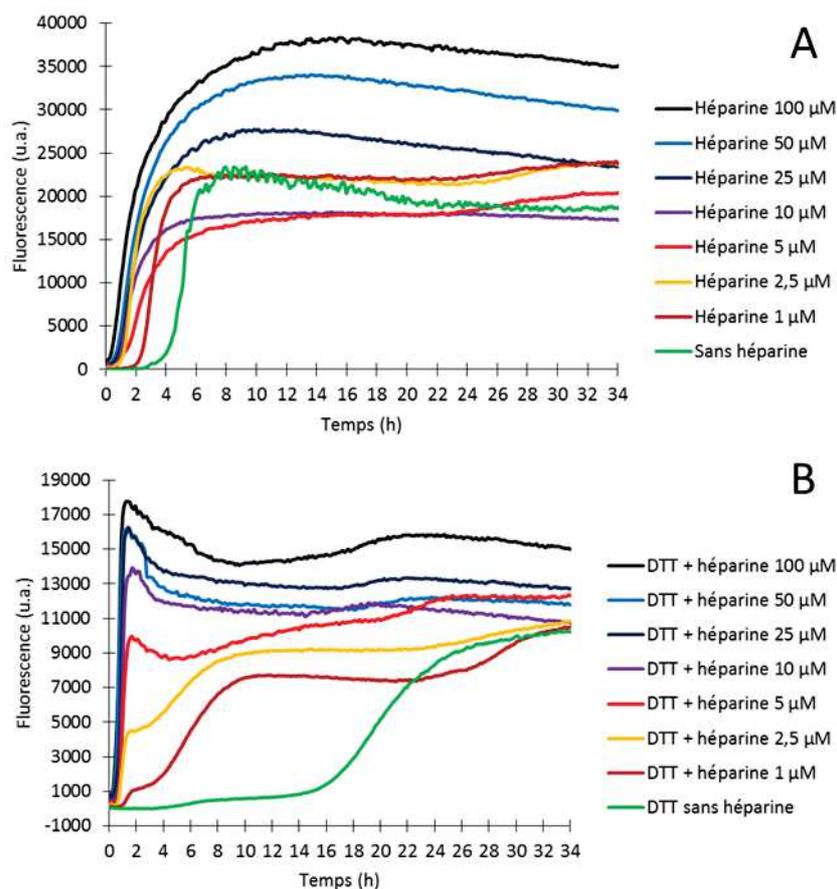


Figure 2.1.13. Fibrillation du modèle AcR3 (100 μ M) dans le tampon phosphate (50 mM) avec 10 μ M de ThT et 0 à 100 μ M d'héparine en **(A)** absence ou en **(B)** présence de DTT (1 mM).

Ces données montrent que les peptides R3 et AcR3 ont des profils de fibrillation similaires à celle du peptide AcPHF6 et de la protéine tau. Suite à ces travaux, les études d'inhibiteurs des fibres du peptide R3 ou AcR3 ont été réalisés dans la suite de ce projet sans DTT et avec une concentration d'héparine de 100 μ M, concentration à laquelle a lieu une formation rapide et importante de fibres. Le modèle R3 a été utilisé comme outil de criblage secondaire pour les molécules actives sur le modèle AcPHF6. Les modèles R3 et AcR3 ont également été caractérisés plus amplement en CD et en AFM.

I.2.2.1.2 Dichroïsme circulaire et microscopie à force atomique

La cinétique de fibrillation des modèles R3 (**Figure 2.1.14.A**) et AcR3 (**Figure 2.1.14.B**) a été étudiée en CD dans les conditions de fibrillation développées ci-dessus (100 μM de peptide dans 50 mM de tampon phosphate avec 100 μM d'héparine). Contrairement au modèle AcPHF6 formant de manière rapide des feuillets β , les modèles R3 et AcR3 présentent initialement un profil non structuré en CD, illustré par une bande négative entre 190 et 200 nm. Après quelques heures dans les conditions de fibrillation, les modèles R3 et AcR3 adoptent un profil caractéristique d'une structure riche en feuillets β (bandes positive en dessous de 200 nm et négative en dessous de 220 nm). Un phénomène similaire est observé pour la fibrillation du modèle R3 en présence de DTT, bien que le changement de profil en feuillets β soit plus long qu'en absence de DTT (**Figure 2.1.14.C**). Par ailleurs, le modèle AcR3 incubé pendant trois jours à 37 °C avec différentes concentrations d'héparine présente en CD un profil de feuillets β uniquement pour des concentrations d'héparine entre 25 et 100 μM (**Figure 2.1.14.D**). En présence de DTT, le profil de feuillets β n'est observé qu'à une concentration de 100 μM d'héparine (**Figure 2.1.14.E**), ce qui confirme la contribution des ponts disulfures dans le processus d'agrégation du peptide. A l'instar de la protéine tau, l'héparine promeut donc la formation de fibres structurées en feuillets β pour le peptide du modèle R3, de telles fibres n'étant formées en majorité qu'à de hautes concentrations d'héparine (supérieures à 25 μM sans DTT et 100 μM avec DTT). Cela valide également les conditions choisies suite aux tests de fluorescence en plaque pour la fibrillation des peptides R3 et AcR3 (en présence de 100 μM d'héparine et sans DTT).

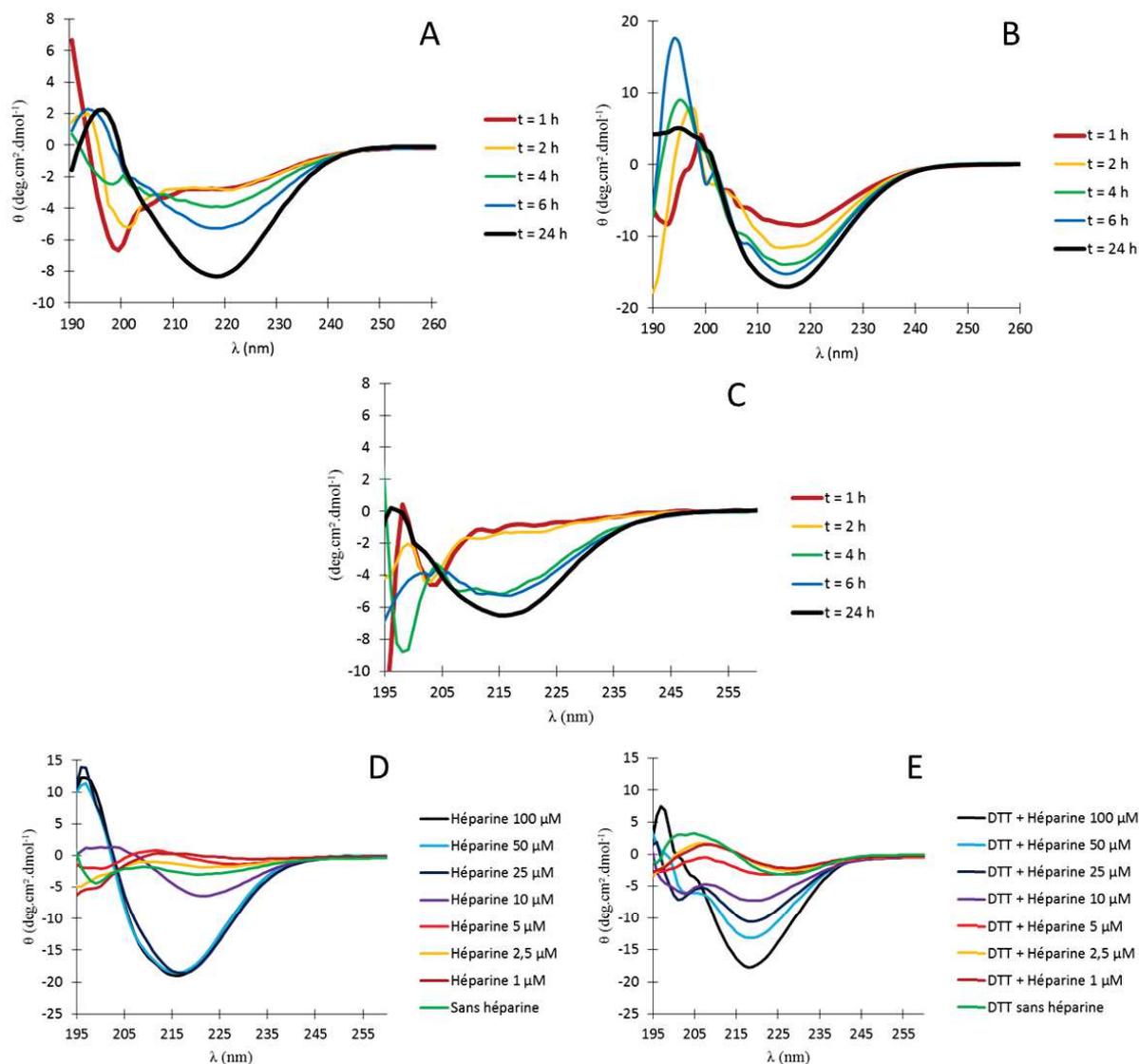


Figure 2.I.14. Cinétique de fibrillation suivie par CD dans le tampon phosphate 50 mM avec 100 μM d'héparine pour les modèles (A) R3 et (B) AcR3 à 100 μM sans DTT, ainsi que (C) du modèle R3 à 100 μM avec DTT (1 mM). CD du modèle AcR3 à 100 μM en présence de 0 à 100 μM d'héparine (D) sans DTT (1 mM) ou (E) avec DTT (1 mM)

En parallèle, les peptides R3 et AcR3 ont été caractérisés par AFM (**Figure 2.I.15**) après incubation pendant plusieurs jours dans les conditions de fibrillation. Après 14 h, temps pour lequel la fluorescence est maximale (plateau) dans les tests en plaque (**Figure 2.I.11.B**), un réseau dense de fibres fines est obtenu. Après plusieurs jours d'incubation, des fibres « matures » sont observées, généralement plus longues et regroupées sous formes de PHFs. Ces fibres présentent un pas d'hélice d'environ 50 à 60 nm (**Figure 2.I.16**) proche de celui trouvé dans les PHFs de tau issus de cerveaux humains (hélicité d'environ 80 nm).⁶⁷

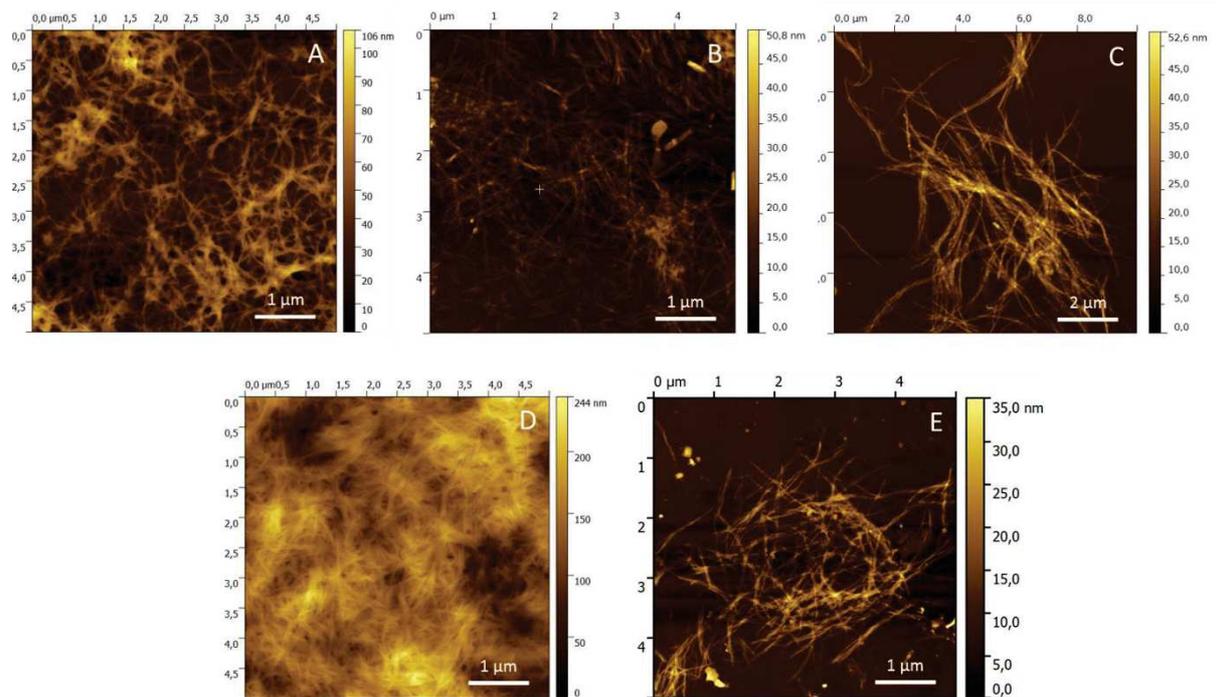


Figure 2.I.15. Images AFM du modèle R3 incubé à 100 μM à 37 $^{\circ}\text{C}$ dans le tampon phosphate 50 mM pendant (A) 14 h, (B) 3 jours et (C) 21 jours et du modèle AcR3 incubé à 100 μM à 37 $^{\circ}\text{C}$ dans le tampon phosphate 50 mM pendant (D) 3 jours et (E) 7 jours.

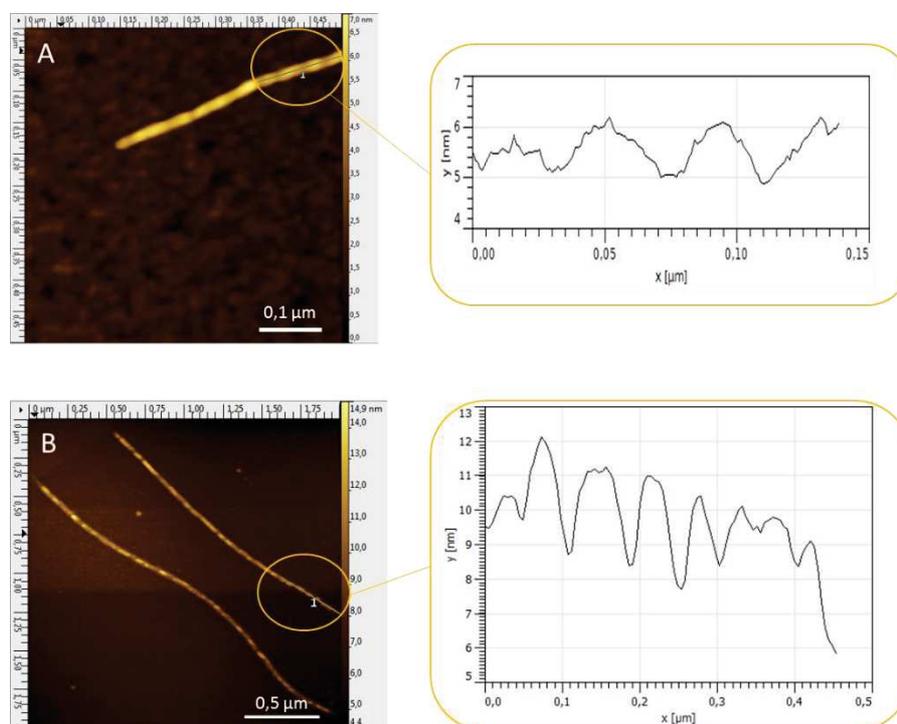


Figure 2.I.16. Hélicité des fibres du modèle (A) R3 avec héparine (100 μM) et (B) AcR3 sans héparine par AFM. Les fibres formées sous la forme de PHFs sont nombreuses en présence d'héparine (A) et rares en absence d'héparine (B).

Le modèle R3 et son homologue AcR3 s'affirment donc comme des modèles complémentaires au modèle AcPHF6 et de bons modèles de la fibrillation de la protéine tau. Ces modèles présentent un processus d'auto-assemblage similaire à celui de la protéine tau, notamment à travers la formation de dimères par le biais de ponts intermoléculaires au niveau de la cystéine 322. En particulier, ces modèles permettent la recherche de composés agissant sur la dimérisation, ce qui n'est pas le cas du modèle AcPHF6. De plus, les fibres observées en AFM sont morphologiquement proches de celles de la protéine tau, avec une organisation sous la forme de PHFs et une hélicité similaire à celle de la protéine tau.

I.2.2.2 Validation du modèle R3

A l'image du modèle AcPHF6, le modèle R3 a été incubé en présence d'inhibiteurs connus de la fibrillation de tau afin de valider son utilisation pour la recherche de nouveaux inhibiteurs potentiels de tau. Les deux inhibiteurs choisis ici sont la myricétine et la quinacrine moutarde (**Figure 2.1.4**), la curcumine et l'ATPZ n'ayant pas montré d'effet inhibiteur sur la fibrillation du peptide AcPHF6. La myricétine est particulièrement active sur le modèle AcPHF6 (**Figures 2.1.7** et **2.1.8**) et sur la protéine tau,⁹³ elle a donc été logiquement sélectionnée pour valider le modèle R3. La quinacrine moutarde a été étudiée par Taniguchi *et al.* et conduit à une inhibition notable de la formation de fibres d'A β (15 μ M) avec une IC₅₀ de 1,2 μ M et de htau39 (22 μ M) avec une IC₅₀ de 3,1 μ M, ce qui valide son utilisation pour l'étude du modèle R3.⁹³

Dans le test de fluorescence à la ThT, l'incubation du peptide R3 à 100 μ M dans le tampon phosphate (50 mM) en présence de 100 μ M de myricétine et de quinacrine moutarde conduit à une inhibition totale de fluorescence (**Figure 2.1.17.A**). Testés à une concentration de 10 μ M, les deux composés ont conduit à une diminution de fluorescence de 42 % pour la myricétine et de 3 % pour la quinacrine moutarde. Le CD effectué sur ces échantillons montre un profil non structuré en présence de 100 μ M de myricétine, alors que l'incubation du modèle R3 en présence de quinacrine moutarde ne résulte qu'en une faible diminution de l'intensité des feuillets β (**Figure 2.1.17.B**). L'incubation du modèle R3 avec les deux inhibiteurs à 10 μ M est caractérisée par un signal de feuillets β similaire à celui du modèle R3 seul.

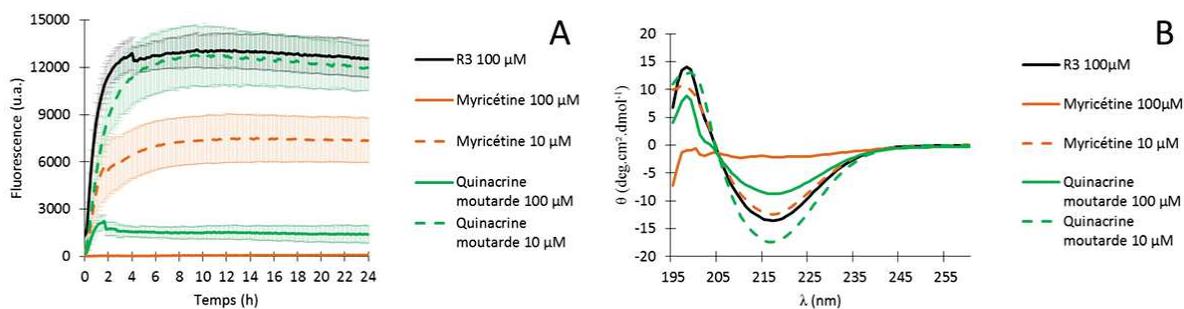


Figure 2.I.17. (A) Test de fluorescence en plaque et (B) CD après 24 h de fibrillation dans le tampon phosphate 50 mM du modèle R3 seul (noir) et en présence de myricétine (orange) ou de quinacrine moutarde (vert) à 100 μM (traits continus) et 10 μM (traits discontinus).

L'AFM réalisée sur le peptide R3 incubé en présence de myricétine et de la quinacrine moutarde à 10 μM montre un réseau de fibres (**Figure 2.I.18**), ce qui est en accord avec les données obtenus pour le test de fluorescence en plaque et en CD. L'absence de feuilletts β en CD dans le cas de la myricétine à une concentration de 100 μM est illustrée en AFM par des sphères d'oligomères, accompagné d'une absence de fibres (**Figure 2.I.18.A**).

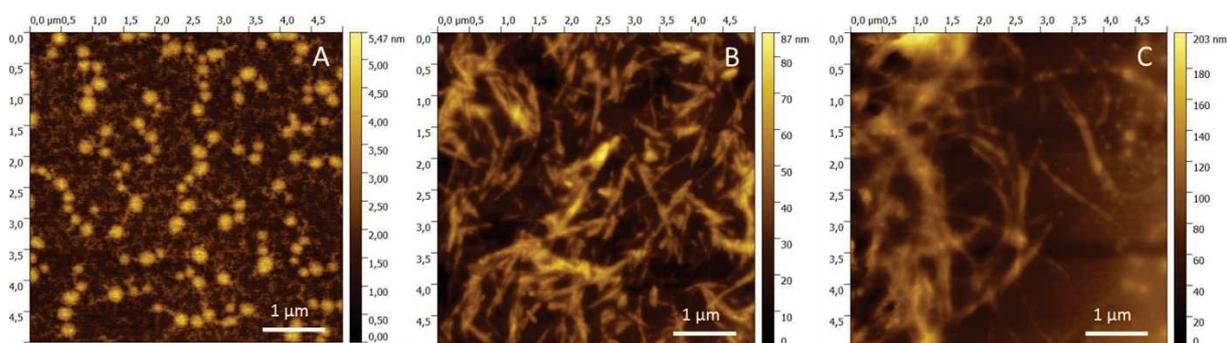


Figure 2.I.18. Images AFM du modèle R3 incubé à 100 μM pendant 3 jours dans le tampon phosphate 50 mM en présence de myricétine à (A) 100 μM et (B) 10 μM ou de (C) quinacrine moutarde à 10 μM .

A l'instar des inhibiteurs testés sur le modèle AcPHF6, ceux évalués sur le modèle R3 présentent des comportements différents. Si la myricétine et la quinacrine moutarde inhibent fortement la fluorescence à 100 μM , la quinacrine moutarde ne présente aucune diminution de fluorescence (3 %) à 10 μM . Dans le cas de la myricétine, cette diminution de fluorescence à 10 μM (44%) est moindre que dans le cas du modèle AcPHF6 (75 % à 10 μM). Ce phénomène pourrait être expliqué par des sites hydrophobes plus enfouis dans le cas des fibres du peptide R3 que pour celles du peptide AcPHF6, comme cela a été illustré auparavant dans le cas de la ThT. De plus, l'incubation du peptide R3 (100 μM) en présence de myricétine à 100 μM mène à une inhibition de la formation des fibres en AFM au profit de petits agrégats sphériques (**Figure 2.I.18.A**). Il est à noter que ces agrégats sont majoritairement non structurés en CD (**Figure 2.I.17.B**). L'action de la myricétine sur la

fibrillation du peptide R3 diffère donc de celle sur les fibres du peptide AcPHF6 pour laquelle les agrégats formés sont majoritairement organisés en feuillets β (**Figure 2.1.7.B**). A 100 μM , la myricétine semble donc capable d'inhiber la phase d'élongation des fibres du modèle R3 en stabilisant des oligomères non structurés en feuillets β dans une phase précoce du processus de fibrillation.

L'activité de la quinacrine moutarde est plus complexe à analyser. A l'image de la curcumine testée sur le modèle AcPHF6, la quinacrine moutarde testée sur le modèle R3 absorbe dans les longueurs d'onde de l'étude (440 à 480 nm).¹⁸⁹ La quinacrine moutarde émet également très fortement à 480 nm après excitation à 440 nm à 100 μM , ce qui est observable dans les puits de contrôle du test en plaque. La présence de feuillets β en CD (**Figure 2.1.7.B**) et de fibres en AFM à 100 μM suggère que la quinacrine moutarde n'inhibe pas la fibrillation du modèle R3 et que la diminution de fluorescence de la ThT observé à 100 μM est essentiellement due à un biais. En effet, aucune inhibition de la fluorescence n'est observée à 10 μM où l'absorption est moindre

En conclusion, les conditions développées dans ce projet ont permis d'observer la formation de structures amyloïdes riches en feuillets β à partir des peptides AcPHF6, R3 et AcR3. L'utilisation d'inhibiteurs de la protéine tau sur ces modèles a de plus permis de valider leur utilisation comme outil de criblage pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de tau. En particulier, la myricétine est capable d'inhiber la formation de fibres pour ces modèles et permet d'observer en particulier des agrégats non structurés pour le modèle R3. En outre, cette étude souligne l'importance de corrélérer plusieurs techniques (fluorescence, CD et AFM) pour l'analyse de l'activité des composés testés. En particulier, la fluorescence peut être biaisée par les propriétés spectroscopiques intrinsèques des composés à tester ou par des facteurs non spectroscopiques liés à l'utilisation de la ThT (compétition entre la ThT et les composés testés). Dans la suite de ce projet, les biais de fluorescence seront pris en considération par une étude des propriétés spectroscopiques des composés testés.

II CRIBLAGE D'UNE CHIMIOTHEQUE D'AURONES

Les aurones présentent des propriétés structurales adéquates pour l'interaction avec les feuillets β des fibres amyloïdes. En effet, ces molécules sont planes et possèdent un caractère hydrophobe associé à leur aromaticité. Comme décrit précédemment (**Chapitre 1.III.3**), ce potentiel a été mis en avant par les travaux d'Ono *et coll.* montrant que des aurones possédant en particulier une fonction amine en position 4' sont capables de se lier aux fibres du peptide A β *in vitro*.^{154-155, 157} La présence de fonctions hydroxyles sur le squelette des aurones pourrait être favorable à leur interaction avec les fibres, de nombreux polyphénols ayant montré des propriétés inhibitrices sur la formation des fibres amyloïdes de tau et d'A β .^{93, 116, 118-119}

Dans cette partie, une série d'aurones et une série de dérivés d'aurones hydroxylés ou non, synthétisées au cours des dernières années au sein de l'équipe MedChem (Département de Pharmacochimie Moléculaire), ont été criblées sur les modèles de fibres AcPHF6 et R3 développés précédemment (**Chapitre 2.I**). Ce criblage a été effectué dans des microplaques en polypropylène en utilisant la ThT comme sonde fluorescente. Cette technique facile à mettre en œuvre pour évaluer l'effet de composés sur la fibrillation peut cependant conduire à des biais dus à l'interférence de la ThT et des composés à tester, comme illustré auparavant (**Chapitre 2.I.2.1**). C'est pourquoi, les propriétés d'absorption et de fluorescence des composés testés seront discutées dans un second temps.

II.1 Criblage à la thioflavine T

Les aurones étudiées lors de ce premier criblage sont réparties en deux catégories : une première série constituée d'aurones possédant différents substituants sur les cycles A et B (**Table 2.II.1**) et une deuxième série de dérivés d'aurones possédant un motif indolyte à la place du cycle B (**Table 2.II.2**). Parmi les deux séries d'aurones testées dans ce projet, plusieurs aurones ont déjà été valorisées à travers différentes études, notamment pour leurs propriétés anti-virales sur le virus de l'hépatite C ou leur diversité d'action sur la tyrosinase.^{145, 148, 190} Le criblage réalisé dans ce projet a parfois nécessité de synthétiser à nouveau certaines aurones et de finaliser leur caractérisation. Les aurones sélectionnées portent pour la plupart un à plusieurs groupements hydroxyles afin d'évaluer la contribution de ces substituants sur l'activité, mais d'autres aurones moins polaires portant des substituants méthoxyles ont également été criblées. Les résultats du criblage sur les modèles AcPHF6

et R3 sont reportés dans les **tables 2.II.1** et **2.II.2**. Les aurones ont été testées à des concentrations de 100, 10 et 1 μM pour une concentration de 100 μM de peptide (AcPHF6 ou R3). La plupart des aurones testées à 100 μM présentent une inhibition de fluorescence de la ThT très forte. Dans les **tables 2.II.1** et **2.II.2** ne sont donc présentées que les activités des aurones à une concentration de 10 et 1 μM . La valeur indiquée dans les **tables 2.II.1** et **2.II.2** représente l'inhibition de fluorescence moyenne de la ThT observée au maximum de fluorescence pour chaque composé testé en triplicata (**Figure 2.II.1**). L'incertitude associée à chaque valeur d'inhibition correspond au ratio des écart-types du test sur le maximum de fluorescence observé. Certains composés présentant une inhibition de fluorescence faible, c'est-à-dire inférieure à 20 % à 10 μM , n'ont pas été testés à 1 μM . De même, des composés ayant une activité faible (inférieure à 20 %) à 1 μM sur le modèle AcPHF6 n'ont pas été criblés sur le modèle R3. En effet, les aurones criblées présentent une inhibition de fluorescence plus importante sur le modèle AcPHF6 que sur le modèle R3. Ce phénomène pourrait être associé à la plus grande complexité du modèle R3, celui-ci formant des fibres plus denses et moins accessibles aux aurones que celles du modèle AcPHF6.

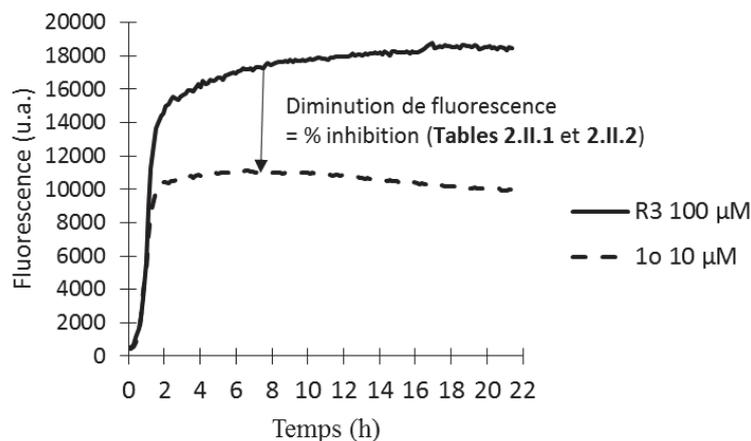
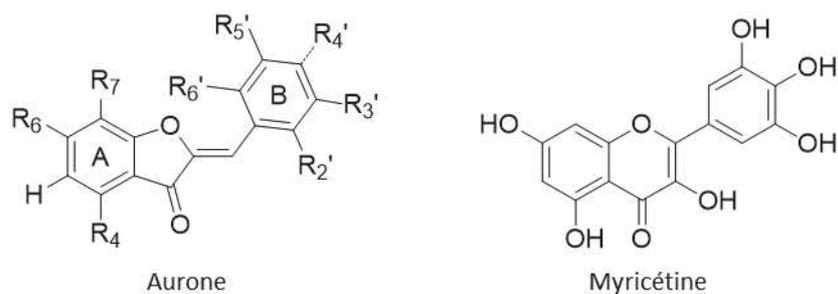


Figure 2.II.1. Diminution de fluorescence observée pour le peptide R3 à 100 μM en présence et en absence de l'aurone **1o** 10 μM .

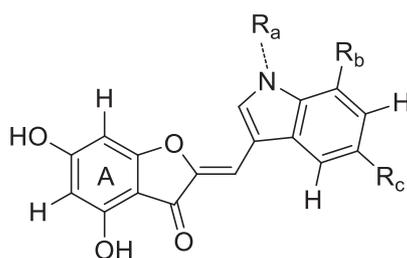
Table 2.II.1. Aurones polysubstituées et myricétine. n.d. non déterminé.



Aurone*	R ₄	R ₆	R ₇	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆ '	AcPHF6 (% inhibition)		R3 (% inhibition)	
									10 μM	1 μM	10 μM	1 μM
1a ¹⁹¹	OMe	OMe	H	H	H	tBu	H	H	45 ± 9	0	0	n.d.
1b ¹⁹¹	OMe	OMe	H	Me	H	Me	H	H	0	n.d.	n.d.	n.d.
1c ¹⁹¹	OMe	OMe	H	F	H	H	H	H	7 ± 4	n.d.	n.d.	n.d.
1d	OMe	OMe	H	H	H		H	H	42 ± 6	9 ± 4	n.d.	n.d.
1e	OMe	OMe	H	H	H		H	H	0	n.d.	n.d.	n.d.
1f	OH	OH	H	SO ₃ H	H	SO ₃ H	H	H	42 ± 2	14 ± 6	11 ± 12	n.d.
1g ¹⁹¹	OH	OH	H	OMe	H	OMe	H	H	69 ± 11	31 ± 5	22 ± 4	17 ± 7
1h ¹⁹¹	OH	OH	H	Cl	H	H	H	Cl	41 ± 13	4 ± 4	n.d.	n.d.
1i ¹⁹¹	H	H	OH	H	H	H	H	H	58 ± 3	29 ± 5	0	n.d.
1j ¹⁹¹	H	H	OH	H	H	Cl	H	H	45 ± 14	9 ± 5	19 ± 4	n.d.
1k ¹⁹¹	H	H	OH	H	H	F	H	H	26 ± 7	0	10 ± 2	n.d.
1l ¹⁹¹	H	H	OH	H	H	COOH	H	H	40 ± 9	18 ± 10	20 ± 16	n.d.
1m ¹⁹¹	H	H	OH	H	H	OMe	H	H	38 ± 3	0	14 ± 7	n.d.
1n ¹⁹¹	H	H	OH	OH	H	OMe	H	H	64 ± 7	5 ± 5	3 ± 14	n.d.
1o	H	H	OH	OH	H	OH	H	H	80 ± 2	14 ± 6	41 ± 6	16 ± 11
1p ¹⁹¹	H	H	OH	H	OH	H	H	H	71 ± 3	21 ± 6	0	n.d.
1q ¹⁹¹	H	H	OH	OH	H	H	H	H	62 ± 7	2 ± 10	7 ± 6	n.d.
1r ¹⁹¹	H	H	OH	OH	OH	H	H	H	84 ± 8	54 ± 4	54 ± 7	10 ± 4
1s ¹⁹⁰	H	OH	H	H	H	OH	H	H	27 ± 6	12 ± 7	n.d.	n.d.
1t ¹⁹⁰	H	OH	H	OH	H	H	H	H	20 ± 4	10 ± 4	n.d.	n.d.
1u ¹⁹⁰	H	OH	H	H	OH	H	H	H	26 ± 4	6 ± 3	n.d.	n.d.
1v ¹⁹⁰	OH	H	H	H	OH	H	H	H	85 ± 9	45 ± 2	60 ± 6	21 ± 14
1w ¹⁴⁸	OH	H	H	H	OH	OH	H	H	88 ± 4	42 ± 6	73 ± 5	28 ± 12
Myricétine									75 ± 3	37 ± 10	42 ± 19	n.d.

*références des articles dans laquelle apparaissent les aurones déjà publiées

Table 2.II.2. Dérivés d'aurones avec un motif indolyle. n.d. non déterminé.



Aurone	R _a	R _b	R _c	AcPHF6 (% inhibition)		R3 (% inhibition)	
				10 μM	1 μM	10 μM	1 μM
2a ¹⁹¹	---CH ₂ -CH=CH ₂	H	H	64 ± 2	50 ± 4	37 ± 3	0
2b ¹⁴⁵	---CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂	H	H	76 ± 7	24 ± 6	31 ± 8	0
2c ¹⁴⁵	---CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	H	H	78 ± 9	27 ± 2	43 ± 12	6 ± 14
2d ¹⁴⁵		H	H	54 ± 5	45 ± 8	0	n.d.
2e ¹⁴⁵		H	H	71 ± 6	15 ± 14	38 ± 4	27 ± 7
2f ¹⁴⁵		H	H	61 ± 11	11 ± 4	20 ± 12	n.d.
2g ¹⁴⁵		H	H	88 ± 3	24 ± 18	60 ± 15	19 ± 15
2h ¹⁴⁵		H	H	69 ± 2	33 ± 4	23 ± 2	n.d.
2i ¹⁹¹		H	H	12 ± 3	n.d.	n.d.	n.d.
2j ¹⁴⁵		H	H	78 ± 12	37 ± 2	32 ± 16	0
2k ¹⁴⁵	---(CH ₂) ₃ -CO ₂ H	H	H	76 ± 8	33 ± 8	50 ± 6	4 ± 7
2l ¹⁴⁵	---(CH ₂) ₃ -CH ₃	Me	H	61 ± 3	44 ± 11	41 ± 9	17 ± 5
2m ¹⁴⁵	---(CH ₂) ₃ -CH ₃	OMe	H	91 ± 2	56 ± 9	26 ± 6	41 ± 13
2n ¹⁴⁵	---(CH ₂) ₃ -CH ₃	H	OMe	74 ± 4	31 ± 3	26 ± 6	27 ± 9
2o ¹⁴⁵	---(CH ₂) ₃ -CH ₃	H	OH	74 ± 8	38 ± 7	54 ± 3	30 ± 3

L'étude des aurones possédant un motif benzylidène (**Table 2.II.1**) montre en premier lieu que les composés moins polaires **1a-1e** ne présentent aucune ou une très faible activité sur le modèle AcPHF6. A l'instar de l'aurone **1g**, cette activité se voit généralement augmentée en présence de groupements hydroxyles. Similairement, la présence d'une fonction hydroxyle pour **1o** au lieu d'une fonction méthoxyle pour **1n** contribue positivement à l'activité de l'aurone. Généralement, la

contribution d'autres groupements tels que les halogènes (**1j** et **1k**), les acides carboxyliques (**1l**) ou sulfoniques (**1f**) est inférieure à celle des fonctions hydroxyles. Plus complexe à analyser, l'influence des groupements hydroxyles semble varier en fonction non seulement du nombre, mais aussi de la position de ceux-ci. En effet, la comparaison des aurones **1i**, **1p** et **1v** avec les aurones **1s-1u** montrent que l'activité est plus importante lorsqu'un groupement hydroxyle est en position 4 ou 7 sur le cycle A plutôt qu'en position 6. En particulier, la position 4 du cycle A apporte une contribution significative à l'activité (**1v** et **1w**), aussi bien sur le modèle AcPHF6 que sur le modèle R3. Plus généralement, l'activité est notablement augmentée par le nombre de fonctions hydroxylées présentes sur l'aurone, comme en attestent les composés **1o**, **1r** et **1w**.

Il est à noter que la présence d'un groupement hydroxyle sur les positions 4 et 6 du cycle A (motif résorcinol) semble généralement apporter une bonne activité (**1f-1h** et **2a-2o**). Ce motif particulier se retrouve très fréquemment dans les aurones présentes dans la nature et semble être un élément essentiel de la bioactivité des aurones.¹⁹²⁻¹⁹³ La seconde série de composés testés est constituée de dérivés d'aurones possédant ce motif résorcinol sur le cycle A ainsi qu'un motif indolyle comme cycle B (**Table 2.II.2**). Ces dérivés synthétisés antérieurement dans l'équipe MedChem (Département de Pharmacochimie Moléculaire) ont été testés afin d'évaluer notamment l'influence de l'extension de la planarité de la molécule. Ces composés présentent une bonne inhibition de fluorescence (60 % à 90 %) sur le modèle AcPHF6 à 10 μ M, à l'exception de **2i** (12 %). Dans cette série également, une contribution positive des groupements hydroxyles est observée. En effet, les dérivés d'aurones **2g** et **2o** possédant une fonction hydroxyle supplémentaire présentent la meilleure inhibition de fluorescence à 10 μ M sur le modèle R3 (60 % et 54 %, respectivement). L'activité moyenne des aurones présentes dans ce tableau semblerait donc être apportée davantage par la présence du motif résorcinol du cycle A qu'aux variations structurales du cycle indolique.

Ce motif résorcinol est retrouvé chez la myricétine qui a une activité importante sur la fibrillation de la protéine tau ainsi que sur les modèles AcPHF6 et R3 (**Chapitres 2.I.1** et **2.I.2.3**). Il est important de noter que la myricétine (**Table 2.II.1**) affiche cependant une activité moindre que plusieurs aurones évaluées dans ce criblage. Elle présente une inhibition de fluorescence de 75 % sur le modèle AcPHF6 et 42 % sur le modèle R3 à 10 μ M, alors que les aurones polyhydroxylées **1o**, **1r**, **1v** et **1w** ainsi que les dérivés d'aurones polyhydroxylées **2g** et **2o** présentent une activité similaire ou supérieure. Le squelette aurone semble donc contribuer à l'inhibition de fluorescence observée. Ceci a été de surcroît illustré par l'évaluation de l'équivalent flavone de l'aurone **2l** qui n'a montré aucune inhibition de fluorescence (0 % à 10 μ M) sur le modèle AcPHF6, alors que l'aurone **2l** correspondante présente une inhibition d'environ 60 %. Ceci valide l'intérêt porté à cette catégorie de flavonoïdes dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'agrégation de fibres amyloïdes.

A l'issue de ce criblage, il apparaît donc important pour améliorer l'activité des aurones de privilégier la synthèse de composés présentant un maximum de fonctions hydroxyles, ainsi que le motif résorcinol en position 4 et 6 sur le cycle A. Cependant, avant d'entreprendre la synthèse de ces nouveaux composés polyhydroxylés, il a été primordial de vérifier que les résultats obtenus lors de ce premier criblage basé sur les tests à la ThT ne sont pas biaisés par les propriétés spectroscopiques des aurones testées.

II.2 Propriétés spectroscopiques des aurones

Comme illustré dans la littérature^{39,181} et également lors de la validation des modèles AcPHF6 et R3 (**Chapitres 2.I.1 et 2.I.2.3**), les tests de fluorescence à la ThT peuvent être partiellement biaisés par les propriétés spectroscopiques des composés testés, à l'image de la curcumine. Cet aspect a donc été étudié ici pour plusieurs des aurones testées précédemment.

II.2.1 Absorption des aurones

L'absorption UV-visible propre aux composés testés est un élément important à considérer lors des tests à la ThT. En effet, si ces composés absorbent aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la ThT, ils peuvent alors avoir un effet de filtre interne résultant en une inhibition voire une extinction complète de la fluorescence. De même, des composés qui absorbent à la longueur d'onde de lecture de l'étude (480 nm) peuvent partiellement absorber la lumière émise par la ThT, ce qui résulte également en une diminution de la fluorescence observée. L'absorption de ces composés peut ainsi être responsable de la présence de faux-positifs dans les tests en plaques à la ThT car la diminution de fluorescence alors observée n'est pas uniquement le résultat d'une interaction entre le composé évalué et les fibres amyloïdes.

L'absorption de quelques aurones issues du premier criblage à la ThT a été étudiée à 10 μ M dans le tampon phosphate utilisé pour les tests à la ThT (**Figure 2.II.2**). Parmi les aurones sélectionnées, certaines présentent une forte inhibition de fluorescence (aurones **1v** et **2h**) dans les tests de fluorescence en plaques, alors que d'autres sont peu ou pas actives (aurones **1c**, **1u** et **2i**). Les aurones étudiées ici ont à une concentration de 10 μ M une absorbance non négligeable d'environ 0,2 à 440 nm (excitation de la ThT), à l'exception de **1c** (aucune absorbance), et une absorbance généralement plus faible à 480 nm (émission de la ThT). Cette étude montre néanmoins qu'il n'y a pas

de corrélation directe entre l'intensité de l'absorbance à 440 nm et 480 nm et l'intensité de l'inhibition observée dans les tests à la ThT. Les aurones **1v** et **2h** qui montrent une activité inhibitrice importante dans les tests à la ThT ont une absorbance similaire à 440 nm aux aurones très peu actives **1u** et **2i** à 440 nm. De même, l'aurone **2i** très peu active est celle qui présente l'absorption la plus importante à la fois à 440 nm comme à 480 nm. De plus, il est important de noter qu'à une concentration de 1 μM , concentration également utilisée lors des tests à la ThT, l'absorbance des aurones devient négligeable à 440 nm comme à 480 nm. En conséquence, la présence de faux-positifs dans le premier criblage effectué est peu probable dans les gammes de concentrations étudiées car l'absorption est généralement faible à 10 μM et négligeable à 1 μM . Ceci n'exclut pas que les valeurs d'inhibition obtenues puissent être légèrement surestimées par ce biais.

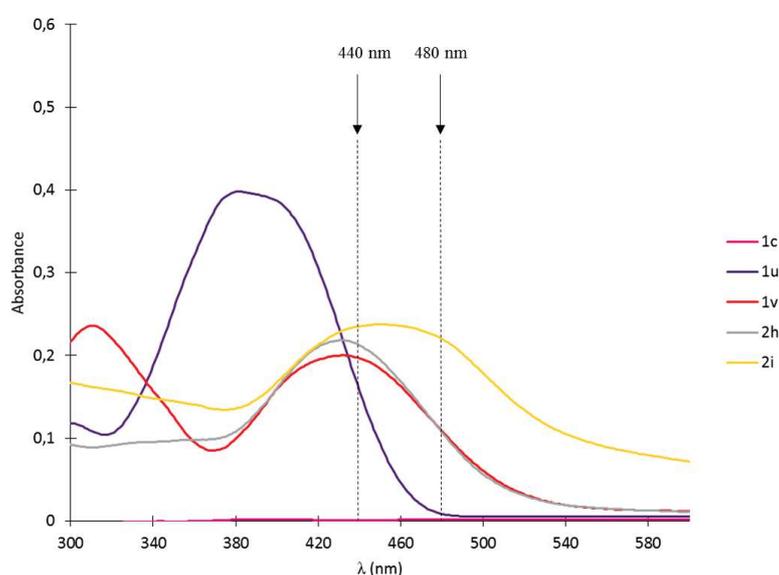


Figure 2.II.2. Absorption des aurones à 10 μM dans le tampon phosphate 50 mM.

II.2.2 Fluorescence des aurones

Un autre paramètre à prendre en compte dans les tests à la ThT est la fluorescence des composés évalués à 480 nm (longueur d'onde de lecture du test) lorsque ceux-ci sont excités à 440 nm (longueur d'onde d'excitation de la ThT). L'émission propre aux aurones est prise en compte dans les puits de contrôle pour les tests de fluorescence en plaque. Ces derniers contiennent uniquement l'aurone à tester et la ThT dans les conditions de fibrillation mais sans peptide.

En revanche, l'émission des aurones en présence de fibres ne peut pas être prise en compte dans les puits de contrôle, alors qu'un changement important de l'intensité de fluorescence des

aurones en présence de fibres pourrait biaiser le test. Cette fluorescence s'ajouterait à celle de la ThT et pourrait conduire à de faux négatifs. Pour apprécier ce biais, la fluorescence des aurones en présence de fibres préformées du modèle AcPHF6 a été enregistrée.

Un autre biais dans les tests à la ThT est la possible compétition de liaison aux fibres entre les composés à tester et la sonde elle-même. Ce phénomène résulte également en une diminution de la fluorescence dans les tests sans pour autant que cela traduise une inhibition de la formation des fibres. L'enregistrement de la fluorescence de la ThT incorporée dans des fibres après ajout des aurones est un moyen d'évaluer cette compétition.

Afin d'estimer ces différents biais, la fluorescence de plusieurs aurones à 480 nm après excitation à 440 nm (10 μ M) a été enregistrée en présence et en absence de fibres préformées d'AcPHF6 (100 μ M) préalablement incubées avec ou sans ThT (10 μ M). Des aurones peu (**1c**, **1u** et **2i**) ou très actives (**1v** et **2h**) ont ainsi été étudiées à une concentration de 10 μ M. Il est à noter que la fluorescence émise par les fibres d'AcPHF6 en absence de ThT est généralement très faible.

L'aurone **1c** a une activité très faible sur le modèle AcPHF6 avec 7 % d'inhibition de fluorescence à 10 μ M dans le test en plaque. De plus, elle ne présente aucune absorption (**Figure 2.II.1**) ou fluorescence (**Figure 2.II.3**) notables à cette concentration d'étude. La fluorescence de cette aurone est peu modifiée en présence de fibres. Par ailleurs, une faible diminution de la fluorescence de la ThT a été observée lors de l'ajout de cette aurone aux fibres d'AcPHF6 préformées en présence de ThT. Ces données confirment que l'aurone **1c** interagit faiblement avec les fibres, ce qui est en adéquation avec le test en plaque.

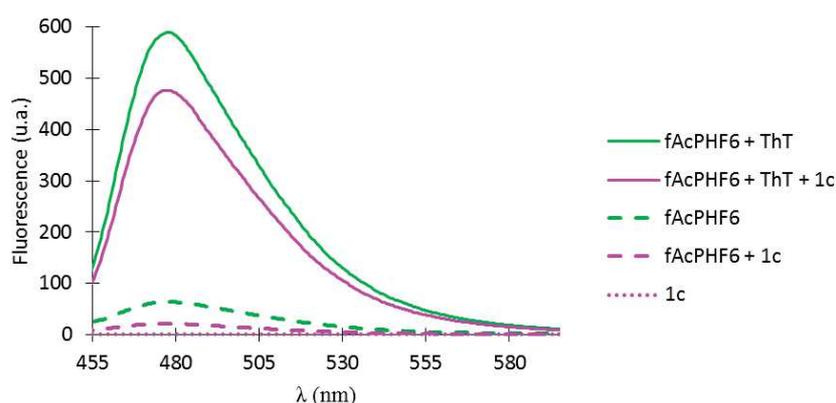


Figure 2.II.3. Fluorescence de l'aurone **1c** seule (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

L'aurone **1u** a également une activité faible sur le modèle AcPHF6 avec 26 % d'inhibition de fluorescence à 10 μ M dans le test en plaque. Contrairement au cas précédent, cette aurone absorbe

modérément à 440 nm (absorbance de 0,16, **Figure 2.II.2**), mais émet très fortement (fluorescence de 230 u.a. à 480 nm, **Figure 2.II.4**) à cette concentration d'étude. Cependant, cette forte fluorescence est prise en compte dans les puits de contrôle du test en plaque et n'est pas modifiée en présence de fibres. De plus, la différence notable observée entre l'intensité de fluorescence pour les fibres du modèle avec ThT en présence et en absence du composé **1u** avoisine la valeur de l'émission de l'aurone seule, ce qui confirme la faible activité de cette aurone. Il est à noter que les aurones **1s** et **1t**, isomères de position de **1u** comportant une fonction hydroxyle sur la position 6 du cycle A, possèdent les mêmes propriétés spectroscopiques, ce qui suggère que la forte fluorescence de ces composés est associée à la présence d'un substituant hydroxyle en position 6.

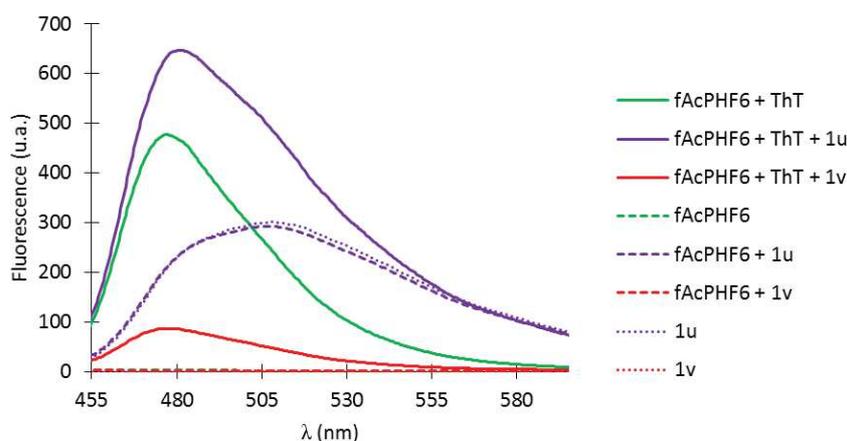


Figure 2.II.4. Fluorescence des aurones **1u** (violet) et **1v** (rouge) seules (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

L'aurone **1v** possède une fonction hydroxyle en position 4 du cycle A et est très active sur le modèle AcPHF6 avec 85 % d'inhibition de fluorescence à 10 μ M sur le test en plaque. Si l'aurone **1v** absorbe similairement à son isomère **1u** (absorbance de 0,20 à 440 nm, 0,11 à 480 nm, **Figure 2.II.2**), elle ne fluoresce pas seule ou en présence de fibres (**Figure 2.II.4**) et ne biaise donc pas la fluorescence observée dans le test en plaque. Après ajout de l'aurone **1v** sur les fibres en présence de ThT, le spectre d'émission présente une forte diminution en intensité, ce qui montre que l'aurone **1v** interagit fortement avec les fibres. Si cette interaction suggère une compétition avec la ThT, elle n'exclut pas que l'aurone **1v** puisse avoir un effet inhibiteur de la fibrillation.

A l'image du composé **1v**, l'aurone **2h** présente une forte activité sur le modèle AcPHF6 avec 69 % d'inhibition de fluorescence à 10 μ M, des propriétés d'absorbance identiques (0,21 à 440 nm, 0,11 à 480 nm, **Figure 2.II.2**) et fluoresce aussi faiblement à 480 nm seule et en présence de fibres (**Figure 2.II.5**), ce qui montre une absence de biais dans le test en plaque et suggère un comportement similaire pour les composés **1v** et **2h**. Enfin, l'aurone **2i** comportant un substituant méthoxyle en plus

par rapport à **2h** présente une activité faible sur le modèle AcPHF6 avec 12 % d'inhibition de fluorescence à 10 μ M. Ceci est corroboré par les études spectroscopiques où le composé **2i** ne diminue que très peu la fluorescence lorsqu'il est incorporé aux fibres en présence de ThT (**Figure 2.II.5**) et confirmé par une absence de biais pour cette aurone, celle-ci ne n'étant que faiblement fluorescente seule et en présence de fibres. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les aurones **2h** et **2i** présentent des propriétés spectroscopiques similaires, notamment une faible fluorescence intrinsèque et une absorbance modérée à 440 nm (absorbance de 0,24 et 0,22, respectivement, **Figure 2.II.2**). Ces données suggèrent qu'à une valeur d'absorbance proche de 0,20, l'absorption des aurones testées a peu d'influence sur leur activité, l'aurone **2h** étant active alors que l'aurone **2i** est peu active.

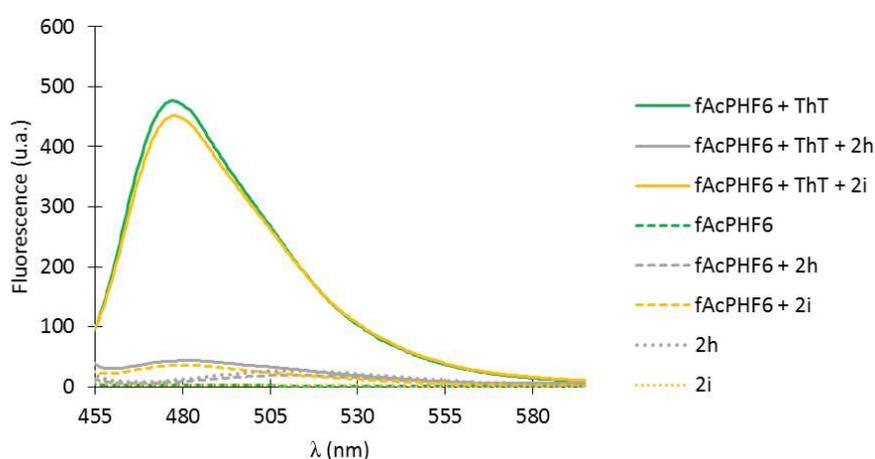


Figure 2.II.5. Fluorescence des aurones **2h** (gris) et **2i** (jaune) seules (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

Ces études permettent de conclure que dans les gammes de concentrations utilisées lors de ce premier criblage, les biais dus aux propriétés d'absorbance et de fluorescence des aurones sont très faibles. En particulier, si l'intensité de fluorescence des aurones en présence de fibres est souvent légèrement augmentée, cette augmentation reste négligeable par rapport à l'intensité de la ThT liée dans le test (500 à 600 u.a.). En revanche, cela souligne la nécessité d'effectuer ce type d'études de manière systématique à des concentrations d'aurone supérieures à 10 μ M.

Par ailleurs, l'ajout d'aurones aux fibres du modèle AcPHF6 préalablement incubées en présence de ThT suggère que, à l'image des composés **1v** et **2h**, certaines aurones sont capables de déplacer la ThT. Ceci n'exclut pas un effet inhibiteur de la fibrillation lors du test à la ThT. En outre, l'ajout des aurones sur les fibres préformées est immédiatement suivi d'une diminution de fluorescence, puis d'un plateau pendant plusieurs heures, ce qui suggère que ces composés ne possèdent pas d'activité de désagrégation des fibres.

En conclusion, le développement de modèles des fibres de tau a permis le criblage d'une quarantaine d'aurones ou de dérivés d'aurones. A l'issue de ce criblage, il est apparu important de synthétiser des nouvelles aurones comportant un maximum de fonctions hydroxyles sur leur squelette, celles-ci étant associées à une plus grande activité. La synthèse de ces aurones a été principalement axée sur une série comportant un motif résorcinol en position 4 et 6 sur le cycle A, motif fréquemment retrouvé dans les aurones naturelles et qui présente généralement une bonne activité dans les tests de fluorescence. Dans un second temps, l'évaluation des aurones sur les modèles a été réalisée à travers des études de fluorescence similaires à celles effectuées pour ce premier criblage. D'autres techniques complémentaires comme le CD et l'AFM ont également été utilisées pour mieux caractériser l'interaction des aurones avec les fibres.

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3 : Synthèse et évaluation d'aurones polyhydroxylées et fonctionnalisées

La première partie de ce chapitre dresse un état de l'art actuel sur les voies de biosynthèse et de synthèse chimique des aurones, avant de décrire dans un second temps les synthèses effectuées au cours de ce projet. Ces dernières s'orientent selon deux axes : la synthèse d'une série d'aurones polyhydroxylées suivie d'une partie exploratoire sur la fonctionnalisation des aurones. La dernière partie de ce chapitre porte sur l'évaluation *in vitro* de ces aurones en utilisant les modèles des fibres de tau et les techniques développées dans le chapitre précédent.

I ETAT DE L'ART SUR LA BIOSYNTHESE ET LA SYNTHESE CHIMIQUE DES AURONES

Les aurones font partie avec les chalcones (**Figure 3.1.1**) d'une classe de flavonoïdes appelée « pigments anthochlores » et sont responsables de la pigmentation jaune de fleurs, que l'on retrouve notamment dans la famille des Asteracées (dahlia, coréopsis) ou encore chez *Antirrhinum majus* (muflier).¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ A l'orée du XXI^{ème} siècle, seules quelques dizaines d'exemples d'aurones naturelles ont été décrites dans la littérature, la plupart sous forme hydroxylée ou glycosylée. Le mécanisme de biosynthèse des aurones au sein des plantes est toujours incertain à l'heure actuelle. Au cours des dernières années cependant, de nombreux travaux ont permis d'élucider une partie des éléments du mécanisme de biosynthèse de ces aurones. En parallèle, les chimistes ont développé plusieurs méthodes de synthèse des aurones permettant leur utilisation dans un nombre croissant d'applications thérapeutiques.¹³⁰⁻¹³⁵ Ces méthodes synthétiques sont parfois inspirées des éléments connus de la biosynthèse des aurones, certaines se basant notamment sur les substrats utilisés par les aurones synthases (AS), nom générique donné pour les enzymes catalysant la formation d'aurones.

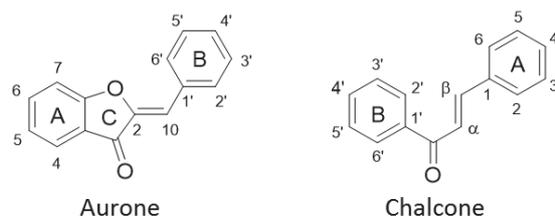


Figure 3.1.1. Structure et nomenclature des aurones et des chalcones.

I.1 Biosynthèse des aurones

Les connaissances sur la biosynthèse des aurones sont limitées jusqu'au début des années 2000 et la caractérisation d'une AS décrite par Nakayama *et al.* chez *A. majus*.¹³⁷ Suite à ces premiers travaux, d'autres études ont permis d'élucider partiellement le mécanisme de formation des aurones dans plusieurs espèces végétales. A l'heure actuelle, deux voies de biosynthèse des aurones ont ainsi été illustrées : une voie « PPO » basée sur des enzymes présentant un comportement similaire aux polyphénols oxydases (PPO), menant en particulier à la formation de l'auréusidine, la bractéatine ou la sulfurétine, ainsi qu'une voie « PRX » suivant un mécanisme radicalaire à l'image de la formation de l'hispidol (**Schéma 3.1.1**).

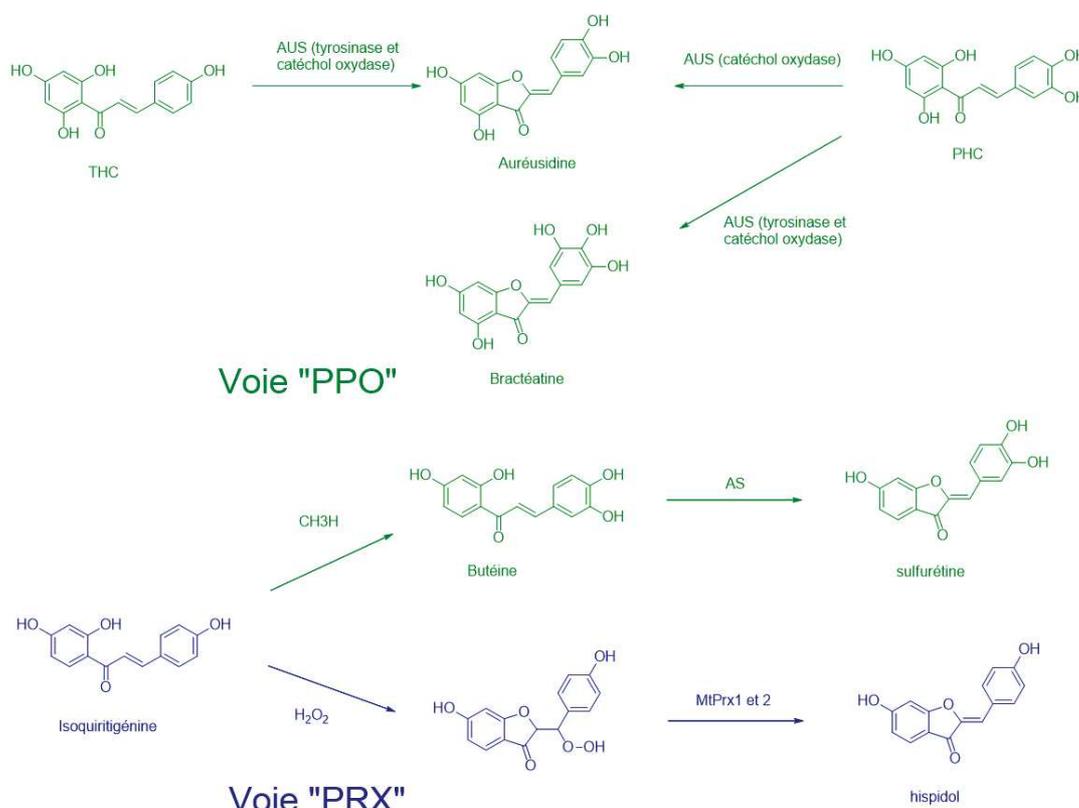


Schéma 3.1.1. Biosynthèse d'aurones par voie « PPO » (vert) pour l'auréusidine, la bractéatine et la sulfurétine, par voie « PRX » (bleu) pour l'hispidol.

I.1.1 Voie « PPO »

Selon les premiers travaux de Nakayama *et al.*,¹³⁷ les aurones sont formées spécifiquement à partir de chalcones par l'intermédiaire d'une aurone synthase appelée alors auréusidine synthase (AUS). Cette glycoprotéine contient un centre binucléaire de cuivre et présente une forte homologie avec les polyphénols oxydase (PPOs). Ces dernières sont omniprésentes chez les plantes supérieures et ont pour la plupart une activité catéchol oxydase (conversion d'*ortho*-diphénols en *ortho*-quinones), bien que certaines présentent également une activité tyrosinase (conversion de monophénols en *ortho*-diphénols). A l'image des PPOs, les aurones synthases (AS) ont une activité catéchol oxydase et peuvent également avoir une activité tyrosinase. L'origine de cette activité tyrosinase retrouvée chez certaines aurones synthases (AS) fait encore débat, mais il semble que dans la plupart des plantes, la conversion *in vivo* s'effectue par l'intermédiaire des cytochromes P450.

Nakayama *et al.* montrent qu'au sein de *A. majus*, l'AUS catalyse la transformation de deux chalcones - la 2',4',6',4-tétrahydroxychalcone (THC) et la 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone (PHC) - en deux aurones - l'auréusidine et la bractéatine - formant une *ortho*-quinone intermédiaire suivie par une cyclisation oxydante non-enzymatique (**schéma 3.1.2**).¹³⁷ Dans le cas de la THC, l'auréusidine est formée suite aux activités tyrosinase et catéchol oxydase de l'AUS. La PHC est également convertie en auréusidine par l'activité catéchol oxydase, mais aussi en bractéatine de manière minoritaire, ce que les auteurs associent au fait que l'AUS est capable d'introduire un groupement hydroxyle sur la position 5 de la PHC.

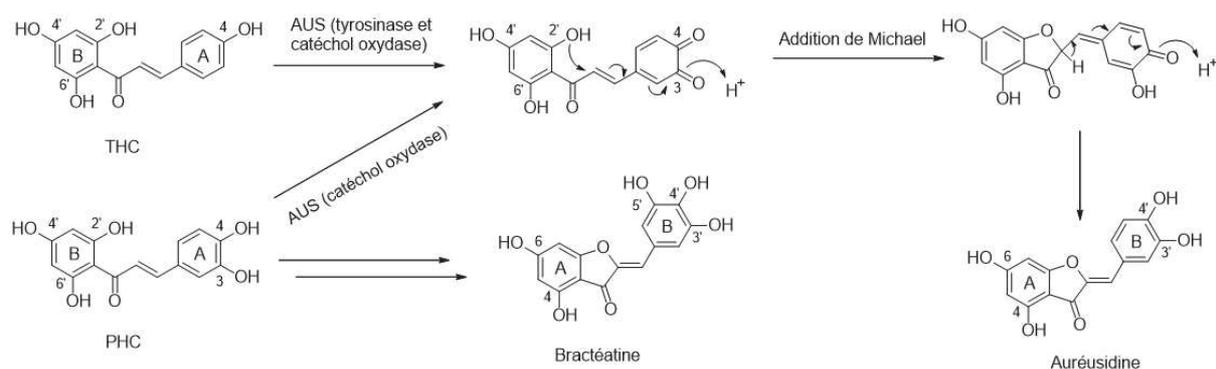


Schéma 3.1.2. Mécanisme de biosynthèse de l'auréusidine à partir de la THC et de la PHC via l'auréusidine synthase (AUS) par voie « PPO ».

Bien que la nature des substrats des AS soit toujours imprécise, les réactions catalysées par les AS sont hautement spécifiques. A cet effet, Nakayama *et al.* montrent que l'AUS présente chez *A. majus* est incapable d'oxyder divers composés monophénolés et *ortho*-diphénolés tels que la tyrosine, l'acide *para*-coumarique, l'acide caféique ou l'auréusidine.¹³⁷ De même, l'AUS ne permet pas

l'hydroxylation en 5' de l'auréusidine pour former la bractéatine. L'AUS catalyse donc spécifiquement la formation d'aurones à partir de chalcones hydroxylées en position 2' et 4. Les aurones présentes dans la nature sont d'ailleurs fréquemment hydroxylées en position 3',4' et 3',4',5', à l'image de l'auréusidine, la bractéatine, la sulfurétine ou encore la maritimétine.

Les premières études de Nakayama *et coll.* n'ont pas permis d'établir si le substrat de l'AUS était la chalcone sous sa forme glycosylée ou aglycone. Une étude ultérieure a montré que l'expression seule du gène AmAS1 de l'AUS ne permet pas la conversion de chalcone en aurone.¹⁹⁷ La biosynthèse des aurones requiert la co-expression du gène AmAS1 et du gène 4'CGT de la chalcone 4'-O-glycosyltransférase localisée dans le cytoplasme. La chalcone 4'-O-glycosylée est transportée dans les vacuoles des cellules où l'AUS permet la cyclisation oxydante de la chalcone en aurone. Ainsi, il semble que le substrat naturel de l'AUS chez *A. majus* soit la forme glycosylée de la chalcone. De plus, contrairement aux PPOs généralement localisées dans les plastes (chloroplastes), l'AUS se situe dans les vacuoles.¹⁹⁸ Ceci constitue un mécanisme de biosynthèse unique parmi les flavonoïdes, où la modification du squelette carboné intervient généralement avant le transport dans les vacuoles.

Plus récemment, Miosic *et al.* rapportent chez *Bidens ferulifolia* la formation de 4-déoxyaurones à partir de 6'-déoxychalcones, composés ne possédant respectivement pas de substituant hydroxyle sur la position 4 de l'aurone et 6 de la chalcone (**Schéma 3.I.1**), par l'action de deux enzymes successives : une chalcone 3-hydroxylase (CH3H) et une aurone synthase (AS).¹⁹⁹ Chez *B. ferulifolia*, l'AS ne permet donc pas d'introduire de groupement hydroxyle et possède uniquement une activité de catéchol oxydase, ce qui diffère de l'AUS chez *A. majus*. De même, Kaintz *et al.* observent la formation de la sulfurétine chez *Coreopsis grandiflora* par l'action de deux enzymes successives.²⁰⁰ La 2',4',4-trihydroxychalcone (isoliquiritigénine) n'est pas convertie par l'AS en son aurone correspondante hydroxylée en position 4' et 6 (hispidol). L'isoquiritigénine est d'abord convertie en butéine par l'intermédiaire de CH3H. La butéine sert alors de substrat à l'AS pour former la sulfurétine chez *B. ferulifolia* et *C. grandiflora* (**Schéma 3.I.1**). Ainsi, bien que les AS présentent un mécanisme de type « PPO » similaire, la conversion de chalcones en 4-hydroxyaurones et 4-déoxyaurones dans ces deux systèmes diffère notablement. L'AS présente chez *C. grandiflora* possède une faible homologie de séquence avec l'AUS chez *A. majus* et est localisée dans les plastes, alors que l'AUS se trouve dans les vacuoles. En outre, l'étude de la biosynthèse de ces aurones permet de souligner l'importance des PPOs dans le métabolisme des plantes.²⁰¹

I.1.2 Voie « PRX »

D'autres aurones sont naturellement trouvées sans fonction hydroxylée ou avec une seule de ces fonctions sur le cycle B, à l'image de l'hispidol, et résultent donc d'une voie de biosynthèse différente que celles obtenues par voie « PPO ». En 1966, Wong décrit la conversion dans des semis de soja de l'isoliquiritigénine en hispidol *via* un intermédiaire 4',6-dihydroxy-2-(α -hydroxybenzyl)coumaranone (**Schéma 3.1.3**). Il postule alors que cet intermédiaire se forme suite à l'époxydation de la chalcone par le peroxyde d'hydrogène, catalysé par une peroxydase non caractérisée, suivi d'une déshydratation.²⁰²⁻²⁰³

En 2009, Farag *et al.* élucide le mécanisme de biosynthèse de l'hispidol dans des cultures cellulaires de *Medicago truncatula* (luzerne).²⁰⁴ Le précurseur isoliquiritigénine forme en premier lieu un radical sur la fonction hydroxylée en 4, comme en atteste l'absence de formation de l'hispidol au profit de produits secondaires lorsque la position 4 est méthoxylée. Après réarrangement, cet intermédiaire réagit avec le peroxyde d'hydrogène et subit ensuite une addition de type Michael intramoléculaire pour former une structure de type dioxétane. L'ouverture du dioxétane résulte en la formation d'un hydropéroxyde qui est ensuite clivé, puis subit une déshydratation pour former l'hispidol (**Schéma 3.1.3**). Cette étape de clivage est réalisée par les peroxydases MtPRX1 et MtPRX2 pour former l'intermédiaire 4',6-dihydroxy-2-(α -hydroxybenzyl)coumaranone, ce qui confirme l'hypothèse initiale de Wong.²⁰²⁻²⁰³

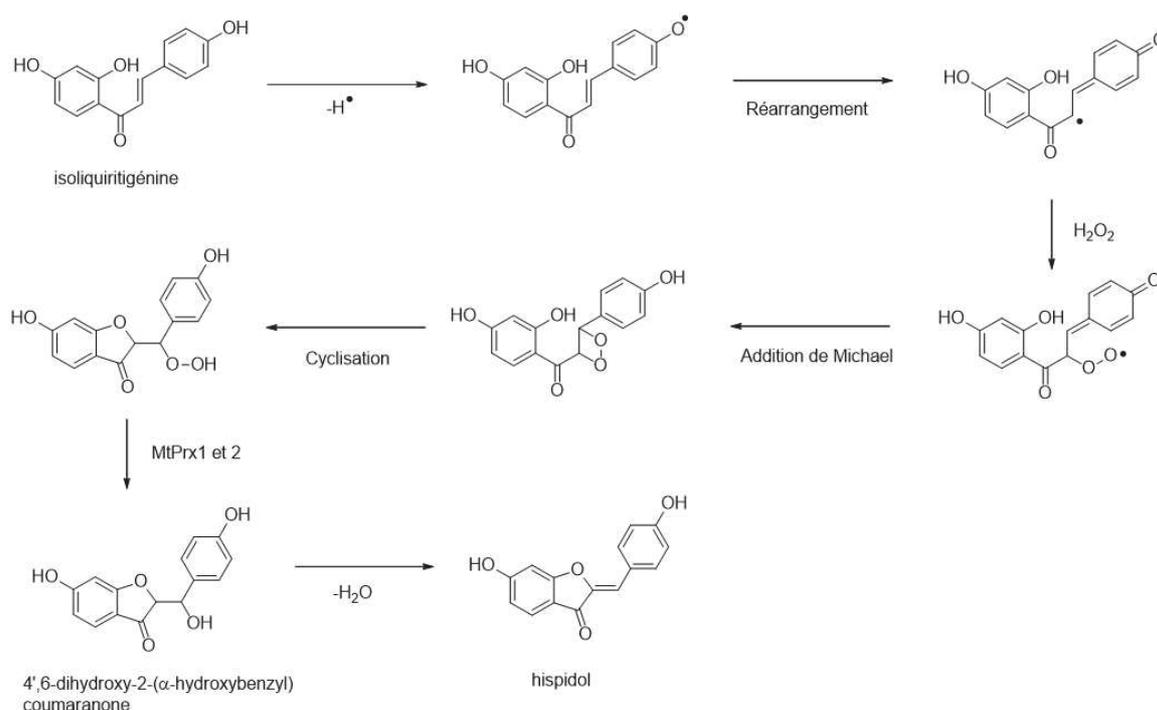
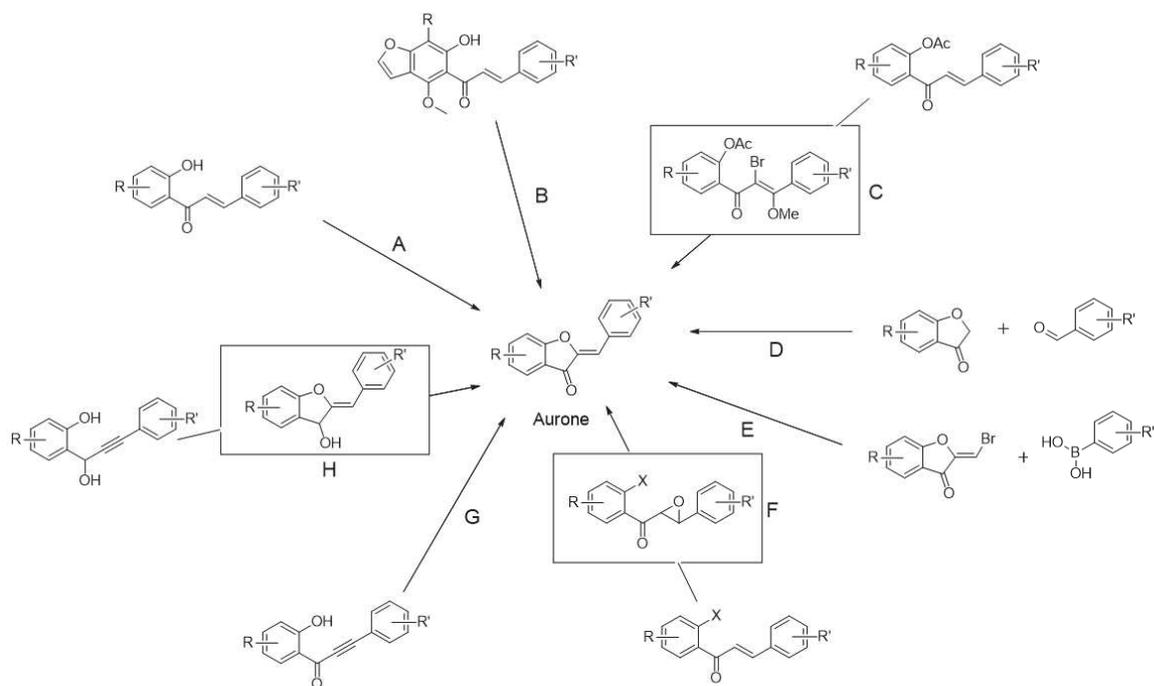


Schéma 3.1.3. Mécanisme de biosynthèse de l'hispidol par la voie « PRX » *via* un mécanisme radicalaire.

Malgré des similitudes entre les voies « PPO » et « PPX », les substrats de ces deux types d'enzymes diffèrent. A l'instar de l'AUS dans la voie « PPO », la présence de fonctions hydroxylées en position 2' (cycle B) et 4 (cycle A) est nécessaire pour la biosynthèse de l'isoliquiritigétine en hispidol dans la voie « PRX ». Cependant, l'absence de biosynthèse de l'hispidol chez *M. truncatula* par un mécanisme « PPO » montre que la formation d'un intermédiaire portant deux fonctions hydroxylées en 3' et 4' sur le cycle B de l'aurone est nécessaire dans cette première voie, ce qui n'est pas le cas de l'hispidol dans la voie « PRX ». De même, contrairement à la voie « PPO », l'expression du substrat THC chez *M. truncatula* ne mène pas à la biosynthèse d'auréusidine par la voie « PRX ». Ces deux voies permettent ainsi la formation d'aurones à partir de chalcones différentes au sein des plantes. En particulier, les PRXs présentes chez *M. truncatula* utilisent une chalcone aglycone, dont le clivage du glycoside résulte d'un stress oxydant, pour former l'hispidol qui possède des propriétés anti fongiques.

1.2 Synthèse chimique des aurones

Comparées aux autres flavonoïdes, les aurones sont peu abondantes dans les espèces végétales. L'obtention de ces composés par extraction et purification d'extraits naturels serait en conséquence une entreprise peu rentable. De plus, cette méthode se limiterait à la faible diversité structurale observée jusqu'ici pour les aurones naturelles, la majorité portant des groupements hydroxyles ou glycosyles en position 4 uniquement ou 4 et 6 sur le cycle A. C'est pourquoi plusieurs voies de synthèse chimique des aurones ont été développées au cours des dernières décennies (**Schéma 3.1.4**), ce qui a notamment permis d'élargir le panel de substituants sur les aurones et d'évaluer leurs effets à des fins thérapeutiques. S'inspirant de la synthèse naturelle d'aurones, la plupart des voies de synthèse chimique des aurones ont été réalisées à partir de chalcones (voies A, B, C et F, **Schéma 3.1.4**) ou de dérivés de chalcones (voies G et H, **Schéma 3.1.4**). D'autres voies ont été basées sur l'assemblage d'intermédiaires, tels que les benzofuranones avec des benzaldéhydes (voie D, **Schéma 3.1.4**) ou des dérivés de benzofuranones avec des acides phénylboroniques (voie E, **Schéma 3.1.4**). Dans cette partie, les voies de synthèse d'aurones formées à partir de chalcones ou de dérivés de chalcones seront exposées dans un premier temps, puis les voies de synthèse d'aurones à partir des benzofuranones et leurs dérivés seront décrites.



- | | | |
|--|--|--|
| <p>A. CuBr₂, DMSO (70-80 %)
OU
Hg(OAc)₂, AcOH ou Pyridine ou DMSO (28-87 %)
OU
Ti(NO₃)₃, HCl, MeOH (43-79 %)</p> | <p>D. HCl 37 %, AcOH
OU
KOH, MeOH (17-93 %)
OU
Al₂O₃, DCM (86-93 %)</p> | <p>G. NaOEt ou K₂CO₃, EtOH (54-79 %)
OU
AgNO₃, MeOH (85-95 %)
OU
Cs₂O₃, Acétone (78-99 %)
OU
PBU₃ 5 % mol, DCM (75-95 %)</p> |
| <p>B. NaOH 20 %, H₂O₂ 30 %, EtOH (78-87 %)</p> | <p>E. Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, 1,4-dioxane (80-85 %)</p> | |
| <p>C. 1) NBS, MeOH (56 %)
2) NaOH, MeOH (63 %)
OU
1) V₂O₅, H₂O₂, NH₄Br, DCM (70-83 %)
2) KOH, EtOH/H₂O (81-83 %)
OU
1) TBATB, CaCO₃, MeOH/DCM (75-85 %)
2) KOH, EtOH/H₂O (85-95 %)</p> | <p>F. 1) NaOH 10 %, H₂O₂ 30 %
MeOH (71-85 %)
2) CsCO₃, CuI (10 mol %)
1,10-phénantroline (20 mol %)
DMF (43-85 %)</p> | <p>H. 1) AuCl (10 mol %), K₂CO₃, MeCN (65-86 %)
2) MnO₂, DCM (64-99 %)</p> |

Schéma 3.1.4. Voies de synthèse chimique d'aurones par cyclisation oxydante de 2'-hydroxychalcones (voies A et B) ou de 2'-acétoxychalcone (voie C), par condensation de benzofuran-3(2H)-ones et de benzaldéhydes (voie D), par couplage Suzuki-Miyaura (voie E), par époxydation de 2'-halogénochalcones (voie F) et par cyclisation de dérivés d'o-alkynoylphénols (voies G et H).

I.2.1 Synthèse à partir de chalcones substituées en position 2'

En 1988, Sekizaki utilise l'acétate de mercure(II) dans l'acide acétique à reflux pour la cyclisation oxydante de 2'-hydroxychalcones en aurones (**Schéma 3.1.4**, Voie A).²⁰⁵ Ce type de réaction forme majoritairement des aurones avec des rendements de 28 à 62%, ainsi que des flavanones avec des rendements de 5 à 21 % (**Schéma 3.1.5**). Basé sur des travaux antérieurs, Sekizaki établit ainsi que l'oxydation de 2'-hydroxychalcones permet selon le métal utilisé la formation de différents types de flavonoïdes, le plus souvent de flavones comme dans le cas de l'oxyde de sélénium(IV) ou du chlorure

de lithium palladium(II).²⁰⁶ En 2006, Agrawal *et al.* propose deux alternatives en utilisant les propriétés oxydantes de la pyridine et du diméthylsulfoxyde (DMSO).²⁰⁷ La première méthode utilisant la pyridine en présence d'acétate de mercure(II) conduit à la formation d'aurones avec un rendement de 77 à 87 % supérieur à la voie présentée par Sekizaki dans l'acide acétique (AcOH). La deuxième méthode utilise le bromure de cuivre(II) dans le DMSO pour former des aurones avec un rendement de 70 à 80 % (**Schéma 3.1.5**). Cette voie utilisée dernièrement par Ashok *et al.* a permis la synthèse rapide d'aurones sous irradiation micro-ondes avec des rendements similaires.²⁰⁸ Ces méthodes ont été illustrées dans des travaux récents utilisant les aurones à des fins thérapeutiques.^{130, 132, 149, 209-211} Dans ces travaux, les aurones sont substituées par des groupements méthoxyles ou halogènes et obtenues à partir d'acétate de mercure(II) dans la pyridine ou dans le DMSO. La toxicité du mercure et son impact environnemental notoire pose cependant des limites à cette méthode. Une alternative de Thakkar *et al.* utilisant le trinitrate de thallium(III) (TTN) en milieu acide dans le méthanol a également mené à la synthèse d'aurones par cyclisation oxydante de la 2'-hydroxychalcone.²¹²⁻²¹³ Dans ces conditions, Thanigaimalai *et al.* ont également évalué la contribution de substituants en *para* sur le cycle A de la chalcone.²¹⁴ Des substituants électrodonneurs amènent ainsi à la synthèse de flavones à partir de 2'-hydroxychalcones, alors que des substituants électroattracteurs conduisent à la formation d'aurones avec des rendements de 43 à 79 % (**Figure 3.1.5**). La toxicité du trinitrate de thallium(III) limite cependant l'usage de cette méthode.

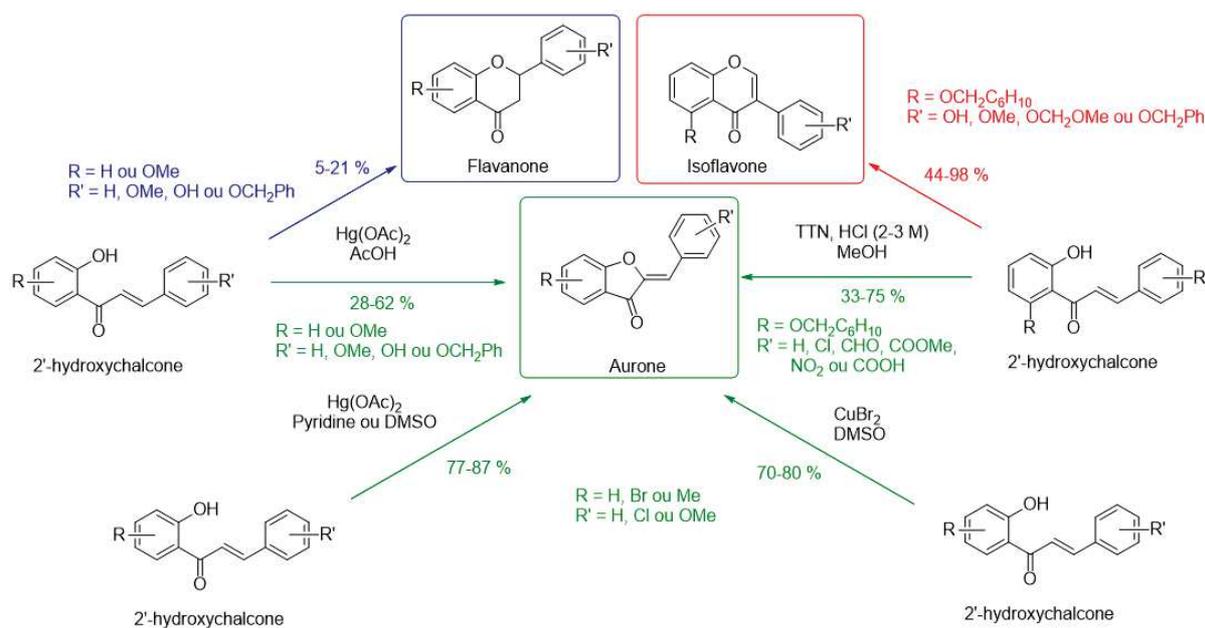


Schéma 3.1.5. Synthèse de flavonoïdes à partir de la 2'-hydroxychalcone.

Par ailleurs, Donnelly *et al.* ont décrit la formation d'aurones à partir de la 2'-acétoxychalcone (**Schéma 3.1.4, Voie C**).²¹⁵⁻²¹⁶ Les auteurs justifient l'utilisation de l'acétate en position 2' par le fait que celui-ci peut prévenir une bromation secondaire sur le cycle B, mais aussi qu'il peut être déprotégé

facilement en milieu basique pour former l'ion phénoxy, ce qui favorise ensuite la cyclisation en aurone. Dans cette voie, la 2'-acétoxychalcone forme un intermédiaire α -bromo- β -méthoxydihydrochalcone par l'utilisation du *N*-bromosuccinimide dans le méthanol avec un rendement de 56 % (**Schéma 3.1.6**). Cet intermédiaire forme ensuite des aurones de manière majoritaire par la réaction de Wheeler en présence de 1 M d'hydroxyde de sodium dans le méthanol, ainsi que des flavones de manière minoritaire. Si la présence sur la chalcone d'un groupement méthyle donneur en *para* du substituant 2'-oxy mène à une bonne régiosélectivité de la réaction (74 % d'aurone pour 6 % de flavone), la présence d'un groupement nitro attracteur conduit à une formation similaire d'aurone (23 %) et de flavone (22 %). Les auteurs attribuent cette formation plus faible d'aurone à la nucléophilie moins importante de l'ion 2'-phénoxy en *para* d'un groupement attracteur. Par la suite, des travaux de Bose *et al.* utilisant cette fois le tribromure de tétrabutylammonium (TBATB) ou encore le bromure d'ammonium en présence d'oxyde de vanadium(V) ont permis la formation similaire d'aurone à partir de la 2'-acétoxychalcone (**Schéma 3.1.4**, voie C).²¹⁷⁻²¹⁸ Ces travaux ont notamment mis en avant la formation préférentielle d'aurone ou de flavone en modulant l'étape de bromation avec des rendements de 81 à 95 %. Les aurones sont formées à partir d'un intermédiaire α -bromo- β -méthoxydihydrochalcone (**Schéma 3.1.6**), à l'image des aurones dans les études de Donnelly *et al.*, alors que des intermédiaires dibromés mènent à la formation des flavones correspondantes.

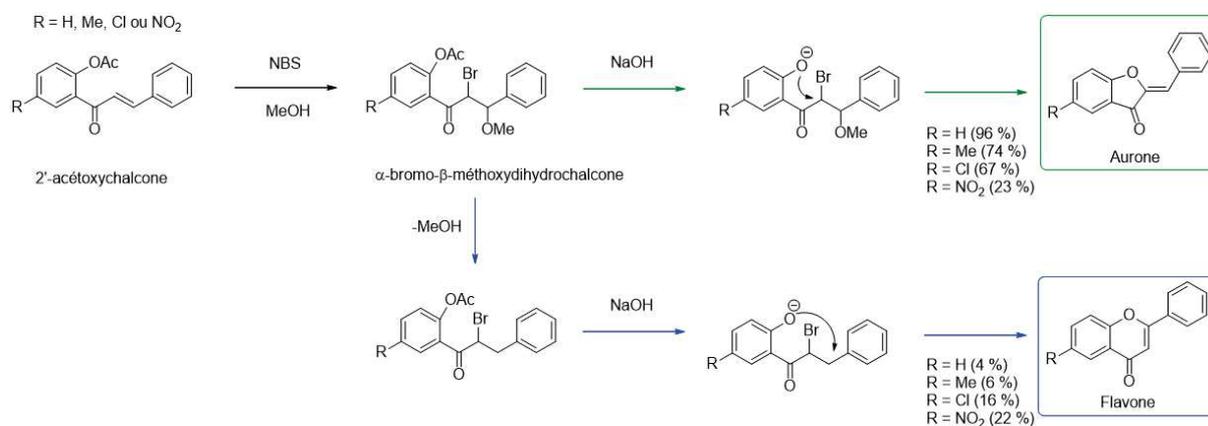


Schéma 3.1.6. Réaction de Wheeler : formation d'aurones (vert) à partir d'un intermédiaire α -bromo- β -méthoxydihydrochalcone.

Récemment, Ragab *et al.* ont également synthétisé une série d'aurones à partir de la 2'-hydroxy-6'-méthoxychalcone, sans métal et en présence d'hydroxyde de sodium en utilisant le peroxyde d'hydrogène, à l'image de la synthèse naturelle des aurones, avec des rendements de 78 à 87 % (**Schéma 3.1.4**, Voie B).²¹⁹ Les auteurs expliquent la formation préférentielle d'aurones dans ces conditions par l'encombrement du groupe méthoxyle voisin de la cétone (**Schéma 3.1.7**). Bien que

moins toxique que les précédentes méthodes, la présence d'un substituant méthoxyle en position 6' limite considérablement la diversité de substituants sur le cycle B de la chalcone.

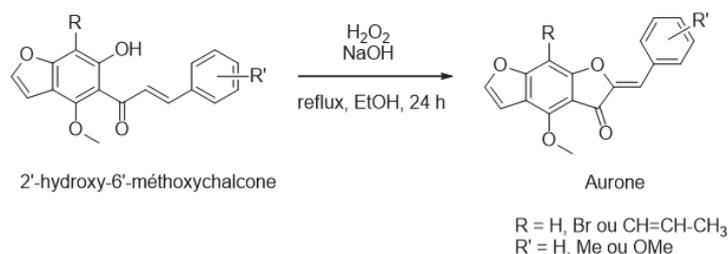


Schéma 3.1.7. Synthèse de flavonoïdes à partir de la 2'-hydroxy-6'-méthoxychalcone.

Enfin, une méthode récente d'obtention d'aurones par Weng *et al.* met en jeu l'époxydation de 2'-halogénochalcones en présence de peroxyde d'hydrogène, s'inspirant cette fois encore de la biosynthèse des aurones (**Schéma 3.1.4**, Voie F).²²⁰ L'époxyde intermédiaire formé est convertie en aurones à 105 °C dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) en présence de carbonate de césium, d'iodure de cuivre(I) comme catalyseur et de 1,10-phénantroline comme ligand (**Schéma 3.1.8**). Cette conversion est réalisée avec un rendement de 43 à 85 % et supporte bien la présence de substituants électrodonneurs (méthyle) comme électroattracteurs (halogène) sur le cycle A de la chalcone.

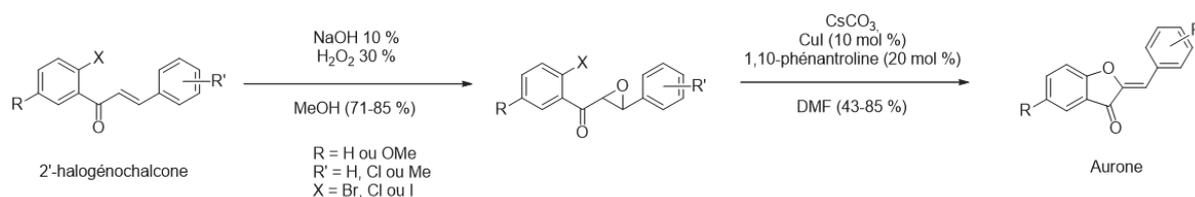


Schéma 3.1.8. Synthèse d'aurone à partir de la 2'-halogénochalcone *via* une espèce époxyde intermédiaire.

1.2.2 Synthèse par cyclisation d'*ortho*-alkynoylphénols et dérivés

En 1986, Garcia *et al.* étudient la formation de flavones et d'aurones en milieu basique à partir d'*ortho*-alkynoylphénols (**Schéma 3.1.4**, Voie G), un milieu acide ne menant par ailleurs qu'à la seule formation de flavones.²²¹ Cette étude montre qu'en présence de carbonate de potassium ou d'éthanolate de sodium, la réaction mène à la formation d'un mélange d'aurones et de flavones. En outre, les auteurs notent la formation majoritaire d'aurones en présence d'un solvant protique (54-79 % d'aurones, 4-18 % de flavones), alors que la formation de flavones s'opère majoritairement dans un solvant aprotique (7-8 % d'aurones, 45-85 % de flavones). Garcia *et al.* postulent alors que la cyclisation par le phénolate s'opère en α de la cétone dans le cas de l'aurone et que l'anion peu stable

résultant est rapidement capturé par le solvant protique (éthanol), favorisant ainsi la formation d'aurone plutôt que de flavone. Dans le cas d'un solvant aprotique, l'anion intermédiaire plus stable obtenu suite à une attaque en β de l'ynone conduit à la formation majoritaire de flavone (**Schéma 3.1.9**).

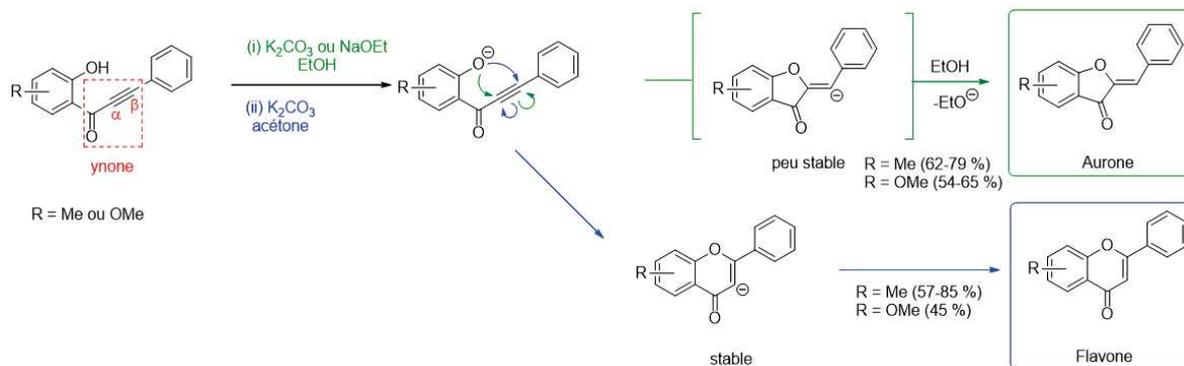


Schéma 3.1.9. Synthèse préférentielle d'aurone (vert) ou de flavone (bleu) en fonction du solvant utilisé selon Garcia *et al.*²²¹

Par la suite, Jong *et al.* décrivent également la synthèse à partir d'*ortho*-alkynoylphénols à l'aide cette fois de nitrate d'argent.²²² L'argent se coordine avec le motif acétylène et le benzène adjacent favorise la formation de l'aurone en créant une charge positive partielle sur le carbone en α de l'ynone (**Schéma 3.1.10**). Cette méthode permet la formation d'aurones avec de bons rendements (85 à 95 %) avec quelques traces de flavones. Plus récemment, la synthèse d'aurones à partir d'alkynoylphénols a été reportée sans l'utilisation de métal par Liu *et al.*²²³ Dans ces travaux, la formation d'aurones est efficacement catalysée par du tributylphosphine (5 % mol) dans le dichlorométhane (DCM) avec des rendements de 75 à 95 % et un ratio aurone/flavone 98:2 (**Schéma 3.1.10**). Cette méthode est légèrement favorisée par des substituants donneurs sur les cycles A et B. Par ailleurs, une dernière étude de Taylor *et al.* décrit la formation d'aurones en milieu basique avec des rendements de 78 à 99 % à partir d'alkynoylphénols en présence de carbonate de césium dans l'acétone (**Schéma 3.1.10**),²²⁴ ce qui contredit les observations antérieures de Garcia *et al.*²²¹ sur le rôle du solvant dans la régiosélectivité du produit formé. Taylor *et al.* notent également la formation de flavones en présence d'acide trifluorométhanesulfonique (TfOH) dans le dichloroéthane. L'ensemble de ces travaux illustrent la complexité de la régiosélectivité lors de la conversion de précurseurs alkynoylphénols en aurones ou en flavones. Cette méthode est de plus limitée par la préparation de précurseurs alkynoylphénols qui nécessitent parfois de nombreuses étapes de synthèse, souvent accompagnées d'un rendement modéré et avec une diversité de substituants faible de par la nature des réactifs de départ.

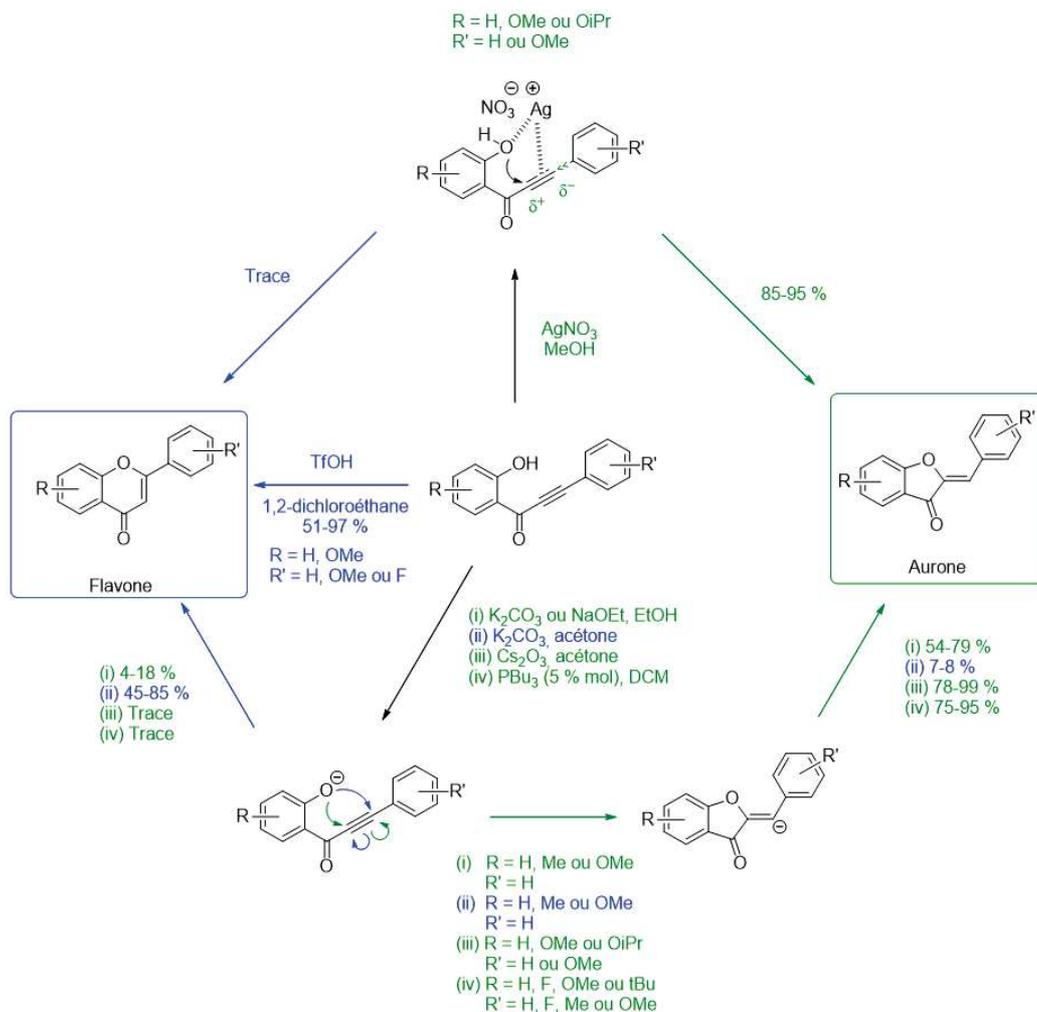


Schéma 3.I.10. Différentes conditions utilisées pour la synthèse d'aurones (vert) et de flavones (bleu) à partir d'*ortho*-alkynylphénols.

Enfin, Harkat *et al.* proposent en 2008 une voie de synthèse d'aurones similaire basée sur la formation d'un intermédiaire 2-(1-hydroxyprop-2-ynyl)phénol (**Schéma 3.I.4**, Voie H).²²⁵ La cyclisation de ce dernier forme une (*Z*)-2-benzylidene-2,3-dihydrobenzofuran-3-ol avec de bons rendements (65 à 86 %) en présence de carbonate de potassium et d'or comme catalyseur dans l'acétonitrile. Celle-ci est ensuite efficacement oxydée en aurone par le dioxyde de manganèse dans le DCM avec des rendements de 64 à 99 %. Les auteurs notent également qu'aucune cyclisation ne s'opère dans les mêmes conditions pour le précurseur *ortho*-alkynylphénol (**Schéma 3.I.11**).

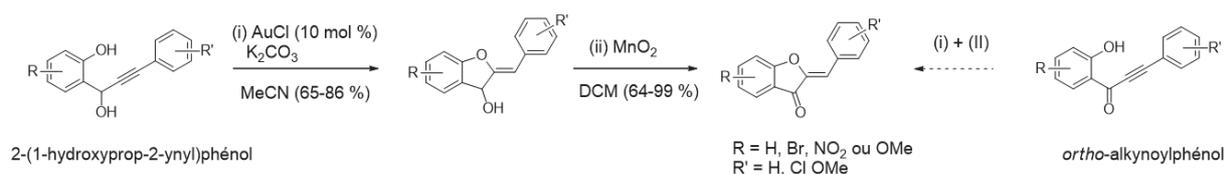


Schéma 3.I.11. Synthèse d'aurone à partir d'un intermédiaire 2-(1-hydroxyprop-2-ynyl)phénol en présence d'un catalyseur d'or suivi d'une oxydation par le dioxyde de manganèse.

I.2.3 Synthèse par couplage Suzuki-Miyaura

Kraus *et al.* rapportent en 2010 la synthèse d'une série d'aurones par couplage Suzuki-Miyaura entre des acides phénylboroniques et des dérivés de (*Z*)-2-bromométhylènebenzofuran-3(2*H*)-one substitués par des groupements méthoxyles (**Schéma 3.I.4**, Voie E).²²⁶ Ces derniers sont obtenus par couplage entre des dérivés de phénol et des dérivés dibromés d'acide acrylique. Ce couplage est suivi d'un réarrangement de Fries en présence d'alumine dans le dichloroéthane, puis d'une déshalogénéation en condition basique dans le THF accompagnée d'une cyclisation oxydante. Kraus *et al.* visent alors à former des flavones par cette méthode et postulent en premier lieu que les intermédiaires formés sont des chromones plutôt que des benzofuranones (voies (i) et (ii), respectivement, **Schéma 3.I.12**). Cependant, le couplage Suzuki-Miyaura mène à la formation d'une série d'aurones. Par la suite, les auteurs parviennent également à synthétiser une série de flavones en passant initialement par des dérivés dichlorés d'acide acrylique. Ils supposent alors que dans le cas d'un dérivé dibromé, la cyclisation oxydante est plus lente que la déshalogénéation, menant à la formation d'une cétone bromo-acétylénique qui cyclise ensuite pour former une benzofuranone, précurseur de l'aurone.

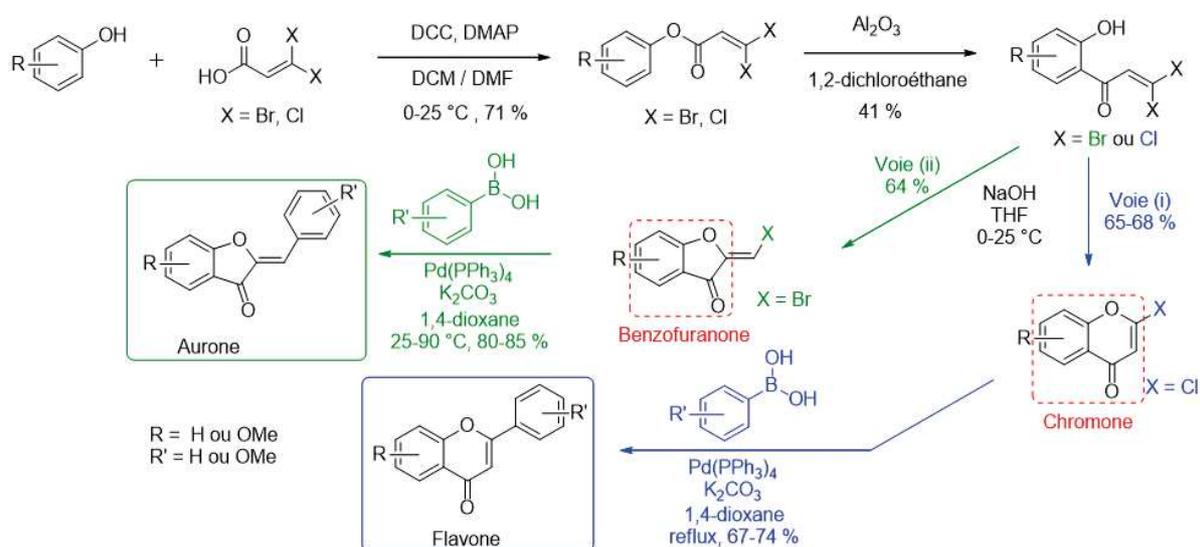


Schéma 3.I.12. Synthèse d'aurones (vert) ou de flavones (bleu) par couplage Suzuki-Miyaura entre un acide phénylboronique et un dérivé halogéné de benzofuranone ou de chromone.

1.2.4 Synthèse par condensation entre une benzofuran-3(2H)-one et un benzaldéhyde

La condensation aldolique entre une benzofuran-3(2H)-one et un benzaldéhyde (**Schéma 3.1.4**, Voie D) est la méthode de synthèse d'aurones la plus couramment utilisée, notamment du fait de la plus grande diversité des précurseurs utilisables. En particulier, de nombreux benzaldéhydes sont disponibles commercialement. De plus, contrairement aux voies de synthèses précédentes, cette voie permet la synthèse régiosélective d'aurones, la formation parallèle d'autres flavonoïdes n'ayant pas été reportée pour cette méthode. De surcroît, la condensation aldolique peut s'effectuer aussi bien en milieu acide, basique ou neutre et est donc aussi compatible avec différentes fonctions présentes sur les précurseurs. Dès 1955, Gneiss *et al.* effectuent la condensation en aurones en présence d'acide chlorhydrique concentré dans l'acide acétique glacial.²²⁷ Toujours utilisée aujourd'hui, cette méthode peut cependant présenter des rendements faibles pour la synthèse d'aurones polyhydroxylées, comme le montrent Haudecoeur *et al.* pour l'aurone hydroxylée en positions 4 et 6 sur le cycle A et 4' sur le cycle B.¹⁹⁰ Par ailleurs, Varma *et al.* réalisent en 1992 la condensation en présence d'alumine neutre dans des conditions douces et avec de très bons rendements (86 à 93 %) à partir de benzofuran-3(2H)-ones non substituées et de benzaldéhydes portant différents substituants (hydroxyle, méthoxyle, ester, halogène ou nitro) en *para*.²²⁸ Bien que très efficace, cette méthode se limite cependant aux composés solubles dans le dichlorométhane. Récemment, Kumar a réalisé la synthèse d'aurones par l'intermédiaire d'hydroxyde de barium activé.²²⁹ Cette méthode décrite par les auteurs comme plus respectueuse de l'environnement a été réalisée sans solvant sur des précurseurs méthoxylés et hydroxylés et présente de très bons rendements (88 à 95 %). Enfin, la condensation en milieu basique utilisant de l'hydroxyde de potassium dans le méthanol a été développée au sein de l'équipe MedChem (Département de Pharmacochimie Moléculaire).²³⁰

Ces différentes méthodes en milieu acide, basique ou neutre ont été appliquées avec succès ces dernières années, parfois avec des modifications dans les conditions de réaction, notamment dans le choix de la base et du solvant utilisés dans le cas des condensations en milieu basique (**Schéma 3.1.13**).^{131, 133, 153, 231-234} L'inconvénient majeur qui ressort de ces travaux est que la synthèse d'aurones par condensation entre une benzofuran-3(2H)-one et un benzaldéhyde dépend fortement du type de précurseur utilisé et peut conduire à des rendements très variables.

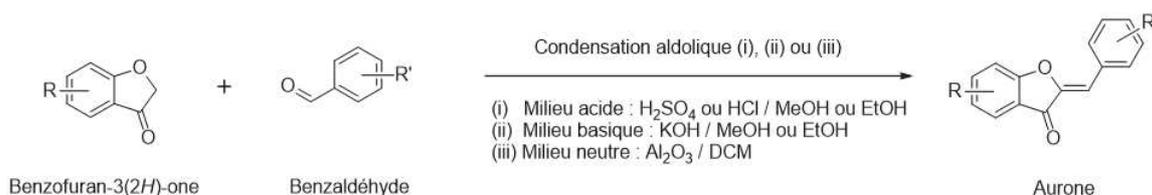


Schéma 3.1.13. Synthèse d'aurones par condensation aldolique de dérivés de benzofuran-3(2*H*)-ones et de benzaldéhydes.

En conclusion, la plupart des voies de synthèse chimique des aurones (**Schéma 3.1.4**) mènent à la formation partagée d'aurones et d'autres flavonoïdes, à l'exception de la condensation entre les dérivés de benzofuran-3(2*H*)-ones et de benzaldéhydes. Malgré des rendements plus modérés et des conditions parfois dures, cette dernière voie présente plusieurs avantages. Régiosélective, elle ne nécessite pas de recours à l'utilisation de métaux, ceux-ci étant souvent coûteux et toxiques. Seule la condensation aldolique en milieu neutre requiert l'utilisation d'oxyde d'aluminium(II), métal peu onéreux extrait de la bauxite.²³⁵ D'autre part, cette voie de synthèse offre davantage de diversité, notamment à travers l'utilisation de nombreux benzaldéhydes commerciaux, une synthèse accessible des précurseurs ainsi que les différentes conditions de réaction possibles (milieu acide, basique ou neutre). Enfin, les aurones synthétisées par les autres voies ne possèdent généralement pas de fonction hydroxyle sur leur squelette. Afin d'obtenir des aurones polyhydroxylées, la voie de synthèse d'aurones par condensation aldolique entre des dérivés de benzaldéhyde et de benzofuran-3(2*H*)-one a donc été privilégiée pour la suite de ce projet.

II SYNTHÈSE D'AURONES

Le premier criblage d'aurones effectué sur les modèles de fibres de tau (**Tables 2.II.1 et 2.II.2**) a souligné l'importance de la présence de substituants hydroxyles sur les cycles A et B des aurones pour l'activité sur la fibrillation. Ce criblage montre également que le nombre et la position des groupements hydroxyles sont des facteurs importants pour l'activité, comme le suggèrent de nombreuses études sur l'impact de polyphénols sur la fibrillation de protéines amyloïdes,^{116, 118-120, 236} à l'image de la myricétine. La suite de ce projet a donc consisté en la synthèse de nouvelles aurones polyhydroxylées, la plupart contenant le motif résorcinol en position 4 et 6 sur le cycle A. La synthèse de quelques aurones polyhydroxylées non présentes dans le premier criblage et ne possédant pas ce motif résorcinol sur le cycle A a également été réalisée afin d'enrichir la chimiothèque d'aurones. Enfin, une seconde partie exploratoire a visé à élargir les applications possibles des aurones en tant qu'inhibiteur ou sonde des fibres amyloïdes. Ceci a été notamment envisagé par la synthèse d'aurones fonctionnalisées pour permettre leur association ultérieure avec d'autres biomolécules.

II.1 Synthèse d'aurones polyhydroxylées

La synthèse d'aurones polyhydroxylées s'est effectuée au sein de l'équipe MedChem selon deux stratégies (**Schéma 3.II.1**). Une première stratégie a consisté en la synthèse directe d'aurones polyhydroxylées dans l'éthanol ou le méthanol en milieu acide ou basique par condensation aldolique des précurseurs benzofuran-3(2*H*)-ones et benzaldéhydes portants des fonctions hydroxyles libres.^{131, 190, 231, 237-238} Une seconde stratégie a reposé sur l'utilisation de précurseurs portant des substituants hydroxyles protégés sous la forme de groupements méthoxyles. Ces précurseurs ont mené à la formation d'aurones protégées,^{190, 239-240} puis à celle d'aurones polyhydroxylées par déprotection des premières aurones formées.

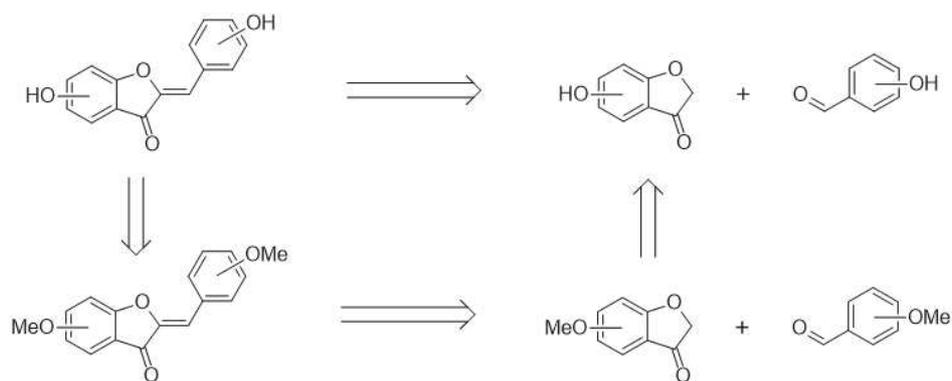


Schéma 3.II.1. Stratégies de synthèse utilisées pour l'obtention d'aurones polyhydroxylées.

II.1.1 Synthèse directe d'aurones par condensation aldolique de précurseurs hydroxylés

La synthèse directe d'aurones par condensation aldolique de précurseurs hydroxylés peut s'effectuer en milieu acide^{131, 190} ou basique.^{145, 190} La condensation aldolique en milieu acide n'a cependant pas été exploitée dans ce projet. La synthèse en milieu acide d'une aurone trihydroxylée a été décrite dans la littérature mais a été réalisée avec un faible rendement (17 %).¹⁹⁰ Dans ce projet, cette tendance a été confirmée par la synthèse de l'aurone **3a** hydroxylée en positions 3' et 5' (cycle B) et obtenue à partir de la benzofuran-3(2H)-one et du 3,5-dihydroxybenzaldéhyde disponibles commercialement (**Schéma 3.II.2**). Cette synthèse a également été effectuée avec un faible rendement de 17 %. En conséquence, la synthèse par condensation aldolique de précurseurs hydroxylés a été réalisée en milieu basique dans ce projet. En effet, l'utilisation de précurseurs hydroxylés en milieu basique est plus favorable du fait de leur plus grande solubilité.

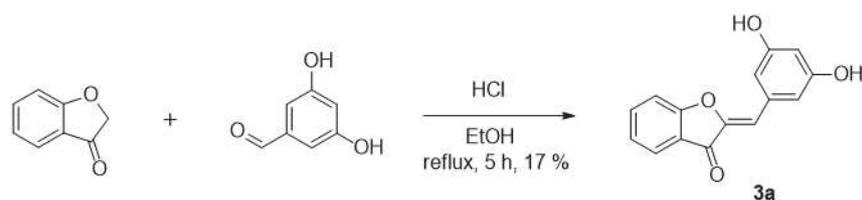


Schéma 3.II.2. Voie de synthèse de l'aurone polyhydroxylée **3a** par condensation en milieu acide.

La synthèse d'aurones en milieu basique a été réalisée à partir de deux benzofuran-3(2H)-ones différentes : la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one, ainsi que la 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one, cette série d'aurones n'ayant pas été évaluée dans le premier criblage.

II.1.1.1 Synthèse d'aurones polyhydroxylées en position 6 et 7 sur le cycle A

Le précurseur 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **I** a été synthétisé en deux étapes (**Schéma 3.II.3**) selon des conditions décrites dans la littérature.²⁴¹ Une réaction de Friedel et Crafts est d'abord effectuée sur le pyrogallol commercial en présence d'acide chloroacétique et de trifluorure de bore. La cyclisation directe en milieu basique de l'intermédiaire formé conduit ensuite à la formation de la 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **I**. Cette réaction est réalisée avec un rendement de 67 % sur les deux étapes.

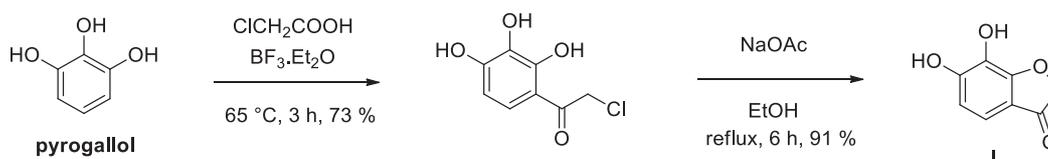


Schéma 3.II.3. Voie de synthèse du précurseur 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **I**.

La condensation aldolique de la 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **I** avec deux benzaldéhydes disponibles commercialement a mené à la synthèse de deux aurones polyhydroxylées et a été réalisée dans l'éthanol à reflux en présence d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (50 %) selon des conditions décrites dans la littérature (**Schéma 3.II.4**).¹⁴⁵

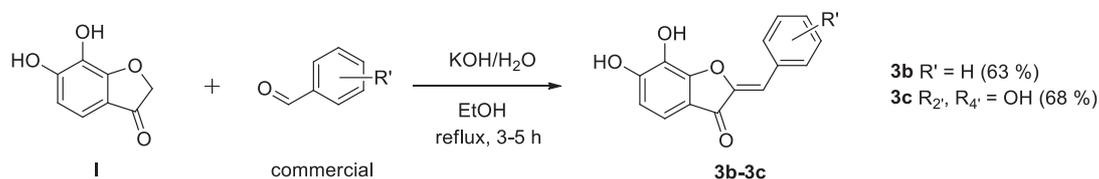


Schéma 3.II.4. Voie de synthèse des aurones **3b** et **3c** par condensation en milieu basique dans l'éthanol.

II.1.1.2 Synthèse d'aurones polyhydroxylées en position 4 et 6 sur le cycle A

La synthèse de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **II** (**Schéma 3.II.5**) a été développée au laboratoire.²³⁰ Le phloroglucinol et le chloroacétonitrile réagissent selon la réaction de Houben-Hoesch en présence de chlorure de zinc(II) dans de l'éther saturé en acide chlorhydrique. L'iminium formé est alors directement hydrolysé en milieu aqueux à reflux et suivi d'une cyclisation intramoléculaire conduisant à la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **II**. Cette réaction s'effectue avec un rendement de 78 %.

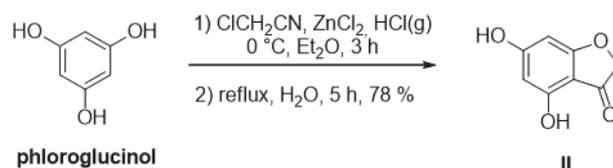


Schéma 3.II.5. Voie de synthèse du précurseur 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one II.

La synthèse d'aurones ne possédant aucun ou seulement un groupement hydroxyle sur chaque cycle s'effectue généralement par condensation aldolique dans le méthanol à reflux en présence d'hydroxyde de potassium aqueux.¹⁹⁰ Au cours de ce projet, trois aurones polyhydroxylées **3d-3f** ont pu être synthétisées dans ces conditions à partir de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one II et de benzaldéhydes disponibles commercialement. La condensation a néanmoins dû être réalisée sous micro-ondes (**Schéma 3.II.6**).

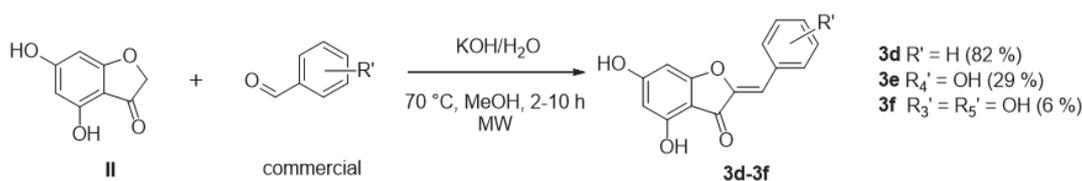


Schéma 3.II.6. Voie de synthèse des aurones **3d-3f** par condensation en milieu basique avec micro-ondes dans le méthanol.

Il est à noter en revanche que la réaction de condensation s'effectue d'autant moins bien que le nombre de groupements hydroxyles augmente sur le cycle B, ce qui limite son intérêt pour la synthèse d'aurones polyhydroxylées. Par cette méthode, l'aurone **3e** hydroxylée en position 4, 6 (cycle A) et 4' (cycle B) a néanmoins été obtenue avec un meilleur rendement qu'en milieu acide dans le méthanol (29 % au lieu de 17 %).¹⁹⁰ En revanche, aucune formation d'aurones n'a été observée dans ces conditions pour la réaction entre la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one II et du 2,3,4-trihydroxybenzaldéhyde.

La synthèse directe d'aurones comportant de nombreux substituants hydroxyles est donc plus efficace en milieu basique qu'en milieu acide. Cependant, un nombre croissant de fonctions hydroxyles sur les précurseurs tend à diminuer le rendement obtenu pour la réaction de condensation aldolique. Ceci pourrait être expliqué en partie par la solubilité décroissante des précurseurs et des aurones formées avec le nombre de fonctions hydroxyles sur les molécules, mais aussi par des effets électroniques moins favorables. Cela a mené à utiliser une autre stratégie en partant de précurseurs portant des fonctions hydroxyles protégées.

II.1.2 Synthèse d'aurones par condensation aldolique de précurseurs protégés

La synthèse d'aurones polyhydroxylées a été réalisée à partir de précurseurs benzofuran-3(2*H*)-ones et benzaldéhydes méthoxylés. En parallèle, l'utilisation d'autres groupements a été évaluée.

II.1.2.1 Synthèse d'aurones polyhydroxylées par l'intermédiaire d'aurones polyméthoxylées

La synthèse du précurseur 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2*H*)-one a été réalisée par alkylation de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one selon des conditions décrites dans la littérature²⁴² utilisant le sulfate de diméthyle, agent alkylant plus efficace que l'iodure de méthyle initialement utilisé au sein du laboratoire.²³⁰ Cette réaction réalisée dans le 1,2-diméthoxyéthane en présence de carbonate de potassium est quantitative (**Schéma 3.II.7**).

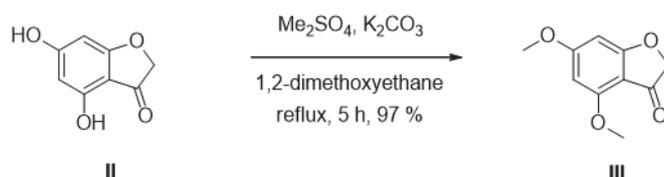


Schéma 3.II.7. Voie de synthèse du précurseur 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2*H*)-one III.

Dans la littérature, la condensation de précurseurs portant des substituants moins polaires (alkyle, méthoxyle) que les groupements hydroxyles est efficace en milieu neutre dans le dichlorométhane en présence d'oxyde d'aluminium (**Schéma 3.II.8**).^{190, 239-240} Cette méthode a dans ce projet permis la synthèse d'aurones méthoxylées à partir de la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2*H*)-one III avec de nombreux avantages : une certaine diversité de produits par une importante disponibilité commerciale de benzaldéhydes méthoxylés, un traitement de réaction rapide et peu coûteux, une absence de produit secondaire ou de dégradation par des conditions douces ainsi qu'un rendement généralement bon (50 à 92%). De plus, la disponibilité commerciale du 7-méthoxybenzaldéhyde a permis la synthèse de trois nouvelles aurones (**3I'**-**3n'**) pour compléter une série du premier criblage (**1i-1r**, **Table 2.II.1**).

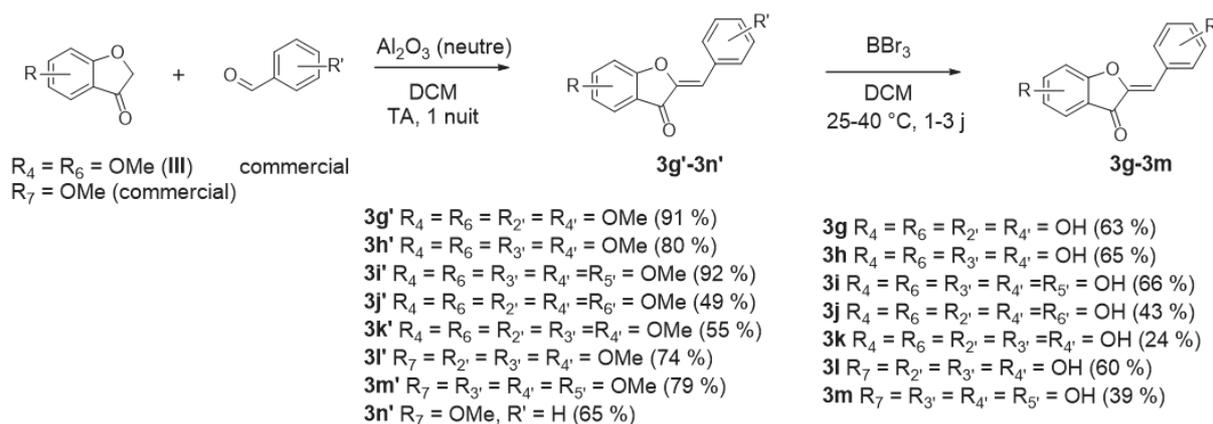


Schéma 3.II.8. Voie de synthèse des aurones polyhydroxylées **3g-3m** par déprotection d'aurones polyméthoxylées.

Ces travaux permettent de montrer l'influence sur la condensation aldolique des substituants présents sur le cycle B. En particulier, l'aurone **3i'** (92 %) est synthétisée avec un rendement nettement supérieur à ses isomères **3j'** et **3k'** (49 % et 55 % respectivement). Dans le cas d'un groupement méthoxyle donneur, la position en *mé*ta du benzaldéhyde défavorise donc moins la condensation que les positions *ortho* et *para*. Ceci peut être expliqué par la contribution des groupements donneurs qui diminuent l'électrophilie du benzaldéhyde, ce qui décroît la réactivité de cette fonction dans le cadre d'une condensation aldolique.

L'étape de déprotection s'effectue dans le dichlorométhane en présence de tribromure de bore selon des conditions décrites dans la littérature.^{190, 210, 225} Il est à noter cependant que la réaction de déprotection se fait d'autant plus difficilement que le nombre de groupements protecteurs augmente. Ainsi, la déprotection s'effectue à température ambiante entre un et trois jours pour des aurones tétraméthoxylées (**3g-3h** et **3l-3m**), là où quelques heures suffisent pour un à deux groupes méthoxyles. Enfin, les aurones pentahydroxylées (**3i-3k**) ont été obtenues après trois jours de réaction dans le dichlorométhane à reflux. Cette méthode a ainsi permis la synthèse de sept aurones portant de quatre à cinq fonctions hydroxyles avec des rendements modérés de 24 à 65 % (**Schéma 3.II.8**).

II.1.2.2 Alternatives aux groupements méthoxyles

En parallèle, des alternatives à la protection des fonctions hydroxyles par des fonctions méthoxyles ont été investiguées. Les fonctions acétyles qui se déprotègent dans des conditions plus douces que les groupements méthoxyles ont ainsi été envisagées. Cependant, la réaction de protection de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** par des groupements acétates mène en

présence de triéthylamine dans l'anhydride acétique à la formation d'un mélange de produits en RMN. Le produit désiré, la 4,6-diacétoxybenzofuran-3(2*H*)-one, est obtenu mais en présence d'un produit secondaire majoritaire (**Schéma 3.II.9**), ce qui peut être expliqué par la trop grande acidité du proton en α de la cétone. D'autres conditions de protection ont été explorées et ont également mené à la formation d'un tel mélange (**Schéma 3.II.9**), limitant l'utilisation de la 4,6-diacétoxybenzofuran-3(2*H*)-one au profit de la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2*H*)-one **III**.

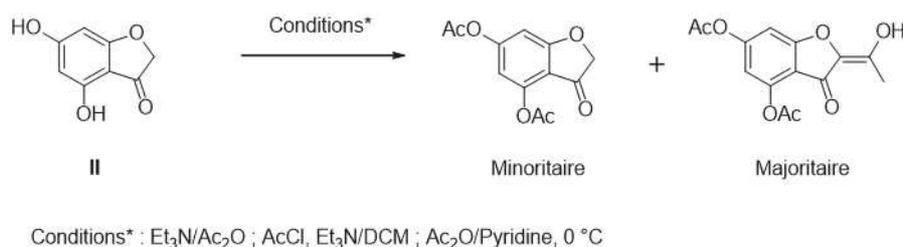


Schéma 3.II.9. Tentatives de synthèse du précurseur 4,6-diacétoxybenzofuran-3(2*H*)-one.

Par ailleurs, le 3,4,5-triacétoxybenzaldéhyde **IV** a été synthétisé avec un rendement de 80 % selon des conditions décrites dans la littérature (**Schéma 3.II.10**).²⁴³ En revanche, la réaction de protection du 2,3,4-trihydroxybenzaldéhyde par des groupements acétates effectuée en parallèle dans les mêmes conditions n'est pas totale selon l'analyse RMN, ce qui pourrait être dû à la présence de la fonction aldéhyde voisine du groupement hydroxyle en position 2 (gêne stérique ou effet de chélation).

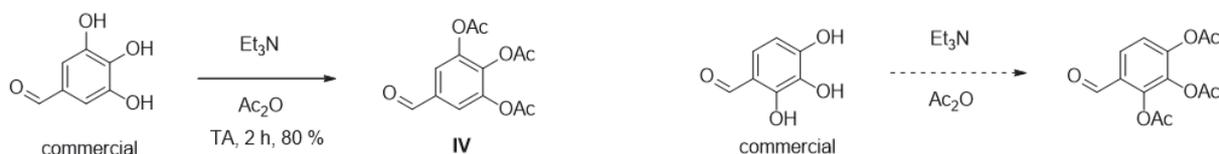


Schéma 3.II.10. Voie de synthèse du précurseur 3,4,5-triacétoxybenzaldéhyde **IV**.

De plus, la condensation entre la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2*H*)-one **III** et le 3,4,5-triacétoxybenzaldéhyde **IV** ne donne lieu à aucune réaction (**Schéma 3.II.11**). La présence de groupements acétates semble donc défavoriser la réaction de condensation en désactivant le benzaldéhyde.

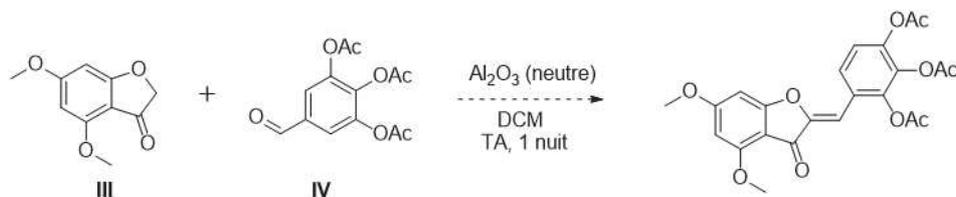


Schéma 3.II.11. Condensation aldolique entre la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2*H*)-one **III** et le 3,4,5-triacétoxybenzaldéhyde **IV**.

Des difficultés similaires ont été observées pour la protection des précurseurs polyhydroxylés par des groupements silylés – le triméthylsilyle (TMS) et le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) -, notamment du fait de leur trop grande instabilité dans les conditions de réaction et de traitement (TMS) ou de leur encombrement pour des fonctions hydroxyles voisines (TBDMS). Ces difficultés ont conduit à privilégier l'utilisation des intermédiaires polyméthoxylés.

Dans ce projet, la voie de condensation aldolique de dérivés de benzofuran-3(2*H*)-one et de benzaldéhydes a ainsi permis la synthèse de vingt-deux aurones dont treize aurones polyhydroxylées possédant jusqu'à cinq fonctions hydroxyles. Bien que certaines aurones aient été préparées en une seule étape à partir de précurseurs hydroxylés (synthèse « directe »), la méthode d'obtention des aurones polyhydroxylées par déprotection d'aurones polyméthoxylées s'est montrée plus efficace pour des aurones possédant un grand nombre de fonctions hydroxyles. En particulier, la condensation des précurseurs méthoxylés en milieu neutre est moins dépendante de la position et du nombre de fonctions hydroxyles. Néanmoins, la déprotection des aurones polyméthoxylées s'effectue dans des conditions dures qui peuvent être incompatibles avec d'autres groupements que les fonctions hydroxyles. De ce fait, la synthèse « directe » d'aurones est privilégiée dans la suite de ce projet centré sur la fonctionnalisation des aurones.

II.2 Synthèse d'aurones fonctionnalisées

Afin d'élargir les applications possibles des aurones en tant qu'inhibiteurs ou sondes des fibres amyloïdes, leur fonctionnalisation a été explorée dans un second temps. Deux méthodes de fonctionnalisation des aurones ont été examinées. La première consiste à associer les aurones à d'autres molécules par ligation sur les cycles A ou B de l'aurone (**Figure 3.II.1**). La ligation de peptide en particulier pourrait être intéressante pour augmenter l'activité et/ou la sélectivité des aurones. A cet effet, une méthode de ligation particulière a été explorée : la formation d'une fonction triazole par cycloaddition de Huisgen entre une molécule portant une fonction alcyne et une autre portant une fonction azoture (**Schéma 3.II.12**).²⁴⁴⁻²⁴⁶ Cette méthode de ligation a été sélectionnée pour des raisons de simplicité de synthèse. En effet, l'ajout d'une triple liaison peut se faire facilement sur les aurones, notamment par l'intermédiaire des substituants hydroxyles, alors qu'une fonction azoture peut être aisément associée à d'autres molécules, en particulier des peptides.

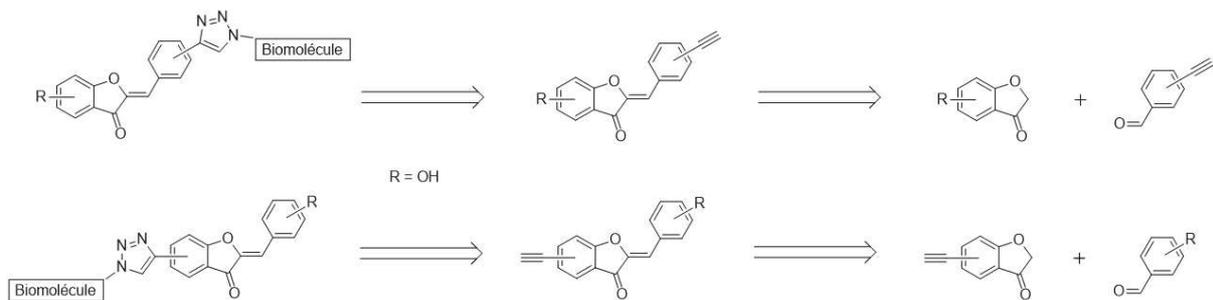


Schéma 3.II.12. Rétrosynthèse de la liaison d'aurones avec une biomolécule.

Le second axe de fonctionnalisation vise à développer une méthode de radiomarquage d'aurones polyhydroxylées par un élément radioactif dans la prospective d'une utilisation en imagerie sur les fibres amyloïdes. Dans le cadre de l'AD, l'application des aurones en imagerie a déjà été illustrée par les travaux d'Ono *et coll.* sur les plaques amyloïdes. Ces travaux portent sur le radiomarquage d'aurones substituées en position 4' (cycle B) par l'intermédiaire d'iode 125 [¹²⁵I], de fluor 18 [¹⁸F] ou d'un complexe de technetium 99m [^{99m}Tc] radioactifs en position 5 ou 4' de l'aurone (**Figure 1.III.4**).^{154-155, 157, 247}

Cependant, malgré de nombreux travaux soulignant l'activité des polyphénols et anti-oxydants sur l'agrégation de fibres amyloïdes,^{115, 118-119, 236, 248-249} les aurones utilisées jusqu'ici par Ono *et coll.* ne sont pas polyhydroxylées et ne sont appliquées qu'aux plaques amyloïdes. Cette partie du projet vise donc à permettre l'utilisation d'aurones polyhydroxylées pour le marquage de fibres amyloïdes, en particulier des fibres de tau dont le marquage en imagerie est toujours à l'étude à l'heure actuelle.

II.2.1 Synthèse d'aurones fonctionnalisées par une triple liaison

Une première aurone a été synthétisée à partir du benzaldéhyde commercial portant directement une triple liaison sur le cycle aromatique. La synthèse d'autres aurones portant une triple liaison a été également réalisée *via* une fonction propargyle sur les précurseurs hydroxylés, benzaldéhydes ou benzofuranones, avant condensation. Une autre voie explorée a consisté à coupler une propargylamine à un benzaldéhyde portant une fonction acide carboxylique. La synthèse de ces précurseurs est présentée dans un premier temps, puis leur condensation pour accéder aux aurones désirées et enfin, la ligation par cycloaddition de Huisgen de deux aurones particulières.

II.2.1.1 Synthèse des précurseurs portant une triple liaison

La synthèse de la 6-propargyloxybenzofuran-3(2*H*)-one **V** a été réalisée à partir de la 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one commerciale selon des conditions décrites pour la transformation similaire de phénols dans l'acétone.²⁵⁰ Le DMF remplace ici l'acétone qui mène dans le cas de la benzofuran-3(2*H*)-one à la formation d'un autre produit du fait de l'acidité du méthylène de la benzofuran-3(2*H*)-one (**Schéma 3.II.13**). Cette réaction en présence de carbonate de potassium et de bromure de propargyl donne après 2 h de chauffage à 80 °C la 6-propargyloxybenzofuran-3(2*H*)-one **V** avec un rendement de 55 % (**Schéma 3.II.13**).

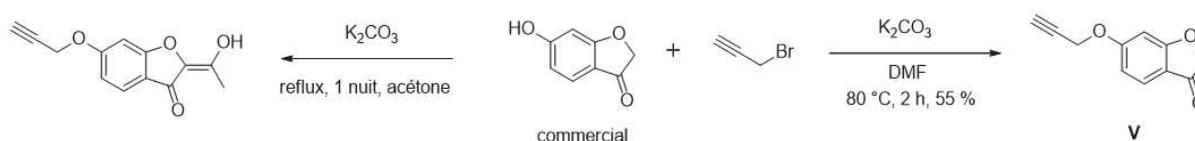


Schéma 3.II.13. Voie de synthèse de la 6-propargyloxybenzofuran-3(2*H*)-one **V**.

A l'image de la 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one, le 4-hydroxybenzaldéhyde a servi de précurseur à la synthèse du 4-propargyloxybenzaldéhyde **VI**. La réaction cette fois réalisée dans l'acétone forme en présence de carbonate de sodium et de bromure de propargyle le produit désiré de manière quantitative en 4 h à reflux (**Schéma 3.II.14**).

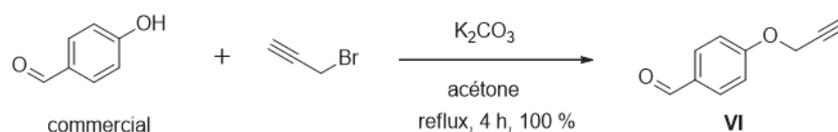


Schéma 3.II.14. Voie de synthèse du 4-propargyloxybenzaldéhyde **VI**.

En revanche, dans le cas de benzaldéhydes dihydroxylés, la réaction donne lieu à la formation d'un mélange de produits résultant d'une mono et d'une disubstitution. Dans le cas du 3,5-dihydroxybenzaldéhyde, le produit disubstitué est majoritaire en RMN en présence de carbonate de potassium (1,5 à 3 équiv.) dans l'acétone ou d'iodure de tétrabutylammonium (TBAI, 0,1 équiv.) dans le DMF (**Schéma 3.II.15**). Néanmoins, le produit monosubstitué a pu être isolé à partir du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde. Ce dernier a été chauffé à 40 °C dans le DMF pendant 24 h en présence d'hydrogénocarbonate de sodium et d'iodure de sodium selon des conditions décrites.²⁵¹ Le 3-hydroxy-4-propargyloxybenzaldéhyde **VII** a été obtenu avec un rendement de 44 % (**Schéma 3.II.15**).

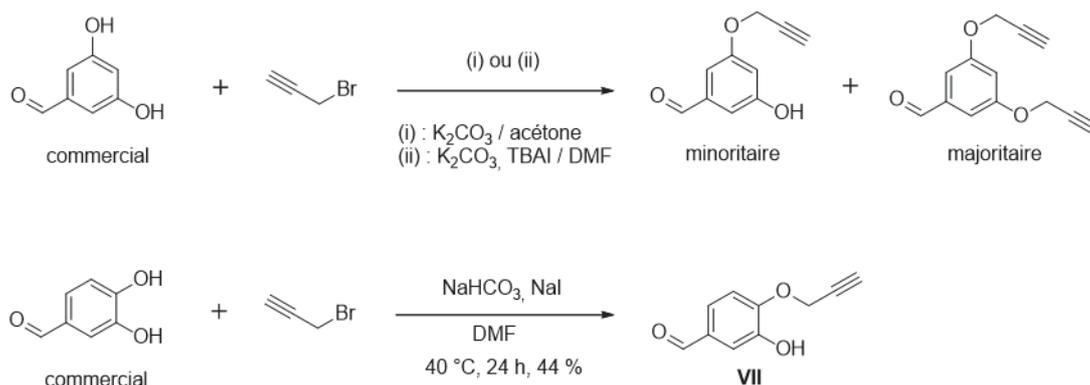


Schéma 3.II.15. Fonctionnalisation de benzaldéhydes dihydroxylés par le bromure de propargyle.

Enfin, le 4-formyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide **VIII** a été synthétisé par couplage entre une fonction acide carboxylique en *para* du benzaldéhyde et la propargylamine. Cette réaction est optimale après une nuit dans le DMF en présence de tétrafluoroborate de *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (TBTU) et de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA). Dans ces conditions, le produit a été isolé avec un rendement de 68 %, alors que d'autres conditions ont mené à une formation moins importante de produit (28 à 46 %) et à des difficultés de purification plus importantes (**Schéma 3.II.16**).

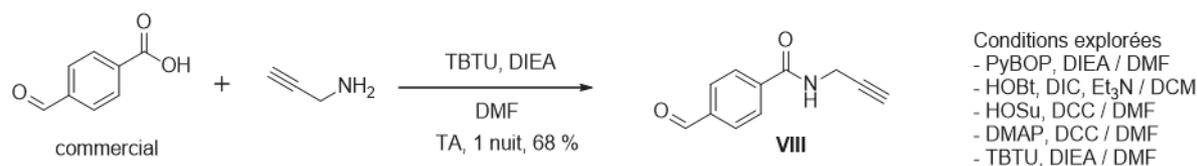


Schéma 3.II.16. Voie de synthèse du 4-formyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide **VIII**.

II.2.1.2 Condensation aldolique des précurseurs portant une triple liaison

Les aures portant une triple liaison ont été synthétisées par condensation aldolique des précurseurs fonctionnalisés décrits auparavant. La synthèse des aures **4a-4c** portant une fonction *O*-propargyle a été réalisée à partir de la 6-propargyloxybenzofuran-3(2*H*)-one **V** et de benzaldéhydes commerciaux comprenant jusqu'à deux fonctions hydroxyles. Cependant, les conditions de condensation aldolique en milieu basique utilisées auparavant (solution aqueuse d'hydroxyde de potassium dans le méthanol ou dans l'éthanol) n'ont pas mené à la formation des aures. Dans le cas du benzaldéhyde, l'aure a pu être par contre isolée en présence de pipéridine avec un rendement de 77 % (voie (i), **Schéma 3.II.17**). En revanche, dans le cas des benzaldéhydes monohydroxylés en position 3 ou 4 sur le cycle B, la condensation n'a fonctionné que dans le

tétrahydrofurane (THF) en présence d'hydrure de sodium comme base. Cela a mené à la formation d'aurones avec des rendements très faibles de 9 à 19 % (voie (ii), **Schéma 3.II.17**). De plus, la formation d'aurones à partir d'un benzaldéhyde dihydroxylé en position 3 et 5 n'a pas pu être observée en présence d'hydrure de sodium dans le THF ou dans le DMF, montrant une limite à la synthèse d'aurones polyhydroxylées à partir de la 6-propargyloxybenzofuran-3(2H)-one **V**.

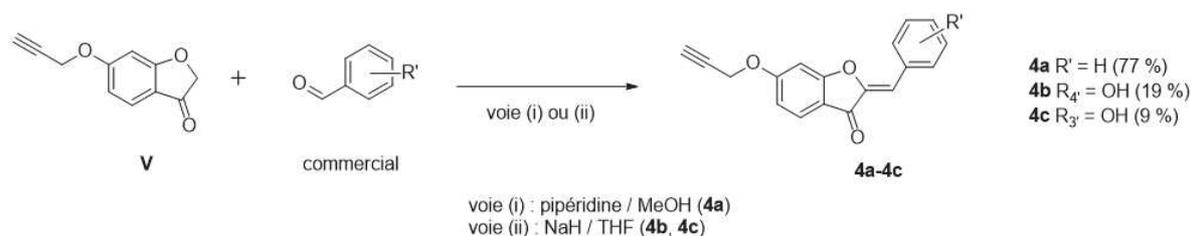


Schéma 3.II.17. Voies de synthèse d'aurones *via* la 6-propargyloxybenzofuran-3(2H)-one **V**.

L'accès à des aurones dihydroxylées portant une triple liaison sur le cycle B a également été réalisée par la condensation de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** avec le 4-propargyloxybenzaldéhyde **VI** synthétisé précédemment, ainsi qu'avec le 4-éthynylbenzaldéhyde commercial. La formation des aurones **4d** et **4e** s'effectue ici dans le méthanol en présence d'hydroxyde de potassium avec un rendement de 40 à 63 % (**Schéma 3.II.18**). La fonctionnalisation par une triple liaison sur le cycle B est donc réalisée plus efficacement sur le cycle B que sur le cycle A, les benzaldéhydes non hydroxylés étant plus réactifs, et permet de plus de conserver le motif résorcinol en position 4 et 6 sur le cycle A.

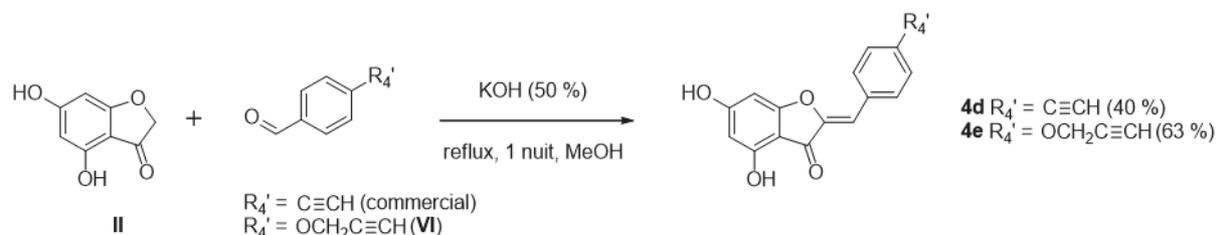


Schéma 3.II.18. Voie de synthèse d'aurones *via* la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II**.

La synthèse d'une aurone portant un lien propargylamide a également été explorée. Cependant, la condensation entre la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** et le benzaldéhyde **VIII** portant la fonction propargylamide n'a mené à aucune formation d'aurone quelles que soient les conditions utilisées pour la condensation (voie (i), **Schéma 3.II.19**). Alternativement, une aurone disponible au laboratoire (Département de Pharmacochimie Moléculaire) et portant un acide carboxylique en 4' a été couplée avec la propargylamine (voie (ii), **Schéma 3.II.19**). Le couplage a été réalisé directement entre ces deux précurseurs ou par l'intermédiaire du chlorure d'acyle dérivé (voie (ii)). Dans les deux cas cependant, aucune réaction n'a eu lieu.

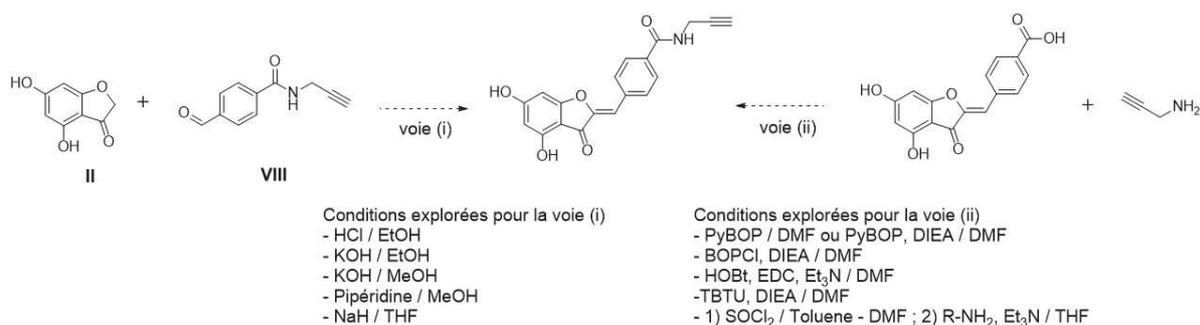


Schéma 3.I.19. Tentatives de synthèse d'une aurone portant une fonction propargylamide.

Au final, ces travaux ont permis la synthèse de cinq nouvelles aurones : les trois aurones **4a-4c** fonctionnalisées sur le cycle A et les deux aurones **4d-4e** fonctionnalisées sur le cycle B. La fonctionnalisation sur le cycle B de l'aurone est particulièrement intéressante car elle permet de conserver le motif résorcinol sur le cycle A, motif d'intérêt dans ce projet d'après le premier criblage d'aurones sur les fibres modèles de tau (**Tables 2.II.1** et **2.II.2**). Les travaux de ligation ci-après ont donc été réalisés à partir des aurones **4d** et **4e**, due à la plus grande accessibilité de leur synthèse et à la présence de ce motif résorcinol sur le cycle A.

II.2.1.3 Ligation des aurones fonctionnalisées avec une triple liaison

Les conditions de ligation entre les aurones **4d** et **4e** et une biomolécule présentant une fonction azoture ont été explorées et optimisées en premier lieu à travers un modèle simple, le composé **IX** (**Schéma 3.II.20**). L'azidoacétate d'éthyle **IX** utilisé est synthétisé de manière quantitative dans le DMSO à partir d'azoture de sodium et de l'iodoacétate d'éthyle commerciaux selon des conditions décrites.²⁵²

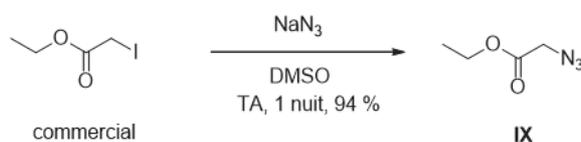


Schéma 3.II.20. Voie de synthèse du modèle azidoacétate d'éthyle **IX**.

Par la suite, le peptide VQIVYK, correspondant à la séquence d'intérêt V306-K311 de la protéine tau, a été sélectionné. Afin de réaliser la réaction de cycloaddition, une fonction azoture a été ajoutée en position N-terminale du peptide VQIVYK en élévation sur phase solide par l'intermédiaire de l'acide 2-azidoacétique **X** (**Schéma 3.II.21**). Ce dernier a été synthétisé à partir d'azoture de sodium et de l'acide iodacétique dans les mêmes conditions que le modèle **IX** (une nuit à température ambiante dans le DMSO) avec cependant un rendement plus faible de 29 %. L'acide 2-

azidoacétique **X** formé est ensuite couplé au peptide VQIVYK sur résine et constitue, après coupure de la résine, le peptide N₃CH₂C(O)-VQIVYK-NH₂, aussi noté N₃PHF6 (**Schéma 3.II.21**).

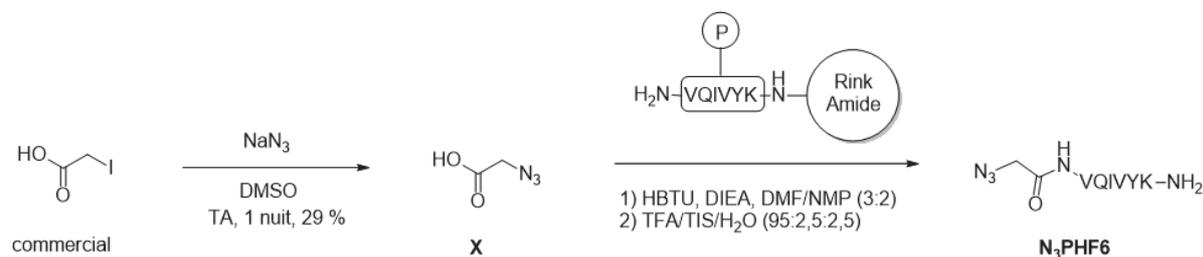


Schéma 3.II.21. Voie de synthèse du motif N₃PHF6.

Le choix de cette séquence particulière repose sur des travaux antérieurs au sein de l'équipe I2BM (Département de Chimie Moléculaire) sur la séquence ¹⁶KLVFFA²¹ du peptide Aβ₄₀.²⁵³⁻²⁵⁴ De nombreuses études décrivent un rôle similaire des séquences ¹⁶KLVFFA²¹ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, respectivement dans le processus d'agrégation du peptide Aβ et de celui de la protéine tau. Dès 1995, Wood *et al.* établissent que la séquence ¹⁷LVFFAED²³ constitue le cœur hydrophobe du peptide Aβ sans lequel la fibrillation du peptide n'a pas lieu,²⁵⁵ comme cela a été illustré par la suite avec le peptide ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ pour la protéine tau.¹⁶⁵ Suite aux travaux de Wood *et al.*,²⁵⁵ une étude de Tjernberg *et al.*²⁵⁶ montrent que la séquence peptidique ¹⁶KLVFF²⁰ est capable de se lier fortement au peptide Aβ₄₀, à l'instar de la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ avec la protéine tau. Dans cette étude, Tjernberg *et al.* soulignent également l'importance de la séquence ¹⁶KLVFF²⁰ pour la fibrillation du peptide Aβ. Par la suite, Hetényi *et al.* ont confirmé par une étude de simulation la forte interaction du motif KLVFF avec lui-même et souligné son rôle de « casseur » de feuillet β.²⁵⁷ Enfin, des travaux effectués plus récemment au laboratoire (Département de Chimie Moléculaire) ont montré que l'association de deux monomères de la séquence ¹⁶KLVFFA²¹ à un châssis cyclodécapeptidique²⁵³ ou à un châssis 2,5-dicétopipérazine²⁵⁴ permet d'inhiber efficacement la fibrillation d'Aβ. Similairement, une étude très récente de Frenkel-Pinter *et al.*²⁵⁸ a montré que le peptide VQIVYK (PHF6) lié à un oligosaccharide ne fibrille pas et que l'agrégation du motif PHF6 seul n'a pas lieu lorsque celui-ci est incubé en présence du couple PHF6-oligosaccharide. L'association avec une autre biomolécule de la séquence clé amyloïdogénique d'une protéine amyloïde pourrait ainsi permettre de prévenir son agrégation.

Basé sur les observations ci-dessus, la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, noyau de la fibrillation de tau, a donc été choisie pour être associée aux aurones **4d** et **4e** par cycloaddition de Huisgen (**Schéma 3.II.22**) dans le but d'obtenir des inhibiteurs plus actifs et plus sélectifs des fibres de tau. Dans un premier temps, le modèle azidoacétate d'éthyle **IX** a été associé à ces aurones **4d** et **4e** pour optimiser les conditions de ligation (**Schéma 3.II.22**).

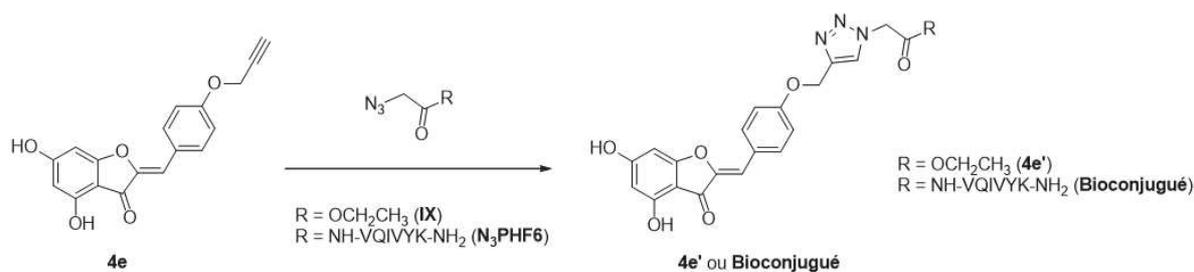


Schéma 3.II.22. Ligation de l'aurone **4e** avec le modèle **IX** et avec le motif **N₃PHF6**.

II.2.1.3.1 Réaction de cycloaddition avec le modèle IX

La cycloaddition de Huisgen entre le modèle **IX** et les aurones **4d** et **4e** a été effectuée sous irradiation micro-ondes dans le DMF en présence de solutions aqueuses de sulfate de cuivre(II) et d'ascorbate de sodium (**Schéma 3.II.23**), couple de réactifs mis en évidence par Sharpless *et coll.*²⁴⁴ en 2002 et largement réutilisé depuis.²⁵⁹⁻²⁶⁰ L'ascorbate de sodium (NaAsc) réduit le cuivre(II) en cuivre(I) qui est nécessaire pour la réaction de cycloaddition. Sharpless *et coll.* présentent ainsi dans leurs travaux des réactions de cycloaddition avec des rendements de 82 à 94 % et proposent l'utilisation du couple sulfate de cuivre(II)/ascorbate de sodium comme alternative à l'utilisation de sels de cuivre(I) qui sont souvent plus onéreux.

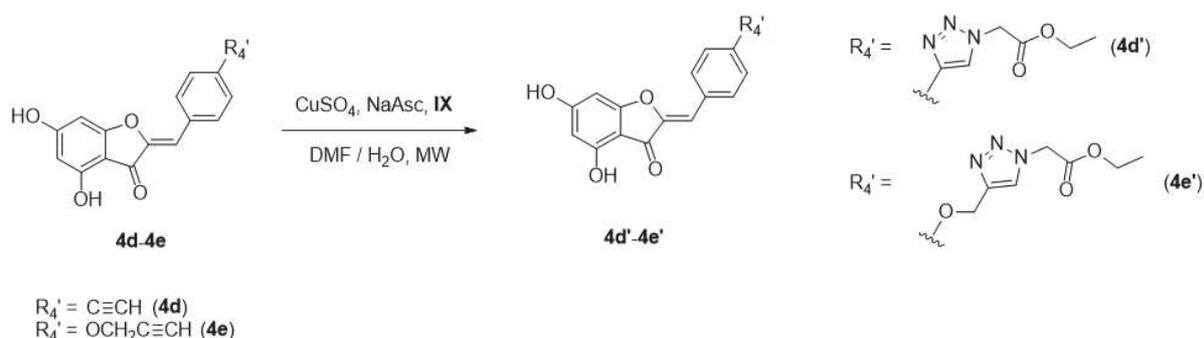


Schéma 3.II.23. Voie de synthèse des aurones **4d'** et **4e'**.

La formation des produits de cycloaddition **4d'** et **4e'** a été suivie par chromatographie liquide à haute pression (HPLC), les produits n'ayant pas été isolés. Différents temps d'irradiation et différentes températures ont été testés (**Table 3.II.1**)

Table 3.II.1. Conditions de cycloaddition des aurones **4d** et **4e** avec le modèle **IX** sous micro-ondes.

Aurone	Température	Temps	Solvant	Produit	Conversion*
4d	40 °C	30 min	DMF / H ₂ O	-	(-)
4d	80 °C	30 min	DMF / H ₂ O	-	(-)
4d	80 °C	30 min	DMSO / H ₂ O	-	(-)
4d	80 °C	2 h	DMF / H ₂ O	-	(-)
4d	100 °C	30 min	DMF / H ₂ O	4d'	(+)
4d	100 °C	2 h	DMF / H ₂ O	4d'	(++)
4d	140 °C	30 min	DMF / H ₂ O	4d'	(+++)
4e	100 °C	2 h	DMF / H ₂ O	-	(-)
4e	140 °C	30 min	DMF / H ₂ O	4e'	(+++)

*Formation du produit en HPLC : (-) aucune, (+) trace, (++) partielle et (+++) totale.

Les conditions de cycloaddition utilisées ici sont issues des travaux de Sharpless *et coll.* : 1 équivalent d'aurone pour 1,5 équivalent du modèle en présence de 0,2 équivalent de sulfate de cuivre(II) et de 0,1 équivalent d'ascorbate de sodium. Dans ces conditions, la formation du produit n'a pas été observée à une température inférieure à 100 °C pour l'aurone **4d**. A cette température, la conversion en produit **4d'** a été plus importante après 2 h de réaction. En revanche, la formation du produit **4e'** issu de la cycloaddition de l'aurone **4e** avec le modèle **IX** n'a pas été observée dans ces conditions, ce qui suggère une plus grande réactivité de l'aurone **4d**. A une température de 140 °C néanmoins, les deux produits de cycloaddition **4d'** et **4e'** ont été formés. La conversion totale de ces produits a été observée après 30 minutes de chauffage à 140 °C (**Table 3.II.1**). L'utilisation de ces conditions dures montre cependant que les aurones **4d** et **4e** sont peu réactives.

II.2.1.3.2 Réaction de cycloaddition avec le peptide N₃PHF6

La cycloaddition de Huisgens entre les aurones **4d** et **4e** et le motif VQIVYK portant une fonction azoture en N-terminal (N₃PHF6) a été réalisée en premier lieu en solution. Une synthèse alternative sur support a ensuite été explorée. Cette dernière a été réalisée en fixant le peptide VQIVYK à une résine Rink Amide MBHA (**Schéma 3.II.24**).

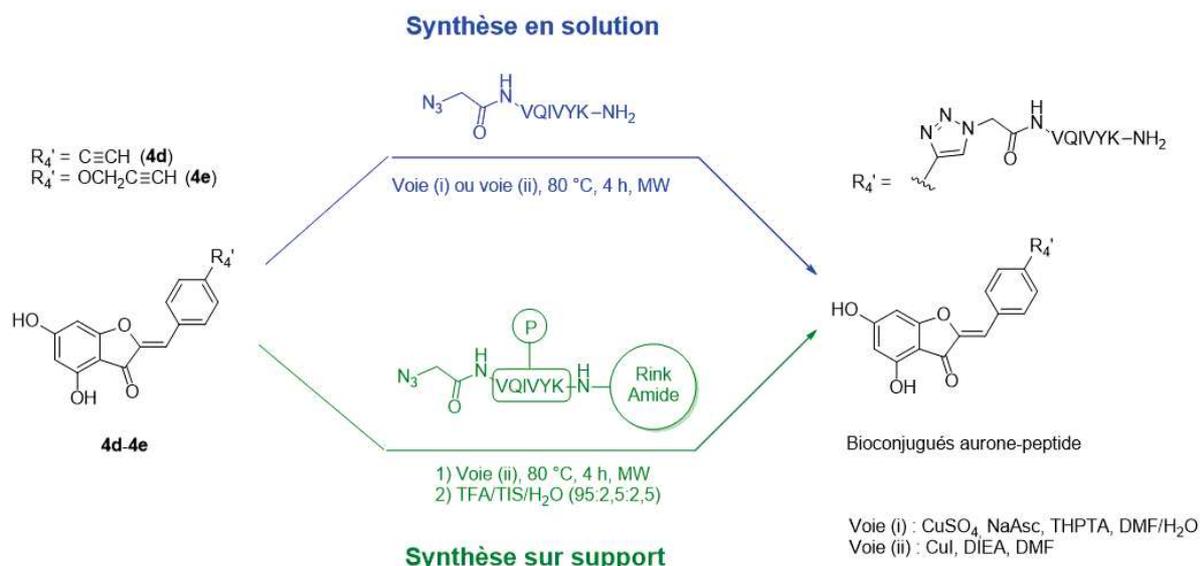


Schéma 3.II.24. Voie de synthèse des bioconjugués par cycloaddition du peptide N₃PHF6 en solution (bleu) et sur support (vert) et des aurones **4d** et **4e**.

Synthèse en solution de bioconjugués aurone-peptide

La synthèse des bioconjugués aurone-peptide a été réalisée sous micro-ondes et suivie par HPLC dans les conditions initialement mises en place sur le modèle azoture **IX** (**Table 3.I.2**). Cependant, de nombreuses tentatives ont montré que ces conditions ne sont pas adaptées à la formation des bioconjugués. En particulier, une instabilité au chauffage a été observée, le peptide et le bioconjugué se dégradant à partir de 100 °C, ce qui est incompatible avec les hautes gammes de température utilisées pour le modèle **IX** (140 °C). L'absence de chauffage (cases orange, **Table 3.II.2**) n'a généralement mené qu'à la formation de traces de produit. En outre, le peptide comme le bioconjugué tendent à être instables après plusieurs heures de chauffage en présence d'eau (agrégation, dégradation), même en présence d'agents empêchant l'agrégation tels que l'hexafluoroisopropanol (HFIP) ou le trifluoroéthanol (TFE). Par ailleurs, les précurseurs comme le produit sont très hydrophobes, ce qui limite fortement leur solubilité dans le milieu réactionnel en présence d'eau. Dans ce système, la conversion d'aurones la plus importante en HPLC a été observée après 4 h de chauffage à 80 °C sous irradiations micro-ondes dans un mélange binaire de solvants DMF / eau (1:1) en présence de sulfate de cuivre(II), d'ascorbate de sodium, de tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine (THPTA) et de peptide en excès. L'ajout de THPTA permettant de stabiliser le cuivre(I)²⁶¹ a notamment permis d'augmenter la conversion des réactifs en produits. Ces conditions ne sont cependant pas idéales, particulièrement du fait de l'instabilité du motif peptidique en milieu aqueux.

Table 3.II.2. Conditions de cycloaddition des aurones **4d** et **4e** avec le modèle peptidique N₃PHF6 en solution (S) ou sur résine (R) sous micro-ondes.

Aurone (équivalent)	N ₃ PHF6 (équivalent)	Réactifs Solvants	Température Temps	Produit
4d (1)	S (1,5)	CuSO ₄ /NaAsc DMF/H ₂ O	100 °C 2-4 h	(-)
4d (1)	S (1,2-2)	CuSO ₄ /NaAsc/THPTA DMF/H ₂ O	80 °C 4-6 h	(++)
4d (1)	S (1,2-2)	CuSO ₄ /NaAsc/THPTA solvant**/H ₂ O/TFE ou HFIP	80-100 °C 4-12 h	(+) à (++)
4d (1)	S (2)	CuI/DIEA DMF/H ₂ O	80 °C 4h	(++)
4d (1)	S (3)	CuI/DIEA DMF	80 °C 4 h	(+++)
4e (1-1,2)	S (1-1,2)	CuSO ₄ /NaAsc/THPTA DMF/H ₂ O	25 °C 8 h	(+)
4e (1-1,2)	S (1-1,2)	CuSO ₄ /NaAsc/THPTA DMF/H ₂ O	80 °C 4-8 h	(+) à (++)
4e (1,2)	S (1)	CuSO ₄ /NaAsc/THPTA DMF/H ₂ O/TFE	80 °C 6 h	(++)
4e (1)	S (2)	CuI/DIEA DMF	80 °C 4 h	(+++)
4d (3)	R (1)	CuSO ₄ /NaAsc/THPTA DMF	25 °C 8-12 h	(+)
4d (2)	R (1)	CuI/DIEA DMF	25 °C 12 h	(+)
4e (4)	R (1)	CuI/DIEA DMF	25 °C 12 h	(++)
4e (5)	R (1)	CuI/DIEA DMF	80 °C 4 h	(+++)

*Formation du produit en HPLC : (-) aucune, (+) trace, (++) partielle et (+++) totale. **solvant (solubilité du milieu) : DMF (soluble), DMSO (soluble), NMP (partiellement soluble) ou tBuOH (insoluble).

Ces difficultés inhérentes à la nature à la fois de l'aurone (faible solubilité) et du peptide (instabilité) ont mené au développement de nouvelles conditions pour la synthèse de ces bioconjugués (Table 3.II.2). Le couple sulfate de cuivre(II) / ascorbate de sodium a été remplacé par

de l'iodure de cuivre(I) (deux équivalents) en présence d'un large excès de DIEA comme base (cinquante équivalents) selon des conditions décrites par Meldal *et coll.* pour une réaction de cycloaddition sur support.²⁴⁵ Dans ces conditions et en présence du peptide N₃PHF6 (deux à trois équivalents), la conversion totale des aurones **4d** et **4e** en leur bioconjugués respectifs a été réalisée après 4 h de chauffage à 80 °C sous irradiations micro-ondes dans le DMF anhydre. Cependant, la très faible solubilité de ceux-ci a conduit à un rendement après purification très faible de 6 % pour le bioconjugué issu de la cycloaddition de l'aurone **4e**. Ces réactions étant réalisées sur une petite échelle (10 mg en moyenne), le second bioconjugué n'a pas été purifié. La purification du bioconjugué issu de l'aurone **4e** a été effectuée par chromatographie liquide en phase inverse à haute pression (RP-HPLC), d'autres méthodes (extractions, lavages, précipitation) ne permettant pas d'isoler le produit. Les difficultés de purification de ces composés ont constitué la principale limite dans l'obtention des bioconjugués, notamment du fait de leur très faible solubilité dans les solvants organiques et aqueux. Ces difficultés ont conduit à explorer la synthèse des bioconjugués sur support afin de proposer une voie alternative de synthèse et de purification de ceux-ci.

Synthèse sur support de bioconjugués aurone-peptide

La synthèse du bioconjugué issu de l'aurone **4e** sur support a été réalisée à partir des conditions développées pour la synthèse en solution (**Table 3.II.2**). Similairement à celle-ci, une absence de chauffage pour la synthèse sur support (cases orange, **Table 3.II.2**) a été associée à une faible conversion de l'aurone **4e** en bioconjugué. De même, la transformation totale de l'aurone **4e** en bioconjugué a été obtenue après 4 h de chauffage à 80 °C dans le DMF en présence de CuI (deux équivalents) et d'un excès de DIEA (cinquante équivalents) et d'aurone (cinq équivalents), l'hexapeptide N₃PHF6 supporté sur une résine Rink Amide étant le réactif limitant (**Table 3.II.2**). La conversion de l'aurone **4e** en bioconjugué a été suivie par HPLC par coupure d'une partie de la résine. La coupure de la résine est réalisée par un mélange ternaire d'acide trifluoroacétique (TFA), de triisopropylsilane (TIS) et d'eau (95:2,5:2,5). Cependant, l'obtention du bioconjugué pur a été difficile. Malgré des lavages répétés de la résine avant coupure avec des solvants organiques (DMF, Et₂O) et des solutions aqueuses basiques et neutres pour éliminer l'excès d'aurone en solution, il a été impossible de s'affranchir de traces d'aurone lors de la coupure du bioconjugué du support. Le bioconjugué étant plus soluble dans un milieu aqueux basique, une tentative de purification en HPLC dans un tampon acétate d'ammonium (pH 8) a également été effectuée, mais a mené à la perte du produit.

La ligation en solution ou sur support solide d'une biomolécule, ici un peptide, sur des aures portant une triple liaison sur le cycle B a été réalisée dans le cadre de ce projet. Cependant, du fait de la très faible solubilité des bioconjugués formés, leur purification a été très difficile ce qui n'a permis l'obtention que d'un bioconjugué en très faible quantité (inférieure à 1 mg). Il est à noter également que le peptide VQIVYK choisi pour cette ligation n'est pas un modèle facile à manipuler du fait de sa propension à s'agréger. Ce travail a néanmoins permis de développer une méthode de fonctionnalisation des aures par cycloaddition de Huisgen, en particulier dans le cas d'aures hydroxylées, ce qui pourrait permettre la conjugaison de différentes molécules aux aures et élargir ainsi leur application à d'autres projets à visée thérapeutique.

II.2.2 Synthèse d'aures iodées

Le second axe de fonctionnalisation des aures exploré dans ce projet repose sur la synthèse d'aures iodées. Dans les travaux d'Ono *et coll.* portant sur la synthèse d'aures iodomarquées,^{154, 157, 247} les aures comportent très peu de substituants et sont issues de nombreuses étapes de synthèse permettant la formation d'un intermédiaire stannylé substitué *in fine* par de l'iode [¹²⁵I]. La synthèse d'aures iodées vise ici à répondre à deux problématiques : étudier l'impact de l'iode sur l'activité des aures, mais aussi investiguer la faisabilité de la synthèse d'aures iodées et polyhydroxylées en vue d'une éventuelle application en imagerie. La synthèse d'aures polyhydroxylées iodomarquées par l'intermédiaire de dérivés stannylés n'a pas été explorée par manque de temps. Dans ce projet, la synthèse d'aures iodées a d'abord été réalisée par condensation de benzofuran-3(2H)-ones iodées avec différents benzaldéhydes disponibles commercialement ou synthétisés au préalable. L'iodation directe d'aures polyhydroxylées a également été investiguée en parallèle avec de l'iode froid ainsi que de l'iode radioactif. Les tests en présence d'iode radioactif ont été effectués par Sandrine Bacot au Laboratoire de Radiopharmaceutique Clinique de Grenoble (INSERM U1039).

II.2.2.1 Tentatives d'iodation directe d'aures

Une première approche d'iodation directe a été basée sur une étude de Barolli *et al.* permettant de radiomarquer la quercétine avec de l'iode [¹³¹I].²⁶² Suivant ces conditions, l'aure **3g** dissoute dans de l'hydroxyde de sodium concentré a été mise en présence de chloramine T comme

oxydant et d'iodure de potassium (iode froid). Dans le cas de l'aurone **3g** cependant, aucune réaction n'a pu être observée (**Schéma 3.II.25**).

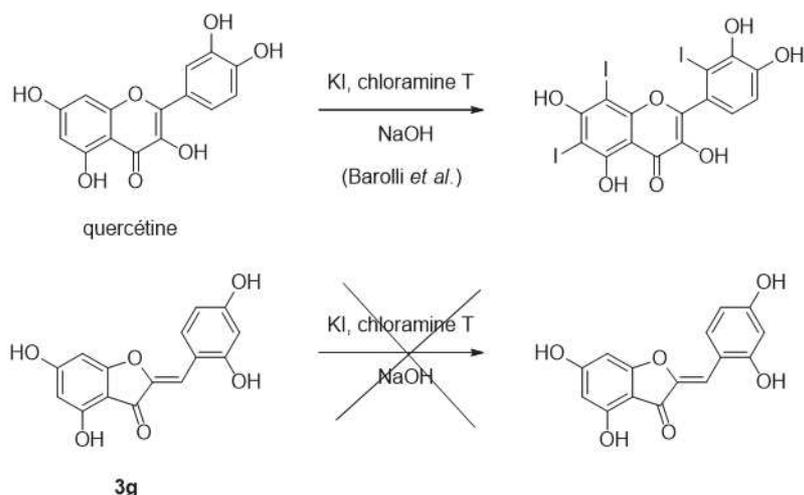


Schéma 3.II.25. Tentative d'iodation de l'aurone **3g** en présence de chloramine T.

En parallèle, une tentative de marquage direct de l'aurone **3g** a été effectuée au Laboratoire de Radiopharmaceutique Clinique de Grenoble (INSERM U1039) avec de l'iode [¹²⁵I] par l'intermédiaire d'Iodogène® sur support dans un milieu tamponné (phosphate 50 mM, pH 9). La radioiodation se fait par substitution électrophile de l'ion iodonium I⁺. L'aurone **3g** a ainsi été mise en présence d'un mélange d'une solution aqueuse d'iodure de sodium (Na¹²⁵I) et d'Iodogène® (phase solide) selon des conditions issues des travaux de Salacinsky *et al.*²⁶³ L'Iodogène® permet ici l'oxydation de l'iodure [¹²⁵I⁻] en ion iodonium [¹²⁵I⁺] (**Schéma 3.II.26**). Cette méthode a mené au radiomarquage de l'aurone **3g** avec une pureté radiochimique (PRC) sans purification de 50 %, ainsi qu'une dé-iodation de 10 % au bout de 24 h (**Figure 3.II.1**). Si l'aurone a effectivement été radiomarkée en partie, cette méthode s'est cependant heurtée à des problèmes de purification de l'aurone selon le protocole de la manipulation d'agents radioactifs.



Schéma 3.II.26. Iodation de l'aurone **3g** en présence d'Iodogène® sur support.

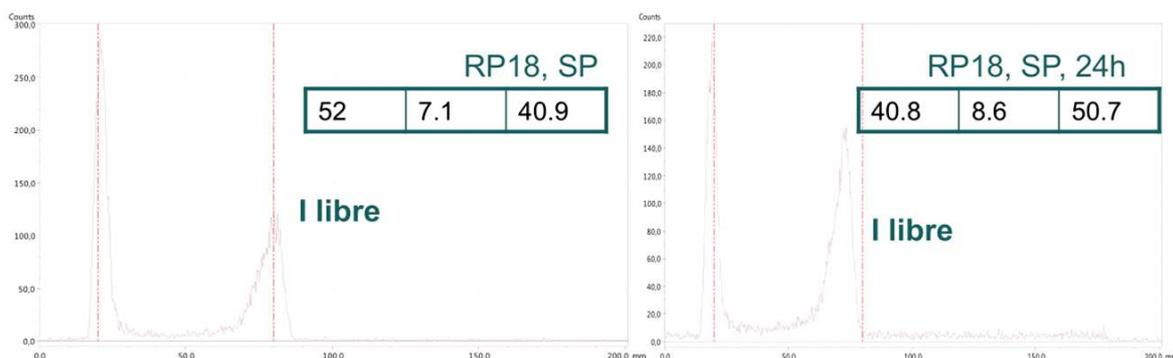


Figure 3.II.1. Suivi chromatographique du radiomarquage de l'aurone **3g*** : 52 % de **3g*** et 40,9 % de [¹²⁵I⁺] libre à t₀ ; 40,8 % de **3g*** et 50,7 % de [¹²⁵I⁺] libre à t_{24h}.

Par ailleurs, l'iodation directe avec de l'iode froid a été effectuée selon des conditions décrites dans la littérature²⁶⁴ sur la 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one par l'intermédiaire de diiode dans l'éthanol en présence d'une solution aqueuse d'acide iodique sur trois aurones différentes : l'aurone polyhydroxylée **3g**, l'aurone polyhydroxylée **4e** présentant une triple liaison sur le cycle B et l'aurone polyméthoxylée **3m** (Schéma 3.II.27). Cela a conduit dans le cas des deux aurones polyhydroxylées **3g** et **4e** à des mélanges de produits inséparables. Il est à noter que la triple liaison sur l'aurone **4e** n'a pas été iodée. En revanche, dans le cas de l'aurone 7,3',4',5'-tétraméthoxylée **3m**, l'iodation directe dans ces conditions n'a mené à aucune réaction.

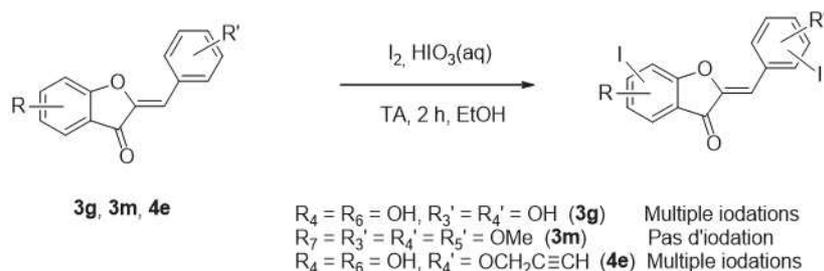


Schéma 3.II.27. Iodation des aurone **3g**, **3m** et **4e** en présence d'acide iodique et de diiode.

Les quelques méthodes testées pour l'iodation directe d'aurones ont montré des limites dans la synthèse ou la purification des composés. De plus, les méthodes employées souffrent d'une absence de généralisation et doivent être mises au point pour chaque composé, ce qui n'est pas idéal.

II.2.2.2 Synthèse d'aurones *via* des benzofuran-3(2H)-ones iodées

Une seconde approche pour l'obtention d'aurones iodées repose sur la synthèse des benzofuran-3(2H)-ones iodées, puis leur condensation avec différents benzaldéhydes.

L'iodation de quatre benzofuran-3(2*H*)-ones, la 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one et la 7-méthoxybenzofuran-3(2*H*)-one commerciales et les benzofuran-3(2*H*)-ones **II** et **III** synthétisées auparavant, s'effectue selon les conditions reportées sur la 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one.²⁶⁴ En présence de diiode dans l'éthanol et d'une solution aqueuse d'acide iodique comme oxydant, la réaction a conduit aux composés iodés **XI-XIII** exclusivement en position 7 du cycle A avec des rendements de 60 à 95 % (**Schéma 3.II.28**). En revanche, lorsque la position 7 est occupée par un groupe méthoxyle, aucune réaction n'a eu lieu, ce qui est en accord avec l'absence d'iodation observée dans ces conditions pour l'aurone 7,3',4',5'-tétraméthoxylée **3m** (**Schéma 3.II.27**).

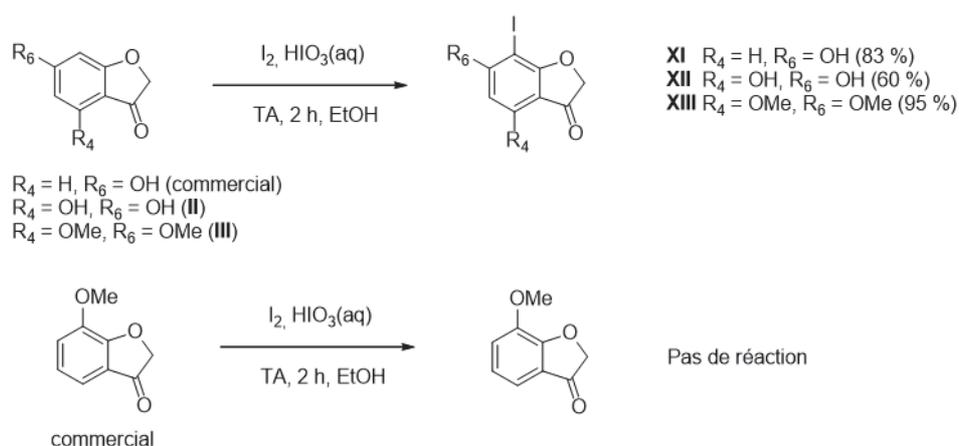


Schéma 3.II.28. Iodation de benzofuran-3(2*H*)-ones dans l'éthanol.

La condensation des benzofuran-3(2*H*)-ones iodées **XI-XIII** avec divers benzaldéhydes a été réalisée en milieu basique ou neutre en fonction des substituants présents (milieu basique pour les précurseurs hydroxylés, milieu neutre pour les précurseurs protégés). La condensation de la 6-hydroxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-one **XI** s'effectue ainsi dans le méthanol en présence d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (**Schéma 3.II.29**). Deux benzaldéhydes, le 4-propargyloxybenzaldéhyde **VI** et le 4-hydroxybenzaldéhyde, ont été utilisés et ont permis de former les aurones **4f** et **4g** avec des rendements de 24 à 65 % respectivement, l'aurone **4g** étant obtenue avec un plus faible rendement du fait d'une purification supplémentaire par recristallisation.

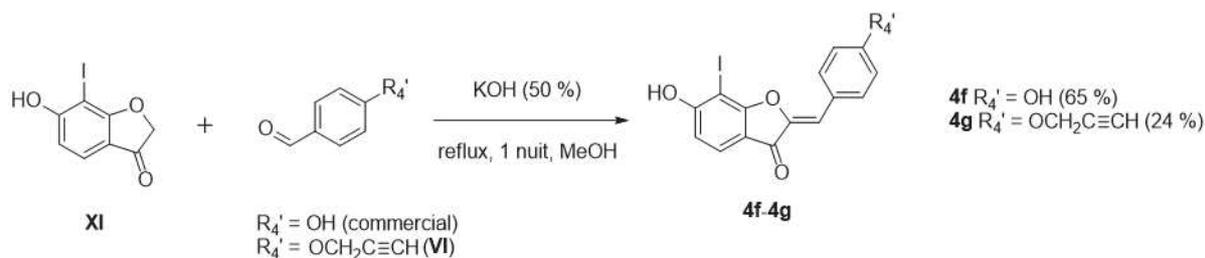


Schéma 3.II.29. Voie de synthèse des aurones iodées **4f-4g** via la 6-hydroxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-one.

La condensation à partir de la 4,6-dihydroxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-one **XII** a été réalisée avec des benzaldéhydes diméthoxylés ou présentant une triple liaison. Cette réaction a cependant mené à la formation des aurones correspondantes accompagnée d'une perte systématique de l'iode (**Schéma 3.II.30**).

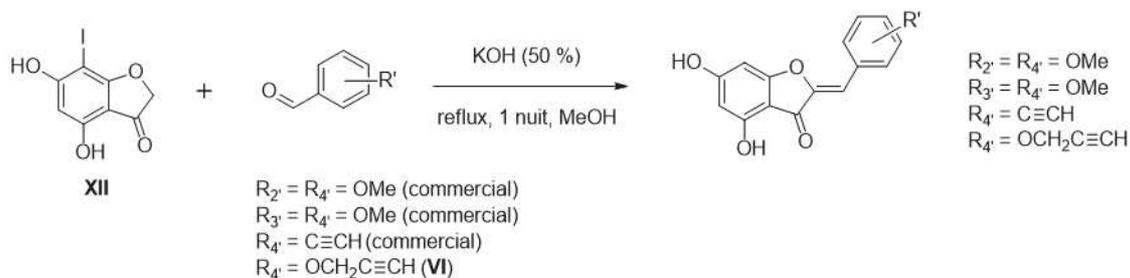


Schéma 3.II.30. Condensation de la 4,6-dihydroxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-one **XII** avec différents benzaldéhydes.

Ce phénomène de dé-iodation n'a en revanche pas été observé lors de la condensation de la 4,6-diméthoxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-ones **XIII** avec des benzaldéhydes triméthoxylés qui a mené à des rendements de 15 à 59 % (**Schéma 3.II.31**). Ces rendements sont en accord avec les tendances décrites auparavant, la condensation étant plus défavorisée par des substituants donneurs en *ortho* qu'en *méta* du benzaldéhyde (**Schéma 3.II.8**).

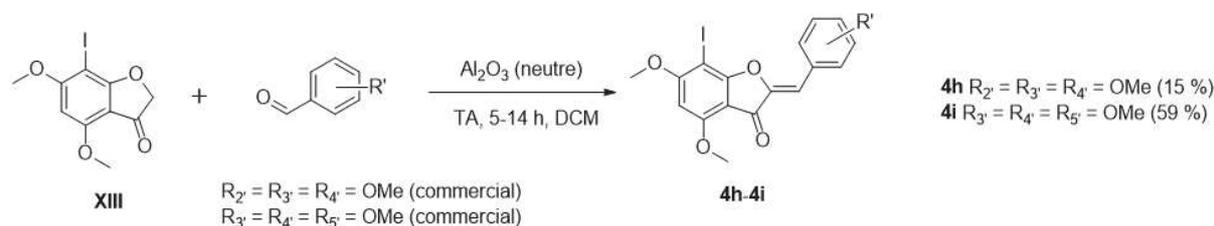


Schéma 3.II.31. Voie de synthèse des aurones iodées **4h-4i** via la 4,6-diméthoxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-one.

La perte de l'iode lors de la condensation de la benzofuran-3(2*H*)-one **XII** pourrait être expliquée par la présence des groupements hydroxyles voisins de l'iode. En effet, une étude de Talekar *et al.*²⁶⁵ décrivant un phénomène de dé-iodation de composés aromatiques comportant un iode en *ortho* d'un phénol suggère que la dé-iodation dépend de la présence des substituants voisins, bien que le mécanisme ne soit pas totalement établi. La différence observée entre les benzofuran-3(2*H*)-ones **XI** et **XII** pourrait ainsi être expliquée par la présence du groupement hydroxyle en *para* de l'iode pour la benzofuran-3(2*H*)-one **XII** qui favoriserait la dé-iodation (**Schéma 3.II.29** et **Schéma 3.II.30**). D'ailleurs, la protection des fonctions hydroxyles ne mène à aucune perte d'iode, comme l'illustre le cas de la benzofuran-3(2*H*)-one **XIII** **Schéma 3.II.31**).

Ce travail a permis d'explorer des conditions d'iodation des aurones. En particulier, l'iodation directe qui permettrait de radiomarquer les aurones pour des applications en imagerie semble difficile à réaliser et semble très dépendante de la structure. La synthèse d'aurones iodées par l'intermédiaire de benzofuran-3(2*H*)-ones iodées a ensuite été explorée afin d'étudier la faisabilité de la synthèse ainsi que l'impact de l'iode sur les aurones. Des conditions d'iodation de trois benzofuran-3(2*H*)-ones ont ainsi été mises au point. Cependant, l'obtention d'aurones par condensation de ces benzofuran-3(2*H*)-ones peut être limitée par un phénomène de dé-iodation, notamment dans le cas d'un groupement hydroxyle en *para* de l'iode.

Suite au criblage de la première chimiothèque, une trentaine d'aurones, dont quatre iodées, ainsi qu'un bioconjugué aurone-peptide ont été synthétisés au cours de ce projet. L'activité des aurones polyhydroxylées ou fonctionnalisées ainsi que du bioconjugué a été ensuite évaluée *in vitro* sur les modèles des fibres de tau (AcPHF6 et R3).

III EVALUATION DES AURONES

Cette dernière partie décrit dans un premier temps l'évaluation des aurones polyhydroxylées synthétisées sur les modèles AcPHF6 et R3, puis dans un second temps celle des aurones fonctionnalisées (aurones iodées, aurones portant une liaison triple et bioconjugué aurone-peptide). L'évaluation de l'activité de ces composés a été réalisée par l'intermédiaire des tests de fluorescence à la ThT utilisés auparavant (**Chapitre 2.I.2**). Le CD et l'AFM ont également été utilisés pour une caractérisation complémentaire de l'effet de ces composés sur la structure des fibres.

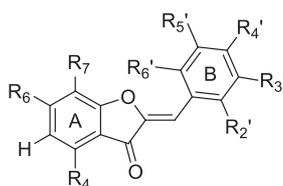
III.1 Cas des aurones polyhydroxylées

III.1.1 Tests à la ThT

Le test utilisant la ThT comme sonde fluorescente des fibres amyloïdes permet une évaluation rapide de l'activité des composés sur la fibrillation. Il a donc été utilisé comme pour le premier criblage (**Tables 2.II.1 et 2.II.2**) sur les modèles AcPHF6 et R3. En parallèle de ce test et pour apprécier les éventuels biais dus aux propriétés spectroscopiques des composés à tester, l'absorbance ainsi que la fluorescence des aurones testées seules et en présence de fibres ont été étudiées.

Les aurones polyhydroxylées évaluées lors de ce second criblage comportent jusqu'à cinq groupements hydroxyles (**Table 3.III.1**). Elles ont été testées à des concentrations de 10 μM et 1 μM en présence de 100 μM de peptide AcPHF6 ou de peptide R3 dans les conditions de fibrillation développées précédemment (tampon phosphate 50 mM, 10 μM de ThT et 100 μM d'héparine pour le peptide R3).

Table 3.III.1. Aurones polyhydroxylées. n.d. non déterminé.



Aurone	R ₄	R ₆	R ₇	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆ '	AcPHF6 (% inhibition)		R3 (% inhibition)	
									10 μM	1 μM	10 μM	1 μM
3a	H	H	H	H	OH	H	OH	H	30 ± 7	0	n.d.	n.d.
3b	H	OH	OH	H	H	H	H	H	87 ± 15	44 ± 19	49 ± 20	20 ± 5
3c	H	OH	OH	OH	H	OH	H	H	100 ± 1	53 ± 6	65 ± 5	19 ± 4
3d	OH	OH	H	H	H	H	H	H	50 ± 3	18 ± 3	20 ± 6	13 ± 12
3e	OH	OH	H	H	H	OH	H	H	51 ± 7	17 ± 6	41 ± 8	18 ± 6
3f	OH	OH	H	H	OH	H	OH	H	66 ± 2	16 ± 4	41 ± 14	10 ± 1
3g	OH	OH	H	OH	H	OH	H	H	85 ± 6	69 ± 5	52 ± 12	31 ± 5
3h	OH	OH	H	H	OH	OH	H	H	74 ± 7	62 ± 8	77 ± 3	30 ± 4
3i	OH	OH	H	H	OH	OH	OH	H	82 ± 7	49 ± 4	69 ± 6	18 ± 4
3j	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	76 ± 15	36 ± 6	38 ± 9	31 ± 8
3k	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	H	93 ± 9	38 ± 7	58 ± 3	39 ± 6
3l	H	H	OH	OH	OH	OH	H	H	93 ± 2	68 ± 11	86 ± 5	10 ± 10
3m	H	H	OH	H	OH	OH	OH	H	92 ± 3	62 ± 6	69 ± 10	28 ± 13

Similairement au premier criblage, l'activité des aurones polyhydroxylées dans le test en plaque est inférieure sur le modèle R3, celui-ci formant des fibres plus denses et moins accessibles aux aurones que celles du modèle AcPHF6. Les aurones les plus actives comportent généralement un nombre important de groupes hydroxyles, ce qui confirme la tendance établie auparavant, avec une activité supérieure à celle observée pour les aurones issues du premier criblage ou pour la myricétine. Dans ce second criblage, la contribution à l'activité des groupes hydroxyles a été étudiée en fonction de leur nombre, mais également de leur position sur l'aurone, notamment au travers des aurones dihydroxylées sur un même cycle. En particulier pour l'aurone **3d**, le motif résorcinol seul présent sur le cycle A amène à une inhibition de fluorescence de 50 % à 10 μM sur le modèle AcPHF6. Pour le composé **3a**, le motif résorcinol sur le cycle B conduit à une inhibition de fluorescence de 30 % à 10 μM sur le modèle AcPHF6, moins importante que lorsque ce motif se trouve sur le cycle A. La position des substituants hydroxyles peut donc contribuer de manière importante à l'activité. La présence de groupes hydroxyles sur le cycle A semble ainsi être nécessaire pour l'activité de l'aurone. Le composé **3b** possédant un motif catéchol sur son cycle A est d'ailleurs particulièrement efficace avec une

inhibition à 10 μM de 87 % sur le modèle AcPHF6 et 49 % sur le modèle R3. Généralement, l'activité augmente avec le nombre d'hydroxyles. Si la présence d'un seul groupe hydroxyle en para sur le cycle B ne modifie que très peu l'activité du composé **3e** par rapport au composé **3d**, deux groupes hydroxyles augmente nettement l'inhibition de fluorescence observée, notamment pour les aurones **3f-3h**. La meilleure activité sur le motif R3 a été observée pour les composés **3i** et **3k-3m** comportant un motif pyrogallol sur le cycle B, ainsi que pour l'aurone **3j** comportant un motif phloroglucinol sur le cycle B.

Suite à ce second criblage, les éventuels biais dus aux propriétés spectroscopiques des composés ont été évalués en mesurant l'absorption et la fluorescence de plusieurs aurones seules et en présence de fibres. L'absorbance de ces composés est généralement proche de celle des aurones du premier criblage (**Figure 3.III.1**) aux longueurs d'onde de l'étude (440 et 480 nm). En effet, la plupart des aurones étudiées ici à 10 μM dans le tampon phosphate 50 mM ont une absorbance modérée allant jusqu'à 0,2 à 440 nm (excitation de la ThT) et négligeable à 480 nm (émission de la ThT). La présence de faux-positifs dans les criblages effectués est donc peu probable dans les gammes de concentrations étudiées, l'absorption étant généralement faible à 10 μM et négligeable à 1 μM .

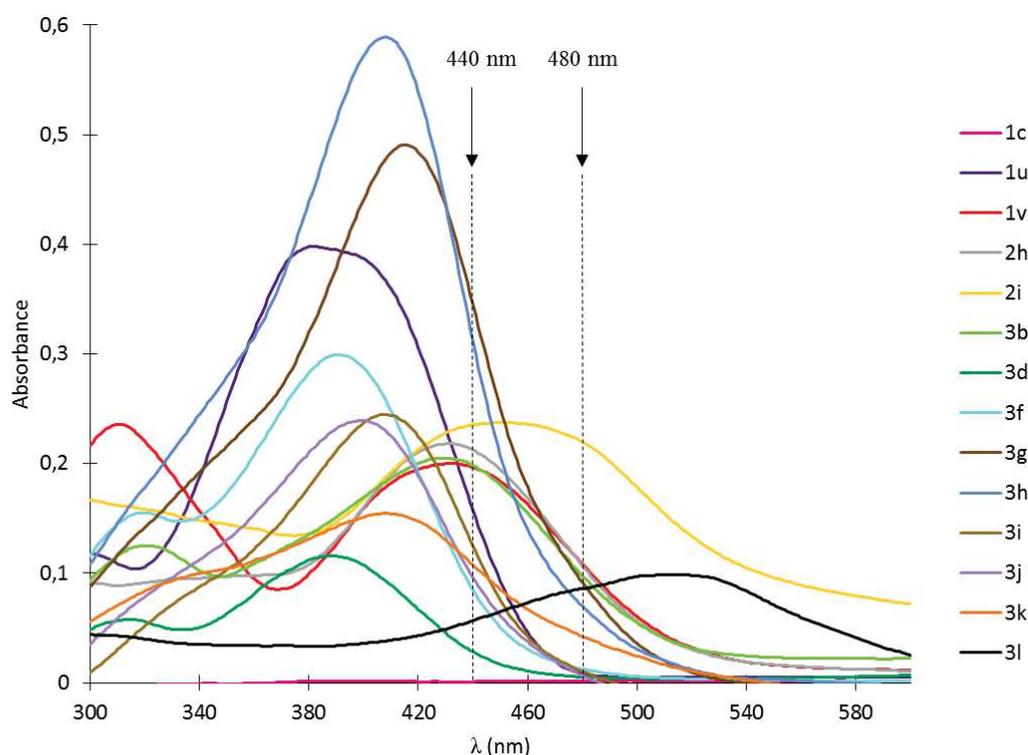


Figure 3.III.1. Absorption des aurones à 10 μM dans le tampon phosphate 50 mM.

Similairement au premier criblage, les aurones polyhydroxylées issues du second criblage ont été testées à 10 μM et ne présentent pas ou peu de biais sur la fluorescence de la ThT observée dans

le test en plaques. En effet, la fluorescence de ces aurones seules ou en présence de fibres est très faible par rapport à celle de la ThT à 480 nm. Ces aurones ont généralement montré une forte capacité à déplacer la ThT.

L'aurone **3b** présente une forte activité dans le test en plaque avec une inhibition de fluorescence de 87 % à 10 μM et 44 % à 1 μM . Cette aurone a une fluorescence quasi nulle par rapport à celle de la ThT et ne montre aucune modification significative de sa fluorescence en présence de fibres (**Figure 3.III.2**), ce qui permet de confirmer l'activité observée dans le test à la ThT. L'ajout de cette aurone (10 μM) sur des fibres du modèle AcPHF6 (100 μM) en présence de ThT (10 μM) conduit à une très forte diminution de fluorescence, ce qui tend à montrer la capacité du composé **3g** à interagir avec les fibres.

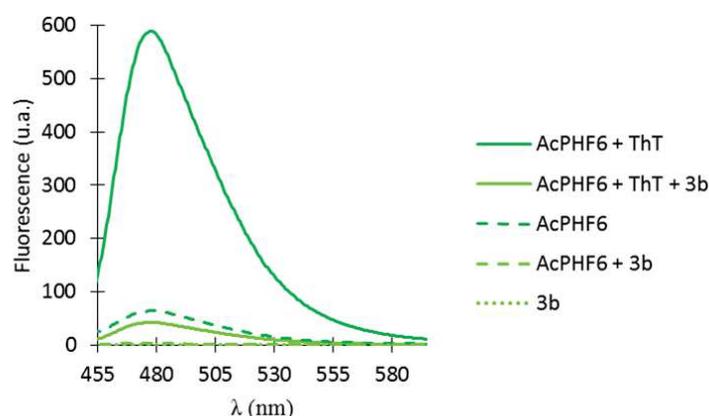


Figure 3.III.2. Fluorescence de l'aurone **3b** seule (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

De même, l'aurone tétrahydroxylée **3g** présente une forte activité sur le modèle AcPHF6 à 10 μM comme à 1 μM avec 85 % et 69 % d'inhibition de fluorescence respectivement. Elle fluoresce faiblement seule ou en présence de fibres et induit une forte diminution de fluorescence lorsqu'elle est ajoutée aux fibres en présence de ThT (**Figure 3.III.3.A**), ce qui confirme qu'elle ne biaise pas le test à la ThT et qu'elle est capable de déplacer la ThT. Ceci n'exclut pas une activité inhibitrice sur la fibrillation lors du test en plaque. L'aurone **3h**, isomère de position **3g**, présente les mêmes propriétés d'absorbance (0,31 à 440 nm, **Figure 3.III.1**), mais ne fluoresce pas seul ou en présence de fibres (**Figure 3.III.3.B**). En conséquence, son activité similaire à **3g**, avec 74 % et 62 % d'inhibition de fluorescence à 10 et 1 μM respectivement sur le modèle AcPHF6, n'est pas biaisée. Ces deux aurones interagissent donc efficacement avec les fibres.

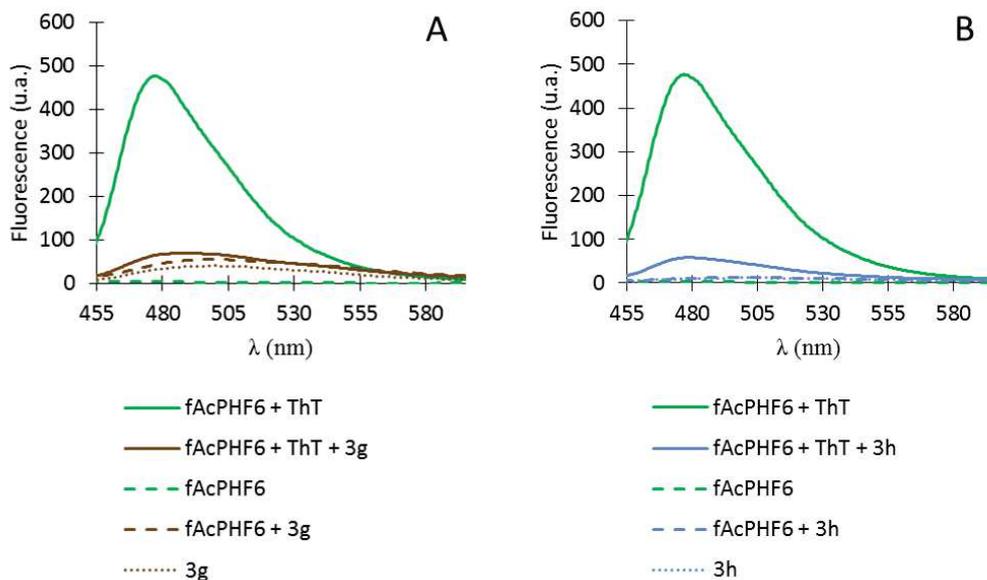


Figure 3.III.3. Fluorescence de l'aurone (A) **3g** et (B) **3h** seule (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

L'aurone tétrahydroxylée **3i** mène à une inhibition quasi-totale de fluorescence (93% à 10 μ M) dans le test en plaque sur le modèle AcPHF6. Cette aurone ne fluoresce pas seule ou en présence de fibres et ne biaise donc aucunement la fluorescence observée dans le test en plaque (**Figure 3.III.4**). L'ajout de **3i** aux fibres en présence de ThT diminue fortement la fluorescence observée, ce qui corrobore le résultat du test en plaque et montre une forte interaction de l'aurone **3i** avec les fibres.

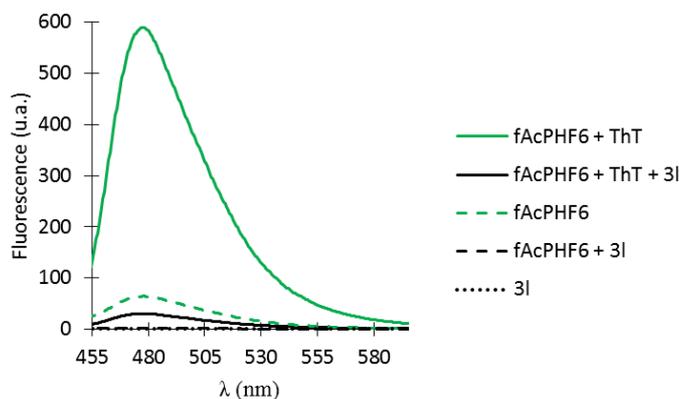


Figure 3.III.4. Fluorescence de l'aurone **3i** seule (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

Enfin, les aurones pentahydroxylées **3i**, **3j** et **3k** présentent une bonne activité sur les modèles AcPHF6 et R3, similaire à celle des aurones tétrahydroxylées **3g**, **3h** et **3i**. Les aurones **3i**, **3j** et **3k** ne fluorescent pas seuls ou dans les fibres du modèle AcPHF6. En revanche, en présence de fibres du modèle R3, la fluorescence du composé **3j** est exaltée. L'intensité de la fluorescence de cette aurone

reste néanmoins faible comparée à celle de la ThT liée dans le test en plaque. La contribution de ce biais ne suffit pas à expliquer la forte inhibition observée dans le test en plaque. De plus, l'ajout de cette aurone aux fibres de R3 en présence de ThT mène à une forte inhibition de fluorescence qui suggère que le composé **3j** déplace la ThT dans les fibres du modèle R3. Les composés pentahydroxylés interagissent donc fortement avec les deux modèles de fibres, à l'image de l'aurone **3k** qui inhibe la fluorescence de 39 % à 1 μ M sur les fibres du modèle R3.

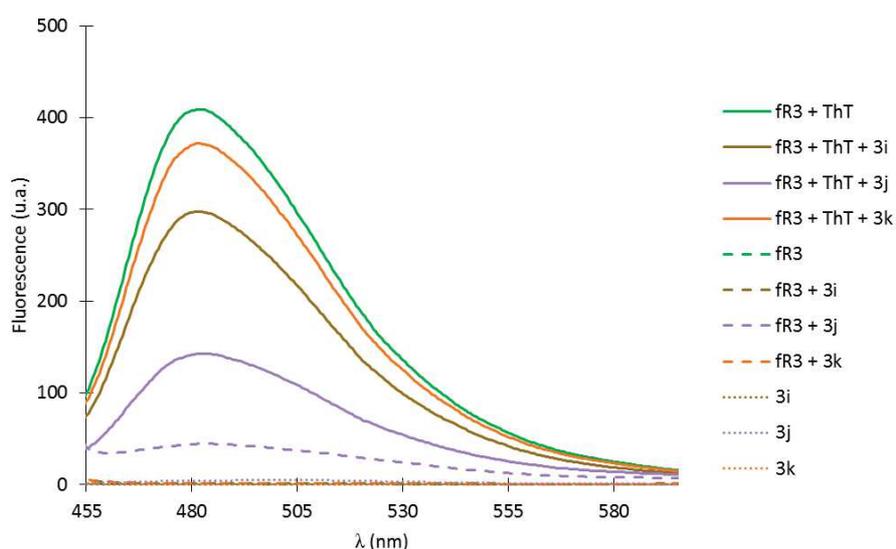


Figure 3.III.5. Fluorescence des aurones **3i**, **3j** et **3k** seules (pointillé), en présence de fibres du modèle R3 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

L'étude des propriétés spectroscopiques des aurones polyhydroxylées a permis de valider leur activité observée dans le test en plaque. En effet, les biais observés pour ces aurones sont généralement peu significatifs par rapport à la fluorescence de la ThT. Les aurones tétrahydroxylées et pentahydroxylées présentent en particulier une forte affinité pour les fibres des modèles AcPHF6 et R3 et peuvent déplacer la ThT. Afin de mieux caractériser l'action de ces aurones, des études complémentaires de CD et d'AFM ont été réalisées.

III.1.2 Dichroïsme circulaire et microscopie à force atomique

Dans l'optique de mieux caractériser en CD et en AFM l'interaction des aurones polyhydroxylées avec les fibres, les aurones ont été incubées avec chaque modèle (24 h pour AcPHF6 ou 3 jours pour R3) à une concentration de 100 μ M, soit un ratio peptide/aurone 1:1, dans les conditions de fibrillation développées auparavant (phosphate 50 mM, 100 μ M d'héparine pour le modèle R3). A cette concentration, les aurones polyhydroxylées inhibent complètement la

fluorescence observée lors des tests à la ThT. Les aurones évaluées sont tétrahydroxylées (**3g**, **3h**, **3i** et **3m**) ou pentahydroxylées (**3j** et **3k**).

Comme vu précédemment, le CD permet de déterminer la structure secondaire majoritairement présente dans un échantillon testé.⁴³ A ce titre, il est donc applicable aux deux modèles peptidiques (AcPHF6 et R3) qui forme des agrégats riches en feuillets β . Il peut notamment permettre d'évaluer d'éventuels changements conformationnels des peptides incubés en présence d'aurones. Le modèle AcPHF6 s'organise très rapidement en feuillets β comme en atteste l'absence de phase de latence dans le test de fibrillation en plaque, alors que le modèle R3 est plus lent avec une phase de latence d'environ une heure. Au cours du processus d'élongation, les oligomères, espèces supposées hautement toxiques dans le cas de la protéine tau,²⁷ adoptent une conformation en feuillets β , ce qui contribue également au signal observé en CD. En conséquence, seuls des composés capables d'inhiber la phase initiale de la fibrillation au cours de laquelle le peptide s'organise en oligomères structurés permettraient de modifier notablement le signal observé en CD, alors que des composés inhibant le processus d'élongation de ces oligomères en fibres résulteraient en un profil de feuillets β en CD.

L'incubation des aurones tétrahydroxylées **3g**, **3h**, **3i** et **3m** évaluées avec le modèle AcPHF6 a mené pour tous ces composés à l'obtention d'un profil de feuillets β en CD (**Figures 3.III.6.A et C**), avec quelques variations d'intensité de ce signal. A l'exception de **3i**, l'intensité est généralement moindre en présence d'aurones attestant une diminution de la structuration du peptide. Par contre, les aurones ne se montrent pas capables d'inhiber totalement la formation de feuillets β sur le modèle AcPHF6. Avec le modèle R3, les aurones tétrahydroxylées **3g** et **3h** conduisent à un profil en CD de feuillets β similaire au peptide R3 seul (**Figure 3.III.6.B**). En revanche, les aurones tétrahydroxylées **3i** et **3m** ont un impact notable sur la structuration du modèle R3, ce qui est caractérisé par une nette diminution de l'amplitude des feuillets β par rapport au modèle R3 seul (**Figure 3.III.6.D**).

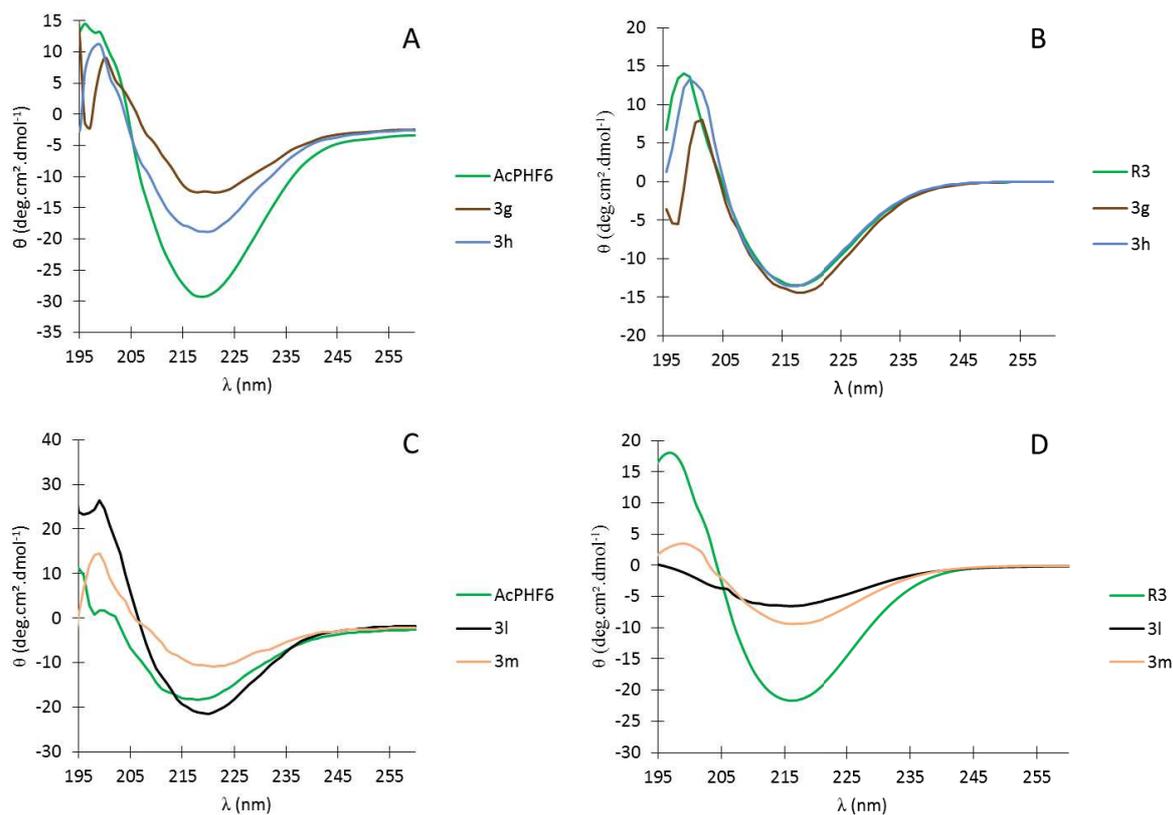


Figure 3.III.6. CD du modèle AcPHF6 (100 μM) incubé pendant 24 h avec les aurones (100 μM) (A) **3g** et **3h**, et (C) **3l** et **3m**. CD du modèle R3 (100 μM) incubé pendant 3 jours avec les aurones (100 μM) (B) **3g** et **3h** (100 μM), et (D) **3l** et **3m**.

Afin de confirmer les résultats obtenus pour les aurones **3l** et **3m**, une cinétique de fibrillation du modèle AcR3 (équivalent de R3) seul et en présence de ces composés a été réalisée sur 24 h (**Figures 3.III.7.A, B et C**, respectivement). Ces études ont validé l'absence ou la très faible présence de feuillets β en présence de ces deux aurones.

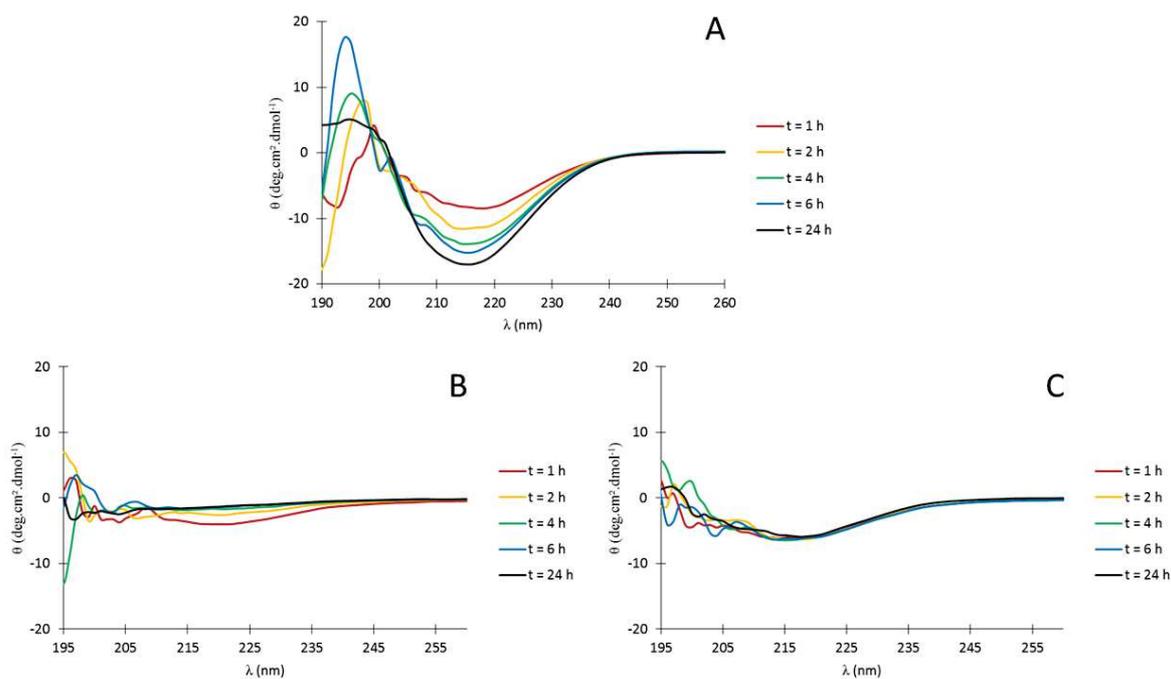


Figure 3.III.7. Cinétique de fibrillation sur 24 h du modèle AcR3 (A) seul et en présence des composés (B) **3i** et (C) **3m**.

L'incubation des aurones pentahydroxylés **3i**, **3j** et **3k** avec le modèle AcPHF6 donne également un profil de feuillets β en CD, bien que le composé **3k** diminue significativement ce signal (**Figure 3.III.8.A**). En revanche sur le modèle R3, ce profil tend à disparaître au profit d'un profil non structuré (**Figure 3.III.8.B**). Ce profil est particulièrement marqué pour les composés **3j** et **3k** avec une courbe négative entre 190 et 200 nm, représentatif d'un profil non structuré, par opposition à la composante positive d'un feuillet β à ces longueurs d'onde. Ces composés sont donc capables d'interférer sur le processus de fibrillation en prévenant l'organisation des agrégats en feuillets β .

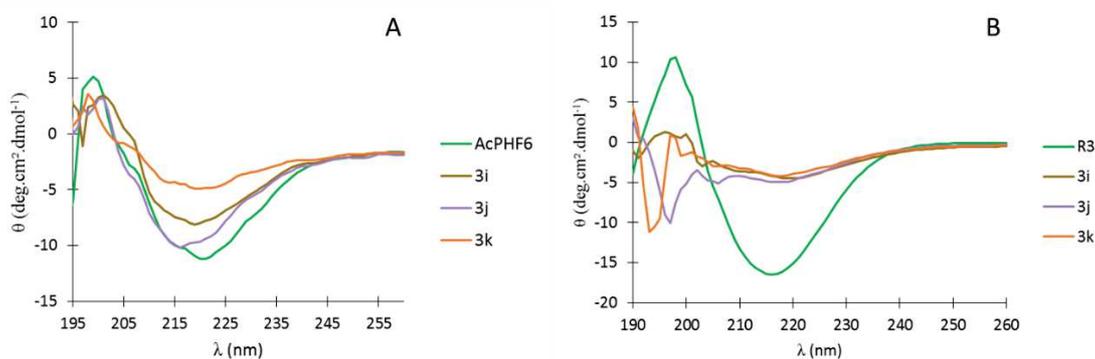


Figure 3.III.8. (A) CD du modèle AcPHF6 (100 μ M) incubé pendant 24 h avec les aurones **3i**, **3j** et **3k** (100 μ M). (B) CD du modèle R3 (100 μ M) incubé pendant 3 jours avec les aurones **3i**, **3j** et **3k** (100 μ M).

Enfin, l'AFM a permis de visualiser les fibres ou agrégats formés en présence ou en absence d'aurones. Bien qu'elle ne puisse être employée pour un criblage de molécules à haut débit, cette technique est complémentaire des autres tests utilisés dans ce projet. Les images AFM ci-après ont été enregistrées après incubation des aurones à une concentration de 100 μM en présence des deux modèles AcPHF6 et R3.

Les fibres du modèle AcPHF6 ont des morphologies différentes lorsqu'elles se forment en présence ou non des aurones tétrahydroxylées **3g** et **3h** et pentahydroxylées **3i**, ces aurones ayant toutes montré en CD une signature de feuillets beta plus ou moins intense. Avec le peptide AcPHF6 seul, de courtes fibres entremêlées se forment (**Figure 3.III.9.A**), comme en présence de l'aurone **3g** (**Figure 3.III.9.B**), bien que les fibres apparaissent plus rectilignes. Par contre, en présence de l'aurone **3h**, une forte diminution de la quantité de fibres est observée (**Figure 3.III.9.C**). Enfin, en présence de l'aurone pentahydroxylée **3i**, de telles fibres ne sont pas observées, laissant place à un « tapis moléculaire » (**Figure 3.III.9.D**).

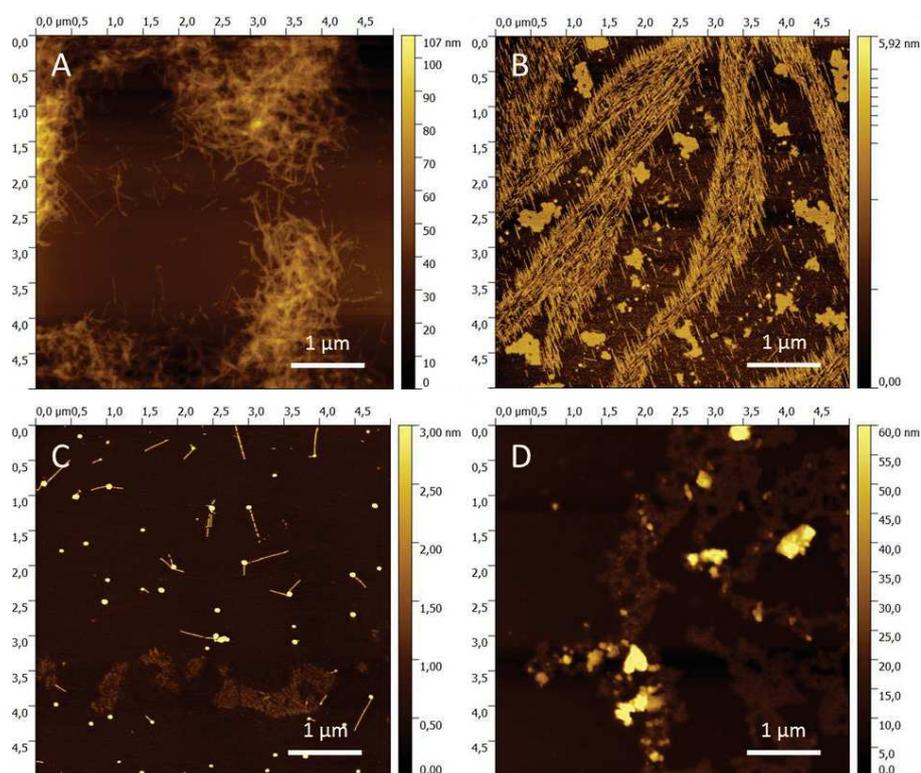


Figure 3.III.9. Images AFM du modèle AcPHF6 (100 μM) incubé pendant 2 h (A) seul et en présence des aurones (B) **3g**, (C) **3h** et (D) **3i** à 100 μM .

Ces cas de figure illustrent la diversité d'action des aurones. L'aurone **3g** interagit fortement avec les fibres du modèle AcPHF6 sans que cela soit synonyme d'inhibition. Il s'agit donc d'un composé capable de se fixer aux fibres. L'aurone **3h** inhibe partiellement la formation des fibres, alors que l'aurone **3i** interfère dans le processus d'agrégation à un stade plus précoce.

L'incubation du modèle R3 pendant 3 jours à 37 °C donne lieu à un réseau de fibres entremêlées plus longues (**Figure 3.III.10.A**) que le modèle AcPHF6. En présence de l'aurone **3g**, un réseau dense de fibres est formé (**Figure 3.III.10.B**), bien qu'à l'image du modèle AcPHF6, la morphologie des fibres formées diffère. De même qu'avec le modèle AcPHF6, l'incubation de R3 en présence de l'aurone **3h** donne lieu à une inhibition partielle de la formation des fibres avec un réseau de fibres moins dense (**Figure 3.III.10.C**).

Contrairement aux deux aurones tétrahydroxylées précédentes, les composés **3l** et **3m** modifient de manière significative la quantité de feuillets β en CD (**Figure 3.III.7.B**). En AFM, l'incubation du modèle R3 en présence de l'aurone tétrahydroxylée **3l** donne lieu à de courtes fibres avec un aspect cisailé (**Figure 3.III.10.D**), synonyme d'une forte inhibition. Un phénomène similaire est observé en présence de l'aurone **3m** avec quelques fibres plus courtes formées (**Figure 3.III.10.E**).

Enfin, l'incubation du modèle R3 en présence des aurones pentahydroxylées **3i**, **3j** et **3k** résulte en une inhibition plus marquée en AFM. En effet, l'incubation avec les aurones **3i** et **3j** donne lieu à un dense « tapis moléculaire » (**Figures 3.III.10.F** et **3.III.10.G**, respectivement), alors que de rares fibres éparses ont été observées pour l'aurone **3k** (**Figure 3.III.10.H**).

Les analyses CD et AFM sur le modèle R3 tendent à confirmer ce qui a été obtenu sur le modèle AcPHF6. Ainsi, l'aurone **3g** ne semble pas induire d'inhibition particulière malgré une forte interaction sur les modèles. L'aurone **3h** donne lieu à une inhibition partielle de la formation de fibres, alors que les aurones **3l** et **3m** mènent à une inhibition plus prononcée. Enfin les aurones pentahydroxylées **3i**, **3j** et **3k** semblent avoir un mode d'action plus efficace, avec notamment une inhibition apparente totale de la formation de fibres pour les composés **3i** et **3j**.

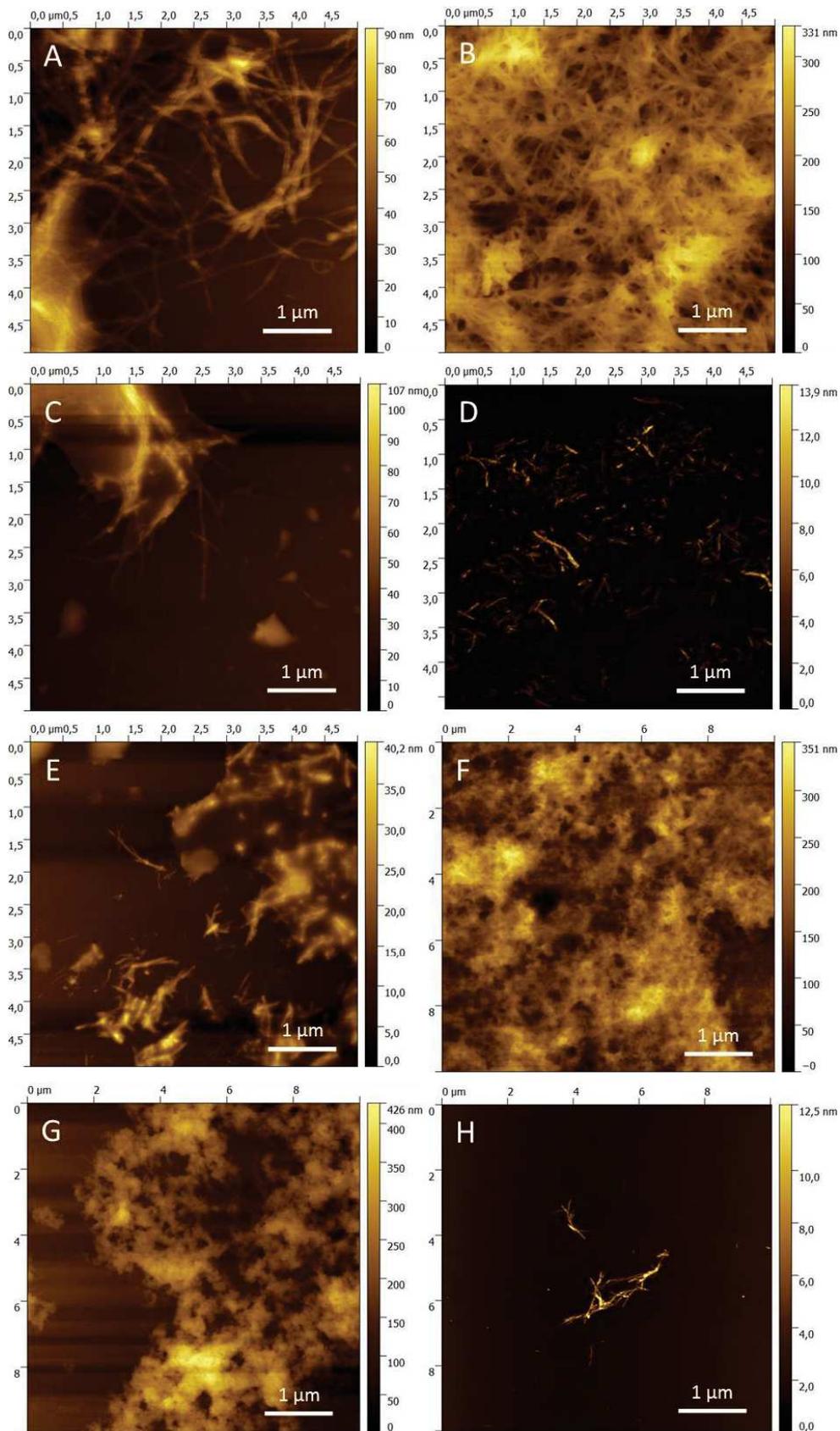


Figure 3.III.10. Images AFM du modèle R3 (100 μM) incubé pendant 3 jours (A) seul et en présence des auronés (B) 3g, (C) 3h, (D) 3l, (E) 3m, (F) 3i, (G) 3j et (H) 3k à 100 μM.

En conclusion, le criblage d'aurones polyhydroxylées a permis de souligner la forte affinité de ces aurones pour les fibres des modèles AcPHF6 et R3. L'utilisation du CD et de l'AFM comme techniques complémentaires aux tests de fluorescence a de plus permis de montrer que les aurones peuvent agir sur le processus de fibrillation de différentes manières :

- ☞ une inhibition partielle de la phase d'élongation. Ceci est marqué par une présence de fibres quantitativement plus faible, à l'image de l'aurone **3h**,
- ☞ une inhibition totale de la phase d'élongation. A l'instar des aurones **3l** et **3m**, cela est caractérisée par des fibres plus courtes, parfois cisailées,
- ☞ un maintien au stade d'oligomères non structurés en feuillets β . Cela a été observé pour les aurones pentahydroxylées **3i**, **3j** et **3k** pour lesquelles un « tapis moléculaire » a été observé au dépend de la formation de fibres.

Cela a également permis de montrer que les aurones peuvent se fixer aux fibres et sont en compétition avec la ThT. Ce phénomène est marqué par la présence d'un fort réseau de fibres qui peut varier légèrement au niveau de sa morphologie. Ce comportement est caractéristique d'une sonde, la molécule s'intercalant effectivement au sein des fibres sans nécessairement prévenir leur formation, comme c'est le cas pour l'aurone **3g**. Ceci souligne également que l'utilisation du CD et de l'AFM permet de discriminer entre les sondes et les inhibiteurs.

Enfin, ces tests ont généralement permis de mettre en avant l'intérêt d'utiliser des aurones comme polyphénols, mais également l'apport des groupements hydroxyles à travers certains motifs pour l'interaction avec les fibres des modèles. Les aurones polyhydroxylées les plus actives synthétisées au cours de ce projet comprennent un motif résorcinol en position 4 et 6 sur le cycle A, motif souvent présent dans les composés naturels et mis en avant dans la littérature pour leur activité sur les fibres amyloïdes. Certaines aurones hydroxylées en position 4 ou 7 sur le cycle A sont également particulièrement actives et devraient être plus amplement investiguées par la suite. Si la présence de groupements hydroxyles est nécessaire sur le cycle A, la forte activité observée chez certaines aurones provient également de la présence de ces substituants sur le cycle B. Aux motifs résorcinol et catéchol déjà mis en avant dans la littérature^{162, 266} peuvent ainsi s'ajouter le motif pyrogallol, que l'on retrouve notamment dans la myricétine et l'épicatéchine gallate, et le motif phloroglucinol.

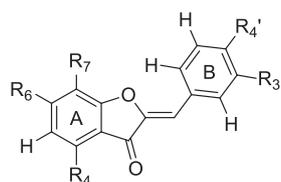
III.2 Cas des aurones fonctionnalisées

Cette partie décrit l'évaluation en fluorescence de l'activité des aurones dites « fonctionnalisées » sur la fibrillation des modèles par le test à la ThT. Celles-ci regroupent les cinq aurones portant une liaison triple, ainsi que deux aurones iodées en position 7. Enfin, l'action du bioconjugué aurone-peptide sur les fibres du modèle R3 est étudié par fluorescence, CD et AFM.

III.2.1 Tests de fluorescence à la ThT

Les aurones fonctionnalisées ont été testées à des concentrations de 10 μM et 1 μM en présence de 100 μM de peptide AcPHF6 ou de peptide R3 (**Table 3.III.2**) dans les conditions de fibrillation développées précédemment (tampon phosphate 50 mM, 10 μM de ThT et 100 μM d'héparine pour le peptide R3).

Table 3.III.2. Aurones fonctionnalisées. n.d. non déterminé.



Aurone	R ₄	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	AcPHF6 (% inhibition)		R3 (% inhibition)	
						10 μM	1 μM	10 μM	1 μM
4a	H	OCH ₂ C≡CH	H	H	H	11 ± 8	n.d.	n.d.	n.d.
4b	H	OCH ₂ C≡CH	H	H	OH	5 ± 4	n.d.	n.d.	n.d.
4c	H	OCH ₂ C≡CH	H	OH	H	19 ± 5	n.d.	n.d.	n.d.
4d	OH	OH	H	H	C≡CH	75 ± 16	28 ± 3	68 ± 6	27 ± 8
4e	OH	OH	H	H	OCH ₂ C≡CH	66 ± 5	n.d.	54 ± 7	n.d.
4f	H	OH	I	H	OH	61 ± 13	27 ± 13	20 ± 11	0
4g	H	OH	I	H	OCH ₂ C≡CH	85 ± 6	43 ± 10	44 ± 18	20 ± 8

Comme vu auparavant, l'activité des aurones dans le test en plaque est inférieure sur le modèle R3 au modèle AcPHF6 du fait des fibres plus denses et moins accessibles du premier. De même, l'absence de fonction hydroxyle sur le cycle A est synonyme d'une activité faible, à l'image des aurones **4a-4c** (5 à 19 % à 10 μM) sur le modèle AcPHF6. Cette faible activité associée à la difficulté de synthèse de ces composés a conduit à privilégier l'étude des aurones fonctionnalisées sur le cycle B

et hydroxylées sur le cycle A. En effet, l'activité des aurones hydroxylées sur le cycle A est nettement supérieure, à l'instar des composés **4d-4g** présentant une inhibition de fluorescence entre 61 et 85 % à 10 μM sur le modèle AcPHF6. Il est également à noter que les composés **4d** et **4e** présentent une activité légèrement supérieure à leur analogues respectifs **3d** et **3e** sans triple liaison. En effet, la diminution de fluorescence observée dans le test en plaque pour les aurones **4d** et **4e** à 10 μM est de 75 et 66 % sur le modèle AcPHF6 et de 68 et 54 % sur le modèle R3 respectivement, alors qu'elle est de 50 et 51 % sur le modèle AcPHF6 et 20 et 41 % sur le modèle R3 pour les aurones **3d** et **3e** respectivement à 10 μM .

Suite à ce dernier criblage, l'impact de l'iode sur la fluorescence a été étudié par comparaison entre l'aurone **1s** issue du premier criblage et ses analogues **4f** et **4g** iodés en position 7. L'absorbance des aurones **1s**, **4f** et **4g** à 10 μM (**Figure 3.III.11.A**) est similaire à 440 nm comme à 480 nm (longueurs d'onde utilisées pour le test en plaques). La fluorescence de l'aurone **1s** est en revanche très différente de ses analogues iodés. En effet, l'aurone **1s** fluoresce très fortement seule à 10 μM (**Figure 3.III.11.B**), à l'image de son isomère **1u** (**Chapitre 2.II.2.2**). Sa fluorescence est de plus fortement augmentée en présence de fibres du modèle AcPHF6, ce qui suggère un biais notable dans la fluorescence observée dans le test en plaque, cette fluorescence n'étant pas prise en compte dans les puits de contrôle. Ceci n'est en revanche pas le cas pour les aurones iodées **4f** et **4g** à 10 μM qui ne fluorescent pas seules et faiblement en présence de fibres (**Figure 3.III.11.B**). Ceci se traduit par une différence notable au niveau des valeurs d'inhibition de fluorescence pour les aurones **1s** (27 %), **4f** (61 %) et **4g** (85 %) à 10 μM sur le modèle AcPHF6 dans le test en plaque (**Tables 2.II.1** et **3.III.2**), le composé **1s** ayant été sous-estimé.

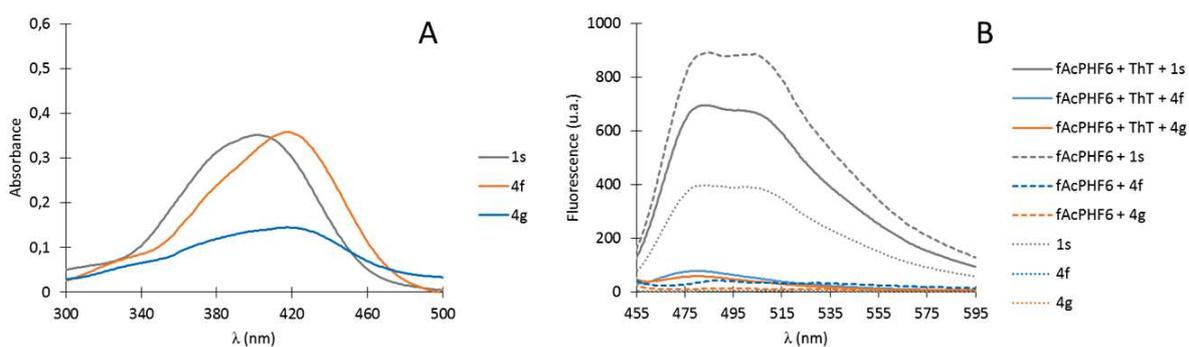


Figure 3.III.11. (A) Absorbance des aurones **1s**, **4f** et **4g**. (B) Fluorescence des aurones **1s**, **4f** et **4g** seules (pointillé), en présence de fibres du modèle AcPHF6 et en absence (tiret) ou en présence (trait) de ThT.

Les composés **4f** et **4g** interagissent donc fortement à 10 μM avec les fibres du modèle AcPHF6 et la présence d'iode sur le squelette des aurones ne semble pas présenter d'influence négative sur

leur activité. Ces composés ont également la capacité de déplacer la ThT d'après les tests de fluorescence effectués en présence de fibres.

III.2.2 Cas du bioconjugué aurone-peptide

L'évaluation du bioconjugué aurone-peptide vise à étudier la contribution du peptide VQIVYK sur l'activité de l'aurone, ainsi qu'à accroître la sélectivité du bioconjugué pour les fibres de tau. L'activité du bioconjugué a été évaluée *in vitro* sur le modèle R3 par des tests de fluorescence en plaque, CD et AFM (**Figure 3.III.12**). L'inhibition de fluorescence observée en présence du bioconjugué est de 68 % à 100 μM et de 20 % à 10 μM (**Figure 3.III.12.A**), ce qui est inférieur à celle de son précurseur aurone **4e** sans peptide (54 % à 10 μM) sur le modèle R3. Le profil de feuillettes β en CD est similaire pour les fibres de R3 seules et en présence du bioconjugué comme de l'aurone **4e** à 100 μM (**Figure 3.II.12.B**). Enfin, l'AFM montre une importante quantité de fibres en présence du bioconjugué (**Figure 3.II.12.C**) comme de l'aurone **4e** (**Figure 3.II.12.D**) à 100 μM .

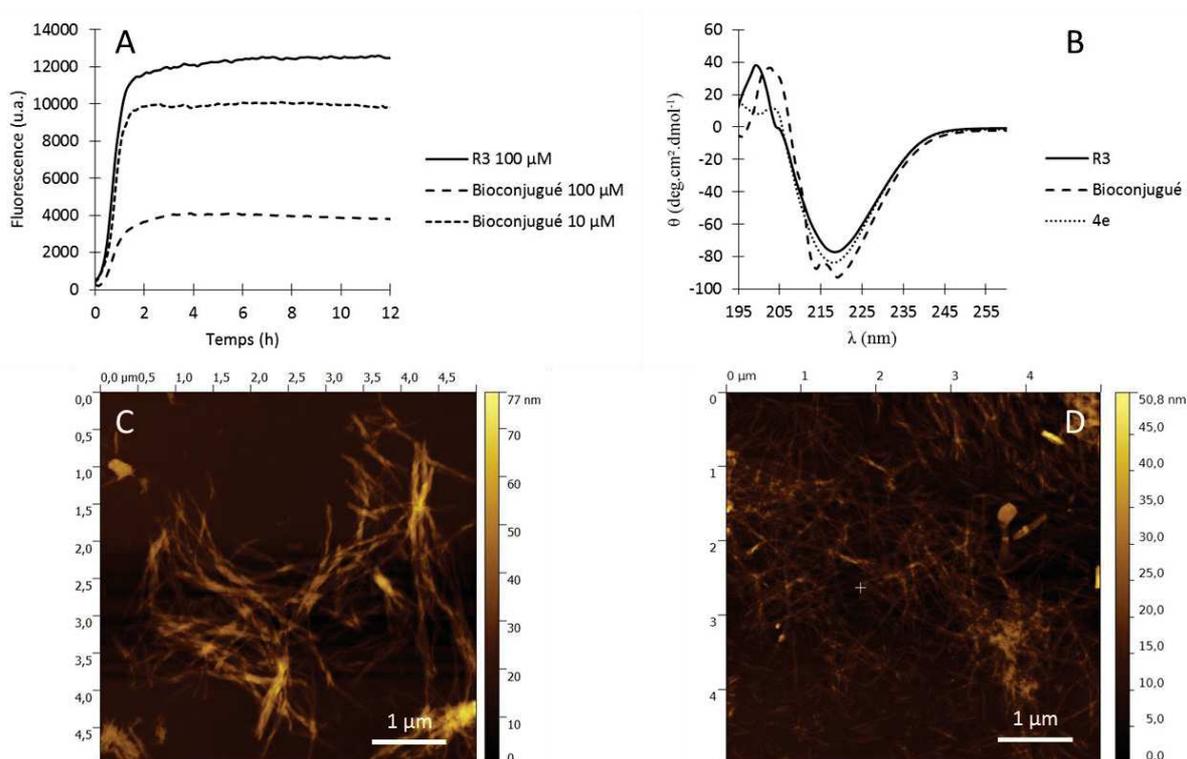


Figure 3.III.12. (A) Test de fluorescence en plaque du modèle R3 seul à 100 μM (ligne continue) et en présence du bioconjugué à 100 μM (traits larges) et 10 μM (traits courts). (B) Dichroïsme circulaire après 3 jours d'incubation à 37 °C pour le modèle R3 (ligne continue), le bioconjugué (trait) et l'aurone correspondante 4i (point) à 100 μM . (C) et (D) Images AFM du modèle R3 incubé pendant 3 jours à 37 °C en présence du bioconjugué (C) et de l'aurone **4e** (D) à 100 μM .

Contrairement à ce qui a été observé pour le peptide KLVFFA dans la fibrillation d'A β ,²⁵³ le peptide VQIVYK associée à un autre élément ne présente pas d'activité inhibitrice prononcée. Au contraire, l'association de ce peptide avec l'aurone **4e** diminue même l'activité de l'aurone **4e** seule dans le test en plaque (**Figure 3.III.12.A**), cette dernière ne présentant pas d'activité inhibitrice en CD et AFM (**Figures 3.III.12.B et D**). Ceci pourrait être attribué au fait que, contrairement à la séquence KLVFFA, la séquence VQIVYK n'est pas un casseur de feuillets β et a de plus la capacité à fibriller *in vitro*. L'association de cette séquence avec l'aurone ne semble donc pas suffisante pour prévenir son agrégation. Cette première évaluation associée à la difficulté de synthèse et de purification des bioconjugués ainsi qu'à leur très faible solubilité posent des limites importantes à l'utilisation de tels composés. Enfin, l'apport de sélectivité par ces composés reste à déterminer. Cela pourrait être réalisé par comparaison entre des tests d'inhibition sur la protéine tau native et le peptide A β . Néanmoins, ces travaux pourraient servir de base pour l'association des aurones à d'autres biomolécules. En particulier, celles-ci pourraient être associées à un peptide non-naturel D-TLKIVW décrit dans la littérature comme capable d'interagir efficacement *in silico* avec le motif VQIVYK et d'empêcher l'élongation du mutant K19 de tau *in vitro*.¹⁷⁶

En conclusion, la synthèse et l'évaluation de nouvelles aurones polyhydroxylées a conduit à l'identification de composés avec une bonne activité sur les modèles de fibres AcPHF6 et R3 à une concentration de 1 μ M, soit un ratio peptide/aurone 100:1. Confirmée par une étude approfondie des propriétés spectroscopiques des aurones seules et en présence de fibres, cette activité est synonyme d'une forte affinité des aurones pour les fibres amyloïdes de ces modèles, ce qui souligne la possibilité d'utiliser ces aurones comme sonde des fibres amyloïdes. Plusieurs aurones possédant quatre à cinq groupements hydroxyles sur leur squelette ont de plus montré une forte activité inhibitrice de la formation des fibres de ces modèles. Cette activité est notamment supérieure à la myricétine, inhibiteur de référence de la fibrillation de la protéine tau, ainsi qu'aux aurones issues du premier criblage et comportant moins de groupements hydroxyles. Bien que ces tests aient été réalisés sur des modèles peptidiques de fibres de tau, les résultats permettent d'affirmer le rôle de cette classe de composés sur la fibrillation de tau, en particulier à travers une utilisation diagnostique (sondes) ou thérapeutique (inhibiteurs de fibres).

Par ailleurs, la fonctionnalisation d'aurones a été étudiée, en particulier à travers la synthèse d'aurones portant une liaison triple sur leur squelette. Ces travaux ont conduit à l'association d'une aurone avec la séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ d'intérêt à travers la synthèse d'un bioconjugué aurone-peptide visant notamment à augmenter la sélectivité de l'aurone pour les fibres de tau. Cependant, l'obtention

de ce bioconjugué est limitée, notamment à travers une purification difficile avec un très faible rendement (6 %). De plus, la présence du peptide sur le bioconjugué n'a pas contribué à augmenter l'affinité de l'aurone associée pour les fibres. Enfin, l'apport de ce bioconjugué à la sélectivité des fibres de tau par rapport à celle du peptide A β n'a pas pu être évalué dans ce projet et reste à déterminer.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce projet de recherche a permis d'étudier l'activité des aurones sur la fibrillation de la protéine tau, phénomène intervenant dans de nombreuses maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer. Cela a été réalisé à travers l'utilisation et le développement des peptides AcPHF6 et R3 issus de la séquence de la protéine tau et capables de former des fibres similaires à celle-ci. La fibrillation de ces peptides a été évaluée par des tests *in vitro* de fluorescence à la ThT, de dichroïsme circulaire et de microscopie à force atomique. Précédemment illustré dans la littérature, l'utilisation du peptide AcPHF6 comme modèle de fibres de tau a été adaptée dans le cadre de ce projet pour le criblage de plusieurs séries d'aurones. Le modèle R3 préalablement synthétisé au sein du laboratoire (Département de Chimie moléculaire) a été développé pour l'évaluation des aurones. Les tests réalisés sur ce dernier modèle en présence d'inhibiteurs de la fibrillation de tau ont montré que celui-ci constitue un modèle représentatif de la fibrillation de la protéine tau native, avec notamment l'implication de la cystéine 322 permettant la formation de dimères, mais également à travers la formation de fibres structurellement similaires à celles de la protéine tau en AFM. Le criblage d'une chimiothèque disponible d'aurones sur ces deux modèles a permis de souligner le potentiel de cette classe de composés sur la fibrillation de tau, mais également la contribution à l'activité des fonctions hydroxyles présentes sur les aurones.

Une deuxième partie de ce projet a donc consisté à synthétiser des aurones polyhydroxylées comportant un nombre plus important de fonctions hydroxyles et à les évaluer sur les modèles AcPHF6 et R3. Cette étude a mené à la synthèse de treize aurones polyhydroxylées possédant jusqu'à cinq groupements hydroxyles qui ont permis d'enrichir la chimiothèque d'aurones. Ce projet a ainsi permis de mettre en avant une synthèse rapide de nouvelles aurones polyhydroxylées, ou d'aurones polyhydroxylées présentes dans la nature en faible quantité, à l'image de l'auréusidine (composé **3h**) ou de la bractéatine (composé **3i**). L'évaluation *in vitro* par fluorescence à la ThT de ces nouvelles aurones a montré que celles-ci peuvent interagir avec les fibres des deux peptides AcPHF6 et R3 avec une activité de l'ordre du micromolaire, soit un ratio peptide/aurone 100:1. En particulier, une série d'aurones comportant un motif résorcinol en positions 4 et 6 sur le cycle A, motif largement présent dans les aurones naturelles, a présenté une bonne activité générale sur les fibres qui a été accrue par l'ajout de groupements hydroxyles sur le cycle B de l'aurone. D'autres aurones hydroxylées en position 4 ou en position 6 et 7 sur le cycle A ont également montré une activité intéressante sur les modèles AcPHF6 et R3. La synthèse de nouvelles séries d'aurones avec ces motifs sur le cycle A pourraient donc

faire le fruit de futures investigations. Cela pourrait être réalisé par la synthèse intermédiaire d'aurones méthoxylées comme illustré dans ce projet par la série d'aurones obtenue à partir de la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one. La série avec un groupement hydroxyle en position 7 a également été complétée par la synthèse de deux aurones portant un motif pyrogallol sur le cycle B (trois fonctions hydroxyles voisines) qui ont montré une forte interaction avec les fibres. La corrélation des études de fluorescence avec le CD et l'AFM a permis de montrer que l'interaction des aurones avec les fibres pouvaient dans certains cas interférer avec le processus de fibrillation. Si la plupart des aurones actives dans les tests de fluorescence ont agi en tant que sonde des fibres, les aurones présentant une affinité supérieure à la ThT pour les fibres (déplacement de la ThT), certaines aurones tétrahydroxylées et pentahydroxylées ont également montré un caractère inhibiteur prononcé de la fibrillation. En particulier, les aurones pentahydroxylées stabiliseraient les oligomères de tau. Ces résultats soulignent le potentiel des aurones pour une utilisation diagnostique comme thérapeutique sur la fibrillation de la protéine tau.

Une seconde partie exploratoire a consisté à étudier la fonctionnalisation d'aurones pour leur association avec d'autres biomolécules. Ceci a été réalisé par l'ajout d'une liaison triple sur le squelette de l'aurone. L'ajout de cette liaison sur le cycle B en présence de fonctions hydroxyles sur le cycle A est plus favorable que l'inverse au niveau de la synthèse comme de l'activité de ces composés. Ces travaux ont mené à la synthèse d'un composé bioconjugué aurone-peptide par cycloaddition de Huisgen avec le peptide VQIVYK. La synthèse de tels composés a pour objectif d'augmenter la sélectivité des aurones pour les fibres de tau. Bien que l'obtention du bioconjugué ait été limitée par une purification difficile, celui-ci a été évalué *in vitro* sur la fibrillation du modèle R3 par fluorescence à la ThT, CD et AFM. Le bioconjugué a montré une activité moindre en fluorescence que l'aurone associée seule, et un profil similaire en CD et en AFM, suggérant que l'association de ce peptide avec les aurones ne contribue pas positivement à l'activité. La contribution de ce motif à la sélectivité n'a pas pu être évaluée dans ce projet et reste à déterminer. Une perspective intéressante de ces travaux serait l'association des aurones avec une autre biomolécule. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, une telle biomolécule pourrait être le peptide non-naturel D-TLKIVW décrit dans la littérature comme capable d'interagir efficacement avec le motif VQIVYK et d'inhiber la phase d'élongation de la fibrillation.

Un dernier axe de recherche a porté sur l'introduction d'iode aux aurones polyhydroxylées. Cette étude s'appuie sur le caractère de sonde des aurones polyhydroxylées et a été réalisée dans la perspective d'évaluer leur capacité à marquer des fibres amyloïdes *in vivo* à travers l'association aux aurones d'un iode radioactif. Des tests de fluorescence effectués sur des aurones iodées ont permis de montrer que l'ajout d'un iode sur le squelette ne modifie pas l'activité observée pour ces aurones.

En revanche, les premières études réalisées dans le cadre de ce projet ont montré que l'insertion directe d'un iode sur le squelette des aurones polyhydroxylées est difficile et nécessite davantage de développement. Une alternative consisterait à associer cet iode par l'intermédiaire d'un bras espaceur fixé à l'aurone, ce qui pourrait être réalisé par cycloaddition de Huisgen en utilisant les conditions développées dans ce projet.

Une perspective à ces travaux de thèse pourrait être l'utilisation de techniques plus récemment développées, telles que la résonance plasmonique de surface ou la résonance magnétique nucléaire en phase solide, afin de mieux caractériser l'affinité des aurones pour les fibres des modèles de tau. En outre, bien que l'activité inhibitrice de certaines aurones soit prometteuse avec un ratio peptide/inhibiteur similaire ou supérieur à celui des inhibiteurs de la fibrillation de tau décrits dans la littérature, elle n'est cependant établie que sur des modèles de fibres de tau *in vitro*. L'activité inhibitrice ou de sonde des aurones devra donc être confirmée sur les fibres de la protéine tau native *in vitro*, mais aussi *in vivo*. A cet égard, les aurones présentent des propriétés physico-chimiques favorables à leur utilisation *in vivo*, comme l'ont montré plusieurs études dans la littérature, notamment une bonne capacité à passer la barrière hémato-encéphalique et une faible toxicité. Ces données devront néanmoins être confirmées dans le cas des aurones polyhydroxylées mises en avant dans ce projet.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

EXPERIMENTAL PROCEDURE

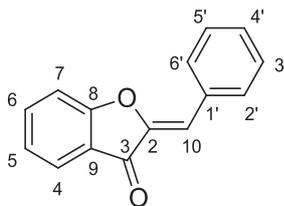
Material and Methods

Synthesis and purification

Commercially available reagents and solvents were purchased from Aldrich, Alfa Aesar, TCI, Acros Bachem, Novabiochem, Merck or Activotech and were used without further purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (plates coated with silica gel 60 F₂₅₄ from Merck) or by reverse-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a Nucleosil C18 column (300 Å, 125 x 3 mm, 5 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm. A 1 mL/min flow linear gradient of 5-100 % acetonitrile in water was applied over 20 min (both water and acetonitrile contained 0.1% TFA). Non-peptidic products were purified with column chromatography on Silica gel 60 (230-400 mesh from Macherey-Nagel) or by automatic flash chromatography with the Grace device: Reveleris X2.

Characterization

¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents on a Brüker AC-400 or Avance III 500 instrument (400 or 500 MHz for ¹H spectra, 100 or 125 MHz for ¹³C spectra, respectively). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to TMS as internal standard or relative to the solvent [¹H: δ(DMSO-*d*₆) = 2.50 ppm, δ(CDCl₃) = 7.26 ppm, δ(CD₃OD) = 3.33 ppm; ¹³C: δ(DMSO-*d*₆) = 39.51 ppm, δ(CDCl₃) = 77.23 ppm, δ(CD₃OD) = 49.00 ppm]. Multiplicity is reported as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Coupling constants *J* are given in Hertz. Interpretation of ¹H and ¹³C NMR spectra were supported by the resolution of 2D COSY and HMBC spectra. Protons and carbons of auronones and their precursors were numbered as below when associated with ¹H and ¹³C NMR signals, unless specified otherwise. Me_x designates a methyl group where *x* refers to the position of the carbon on which the methyl Me stands. This designation is also used in the case of methoxyl (OMe_x) or carboxyl (COO_x) groups, as well as the methyl groups linked to these carboxyl functions (COOMe_x). Auronones were obtained solely as *Z*-isomers as confirmed by ¹³C NMR (δ(C₁₀) ~ 110 ppm).²⁶⁷



Electrospray ionization (ESI) mass spectra were acquired by the Institute of Molecular Chemistry of Grenoble (ICMG – FR 2607) on an Esquire 3000 Plus Bruker Daltonis instrument with a nanospray inlet. Accurate mass measurements (HRMS) were carried out on a ESI/QTOF with the Waters Xevo G2-S QToF device. HPLC analyses were performed with an Agilent 1100 series using a diode array detector and a C18 reversed-phase column (Nucleosil C18, Macherey-Nagel, 5 μm particle size, 125 mm \times 3 mm) at 45°C, with a mobile phase composed of A = water and TFA 0.1 % and B = MeOH and TFA 0.1 % with a gradient 85:15 to 0:100 A:B over 10 min, 1 mL/min, 30 μL injection, detection at 254 nm. Purity of the reported compounds were ≥ 95 %. Combustion analyses (Anal.) were performed by the ICMG. Melting points (m.p.) expressed in degree Celsius ($^{\circ}\text{C}$) were measured on a Büchi B540 apparatus. Microwave reactions were carried out on a Biotage Initiator+ SP Wave.

General procedures for the synthesis of aurones and their precursors

Procedure A: Synthesis of aurones *via* basic-mediated aldolic condensation in methanol at 65 °C

A benzofuran-3(2*H*)-one derivative (1 equiv.) was dissolved into MeOH (15 mL/mmol). An aqueous solution of potassium hydroxide (50 %, 1.5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1.2 to 1.5 equiv.) were added to the mixture which was stirred at 65 °C until disappearance of the starting material (5 to 15 h), then concentrated under reduced pressure. The mixture was diluted with water and acidified with 1 M HCl until pH 2-3 was reached, then extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one derivative.

Procedure B: Synthesis of aurones *via* basic-mediated aldolic condensation in methanol using a microwave reactor

4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (1 equiv.) was dissolved into MeOH (15 mL/mmol). An aqueous solution of potassium hydroxide (50 %, 1.5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1.5 equiv.) were added to the mixture which was stirred at 70 °C in the microwave reactor for 2 to 10 h and concentrated under reduced pressure. The mixture was diluted with water and acidified with 1 M HCl until pH 2-3 was reached, then extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidene-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one derivative.

Procedure C: Synthesis of aurones *via* neutral alumina-mediated aldolic condensation in dichloromethane at room temperature (rt)

To a solution of a benzofuran-3(2*H*)-one derivative (1 equiv.) in anhydrous dichloromethane (20 mL/mmol) were added a benzaldehyde derivative (1.2 to 1.5 equiv) and neutral aluminium oxide (4.0 g/mmol). The suspension was stirred at rt under nitrogen until complete disappearance of the starting material (3 to 12 h), then filtered, washed with dichloromethane and concentrated under

reduced pressure. The product was recrystallized in MeOH, filtered off and washed with MeOH to afford the pure (Z)-2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-one derivative.

Procedure D: Synthesis of aurones via basic-mediated aldolic condensation in ethanol at 80 °C

A benzofuran-3(2H)-one derivative (1 equiv.) was dissolved into EtOH (3 mL/mmol). An aqueous solution of potassium hydroxide (50 %, 5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1 to 2 equiv.) were added to the mixture which was stirred at 80 °C until disappearance of the starting material (2 to 5 h), then concentrated under reduced pressure. The mixture was diluted with water and acidified with 1 M HCl until pH 2-3 was reached, then extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (Z)-2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-one derivative.

Procedure E: Synthesis of aurones via deprotection of methoxy analogues

To a solution of a (Z)-2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-one derivative (1 equiv.) in anhydrous dichloromethane (10 mL/mmol) was added pure boron tribromide (20 equiv.) at 0 °C. The solution was then stirred at rt or 40 °C for one to three days. The mixture was then cooled in an ice-bath, diluted with cold water, then extracted with ethyl acetate (3 times), washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (Z)-2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-one derivative.

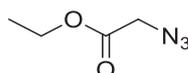
Procedure F: Iodination of benzofuran-3(2H)-ones

A benzofuran-3(2H)-one derivative (1 equiv.) was dissolved in ethanol (30 mL/20 mmol). Iodine (0.4 equiv.) was added, followed by the dropwise addition of a solution of iodic acid in water (0.2 equiv., 4.5 mL/mmol). The mixture was stirred at rt for 2 h, then diluted with water and stirred for another 30 min. The resulting precipitate was filtered off, washed with saturated aqueous sodium thiosulfate and water, then dried in the oven to afford the pure benzofuran-3(2H)-one derivative.

Synthesis of aurones and their precursors

Synthesis of azide derivatives

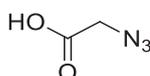
Synthesis of intermediates **IX** and **X** was achieved according to the procedure previously described in the literature.²⁵²



ethyl 2-azidoacetate (IX)

In DMSO (20 mL) were dissolved ethyl iodoacetate (4.68 mmol, 0.55 mL) and sodium azide (7.00 mmol, 556 mg). The mixture was stirred at rt overnight. The product was extracted with diethyl ether (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Yield: 94 % (clear oil).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 4.26 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH₂), 3.86 (s, 2H, CH₂), 1.31 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 168.3 (COO), 61.9 (OCH₂), 50.4 (CH₂), 14.1 (CH₃).



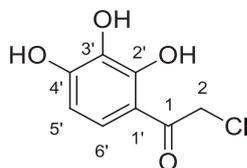
2-azidoacetic acid (X)

In DMSO (20 mL) were dissolved 2-iodoacetic acid (5.38 mmol, 1.00 g) and sodium azide (8.07 mmol, 524 mg). The mixture was stirred at rt overnight. The mixture was diluted with water and acidified with 1 M hydrochloric acid until pH 2 was reached, then extracted with diethyl ether (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated. Yield: 29 % (yellow oil).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.96 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 169.1 (COO), 49.6(CH₂).

Synthesis of benzofuran-3(2H)-one derivatives

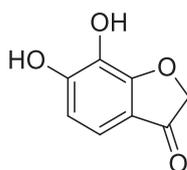
Synthesis of intermediates **I'**, **I**, **II** and **III** was achieved according to the procedure previously performed at the DPM.²⁶⁸



2-chloro-1-(2,3,4-trihydroxyphenyl)ethanone (I')

Pyrogallol (60 mmol, 7.5 g), chloroacetic acid (71 mmol, 6.74 g) and boron trifluoride diethyl etherate (0.25 mL/mmol) were mixed together and stirred at 65 °C for 3 h. After cooling, the mixture was diluted with distilled water and extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduce pressure. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 73 % (yellow powder).

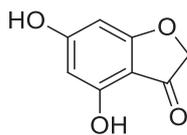
m.p. 165-168 °C {lit.²⁶⁸ **m.p.** 165-168 °C}. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.30 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{6'}), 6.44 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{5'}), 4.79 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):** δ ppm 197.3 (C₁), 154.3 (C_{4'}), 153.7 (C_{2'}), 133.9 (C_{3'}), 123.7 (C_{6'}), 112.7 (C_{1'}), 109.2 (C_{5'}), 46.2 (C₂).



6,7-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (I)

2-chloro-1-(2,3,4-trihydroxyphenyl)ethanone **I'** (42.7 mmol, 8.65 g) was dissolved into EtOH (100 mL). Sodium acetate (82.0 mmol, 10.5 g) was added, then the mixture was stirred at reflux for 6 h. After cooling, the product was filtered off, washed with water and dried in the oven. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 91 % (yellow powder).

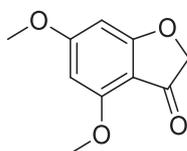
m.p. 231-232 °C {lit.²⁶⁸ **m.p.** 231-232 °C}. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.06 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 6.61 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₅), 4.68 (s, 2H, H₂). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):** δ ppm 201.0 (C₃), 165.6 (C₆), 156.0 (C₈), 131.7 (C₇), 116.2 (C₄), 115.6 (C₉), 113.1 (C₅), 77.0 (C₂). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₈H₇O₄ [M+H]⁺ 167.0338, found 167.0341.



4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (II)

To a solution of phloroglucinol (119 mmol, 15.0 g) in diethyl ether (250 mL) at 0 °C were added chloroacetonitrile (119 mmol, 7.5 mL) and dried zinc chloride (11.9 mmol, 1.62 g). The mixture was allowed to react with gaseous hydrochloric acid at 0 °C for 1 h. The resulting suspension was stirred at 0 °C for 1.5 h, and then was allowed to react with gaseous hydrochloric acid for another 30 min. The precipitate was filtered off, washed with diethyl ether, dried, and suspended in water (200 mL). The mixture was refluxed for 5 h. After cooling, the crystals were filtered, washed with cold water and dried in the oven. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 78 % (red solid). Rf: 0.28 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 257-259 °C {lit.²⁶⁸ **m.p.** 257-259 °C}. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 5.91 (s, 2H, H_{5,7}), 4.54 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 193.9 (C₃), 175.5 (C₈), 167.5 (C₆), 157.4 (C₄), 102.6 (C₉), 96.1 (C₅), 90.0 (C₇), 74.8 (C₂). **HRMS (ESI-) *m/z* calcd for C₈H₅O₄ [M-H]⁻ 165.0188, found 165.0189.**

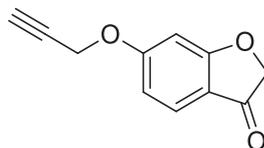


4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (III)

To a solution of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one II (2.00 g, 12.0 mmol) in 1,2-dimethoxyethane (50 mL) were added potassium carbonate (3.70 g, 26.5 mmol) and dimethyl sulfate (2.50 mL, 26.5 mmol), then the mixture was refluxed for 5 h. After cooling, volatile species were concentrated, then the mixture was diluted with water (40 mL) and extracted with dichloromethane (three times). The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography with an eluent of 60 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 97 % (orange powder). Rf = 0.31 (3:2 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 136 °C {lit.²⁶⁸ **m.p.** 135-137 °C}. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 6.08 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 5.94 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 4.52 (s, 2H, CH₂), 3.84 (s, 3H, Me₄), 3.80 (s, 3H, Me₆). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):**

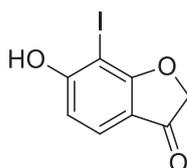
δ ppm 194.9 (C₃), 177.1 (C₈), 169.7 (C₆), 158.8 (C₄), 104.7 (C₉), 92.9 (C₅), 88.9 (C₇), 75.5 (C₂), 56.0 (Me₄), 55.9 (Me₆).



6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one (V)

To a mixture of commercially available 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (13.3 mmol, 2 g) and potassium carbonate (13.3 mmol, 1.84 g) in dry DMF was added propargyl bromide (13.3 mmol, 1.16 mL). The mixture was stirred at 80°C under nitrogen for 3 h, then cooled down to rt. The mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 times). The combined organic phases were dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography with a gradient of 0-25 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 51 % (yellow solid). Rf: 0.48 (1:3 ethyl acetate in cyclohexane).

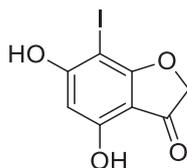
m.p. 109 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.59 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H₄), 6.71 (dd, 1H, J = 8.6, 2.2 Hz, H₅), 6.66 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H₇), 4.76 (d, 1H, J = 2.4 Hz, \equiv CCH₂), 4.63 (s, 2H, OCH₂CO), 2.58 (t, 1H, J = 2.4 Hz, \equiv CH). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 197.6 (C₃), 176.2 (C₈), 165.8 (C₆), 125.2 (C₄), 115.1 (C₉), 111.9 (C₅), 97.7 (C₇), 77.2 (\equiv C-), 77.1 (\equiv CH), 75.5 (OCH₂CO), 56.2 (\equiv CCH₂).



6-hydroxy-7-iodobenzofuran-3(2H)-one (XI)

The crude product was prepared according to the *procedure F* from commercially available 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 83 % (cream solid). Rf: 0.32(1:3 ethyl acetate in cyclohexane).

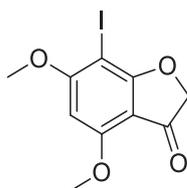
m.p. 174-176 °C. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 7.44 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₄), 6.68 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₅), 4.82 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 197.0 (C₃), 175.1 (C₆), 165.8 (C₈), 124.4 (C₄), 113.7 (C₉), 110.5 (C₅), 75.9 (C₇), 67.2 (C₂). **HRMS (ESI-)** m/z calcd for C₈H₄I O₃ [M-H]⁻ 274.9205, found 274.9214.



4,6-dihydroxy-7-iodobenzofuran-3(2H)-one (XII)

The crude product was prepared according to the *procedure F* from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 60 % (red solid). Rf: 0.25 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 166-168 °C. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 6.15 (s, 1H, H₅), 4.67 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 194.1 (C₃), 174.7 (C₈), 165.9 (C₆), 157.4 (C₄), 103.9 (C₉), 96.0 (C₅), 75.4 (C₂), 54.6 (C₇). **HRMS (ESI-)** *m/z* calcd for C₈H₄I₂O₄ [M-H]⁻ 290.9154, found 290.9160.

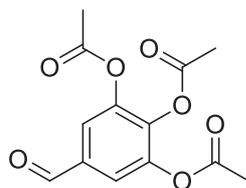


7-iodo-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (XIII)

The crude product was prepared according to the *procedure F* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one **III** on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 95 % (cream solid). Rf: 0.20 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 140-142 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 6.06 (s, 1H, H₅), 4.67 (s, 2H, CH₂), 3.98 (s, 3H, Me₄), 3.97 (s, 3H, Me₆). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ ppm 195.0 (C₃), 174.8 (C₈), 167.2 (C₆), 159.8 (C₄), 105.8 (C₉), 89.0 (C₅), 75.8 (C₂), 57.3 (C₇), 57.1 (Me₄), 56.3 (Me₆). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₀H₁₀I₂O₄ [M+H]⁺ 320.9624, found 320.9620.

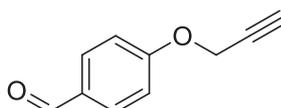
Synthesis of benzaldehyde derivatives



3,4,5-triacetoxybenzaldehyde (IV)

Commercially available 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde (0.32 mmol, 100 mg) was dissolved into acetic anhydride (1 mL) in an ice-bath, then triethylamine (3.90 mmol, 0.55 mL) was added. The mixture was stirred at rt for 2 h. Ethanol (0.5 mL) was added at 0 °C, then the mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3 times). The combined organic phases were washed with an aqueous solution of saturated sodium bicarbonate, water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography with a gradient of 10-25 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 80 % (clear oil). Rf: 0.21 (1:3 ethyl acetate in cyclohexane).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 9.90 (s, 1H, CHO), 7.64 (s, 2H, H_{2,6}), 2.30 (s, 3H, Me_{4'}), 2.29 (s, 6H, Me_{3',5'}). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 189.3 (CHO), 167.5 (COO_{3',5'}), 166.3 (COO_{4'}), 144.2 (C_{3',5'}), 139.6 (C_{4'}), 134.0 (C_{1'}), 121.7 (C_{2',6'}), 20.6 (COOMe_{3',5'}), 20.1 (COOMe_{4'}).

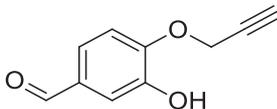


4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (VI)

Commercially available 4-hydroxybenzaldehyde (4.09 mmol, 500 mg) was dissolved into acetone (50 mL). Potassium carbonate (16.4 mmol, 2.27 g) and propargyl bromide (16.4 mmol, 1.78 mL) were added to the mixture which was then heated to reflux. The heterogeneous mixture was stirred for 4 h, then cooled to rt. The mixture was diluted with water and extracted with dichloromethane (3 times). The combined organic phases were dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Yield: 100 % (pale yellow solid). Rf: 0.66 (1:3 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 77 °C {lit.²⁶⁹ **m.p.** 77-79 °C}. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 9.90 (s, 1H, CHO), 7.86 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H_{2',4'}), 7.09 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 4.78 (d, J = 2.4 Hz, 2H, CH₂), 2.56 (t, J = 2.4 Hz, 1H, \equiv CH). **¹³C**

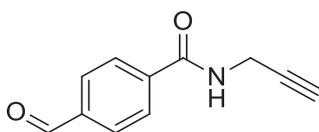
NMR (100 MHz, CDCl₃): δ ppm 190.7 (CHO), 162.4 (C_{4'}), 131.9 (C_{2',6'}), 130.6 (C_{1'}), 115.2 (C_{3',5'}), 77.5 (-C \equiv), 76.3 (\equiv CH), 55.9 (CH₂). **MS (apci+)** m/z (%) 161.1 (100) [M+H]⁺.



3-hydroxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (VII)

Commercially available 3,4-dihydroxybenzaldehyde (0.72 mmol, 100 mg) was dissolved into anhydrous DMF (45 mL). Sodium hydrogencarbonate (1.09 mmol, 91.2 mg), sodium iodide (0.22 mmol, 32.6 mg) and propargyl bromide (1.45 mmol, 0.16 mL) were added to the mixture which was stirred at 40 °C for 1 day and concentrated. The mixture was diluted with water and acidified with 1 M HCl until pH 3 was reached, then extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography with a gradient of 10-25 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 44 % (clear oil). Rf: 0.47 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ ppm 9.77 (s, 1H, CHO), 7.40 (dd, 1H, J = 8.2, 2.0 Hz, H_{6'}), 7.30 (d, 1H, J = 2.0 Hz, H_{2'}), 7.19 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H_{5'}), 4.90 (2, 2H, J = 2,4 Hz, CH₂), 3.04 (t, 1H, J = 2,4 Hz, \equiv CH). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):** δ ppm 191.7 (CHO), 151.1 (C_{4'}), 147.2 (C_{3'}), 130.9 (C_{1'}), 123.9 (C_{6'}), 114.0 (C_{2'}), 112.7 (C_{5'}), 77.5 (\equiv CH), 76.3 (-C \equiv), 55.9 (CH₂). **MS (ESI-)** m/z (%) 174.7 (100) [M-H]⁻.



4-formyl-N-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (VIII)

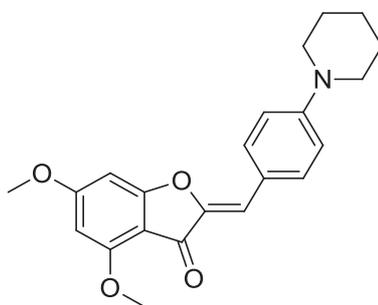
Commercially available 4-formylbenzoic acid (3.330 mmol, 500 mg) and TBTU (6.66 mmol, 2.14 g) were dissolved into anhydrous DMF (10 mL) under nitrogen. DIEA (16.7 mmol, 2.90 mL) and propargylamine (16.7 mmol, 0.43 mL) were added to the mixture which was stirred at rt under nitrogen overnight. The mixture was diluted with water and acidified with 1 M HCl until pH 3 was reached, then extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with an aqueous solution of saturated sodium bicarbonate, water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by

column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 68 % (white solid). Rf: 0.48 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 0.08 (s, 1H, CHO), 7.99-7.92 (m, 4H, H_{2',3',5',6'}), 6.40-6.31 (m, 1H, NH), 4.28 (dd, 2H, J = 5.6, 2.6 Hz, CH₂), 2.30 (t, 1H, J = 2.6 Hz, ≡CH). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 191.4 (CHO), 165.9 (CONH), 138.8 (C_{1'}), 138.4 (C_{4'}), 129.9 (C_{2',6'}), 127.7 (C_{3',5'}), 79.0 (-C≡), 72.3 (≡CH), 30.0 (CH₂).

Synthesis of aurones derivatives via basic or acidic-mediated aldolic condensation

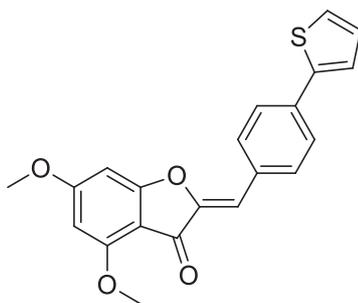
Synthesis of aurones **1d**, **1e**, **1f**, **1o**, **3b** and **3c** was achieved according to the procedure previously performed at the DPM (unpublished except for **3b**).²⁶⁸



(Z)-4,6-dimethoxy-2-(4-(piperidin-1-yl)benzylidene)benzofuran-3(2H)-one (1d)

The crude product was prepared according to the *procedure A* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one **III** and commercially available 4-(piperidin-1-yl)benzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 5-40 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 48 % (orange solid). Rf: 0.31 (2:3 ethyl acetate in cyclohexane).

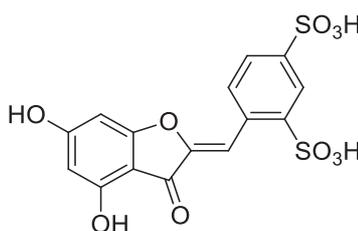
m.p. >250 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.76 (d, 2H, J = 8.9 Hz, H_{2',6'}), 6.91 (d, 2H, J = 8.9 Hz, H_{3',5'}), 6.75 (s, 1H, H₁₀), 6.37 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₇), 6.11 (d, 1H, J = 1.8 Hz, H₅), 3.94 (s, 3H, Me₄), 3.90 (s, 3H, Me₆), 3.34-3.29 (m, 4H, NCH₂), 1.74-1.59 (m, 6H, NCH₂-3CH₂-CH₂N). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 180.7 (C₃), 168.7 (C₈), 168.5 (C₆), 159.4 (C_{4'}), 152.2 (C₄), 146.4 (C₂), 133.0 (C_{2',6'}), 122.3 (C_{1'}), 115.0 (C_{3',5'}), 112.3 (C₁₀), 106.0 (C₉), 93.9 (C₅), 89.3 (C₇), 56.3 (Me₄), 56.2 (Me₆), 49.2 (2CH₂N), 25.6 (2CH₂CH₂N), 24.5 (CH₂CH₂CH₂N). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₂₂H₂₄NO₄ [M+H]⁺ 366.1700, found 366.1701.



(Z)-4,6-dimethoxy-2-(4-(thiophen-2-yl)benzylidene)benzofuran-3(2H)-one (1e)

4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one **III** (0.52 mmol, 100 mg) was taken up into MeOH (8 mL). Potassium hydroxide 50 % (8 mL) and commercially available 4-(thiophen-2-yl)benzaldehyde (0.77 mmol, 145 mg) were added to the mixture which was stirred at reflux for 7 h, then cooled to rt, filtered off and washed with cold methanol. Yield: 74 % (orange solid). R_f = 0.29 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 190 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.89 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{2,6'}), 7.69 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{3,5'}), 7.40 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, SCH), 7.34 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, SCCH), 7.12 (dd, 1H, *J* = 5.0, 3.6 Hz, SCHCH), 6.79 (s, 1H, H₁₀), 6.42 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅), 6.16 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 3.98 (s, 3H, Me₄), 3.94 (s, 3H, Me₆). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 180.8 (C₃), 169.2 (C_{6,8}), 159.7 (C₄), 148.1 (C₂), 143.9 (SCCH), 135.3 (C_{4'}), 131.9 (C_{1'}), 131.9 (C_{2',6'}), 128.5 (SCH), 126.2 (C_{3',5'}), 125.8 (SCHCH), 124.0 (SCCH), 110.5 (C₁₀), 105.5 (C₉), 94.3 (C₅), 89.5 (C₇), 56.5 (Me₄), 56.4 (Me₆). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calcd for C₂₁H₁₇O₄S [M+H]⁺ 365.0842, found 365.0843.

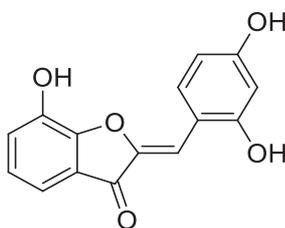


(Z)-4-((4,6-dihydroxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene)methyl)benzene-1,3-disulfonic acid (1f)

4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** (0.66 mmol, 110 mg) was taken up into EtOH (1 mL). Potassium hydroxide 50% (4 mL) and 4-formylbenzene-1,3-disulfonic acid (1.50 mmol, 450 mg) were added to the mixture which was stirred at 60 °C until complete disappearance of the starting material, then concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with water and acidified by 1 M HCl until pH 2 was reached. The mixture was extracted with ethyl acetate (three times). The combined

organic phases were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % MeOH in DCM. Yield: 61 % (yellow solid). Rf: 0.29 (1:1 MeOH in DCM).

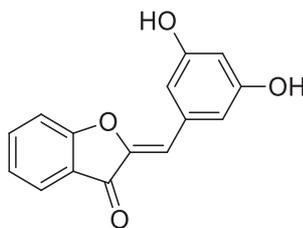
m.p. >300 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 8.15 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{3'}), 8.08 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H_{6'}), 7.72 (s, 1H, H₁₀), 7.61 (dd, 1H, *J* = 7.6, 2.0 Hz, H_{5'}), 6.21 (s, 1H, H₇), 6.07 (s, 1H, H₅). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 179.3 (C₃), 167.8 (C₈), 167.4 (C₆), 158.4 (C₄), 147.5 (C_{2'}), 147.1 (C₂), 146.9 (C_{1'}), 130.4 (C_{6'}), 129.5 (C_{4'}), 125.9 (C_{5'}), 124.8 (C_{3'}), 106.9 (C₁₀), 102.6 (C₉), 97.7 (C₅), 90.6 (C₇). **HRMS (ESI-)** *m/z* calcd for C₁₅H₉O₁₀S₂ [M-H]⁻ 412.9643, found 412.9646.



(Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidene)-7-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (1o)

The crude product was prepared from its methoxy analogue according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with an eluent of 50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 38 % (orange solid). Rf = 0.27 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

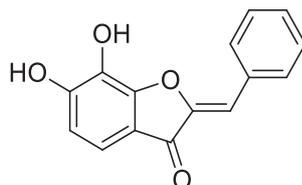
m.p. >265 °C (decomposition). **¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 8.14 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{6'}), 7.20 (s, 1H, H₁₀), 7.19 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.2 Hz, H₆), 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.2 Hz, H₄), 7.08 (dd, 1H, *J* = 7.7, 7.7 Hz, H₅), 6.43 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.4 Hz, H_{5'}), 6.39 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H_{3'}). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ ppm 183.7 (C₃), 161.9 (C_{4'}), 160.0 (C_{2'}), 153.9 (C₇), 144.6 (C₂), 143.9 (C₈), 133.5 (C_{1'}), 124.4 (C₅), 123.5 (C₉), 122.8 (C₆), 114.1 (C₄), 111.0 (C_{6'}), 108.9 (C_{5'}), 108.3 (C₁₀), 102.6 (C_{3'}). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₅ [M+H]⁺ 271.0601, found 271.0603.



(Z)-2-(3,5-dihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3a)

Commercially available benzofuran-3(2*H*)-one (0.75 mmol, 100 mg) and 3,5-dihydroxybenzaldehyde (0.92 mmol, 127 mg) were mixed in ethanol (5 mL). 12 M HCl (0.5 mL) was added, then the mixture was stirred at 75 °C for 5 h. The mixture was cooled down to rt then filtered and concentrated under reduced pressure. The mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 17 % (gold-brown solid). Rf: 0.51 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

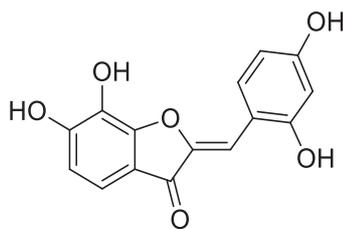
m.p. >190 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.73 (td, 1H, *J* = 7.8, 1.0 Hz, H₆), 7.70 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.0 Hz, H₄), 7.36 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H₇), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H₅), 6.91 (d, 2H, *J* = 2.2 Hz, H_{2,6'}), 6.70 (s, 1H, H₁₀), 6.36 (t, 1H, *J* = 2.2 Hz, H_{4'}). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):** δ ppm 186.3 (C₃), 167.5 (C₈), 159.9 (C_{3',5'}), 149.0 (C₂), 138.7 (C_{1'}), 134.9 (C₆), 125.3 (C₄), 124.9 (C₅), 122.5 (C₉), 114.9 (C₇), 114.0 (C₁₀), 111.1 (C_{1',6'}), 106.0 (C_{4'}). **HRMS (ESI-)** *m/z* calcd for C₁₅H₉O₄ [M-H]⁻ 253.0501, found 253.0511.



(Z)-2-benzylidene-6,7-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (3b)

The crude product was prepared according to the *procedure D* from 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one **I** and benzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. The product was finally recrystallized in acetonitrile. Yield: 63 % (yellow solid). Rf: 0.34 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

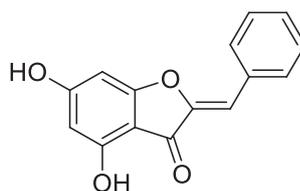
m.p. 201-202 °C. **¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 8.04 (dd, 2H, *J* = 7.3, 1.2 Hz, H_{2',6'}), 7.50 (dd, 2H, *J* = 7.3, 7.3 Hz, H_{3',5'}), 7.43 (dd, 1H, *J* = 7.3, 1.2 Hz, H_{4'}), 7.15 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₄), 6.77 (s, 1H, H₁₀), 6.74 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅). **¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 182.2 (C₃), 155.2 (C₈), 154.9 (C₆), 147.5 (C₂), 132.1 (C_{1'}), 131.2 (C_{2',6'}), 130.0 (C₇), 129.5 (C_{4'}), 128.9 (C_{3',5'}), 115.6 (C₄), 113.9 (C₉), 112.8 (C₅), 110.1 (C₁₀). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₄ [M+H]⁺ 255.0652, found 255.0656.



(Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidene)-6,7-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (3c)

The crude product was prepared according to *procedure D* from 6,7-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **I** and 2,4-dihydroxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with an eluent of 66 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 68 % (red powder). Rf = 0.31 (ethyl acetate).

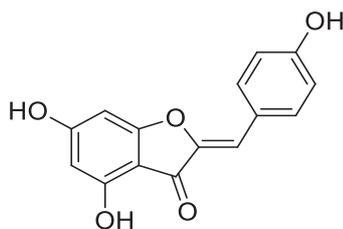
m.p. 275-276 °C. **¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 8.15 (d, 1H, *J* = 7.4 Hz, H_{6'}), 7.09 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₄), 7.05 (s, 1H, H₁₀), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 6.40 (dd, 1H, *J* = 7.4, 2.3 Hz, H_{5'}), 6.40 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H_{3'}). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ ppm 182.3 (C₃), 161.2 (C_{4'}), 159.5 (C₂), 155.1 (C₈), 154.3 (C₆), 145.7 (C₂), 133.3 (C_{1'}), 130.5 (C₇), 115.5 (C₄), 115.2 (C₉), 112.9 (C₅), 111.1 (C_{6'}), 108.6 (C_{5'}), 106.2 (C₁₀), 102.6 (C_{3'}). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₆ [M+H]⁺ 287.0550, found 287.0553.



(Z)-2-benzylidene-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (3d)

The crude product was prepared according to the *procedure B* from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** and benzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 82 % (orange solid). Rf: 0.24 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

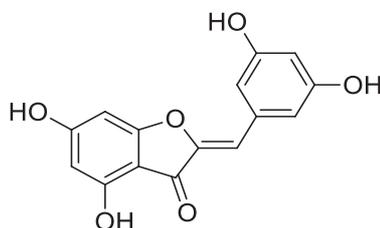
m.p. >250 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.80 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H_{2',6'}), 7.37 (dd, 2H, *J* = 7.5, 7.2 Hz, H_{3',5'}), 7.31 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, H_{4'}), 6.59 (s, 1H, H₁₀), 6.18 (s, 1H, H₇), 6.03 (s, 1H, H₅). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD):** δ ppm 182.7 (C₃), 170.0 (C₈), 169.7 (C₆), 160.1 (C₄), 149.6 (C₂), 133.9 (C_{4'}), 132.0 (C_{3',5'}), 130.4 (C_{1'}), 129.8 (C_{2',6'}), 111.1 (C₁₀), 104.4 (C₉), 98.8 (C₅), 91.9 (C₇). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₄ [M+H]⁺ 255.0657, found 255.0662.



(Z)-4,6-dihydroxy-2-(4-hydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3e)

The crude product was prepared according to the *procedure B* from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** and 4-hydroxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 29 % (yellow powder). R_f = 0.37 (ethyl acetate).

m.p. >280 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 7.74 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{2',6'}), 6.85 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 6.53 (s, 1H, H₁₀), 6.18 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.05 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅). **¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 179.4 (C₃), 168.0 (C₈), 167.5 (C₆), 159.2 (C_{4'}), 158.6 (C₄), 146.4 (C₂), 133.1 (C_{2',6'}), 123.7 (C_{1'}), 116.4 (C_{3',5'}), 109.4 (C₁₀), 103.2 (C₉), 98.0 (C₅), 90.8 (C₇). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₅ [M+H]⁺ 271.0606, found 271.0607.



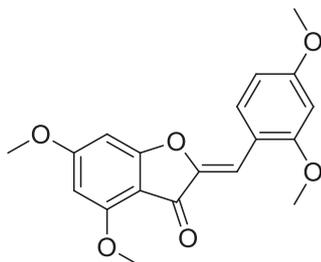
(Z)-2-(3,5-dihydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (3f)

The crude product was prepared according to the *procedure B* from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **II** and 3,5-dihydroxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with an eluent of 5 % MeOH in cyclohexane. Yield: 6 % (yellow solid). R_f: 0.24 (1:4 MeOH in DCM).

m.p. >240 °C (decomposition). **¹H NMR (500 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 6.75 (d, 2H, *J* = 2.1 Hz, H_{2',6'}), 6.36 (s, 1H, H₁₀), 6.26 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz, H_{4'}), 6.16 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.03 (s, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅). **¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 179.5 (C₃), 168.2 (C₈), 167.8 (C₆), 158.9 (C_{3',5'}), 158.8 (C₄), 147.9 (C₂), 134.0 (C_{1'}), 109.3 (C_{2',6'}), 109.2 (C₁₀), 104.4 (C_{4'}), 102.9 (C₉), 98.2 (C₅), 90.8 (C₇). **HRMS (ESI-)** *m/z* calcd for C₁₅H₉O₆ [M-H]⁻ 285.0399, found 285.0403.

Synthesis of hydrophobic aurones derivatives via neutral alumina-mediated condensation

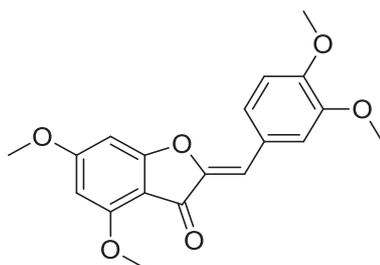
Synthesis of aurones **3g'**, **3h'**, **3l'**, **3m'** and **3n'** was achieved according to the procedure previously performed at the DPM (unpublished for **3l'**, **3m'** and **3n'**).²⁷⁰



(Z)-2-(2,4-dimethoxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (3g')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one **III** and 2,4-dimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 91 % (yellow powder). R_f = 0.53 (ethyl acetate).

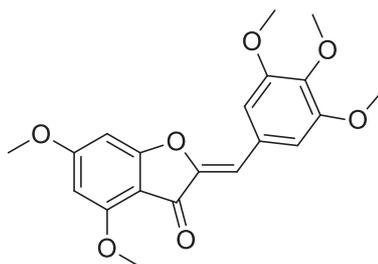
m.p. 212 °C {lit. **m.p.**¹⁹⁰ 213-214 °C}. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ ppm 8.19 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{6'}), 7.27 (s, 1H, H₁₀), 8.57 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.4 Hz, H_{5'}), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H_{2'}), 6.36 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.11 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 3.94 (s, 3H, Me₄), 3.90 (s, 3H, Me₆), 3.87 (s, 3H, Me_{2'}), 3.86 (s, 3H, Me_{4'}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 180.5 (C₃), 168.6 (C₈), 168.4 (C₆), 162.2 (C_{4'}), 160.1 (C_{2'}), 159.2 (C₄), 146.8 (C₂), 132.8 (C_{6'}), 114.7 (C_{1'}), 105.7 (C₉), 105.5 (C_{5'}), 105.3 (C₁₀), 97.9 (C_{3'}), 93.8 (C₅), 89.0 (C₇), 56.1 (Me₄), 56.0 (Me₆), 55.5 (Me_{2'}), 55.4 (Me_{4'}).



(Z)-2-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (3h')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one **III** and 3,4-dimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 80 % (yellow powder). R_f = 0.52 (ethyl acetate).

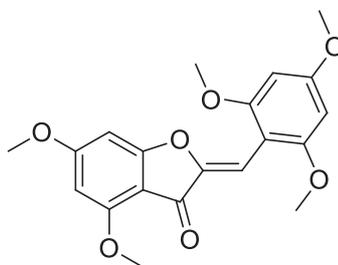
m.p. 170 °C {lit.¹⁹⁰ **m.p.** 173-174 °C}. **¹H NMR (500MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.46 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H_{2'}), 7.44 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.9 Hz, H_{6'}), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H_{5'}), 6.74 (s, 1H, H₁₀), 7.27 (s, 1H, H₁₀), 6.35 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.13 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 3.96 (s, 3H, Me_{3'}), 3.95 (s, 3H, Me₄), 3.93 (s, 3H, Me_{4'}), 3.91 (s, 3H, Me₆). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ ppm 180.5 (C₃), 168.7 (C₈), 168.7 (C₆), 159.3 (C₄), 150.3 (C_{4'}), 148.9 (C_{3'}), 146.8 (C₂), 125.5 (C_{1'}), 125.2 (C_{6'}), 113.5 (C_{2'}), 111.2 (C₁₀), 111.1 (C_{5'}), 105.4 (C₉), 93.9 (C₅), 89.1 (C₇), 56.2 (Me_{3'}), 56.1 (Me₆), 55.9 (Me₄), 55.9 (Me_{4'}).



(Z)-4,6-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3i')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one **III** and 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 92 % (pale yellow powder). R_f = 0.11 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

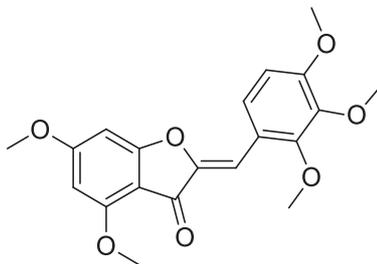
m.p. 215 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.12 (s, 2H, H_{2',6'}), 6.69 (s, 1H, H₁₀), 6.34 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.14 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 3.96 (s, 3H, Me₄), 3.93 (s, 6H, Me_{3',5'}), 3.92 (s, 3H, Me₆), 3.90 (s, 3H, Me_{4'}). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ ppm 180.5 (C₃), 168.9 (C₆), 168.8 (C₈), 159.4 (C₄), 153.2 (C_{3',5'}), 147.3 (C₂), 139.5 (C_{4'}), 128.1 (C_{1'}), 111.0 (C₁₀), 108.5 (C_{2',6'}), 105.3 (C₉), 94.0 (C₅), 89.2 (C₇), 61.0 (Me_{4'}), 56.2 (Me₆), 56.2 (Me_{3',5'}), 56.1 (Me₄).



(Z)-4,6-dimethoxy-2-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3j')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one **III** and 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 49 % (yellow powder). R_f = 0.17 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

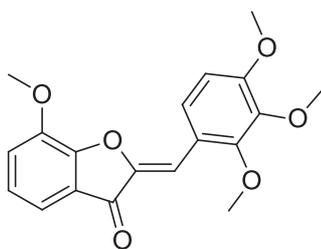
m.p. 176 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 6.94 (s, 1H, H₁₀), 6.22 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.16 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, H_{3',5'}), 6.08 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 3.93 (s, 3H, Me₄), 3.86 (s, 3H, Me₆), 3.85 (s, 9H, Me_{2',4',6'}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 180.4 (C₃), 168.8 (C₈), 168.5 (C₆), 162.6 (C_{4'}), 159.8 (C_{2',6'}), 159.3 (C₄), 147.8 (C₂), 105.8 (C₉), 104.0 (C₁₀), 103.5 (C_{1'}), 93.3 (C₅), 90.7 (C_{3',5'}), 88.8 (C₇), 56.1 (Me₄), 55.9 (Me₆), 55.8 (Me_{2',6'}), 55.4 (Me_{4'}).



(Z)-4,6-dimethoxy-2-(2,3,4-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2*H*)-one (3k')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one **III** and 2,3,4-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 55 % (yellow powder). R_f = 0.14 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

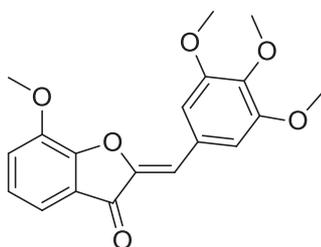
m.p. 171 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 8.14 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H_{6'}), 7.15 (s, 1H, H₁₀), 6.76 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H_{5'}), 6.36 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.13 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 3.95 (s, 6H, Me_{4,2'}), 3.92 (s, 3H, Me_{4'}), 3.90 (s, 3H, Me₆), 3.88 (s, 3H, Me_{3'}). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 180.5 (C₃), 168.7 (C₈), 168.6 (C₆), 159.4 (C₄), 154.9 (C_{4'}), 153.7 (C_{2'}), 147.5 (C₂), 142.2 (C_{3'}), 126.7 (C_{6'}), 119.7 (C_{1'}), 107.5 (C_{5'}), 105.6 (C₉), 105.1 (C₁₀), 93.8 (C₅), 89.1 (C₇), 61.8 (Me_{2'}), 60.9 (Me_{3'}), 56.2 (Me₄), 56.0 (Me_{6,4'}).



(Z)-7-methoxy-2-(2,3,4-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3l')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from commercially available 7-methoxybenzofuran-3(2H)-one and 2,3,4-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 74 % (yellow powder). R_f = 0.21 (1:3 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 150 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 8.14 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_{6'}), 7.39 (dd, 1H, *J* = 6.7, 2.1 Hz, H₄), 7.34 (s, 1H, H₁₀), 7.15 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.1 Hz, H₆), 7.12 (dd, 1H, *J* = 8.0, 6.7 Hz, H₅), 6.84 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_{5'}), 4.02 (s, 3H, Me₇), 3.97 (s, 3H, Me_{2'}), 3.93 (s, 3H, Me_{4'}), 3.89 (s, 3H, Me_{3'}). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ ppm 184.5 (C₃), 155.6 (C₈), 155.4 (C_{4'}), 154.1 (C_{2'}), 146.5 (C₂), 145.9 (C₇), 142.1 (C_{3'}), 127.5 (C_{6'}), 123.6 (C₅), 123.4 (C₉), 119.4 (C₆), 118.2 (C_{1'}), 115.8 (C₄), 108.0 (C₁₀), 107.9 (C_{5'}), 61.9 (Me_{2'}), 60.9 (Me_{3'}), 56.3 (Me₇), 56.0 (Me_{4'}).

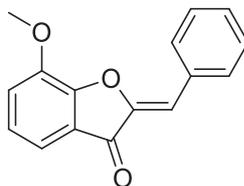


(Z)-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3m')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from commercially available 7-methoxybenzofuran-3(2H)-one and 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 79 % (yellow powder). R_f = 0.50 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 160 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.39 (dd, 1H, *J* = 7.0, 1.9 Hz, H₄), 7.25 (s, 2H, H_{2',6'}), 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.9, 1.9 Hz, H₆), 7.14 (dd, 1H, *J* = 7.9, 7.0 Hz, H₅), 6.85 (s, 1H, H₁₀), 4.01 (s, 3H, Me₇), 3.95 (s, 6H, Me_{3',5'}), 3.92 (s, 3H, Me_{4'}). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ ppm 184.6 (C₃), 155.7 (C₈), 153.3 (C_{3',5'}),

146.4 (C₂), 145.9 (C₇), 140.0 (C_{4'}), 127.7 (C_{1'}), 123.9 (C₅), 123.1 (C₉), 118.8 (C₆), 115.9 (C₁₀), 113.7 (C₄), 108.9 (C_{2',6'}), 61.0 (Me_{4'}), 56.5 (Me₇), 56.1 (Me_{3',5'}).



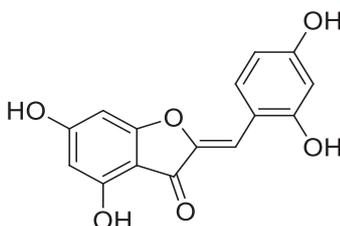
(Z)-2-benzylidene-7-methoxybenzofuran-3(2H)-one (3n')

The crude product was prepared according to the *procedure C* from commercially available 7-methoxybenzofuran-3(2H)-one and benzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 65 % (yellow powder). R_f = 0.66 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 168 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.96 (ddd, 2H, *J* = 7.1, 1.6, 1.3 Hz, H_{2',6'}), 7.44-7.49 (m, 2H, H_{3',5'}), 7.41 (dt, 1H, *J* = 7.1, 1.3 Hz, H_{4'}), 7.39 (dd, 1H, *J* = 7.1, 1.6 Hz, H₄), 7.18 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, H₆), 7.14 (dd, *J* = 8.0, 7.1 Hz, H₅), 6.92 (s, 1H, H₁₀), 4.04 (s, 3H, Me₇). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ ppm 184.9 (C₃), 155.9 (C₈), 146.8 (C₂), 146.0 (C₇), 132.2 (C_{4'}), 131.7 (C_{3',5'}), 129.9 (C_{1'}), 128.9 (C_{2',6'}), 123.9 (C₅), 123.0 (C₉), 118.8 (C₆), 115.9 (C₁₀), 113.6 (C₄), 56.4 (Me₇).

Synthesis of aurones derivatives by deprotection of hydrophobic aurones

Synthesis of aurones **3g**, **3h**, **3l** and **3m** was achieved according to the procedure previously performed at the DPM (unpublished for **3l** and **3m**).²⁷⁰

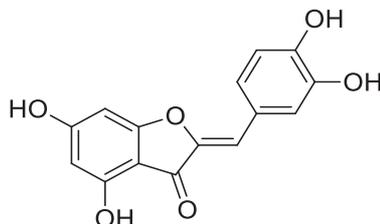


(Z)-2-(2,4-dihydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (3g)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3g'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 0-10 % methanol in dichloromethane. Yield: 63 % (brown solid). R_f = 0.23 (1:9 MeOH in DCM).

m.p. >270 °C (decomposition) {lit.¹⁹⁰ **m.p.** >270 °C (decomposition)}. **¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO):** δ ppm 7.88 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_{6'}), 6.87 (s, 1H, H₁₀), 6.39 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H_{3'}), 6.36 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.3

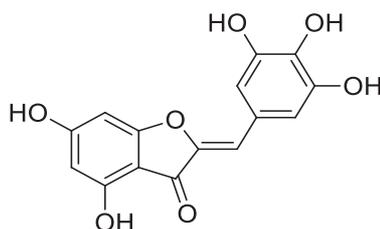
Hz, H₅), 6.17 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.04 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅). ¹³C NMR (125 MHz, d₆-DMSO): δ ppm 179.5 (C₃), 167.7 (C₈), 167.1 (C₆), 160.7 (C_{4'}), 159.0 (C_{2'}), 158.4 (C₄), 145.8 (C₂), 132.4 (C_{6'}), 111.2 (C_{1'}), 108.5 (C_{5'}), 104.0 (C₁₀), 103.4 (C₉), 102.7 (C_{3'}), 97.9 (C₅), 90.8 (C₇). MS (ESI+) *m/z* 287 (M+H)⁺, 309 (M+Na)⁺. Anal. Calcd for C₁₅H₁₀O₆·1.1H₂O: C, 58.86, H, 3.99, found: C, 58.78, H, 3.98.



(Z)-2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (3h)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3h'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 0-10 % methanol in dichloromethane. Yield: 65 % (orange solid). R_f = 0.29 (1:9 MeOH in DCM).

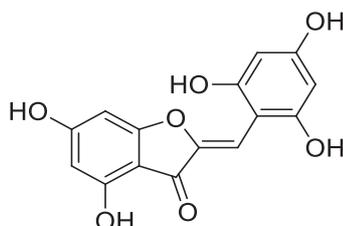
m.p. >260 °C (decomposition) {lit.¹⁹⁰ **m.p.** >260 °C (decomposition)}. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ ppm 7.39 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H_{2'}), 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.9 Hz, H_{6'}), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H_{5'}), 6.44 (s, 1H, H₁₀), 6.17 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.06 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅). ¹³C NMR (125 MHz, d₆-DMSO): δ ppm 179.4 (C₃), 167.9 (C₈), 167.4 (C₆), 158.6 (C₄), 147.8 (C_{4'}), 146.3 (C₂), 145.8 (C_{3'}), 124.3 (C_{6'}), 124.1 (C_{1'}), 118.0 (C_{2'}), 116.4 (C_{5'}), 110.0 (C₁₀), 103.3 (C₉), 98.0 (C₅), 90.7 (C₇). MS (ESI+) *m/z* 287 (M+H)⁺, 309 (M+Na)⁺. Anal. Calcd for C₁₅H₁₀O₆·1.3H₂O: C, 57.57, H, 4.05, found: C, 57.12, H, 3.81.



(Z)-4,6-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3i)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3i'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 0-20 % methanol in dichloromethane. Yield: 66 % (brown solid). R_f = 0.54 (2:8 MeOH in DCM).

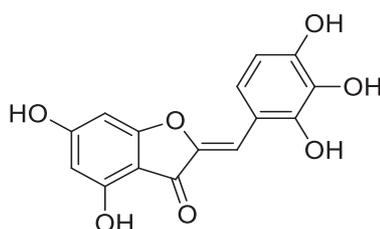
m.p. >250 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 6.98 (s, 2H, H_{2',6'}), 6.50 (s, 1H, H₁₀), 6.21 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₇), 6.04 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₅). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD):** δ ppm 181.3 (C₃), 168.3 (C₆), 168.0 (C₈), 158.5 (C₄), 146.6 (C₂), 145.6 (C_{3',5'}), 135.7 (C_{4'}), 123.2 (C_{1'}), 111.7 (C₁₀), 110.4 (C_{2',6'}), 103.2 (C₉), 97.1 (C₅), 90.2 (C₇). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₇ [M+H]⁺ 303.0505, found 303.0505.



(Z)-4,6-dihydroxy-2-(2,4,6-trihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3j)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3j'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 0-20 % methanol in dichloromethane. Yield: 43 % (red solid). R_f = 0.39 (ethyl acetate).

m.p. >240 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.08 (s, 1H, H₁₀), 6.16 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.03 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 5.94 (s, 2H, H_{3',5'}). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD):** δ ppm 180.7 (C₃), 167.9 (C₆), 166.9 (C₈), 161.1 (C_{4'}), 158.2 (C_{4,2',6'}), 145.0 (C₂), 105.0 (C₁₀), 103.6 (C₉), 99.9 (C_{1'}), 97.0 (C₅), 94.6 (C_{3',5'}), 90.1 (C₇). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₇ [M+H]⁺ 303.0505, found 303.0509.

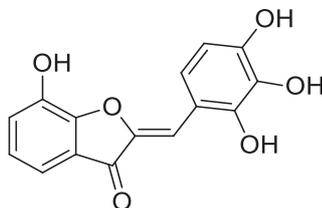


(Z)-4,6-dihydroxy-2-(2,3,4-trihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3k)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3k'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 0-20 % methanol in dichloromethane. Yield: 24 % (brown solid). R_f = 0.28 (ethyl acetate).

m.p. >260 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.61 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{6'}), 7.22 (s, 1H, H₁₀), 6.46 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{5'}), 6.21 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₇), 6.03 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H₅). **¹³C NMR**

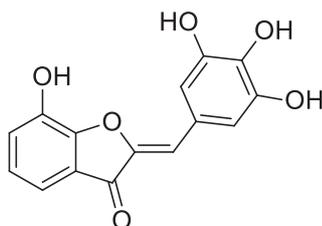
(125 MHz, CD₃OD): δ ppm 181.5 (C₃), 167.8 (C₆), 167.8 (C₈), 158.3 (C₄), 148.2 (C_{4'}), 147.1 (C_{2'}), 146.3 (C₂), 132.5 (C_{3'}), 122.5 (C_{6'}), 112.2 (C_{1'}), 107.4 (C_{5'}), 106.3 (C₁₀), 103.5 (C₉), 97.0 (C₅), 90.2 (C₇). HRMS (ESI+) m/z calcd for C₁₅H₁₁O₇ [M+H]⁺ 303.0505, found 303.0505.



(Z)-7-hydroxy-2-(2,3,4-trihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3l)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3l'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was precipitated in diethyl ether, filtered off and washed with diethyl ether. Yield: 60 % (red solid). R_f = 0.51 (ethyl acetate).

m.p. >243 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 7.68 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{6'}), 7.21 (s, 1H, H₁₀), 7.19 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.1 Hz, H₄), 7.17 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.1 Hz, H₆), 7.05 (dd, 1H, *J* = 7.7, 7.7 Hz, H₅), 6.48 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{5'}). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 184.6 (C₃), 154.9 (C₈), 150.7 (C_{4'}), 149.3 (C_{2'}), 145.9 (C₂), 144.8 (C₇), 134.2 (C_{3'}), 125.4 (C₅), 124.5 (C₉), 124.2 (C_{6'}), 123.8 (C₆), 115.0 (C₄), 113.0 (C_{1'}), 109.9 (C₁₀), 109.6 (C_{5'}). HRMS (ESI+) m/z calcd for C₁₅H₁₁O₆ [M+H]⁺ 287.0550, found 287.0552.



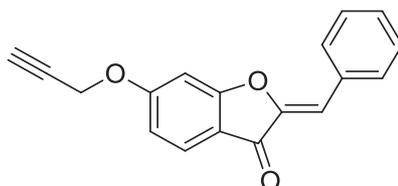
(Z)-7-hydroxy-2-(3,4,5-trihydroxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (3m)

The crude product was prepared from its methoxy analogue **3m'** according to the *procedure E* on a 100 mg scale. The crude residue was precipitated in diethyl ether, filtered off and washed with diethyl ether. Yield: 39 % (orange solid). R_f = 0.43 (pure ethyl acetate).

m.p. >280 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 7.19 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz, H₄), 7.16 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.2 Hz, H₆), 7.06 (dd, 1H, *J* = 7.8, 7.8 Hz, H₅), 7.00 (s, 2H, H_{2',6'}), 6.66 (s, 1H, H₁₀). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 183.5 (C₃), 153.8 (C₈), 146.0 (C_{3',5'}), 144.8 (C₂), 143.6 (C₇), 137.0

(C_{4'}), 124.1 (C₅), 122.9 (C₉), 122.5 (C₆), 122.0 (C_{1'}), 114.4 (C₁₀), 113.6 (C₄), 111.4 (C_{2',6'}). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₅H₁₁O₆ [M+H]⁺ 287.0550, found 287.0552.

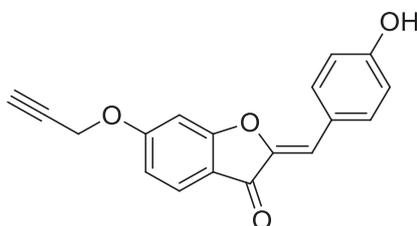
Synthesis of functionalized aurones derivatives



(Z)-2-benzylidene-6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one (4a)

6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one **V** (0.27 mmol, 50 mg) was taken up into MeOH (5 mL). Piperidine (0.1 mL) was added, followed by benzaldehyde (0.34 mmol, 65 μ L). The mixture was stirred at reflux for 4 h. The solid formed was collected by filtration, washed with MeOH, and dried in the oven. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 77 % (pink solid). Rf: 0.50 (1:3 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 183 °C. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 7.98 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, H_{2',6'}), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₄), 7.51 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, H_{3',5'}), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, H_{4'}), 7.21 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₇), 6.90 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.1 Hz, H₅), 6.87 (s, 1H, H₁₀), 5.02 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz, -CH₂O), 3.71 (t, 1H, *J* = 2.3 Hz, \equiv CH). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 181.7 (C₃), 167.6 (C₈), 165.0 (C₆), 147.1 (C₂), 131.7 (C_{1'}), 131.1 (C_{2',6'}), 129.8 (C_{4'}), 128.9 (C_{3',5'}), 125.6 (C₄), 114.4 (C₉), 113.0 (C₅), 111.1 (C₁₀), 98.2 (C₇), 79.2 (\equiv C-), 78.2 (\equiv CH), 56.5 (-CH₂O). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₈H₁₃O₃ [M+H]⁺ 277.0865, found 277.0874.

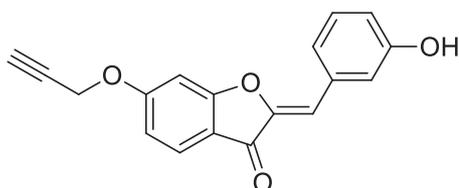


(Z)-2-(4-hydroxybenzylidene)-6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one (4b)

6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one **V** (0.26 mmol, 50 mg), sodium hydride (1.06 mmol, 25.5 mg) and 4-hydroxybenzaldehyde were mixed in anhydrous THF (5 mL). The mixture was stirred at rt under nitrogen overnight then concentrated under reduced pressure. The residue was

diluted with water acidified with 1 M HCl until pH 3 was reached and extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography with an eluent of 25 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 19% (yellow solid). Rf: 0.58 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

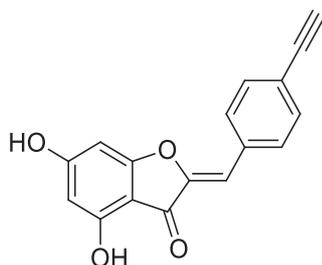
m.p. 210 °C. **¹H NMR (400 MHz, CD₃OD):** δ ppm 7.81 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H_{3',5'}), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₄), 7.02 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₇), 6.87 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, H_{2',6'}), 6.86 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.1 Hz, H₅), 6.79 (s, 1H, H₁₀), 4.90 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, -CH₂O), 3.08 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, ≡CH). **¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD):** δ ppm 183.0 (C₃), 167.9 (C₈), 165.5 (C₆), 159.6 (C_{4'}), 146.0 (C₂), 133.3 (C_{2',6'}), 124.9 (C_{1'}), 123.4 (C₄), 115.5 (C_{3',5'}), 114.9 (C₉), 113.3 (C₅), 112.6 (C₁₀), 97.4 (C₇), 77.1 (≡C-), 76.4 (≡CH), 56.0 (-CH₂O). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₈H₁₃O₄ [M+H]⁺ 293.0814, found 293.0820.



(Z)-2-(3-hydroxybenzylidene)-6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one (4c)

6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzofuran-3(2H)-one **V** (1.06 mmol, 200 mg), sodium hydride (4.26 mmol, 25.5 mg) and 4-hydroxybenzaldehyde (0.80 mmol, 98 mg) were mixed in anhydrous THF (5 mL). The mixture was stirred at rt under nitrogen overnight then 5 h at 50 °C, then concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with water acidified with 1 M HCl until pH 3 was reached and extracted with ethyl acetate (three times). The combined organic phases were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 16 % (orange solid). Rf: 0.56 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

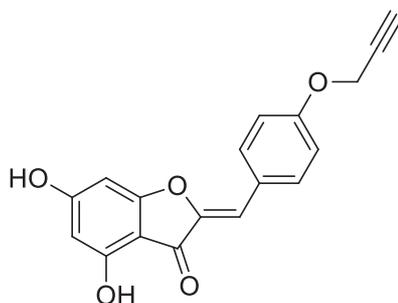
m.p. 167 °C. **¹H NMR (500 MHz, d₆-acetone):** δ ppm 7.85 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.0 Hz, H_{6'}), 7.74 (dd, 1H, *J* = 2.2, 2.2 Hz, H_{2'}), 7.72 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H₄), 7.53 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.2 Hz, H_{5'}), 7.21 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 2.2, 1.0 Hz, H_{4'}), 7.11 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H₇), 6.93 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.1 Hz, H₅), 6.77 (s, 1H, H₁₀), 5.03 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, -CH₂O), 3.23 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, ≡CH). **¹³C NMR (125 MHz, d₆-acetone):** δ ppm 181.7 (C₃), 168.2 (C₈), 165.5 (C₆), 151.4 (C_{3'}), 147.9 (C₂), 133.8 (C_{1'}), 129.7 (C_{5'}), 128.5 (C_{6'}), 125.4 (C₄), 123.9 (C_{2'}), 123.2 (C_{4'}), 114.8 (C₉), 113.0 (C₅), 109.6 (C₁₀), 97.9 (C₇), 77.7 (≡C-), 77.2 (≡CH), 56.4 (-CH₂O). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₈H₁₃O₄ [M+H]⁺ 293.0814, found 293.0820.



(Z)-2-(4-ethynylbenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (4d)

The crude product was prepared according to the *procedure A* from 4,6-dihydroxyfuran-3(2H)-one **II** and 4-ethynylbenzaldehyde on a 1 g scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 10-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 40 % (yellow solid). Rf: 0.15 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. >190 °C (decomposition). **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO)**: δ ppm 7.89 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{3',5'}), 7.55 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{2',6'}), 6.62 (s, 1H, H₁₀), 6.22 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.08 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅), 4.34 (s, 1H, ≡CH). **¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO)**: δ ppm 178.8 (C₃), 167.7 (C₆), 167.5 (C₈), 158.4 (C₄), 148.2 (C₂), 132.9 (C_{1'}), 132.1 (C_{3',5'}), 130.6 (C_{2',6'}), 122.0 (C_{4'}), 107.0 (C₁₀), 102.3 (C₉), 97.8 (C₅), 90.6 (C₇), 83.3 (-C≡), 82.6 (≡CH). **MS (ESI-)** *m/z* (%): 277.0 (100) [M-H]⁻. **HRMS (ESI-)** *m/z* calcd for C₁₇H₉O₄ [M-H]⁻ 277.0501, found 277.0497.

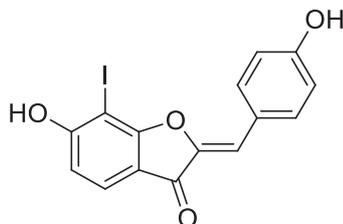


(Z)-4,6-dihydroxy-2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzylidene)benzofuran-3(2H)-one (4e)

The crude product was prepared according to the *procedure A* from 4,6-dihydroxyfuran-3(2H)-one **II** and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde **VI** on a 1 g scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 10-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 63 % (yellow solid). Rf: 0.19 (1:1 ethyl acetate in cyclohexane).

m.p. 208-210°C. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO)**: δ ppm 7.86 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 7.08 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{2',6'}), 6.59 (s, 1H, H₁₀), 6.21 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.06 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅), 4.86 (d, 2H, *J* = 2.3

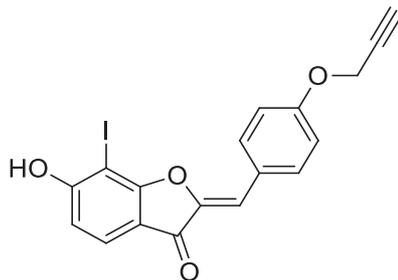
Hz, OCH₂), 3.61 (t, 1H, *J* = 2.3 Hz, ≡CH). ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO): δ ppm 178.9 (C₃), 167.6 (C₆), 167.2 (C₈), 158.2 (C_{4'}), 157.8 (C₄), 146.6 (C₂), 132.3 (C_{2',6'}), 125.5 (C_{1'}), 115.3 (C_{3',5'}), 108.1 (C₁₀), 102.6 (C₉), 97.6 (C₅), 90.5 (C₇), 78.9 (-C≡), 78.5 (≡CH), 55.5 (OCH₂). MS (ESI-) *m/z* (%): 307.1 (100) [M-H]⁻. HRMS (ESI-) *m/z* calcd for C₁₈H₁₁O₅ [M-H]⁻ 307.0606, found 307.0609.



(Z)-6-hydroxy-2-(4-hydroxybenzylidene)-7-iodobenzofuran-3(2H)-one (4f)

The crude product was prepared according to the *procedure A* from 6-hydroxy-7-iodobenzofuran-3(2H)-one **XI** and 4-hydroxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in cyclohexane. Yield: 65 % (yellow solid). Rf: 0.62 (ethyl acetate).

m.p. 251-252 °C. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ ppm 7.90 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{2',6'}), 7.57 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₄), 6.89 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 6.82 (s, 1H, H₁₀), 6.80 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅). ¹³C NMR (125 MHz, d₆-DMSO): δ ppm 181.9 (C₃), 168.2 (C₆), 165.8 (C₈), 160.0 (C_{4'}), 146.0 (C₂), 134.0 (C_{2',6'}), 125.6 (C₄), 123.3 (C_{1'}), 116.5 (C_{3',5'}), 114.5 (C₉), 112.7 (C₁₀), 112.1 (C₅), 67.8 (C₇). HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C₁₅H₁₀IO₄ [M+H]⁺ 380.9624, found 380.9622.

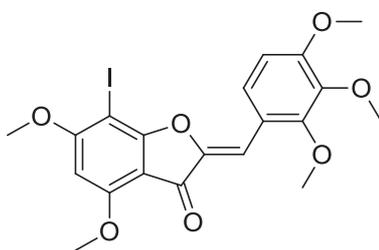


(Z)-6-hydroxy-7-iodo-2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzylidene)benzofuran-3(2H)-one (4g)

The crude product was prepared according to the *procedure A* from 6-hydroxy-7-iodobenzofuran-3(2H)-one **XI** and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde **VI** on a 100 mg scale. The crude residue was purified by column chromatography with a gradient of 25-50 % ethyl acetate in

cyclohexane. The product was then suspended in diethyl ether, filtered off and washed with diethyl ether. Yield: 24 % (yellow solid). Rf: 0.70 (ethyl acetate).

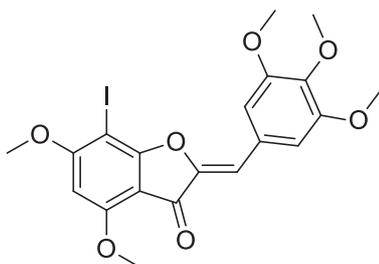
m.p. 230 °C. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 8.01 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{2',6'}), 7.59 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₄), 7.13 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H_{3',5'}), 6.87 (s, 1H, H₁₀), 6.81 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅) 4.91 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz, CH₂), 3.62 (t, 1H, *J* = 2.3Hz, ≡CH). **¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 182.0 (C₃), 168.4 (C₆), 166.0 (C₈), 159.0 (C_{4'}), 146.7 (C₂), 133.5 (C₂C_{6'}), 125.7 (C₄), 125.6 (C_{1'}), 115.9 (C₃C_{5'}), 114.4 (C₉), 112.2 (C₁₀), 111.9 (C₅), 79.3 (-C≡), 79.1 (≡CH), 67.9 (C₇), 56.1 (OCH₂). **HRMS (ESI+)** *m/z* calcd for C₁₈H₁₂O₄ [M+H]⁺ 418.9780, found 418.9784.



(Z)-7-iodo-4,6-dimethoxy-2-(2,3,4-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (4h)

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxy-7-iodobenzofuran-3(2H)-one **XIII** and 2,3,4-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 15 % (yellow solid). Rf: 0.47 (ethyl acetate).

m.p. 196 °C. **¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 8.04 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_{6'}), 7.00 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_{5'}), 6.88 (s, 1H, H₁₀), 6.51 (s, 1H, H₅), 4.02 (s, 3H, Me₄), 3.98 (s, 3H, Me₆), 3.89 (s, 6H, Me_{2',4'}), 3.78 (s, 3H, Me_{3'}). **¹³C NMR (125 MHz, *d*₆-DMSO):** δ ppm 179.6 (C₃), 167.2 (C₈), 166.9 (C₆), 160.2 (C₄), 155.6 (C_{4'}), 153.5 (C_{2'}), 147.0 (C₂), 142.2 (C_{3'}), 126.5 (C_{6'}), 118.6 (C_{1'}), 109.0 (C_{5'}), 105.7 (C₉), 104.2 (C₁₀), 92.3 (C₅), 62.2 (Me_{2'}), 60.9 (Me_{3'}), 58.4 (C₇), 58.1 (Me_{6'}), 57.0 (Me₄), 56.5 (Me_{4'}).



(Z)-7-iodo-4,6-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)benzofuran-3(2H)-one (4i)

The crude product was prepared according to the *procedure C* from 4,6-dimethoxy-7-iodobenzofuran-3(2*H*)-one **XIII** and 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde on a 100 mg scale. The product was analytically pure and used without further purification. Yield: 59 % (yellow powder). R_f = 0.42 (ethyl acetate).

m.p. 257 °C. **¹H NMR (400MHz, CDCl₃):** δ ppm 7.26 (s, 2H, H_{2',6'}), 6.75 (s, 1H, H₁₀), 6.17 (s, 1H, H₅), 4.04 (s, 3H, Me₄), 4.02 (s, 3H, Me₆), 3.98 (s, 6H, Me_{3',5'}), 3.91 (s, 3H, Me_{4'}). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):** δ ppm 180.7 (C₃), 167.5 (C₈), 166.4 (C₆), 160.3 (C₄), 153.2 (C_{3',5'}), 147.0 (C₂), 139.6 (C_{4'}), 127.6 (C_{1'}), 112.1 (C₁₀), 108.6 (C_{2',6'}), 106.5 (C₉), 90.3 (C₅), 61.0 (Me_{4'}), 57.3 (C₇), 57.1 (Me₆), 56.5 (Me₄), 56.3 (Me_{3',5'}).

Procedure for peptide synthesis (SPPS) and purification

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertbutyl (Fmoc/tBu) protection strategy on the rink amide MBHA resin. Manual SPPS was performed in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Prior to the assembly of the peptide, the resin was swollen twice with DCM (10 mL) for 5 min. Fmoc groups were deprotected by a mixture of piperidine/DMF (1:4), then the resin was washed 5 times with DMF (10 mL) for 2 min. Syntheses of AcPHF6 (Ac-VQIVYK-NH₂) and N₃PHF6 (N₃CH₂CO-VQIVYK-NH₂) were performed by manual SPPS on a 1 g scale of Rink amide MBHA resin with DIPEA (6 equiv.) as the base, HBTU (3 equiv.) as the coupling agent dissolved in DMF while the amino acids (3 equiv.) were each taken up into NMP to give a mixture 3:2 DMF/NMP. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by TNBS test: to a small amount of resin beads in DMF was added a few drops of a 1M solution of picrylsulfonic acid in water (TNBS). The mixture was left at rt for 1 min. Remaining free amino functions resulted in a red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid was repeated until the solution with the beads remain yellow (negative TNBS test). Following each coupling, the resin was washed 5 times with DMF (10 mL) for 2 min and swollen with DCM (10 mL) for 2 min. At the end of N₃PHF6 synthesis, the supported peptide was coupled with 2-azidoacetic acid dissolved in DMF in the same conditions than amino acid coupling. For AcPHF6 synthesis, the supported peptide was *N*-acetylated with a solution of 1:2:5 acetic anhydride/pyridine/DMF. Each supported peptide was finally cleaved with a mixture of TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) then the cleaving mixture was concentrated and the peptide obtained by precipitation and trituration in diethyl ether.

Automated syntheses of peptide are performed on ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) or on Syro II Synthesizer (Biotage) using standard solid phase methods. R3 and AcR3 peptides were synthesized in NMP by automated synthesis following the same procedure as manual synthesis.

Purification of each peptide was achieved by dissolving them into a mixture of HFIP/TFA (1:1) then applied to a reverse-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) on a Nucleosil C18 column (100 Å, 250 x 21 mm, 7 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm. A 20 mL/min flow linear gradient of 5-75 % acetonitrile in water was applied over 20 min for AcPHF6 (both water and acetonitrile contained 0.1% TFA), 5-60 % over 20 min for N₃PHF6, 5-100 % over 20 min for AcR3 and

5-60 % over 30 min for R3. The purified peptides were lyophilized and controlled by high resolution mass spectroscopy.

AcPHF6: HRMS (ESI+) m/z calcd for $C_{38}H_{64}N_9O_9$ $[M+H]^+$ 790.4827, found 790.4818. N_3 PHF6: HRMS (ESI+) m/z calcd for $C_{38}H_{63}N_{12}O_9$ $[M+H]^+$ 831.4841, found 831.4830. **AcR3: HRMS (ESI+) m/z calcd for $C_{102}H_{175}N_{28}O_{30}S$ $[M+H]^+$ 2304.2750, found 2304.2727. **R3: MS (ESI+) m/z 1188.8 ($m/2$), 792.9 ($m/3$), 595.0 ($m/4$).****

Procedure for the *in vitro* assays

Thioflavin T fluorescence assays

A typical ThT assay's microplate includes ThT control wells, peptide (AcPHF6 or R3) control wells and aurone control wells. The wells were prepared in triplicate whose average corresponds to the results presented in this work. The total volume of each well was 100 μ L for a final concentration of 100 μ M peptide, 10 μ M ThT and 1 μ M to 100 μ M aurone with a maximum of 0.05 % DMSO in 50 mM phosphate buffer pH 7.4. The mixture in each well containing both peptide and aurone was prepared from stock solutions added in the following order: (1) phosphate buffer 100 mM ($V = 50$ μ L, $c_{final} = 50$ mM) ; (2) ThT 100 μ M in water ($V = 10$ μ L, $c_{final} = 10$ μ M) ; (3) aurone 1000 to 10 μ M in 0.5 % to 0.005 % DMSO in water ($V = 10$ μ L, $c_{final} = 100$ to 1 μ M with 0.05 % to 0.0005 % DMSO) ; (4) heparin 1 mM in water ($V = 10$ μ L, $c_{final} = 100$ mM) ; (5) Water ($V = 10$ μ L) ; (6) peptide (AcPHF6 or R3) 1 mM in water ($V = 10$ μ L, $c_{final} = 100$ mM). In the case of assays using AcPHF6 peptide, stock solution (4) was replaced by water ($V = 10$ μ L). An additional stock solution (7) was prepared for control wells with: (7) 0.5 % to 0.005 % DMSO in water ($V = 10$ μ L, 0.05 % to 0.0005 % DMSO in the well). ThT control wells were made from stock solutions (1) phosphate buffer, (2) ThT, (7) DMSO, (4) heparin (for R3) or water ($V = 10$ μ L for AcPHF6), and (5) water ($V = 20$ μ L). For peptide control wells, the stock solution (6) was replaced by water ($V = 10$ μ L). For aurone control wells, the stock solution (3) was replaced by the stock solution (7). ThT fluorescence assays were conducted in standard 96-well plates (U-shape, black, polypropylene, Greiner Bio-One, USA) in a POLARstar Omega fluorescence plate reader (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany) at room temperature (AcPHF6 peptide) or 37 °C (R3 peptides) with excitation and emission wavelengths at 440 nm and 480 nm, respectively. Fluorescence data were recorded every minute over 2 h (AcPHF6 peptide) or 34 h (R3 peptides) with 10 s shaking (700

rpm) prior to each reading (top optic, orbital averaging of 3 mm diameter) with a gain of 1200. Inhibitions reported were obtained from the ratio of the maximum of the average of the peptide/aurone triplicates by the maximum of the average of the peptide triplicates in the corresponding experiment. Standard deviations were calculated for the average triplicates.

Absorption spectra

Absorption spectra were acquired on a spectrophotometer SAFAS UVmc (SAFAS S.A., Monaco, France) with an optical length of 8.5 mm and a ray of 0.5x4 mm. Acquisitions were recorded using the software SAFAS SP2000 from 300 nm to 600 nm with a spectral resolution of 1 nm and an average time of 0.3 s per data point from a drop (5 μ L) of sample. Samples were prepared to give a final concentration of 1 μ M to 100 μ M aurone with a maximum of 5 % DMSO in 50 mM phosphate buffer pH 7.4.

Emission spectra

Emission spectra were acquired on a LS 50 Luminescence Spectrometer (PerkinElmer Inc, Waltham, MA, USA) using a quartz cell with a 3 mm path length and a maximum volume of 300 μ L. Acquisitions were recorded using the software FL WinLab from 300 nm to 600 nm with an excitation slit of 5 nm width, an emission slit of 10 nm width and a scan speed of 150 nm/min at an excitation wavelength of 440 nm. Emission spectra of aurones were recorded: from 10 μ M aurone alone with a maximum of 0.5 % DMSO in 50 mM phosphate buffer pH 7.4, from aurones added to peptide (AcPHF6 or R3) fibres and from aurones added to peptide fibres in presence of ThT. Emission spectra of aurones in presence of peptide fibres were recorded from a final concentration of 10 μ M aurone with a maximum of 0.5 % DMSO in presence of 100 μ M peptide in 50 mM phosphate buffer pH 7.4, the peptide solution being previously incubated in phosphate buffer for 4 h at room temperature (AcPHF6 peptide) or 24 h at 37 °C (R3 peptide). For spectra of aurones in presence of peptide fibres and ThT, peptide was incubated with ThT in phosphate buffer for 4 h at room temperature (AcPHF6 peptide) or 24 h at 37 °C (R3 peptide) prior to the addition of aurone to reach in the quartz cell a final concentration of 10 μ M aurone in 50 mM phosphate buffer pH 7.4 in presence of 100 μ M of fibrillar peptide and 10 μ M ThT.

Circular Dichroism (CD)

CD spectra were acquired on a JASCO J-810 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) using a quartz cell with a 1 mm path length and a maximum volume of 300 μL . Acquisitions were recorded at room temperature (AcPHF6 peptide) or at 37 °C (R3 peptides) between 260 nm and 195 nm with a spectral resolution of 1 nm, an average time of 1 s per data point and a band width of 10 nm. The spectra reported represent an average of four acquisitions and have been smoothed using the method of Savitzky-Golay. Spectra were acquired from fresh samples or from the combined triplicates of the corresponding ThT fluorescence assay. The total volume of each quartz cell was 300 μL for a final concentration of 100 μM peptide, 10 μM ThT and 1 μM to 100 μM aurone in 50 mM phosphate buffer pH 7.4 with a maximum of 0.05 % DMSO. Prior to the acquisitions in the quartz cell, the mixtures from fresh samples were incubated for 2 h to 24 h at room temperature (AcPHF6 peptide) or for 24 h to 72 h at 37 °C (R3 peptides) in an Eppendorf® Protein LoBind tube.

Atomic Force Microscopy (AFM)

Every AFM sample was prepared by taking a 3 μL sample from the corresponding well in the ThT fluorescence assay after an incubation of 2 h to 24 h at room temperature (AcPHF6 peptide) or 24 h to 72 h at 37 °C (R3 peptides). Each sample was adsorbed onto a freshly cleaved mica surface for 10 min to 15 min after which the surface was washed two times by adding 10 μL of pure H_2O and subsequently removing it. AFM height images (40x40 μm down to 0.5x0.5 μm , 512x512 pixel) were recorded at randomly selected surface positions in peak force mode using a Dimension Icon (Bruker, Santa Barbara, CA, USA). The cantilevers SCANASIST-Air (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) used were triangular and had a force contact of 0.4 N/m and a resonance frequency of 70 kHz at tip scan rates of 1 Hz. AFM processed using the flattening function of the Gwyddion microscope software.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Virchow, R., Zur Cellulose-Frage. *Virchows Archiv* **1854**, 6 (3), 416.
2. Cohen, A. S.; Connors, L. H., The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *The Journal of Pathology* **1987**, 151 (1), 1-10.
3. Giles, R. B., Jr.; Calkins, E., Studies of the composition of secondary amyloid. *The Journal of Clinical Investigation* 34 (9), 1476-1482.
4. Cohen, A. S.; Calkins, E., Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* **1959**, 183 (4669), 1202-1203.
5. Cohen, A. S.; Calkins, E.; Levene, C. I., Studies on Experimental Amyloidosis: I. Analysis of Histology and Staining Reactions of Casein-Induced Amyloidosis in the Rabbit. *The American journal of pathology* **1959**, 35 (5), 971-989.
6. Hobbs, J. R.; Morgan, A. D., Fluorescence microscopy with thioflavine-T in the diagnosis of amyloid. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **1963**, 86 (2), 437-442.
7. Puchtler, H.; Sweat, F., Congo Red as a Stain for Fluorescence Microscopy of Amyloid. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1965**, 13 (8), 693-694.
8. Luna-Munoz, J.; Peralta-Ramirez, J.; Chavez-Macias, L.; Harrington, C. R.; Wischik, C. M.; Mena, R., Thiazin red as a neuropathological tool for the rapid diagnosis of Alzheimer's disease in tissue imprints. *Acta Neuropathol* **2008**, 116 (5), 507-15.
9. Gueft, B.; Ghidoni, J. J., The Site of Formation and Ultrastructure of Amyloid. *The American journal of pathology* **1963**, 43 (5), 837-854.
10. Shirahama, T.; Cohen, A. S., High-Resolution Electron Microscopic Analyses of the Amyloid Fibril. *The Journal of cell biology* **1967**, 33 (3), 679-708.
11. Eanes, E. D.; Glenner, G. G., X-Ray Diffraction Studies on Amyloid Filaments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1968**, 16 (11), 673-677.
12. Sunde, M.; Blake, C., The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. In *Advances in Protein Chemistry*, Frederic M. Richards, D. S. E.; Peter, S. K., Eds. Academic Press: 1997; Vol. Volume 50, pp 123-159.
13. Makin, O. S.; Serpell, L. C., Structures for amyloid fibrils. *FEBS Journal* **2005**, 272 (23), 5950-5961.
14. Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.-i.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermarck, P., Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid* **2014**, 21 (4), 221-224.
15. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75 (1), 333-366.
16. Serpell, L. C.; Sunde, M.; Benson, M. D.; Tennent, G. A.; Pepys, M. B.; Fraser, P. E., The protofilament substructure of amyloid fibrils¹. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 300 (5), 1033-1039.
17. Naiki, H.; Hashimoto, N.; Suzuki, S.; Kimura, H.; Nakakuki, K.; Gejyo, F., Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension *in vitro*. *Amyloid* **1997**, 4 (4), 223-232.
18. Arosio, P.; Knowles, T. P. J.; Linse, S., On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, 17 (12), 7606-7618.
19. Harper, J. D.; Lansbury, P. T., Models of Amyloid Seeding in Alzheimer's Disease and Scrapie: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **1997**, 66 (1), 385-407.
20. Wilson, M. R.; Yerbury, J. J.; Poon, S., Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Molecular BioSystems* **2008**, 4 (1), 42-52.
21. Kirkitadze, M. D.; Bitan, G.; Teplow, D. B., Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: The emerging role of oligomeric assemblies. *Journal of neuroscience research* **2002**, 69 (5), 567-577.

22. Souillac, P. O.; Uversky, V. N.; Millett, I. S.; Khurana, R.; Doniach, S.; Fink, A. L., Elucidation of the Molecular Mechanism during the Early Events in Immunoglobulin Light Chain Amyloid Fibrillation: Evidence for an Off-Pathway Oligomer at Acidic pH. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (15), 12666-12679.
23. Patterson, K. R.; Remmers, C.; Fu, Y.; Brooker, S.; Kanaan, N. M.; Vana, L.; Ward, S.; Reyes, J. F.; Philibert, K.; Glucksman, M. J.; Binder, L. I., Characterization of Prefibrillar Tau Oligomers *in Vitro* and in Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (26), 23063-23076.
24. Breydo, L.; Kurouski, D.; Rasool, S.; Milton, S.; Wu, J. W.; Uversky, V. N.; Lednev, I. K.; Glabe, C. G., Structural differences between amyloid beta oligomers. *Biochemical and biophysical research communications* **2016**, *477* (4), 700-705.
25. Sengupta, U.; Nilson, A. N.; Kaye, R., The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* **2016**, *6*, 42-49.
26. Hayden, E. Y.; Teplow, D. B., Amyloid β -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* **2013**, *5* (6), 1-11.
27. Flach, K.; Hilbrich, I.; Schiffmann, A.; Gärtner, U.; Krüger, M.; Leonhardt, M.; Waschipky, H.; Wick, L.; Arendt, T.; Holzer, M., Tau Oligomers Impair Artificial Membrane Integrity and Cellular Viability. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (52), 43223-43233.
28. Lasagna-Reeves, C. A.; Castillo-Carranza, D. L.; Guerrero-Muñoz, M. J.; Jackson, G. R.; Kaye, R., Preparation and Characterization of Neurotoxic Tau Oligomers. *Biochemistry* **2010**, *49* (47), 10039-10041.
29. Cohen, S. I. A.; Linse, S.; Luheshi, L. M.; Hellstrand, E.; White, D. A.; Rajah, L.; Otzen, D. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J., Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (24), 9758-9763.
30. Barz, B.; Strodel, B., Understanding Amyloid- β Oligomerization at the Molecular Level: The Role of the Fibril Surface. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22* (26), 8768-8772.
31. Cowan, C. M.; Mudher, A., Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol* **2013**, *4*, 114.
32. Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P., Quantifying Amyloid β -Peptide (A β) Aggregation Using the Congo Red-A β (CR-A β) Spectrophotometric Assay. *Analytical biochemistry* **1999**, *266* (1), 66-76.
33. Klunk, W. E.; Jacob, R. F.; Mason, R. P., [19] Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 1999; Vol. Volume 309, pp 285-305.
34. Friedhoff, P.; Schneider, A.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Rapid Assembly of Alzheimer-like Paired Helical Filaments from Microtubule-Associated Protein Tau Monitored by Fluorescence in Solution. *Biochemistry* **1998**, *37* (28), 10223-10230.
35. Levine, H., Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* **1993**, *2* (3), 404-410.
36. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C.; Andrisano, V., Insight Into the Kinetic of Amyloid β (1–42) Peptide Self-Aggregation: Elucidation of Inhibitors' Mechanism of Action. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2007**, *8* (17), 2152-2161.
37. Podlisny, M. B.; Walsh, D. M.; Amarante, P.; Ostaszewski, B. L.; Stimson, E. R.; Maggio, J. E.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J., Oligomerization of Endogenous and Synthetic Amyloid β -Protein at Nanomolar Levels in Cell Culture and Stabilization of Monomer by Congo Red. *Biochemistry* **1998**, *37* (11), 3602-3611.
38. Lendel, C.; Bolognesi, B.; Wahlström, A.; Dobson, C. M.; Gräslund, A., Detergent-like Interaction of Congo Red with the Amyloid β Peptide. *Biochemistry* **2010**, *49* (7), 1358-1360.
39. Jameson, L. P.; Smith, N. W.; Dzyuba, S. V., Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid (A β) self-assembly. *ACS chemical neuroscience* **2012**, *3* (11), 807-19.
40. Kumar, S.; Walter, J., Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging* **2011**, *3* (8), 803-812.

41. Stine, W. B.; Snyder, S. W.; Lador, U. S.; Wade, W. S.; Miller, M. F.; Perun, T. J.; Holzman, T. F.; Krafft, G. A., The nanometer-scale structure of amyloid- β visualized by atomic force microscopy. *Journal of Protein Chemistry* **1996**, *15* (2), 193-203.
42. Benditt, E. P.; Eriksen, N.; Berglund, C., Congo Red Dichroism with Dispersed Amyloid Fibrils, an Extrinsic Cotton Effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1970**, *66* (4), 1044-1051.
43. Brahm, S.; Brahm, J., Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal of Molecular Biology* **1980**, *138* (2), 149-178.
44. Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J., Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (24), E3095-E3103.
45. Chimon, S.; Ishii, Y., Capturing Intermediate Structures of Alzheimer's β -Amyloid, A β (1-40), by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (39), 13472-13473.
46. Madine, J.; Jack, E.; Stockley, P. G.; Radford, S. E.; Serpell, L. C.; Middleton, D. A., Structural Insights into the Polymorphism of Amyloid-Like Fibrils Formed by Region 20-29 of Amylin Revealed by Solid-State NMR and X-ray Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (45), 14990-15001.
47. Comellas, G.; Rienstra, C. M., Protein Structure Determination by Magic-Angle Spinning Solid-State NMR, and Insights into the Formation, Structure, and Stability of Amyloid Fibrils. *Annual Review of Biophysics* **2013**, *42* (1), 515-536.
48. Autiero, I.; Saviano, M.; Langella, E., *In silico* investigation and targeting of amyloid β oligomers of different size. *Molecular BioSystems* **2013**, *9* (8), 2118-2124.
49. Doussineau, T.; Mathevon, C.; Altamura, L.; Vendrely, C.; Dugourd, P.; Forge, V.; Antoine, R., Mass Determination of Entire Amyloid Fibrils by Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie* **2016**, *128* (7), 2386-2390.
50. Buée, L.; Bussièr, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews* **2000**, *33* (1), 95-130.
51. Braak, H.; Braak, E., Demonstration of Amyloid Deposits and Neurofibrillary Changes in Whole Brain Sections. *Brain Pathology* **1991**, *1* (3), 213-216.
52. Goedert, M.; Ghetti, B.; Spillantini, M. G., Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**, *2* (2).
53. Hof, P. R.; Bouras, C.; Buée, L.; Delacourte, A.; Perl, D. P.; Morrison, J. H., Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases. *Acta Neuropathologica* **1992**, *85* (1), 23-30.
54. Hirano, A., Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex on Guam: immunohistochemical studies. *Keio Journal of Medicine* **1992**, *41* (1), 6-9.
55. Paulus, W.; Selim, M., Corticonigral degeneration with neuronal achromasia and basal neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathologica* **1990**, *81* (1), 89-94.
56. Hof, P. R.; Bouras, C.; Perl, D. P.; Sparks, D.; Mehta, N.; Morrison, J. H., Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with down's syndrome: Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. *Archives of Neurology* **1995**, *52* (4), 379-391.
57. Geddes, J. F.; Hughes, A. J.; Lees, A. J.; Daniel, S. E., Pathological overlap in cases of parkinsonism associated with neurofibrillary tangles. *Brain* **1993**, *116* (1), 281.
58. Hauw, J. J.; Verny, M.; Delaère, P.; Cervera, P.; He, Y.; Duyckaerts, C., Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neuroscience letters* **1990**, *119* (2), 182-186.
59. Hof, P. R.; Bouras, C.; Perl, D. P.; Morrison, J. H., Quantitative neuropathologic analysis of Pick's disease cases: cortical distribution of Pick bodies and coexistence with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* **1994**, *87* (2), 115-124.

60. Yang, W.; Ang, L. C.; Strong, M. J., Tau protein aggregation in the frontal and entorhinal cortices as a function of aging. *Developmental Brain Research* **2005**, *156* (2), 127-138.
61. Scholz, T.; Mandelkow, E., Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2014**, *71* (16), 3139-50.
62. Mietelska-Porowska, A.; Wasik, U.; Goras, M.; Filipek, A.; Niewiadomska, G., Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15* (3), 4671.
63. Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**, *2* (7).
64. Pooler, A. M.; Noble, W.; Hanger, D. P., A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology* **2014**, *76 Pt A*, 1-8.
65. Simic, G.; Babic Leko, M.; Wray, S.; Harrington, C.; Delalle, I.; Jovanov-Milosevic, N.; Bazadona, D.; Buee, L.; de Silva, R.; Di Giovanni, G.; Wischik, C.; Hof, P. R., Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* **2016**, *6* (1).
66. Wille, H.; Drewes, G.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau *in vitro*. *The Journal of cell biology* **1992**, *118* (3), 573-584.
67. Barghorn, S.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Purification of Recombinant Tau Protein and Preparation of Alzheimer-Paired Helical Filaments *In Vitro*. In *Amyloid Proteins*, Sigurdsson, E., Ed. Humana Press: 2005; Vol. 299, pp 35-51.
68. Jeganathan, S.; von Bergen, M.; Brütlich, H.; Steinhoff, H.-J.; Mandelkow, E., Global Hairpin Folding of Tau in Solution. *Biochemistry* **2006**, *45* (7), 2283-2293.
69. Maeda, S.; Sahara, N.; Saito, Y.; Murayama, S.; Ikai, A.; Takashima, A., Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience research* **2006**, *54* (3), 197-201.
70. Maeda, S.; Sahara, N.; Saito, Y.; Murayama, M.; Yoshiike, Y.; Kim, H.; Miyasaka, T.; Murayama, S.; Ikai, A.; Takashima, A., Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments. *Biochemistry* **2007**, *46* (12), 3856-3861.
71. Crowe, A.; Huang, W.; Ballatore, C.; Johnson, R. L.; Hogan, A. M.; Huang, R.; Wichterle, J.; McCoy, J.; Hurn, D.; Auld, D. S.; Smith, A. B., 3rd; Inglese, J.; Trojanowski, J. Q.; Austin, C. P.; Brunden, K. R.; Lee, V. M., Identification of aminothienopyridazine inhibitors of tau assembly by quantitative high-throughput screening. *Biochemistry* **2009**, *48* (32), 7732-45.
72. Ward, S. M.; Himmelstein, D. S.; Lancia, J. K.; Binder, L. I., Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans* **2012**, *40* (4), 667-71.
73. Cardenas-Aguayo Mdel, C.; Gomez-Virgilio, L.; DeRosa, S.; Meraz-Rios, M. A., The role of tau oligomers in the onset of Alzheimer's disease neuropathology. *ACS chemical neuroscience* **2014**, *5* (12), 1178-91.
74. Frost, B.; Jack, R. L.; Diamond, M. I., Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (19), 12845-52.
75. Kfoury, N.; Holmes, B. B.; Jiang, H.; Holtzman, D. M.; Diamond, M. I., Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287* (23), 19440-51.
76. Michel, C. H.; Kumar, S.; Pinotsi, D.; Tunnacliffe, A.; St. George-Hyslop, P.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.-M.; Kaminski, C. F.; Kaminski Schierle, G. S., Extracellular Monomeric Tau Protein Is Sufficient to Initiate the Spread of Tau Protein Pathology. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (2), 956-967.
77. Karch, C. M.; Jeng, A. T.; Goate, A. M., Extracellular Tau Levels Are Influenced by Variability in Tau That Is Associated with Tauopathies. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (51), 42751-42762.
78. Gómez-Ramos, A.; Díaz-Hernández, M.; Rubio, A.; Miras-Portugal, M. T.; Avila, J., Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2008**, *37* (4), 673-681.

79. Medina, M.; Avila, J., New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochemical Pharmacology* **2014**, *88* (4), 540-547.
80. Falcon, B.; Cavallini, A.; Angers, R.; Glover, S.; Murray, T. K.; Barnham, L.; Jackson, S.; O'Neill, M. J.; Isaacs, A. M.; Hutton, M. L.; Szekeres, P. G.; Goedert, M.; Bose, S., Conformation Determines the Seeding Potencies of Native and Recombinant Tau Aggregates. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (2), 1049-1065.
81. Villemagne, V. L.; Fodero-Tavoletti, M. T.; Masters, C. L.; Rowe, C. C., Tau imaging: early progress and future directions. *The Lancet Neurology* **2015**, *14* (1), 114-124.
82. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **2013**, *9* (2), 208-45.
83. Ghareeb, D. A.; Mohamed, S.; El-Sayed, M., The interrelationship between insulin resistance and Alzheimer development. *Journal of Biomedical Science and Engineering* **2013**, *Vol.06No.07*, 20.
84. Arriagada, P. V.; Growdon, J. H.; Hedley-Whyte, E. T.; Hyman, B. T., Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **1992**, *42* (3), 631-631.
85. Braak, H.; Braak, E., Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* **1991**, *82* (4), 239-259.
86. Delacourte, A.; David, J. P.; Sergeant, N.; Buee, L.; Wattez, A.; Vermersch, P.; Ghazali, F.; Fallet-Bianco, C.; Pasquier, F.; Lebert, F.; Petit, H.; Di Menza, C., The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **1999**, *52* (6), 1158-1158.
87. Jack Jr, C. R.; Albert, M. S.; Knopman, D. S.; McKhann, G. M.; Sperling, R. A.; Carrillo, M. C.; Thies, B.; Phelps, C. H., Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* **2011**, *7* (3), 257-262.
88. Brunden, K. R.; Trojanowski, J. Q.; Smith, A. B., 3rd; Lee, V. M.; Ballatore, C., Microtubule-stabilizing agents as potential therapeutics for neurodegenerative disease. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2014**, *22* (18), 5040-9.
89. Golde, T. E.; Petrucelli, L.; Lewis, J., Targeting A β and tau in Alzheimer's disease, an early interim report. *Experimental Neurology* **2010**, *223* (2), 252-266.
90. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E., Progress and developments in tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56* (11), 4135-55.
91. Wischik, C. M.; Harrington, C. R.; Storey, J. M. D., Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* **2014**, *88* (4), 529-539.
92. Pickhardt, M.; Neumann, T.; Schwizer, D.; Callaway, K.; Vendruscolo, M.; Schenk, D.; St. George-Hyslop, P.; M. Mandelkow, E.; M. Dobson, C.; McConlogue, L.; Mandelkow, E.; Toth, G., Identification of Small Molecule Inhibitors of Tau Aggregation by Targeting Monomeric Tau As a Potential Therapeutic Approach for Tauopathies. *Current Alzheimer Research* **2015**, *12* (9), 814-828.
93. Taniguchi, S.; Suzuki, N.; Masuda, M.; Hisanaga, S.; Iwatsubo, T.; Goedert, M.; Hasegawa, M., Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280* (9), 7614-23.
94. Pickhardt, M.; Gazova, Z.; von Bergen, M.; Khlistunova, I.; Wang, Y.; Hascher, A.; Mandelkow, E. M.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments *in vitro* and in cells. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280* (5), 3628-35.
95. Paranjape, S. R.; Riley, A. P.; Somoza, A. D.; Oakley, C. E.; Wang, C. C. C.; Prisinzano, T. E.; Oakley, B. R.; Gamblin, T. C., Azaphilones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Tau Aggregates *in Vitro*. *ACS chemical neuroscience* **2015**, *6* (5), 751-760.
96. Wang, Y.; Mandelkow, E., Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways. *Biochemical Society Transactions* **2012**, *40* (4), 644.
97. Einar, M. S., Tau-Focused Immunotherapy for Alzheimers Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer Research* **2009**, *6* (5), 446-450.

98. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology* **2010**, *59* (4-5), 276-89.
99. Ballatore, C.; Crowe, A.; Piscitelli, F.; James, M.; Lou, K.; Rossidivito, G.; Yao, Y.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Brunden, K. R.; Smith, A. B., 3rd, Aminothienopyridazine inhibitors of tau aggregation: evaluation of structure-activity relationship leads to selection of candidates with desirable *in vivo* properties. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20* (14), 4451-61.
100. Crowe, A.; James, M. J.; Lee, V. M. Y.; Smith, A. B.; Trojanowski, J. Q.; Ballatore, C.; Brunden, K. R., Aminothienopyridazines and Methylene Blue Affect Tau Fibrillization via Cysteine Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (16), 11024-11037.
101. Krebs, M. R.; Bromley, E. H.; Donald, A. M., The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of structural biology* **2005**, *149* (1), 30-7.
102. Chirita, C.; Necula, M.; Kuret, J., Ligand-Dependent Inhibition and Reversal of Tau Filament Formation. *Biochemistry* **2004**, *43* (10), 2879-2887.
103. Wischik, C. M.; Edwards, P. C.; Lai, R. Y.; Roth, M.; Harrington, C. R., Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (20), 11213-11218.
104. Schirmer, R. H.; Adler, H.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E., "Lest we forget you — methylene blue ...". *Neurobiology of Aging* **2011**, *32* (12), 2325.e7-2325.e16.
105. Akoury, E.; Pickhardt, M.; Gajda, M.; Biernat, J.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M., Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of Tau aggregation. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52* (12), 3511-5.
106. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02380573?term=methylene+blue&rank=13>.
107. Crowe, A.; Ballatore, C.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y., High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochemical and biophysical research communications* **2007**, *358* (1), 1-6.
108. Ballatore, C.; Brunden, K. R.; Piscitelli, F.; James, M. J.; Crowe, A.; Yao, Y.; Hyde, E.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y.; Smith, A. B., Discovery of Brain-Penetrant, Orally Bioavailable Aminothienopyridazine Inhibitors of Tau Aggregation. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53* (9), 3739-3747.
109. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Khlistunova, I.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Waldmann, H., Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (48), 9215-9219.
110. Pickhardt, M.; Biernat, J.; Khlistunova, I.; Wang, Y. P.; Gazova, Z.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., N-Phenylamine Derivatives as Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. *Current Alzheimer Research* **2007**, *4* (4), 397-402.
111. Gregor, L.; Marcus, P.; David, G. L.; Boris, S.; Eckhard, M., Screening for Inhibitors of Tau Protein Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments: A Ligand Based Approach Results in Successful Scaffold Hopping. *Current Alzheimer Research* **2007**, *4* (3), 315-323.
112. Pickhardt, M.; Larbig, G.; Khlistunova, I.; Coksezen, A.; Meyer, B.; Mandelkow, E.-M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E., Phenylthiazolyl-Hydrazide and Its Derivatives Are Potent Inhibitors of τ Aggregation and Toxicity *in Vitro* and in Cells. *Biochemistry* **2007**, *46* (35), 10016-10023.
113. Taghavi, A.; Nasir, S.; Pickhardt, M.; Haußen, R. H.-v.; Mall, G.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.-M.; Schmidt, B., N'-Benzylidene-Benzohydrazides as Novel and Selective Tau-PHF Ligands. *Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, *27* (4), 835-843.
114. Osmanova, N.; Schultze, W.; Ayoub, N., Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews* **2010**, *9* (2), 315-342.
115. Ono, K.; Yamada, M., Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for α -synuclein fibrils *in vitro*. *Journal of neurochemistry* **2006**, *97* (1), 105-15.
116. Riviere, C.; Richard, T.; Vitrac, X.; Merillon, J. M.; Valls, J.; Monti, J. P., New polyphenols active on β -amyloid aggregation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18* (2), 828-31.

117. Noor, H.; Cao, P.; Raleigh, D. P., Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2012**, *21* (3), 373-82.
118. Churches, Q. I.; Caine, J.; Cavanagh, K.; Epa, V. C.; Waddington, L.; Tranberg, C. E.; Meyer, A. G.; Varghese, J. N.; Streltsov, V.; Duggan, P. J., Naturally occurring polyphenolic inhibitors of amyloid β aggregation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2014**, *24* (14), 3108-3112.
119. Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E., Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical biology & drug design* **2006**, *67* (1), 27-37.
120. Hamaguchi, T.; Ono, K.; Murase, A.; Yamada, M., Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *The American journal of pathology* **2009**, *175* (6), 2557-65.
121. Choi, S. M.; Kim, B. C.; Cho, Y. H.; Choi, K. H.; Chang, J.; Park, M. S.; Kim, M. K.; Cho, K. H.; Kim, J. K., Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. *Chonnam medical journal* **2014**, *50* (2), 45-51.
122. Berhanu, W. M.; Masunov, A. E., Atomistic mechanism of polyphenol amyloid aggregation inhibitors: molecular dynamics study of Curcumin, Exifone, and Myricetin interaction with the segment of tau peptide oligomer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2015**, *33* (7), 1399-1411.
123. Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M., REVIEW: Curcumin and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2010**, *16* (5), 285-297.
124. Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubada, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M., Curcumin Inhibits Formation of Amyloid β Oligomers and Fibrils, Binds Plaques, and Reduces Amyloid *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (7), 5892-5901.
125. Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K.-H.; Choi, Y.; Kim, B.-T., Curcumin and Dehydrozingerone Derivatives: Synthesis, Radiolabeling, and Evaluation for β -Amyloid Plaque Imaging[†]. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49* (20), 6111-6119.
126. Ma, Q.-L.; Zuo, X.; Yang, F.; Ubada, O. J.; Gant, D. J.; Alaverdyan, M.; Teng, E.; Hu, S.; Chen, P.-P.; Maiti, P.; Teter, B.; Cole, G. M.; Frautschy, S. A., Curcumin Suppresses Soluble Tau Dimers and Corrects Molecular Chaperone, Synaptic, and Behavioral Deficits in Aged Human Tau Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (6), 4056-4065.
127. Park, K.-s.; Seo, Y.; Kim, M. K.; Kim, K.; Kim, Y. K.; Choo, H.; Chong, Y., A curcumin-based molecular probe for near-infrared fluorescence imaging of tau fibrils in Alzheimer's disease. *Organic & biomolecular chemistry* **2015**, *13* (46), 11194-11199.
128. Goozee, K. G.; Shah, T. M.; Sohrabi, H. R.; Rainey-Smith, S. R.; Brown, B.; Verdile, G.; Martins, R. N., Examining the potential clinical value of curcumin in the prevention and diagnosis of Alzheimer's disease. *British Journal of Nutrition* **2015**, *115* (3), 449-465.
129. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01383161?term=curcumin&rank=5>.
130. Detsi, A.; Majdalani, M.; Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kefalas, P., Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**, *17* (23), 8073-8085.
131. Shin, S. Y.; Shin, M. C.; Shin, J.-S.; Lee, K.-T.; Lee, Y. S., Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE2 productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21* (15), 4520-4523.
132. Roussaki, M.; Costa Lima, S.; Kypreou, A.-M.; Kefalas, P.; Cordeiro da Silva, A.; Detsi, A., Aurones: A Promising Heterocyclic Scaffold for the Development of Potent Antileishmanial Agents. *International Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *2012*, 8.
133. Carrasco, M. P.; Newton, A. S.; Gonçalves, L.; Góis, A.; Machado, M.; Gut, J.; Nogueira, F.; Hänscheid, T.; Guedes, R. C.; dos Santos, D. J. V. A.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R., Probing the aurone

scaffold against *Plasmodium falciparum*: Design, synthesis and antimalarial activity. *European journal of medicinal chemistry* **2014**, *80*, 523-534.

134. Manjulatha, K.; Srinivas, S.; Mulakayala, N.; Rambabu, D.; Prabhakar, M.; Arunasree, K. M.; Alvala, M.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M., Ethylenediamine diacetate (EDDA) mediated synthesis of aurones under ultrasound: their evaluation as inhibitors of SIRT1. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22* (19), 6160-5.

135. Dubois, C.; Haudecoeur, R.; Orio, M.; Belle, C.; Bochot, C.; Boumendjel, A.; Hardré, R.; Jamet, H.; Réglie, M., Versatile Effects of Aurone Structure on Mushroom Tyrosinase Activity. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2012**, *13* (4), 559-565.

136. Iwashina, T., The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research* **2000**, *113* (3), 287-299.

137. Nakayama, T.; Sato, T.; Fukui, Y.; Yonekura-Sakakibara, K.; Hayashi, H.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Nishino, T., Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Letters* **2001**, *499* (1-2), 107-111.

138. Atta Ur, R.; Choudhary, M. I.; Hayat, S.; Khan, A. M.; Ahmed, A., Two New Aurones from Marine Brown Alga *Spatoglossum variabile*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2001**, *49* (1), 105-107.

139. Huong, T. T.; Cuong, N. X.; Tram, L. H.; Quang, T. T.; Duong, L. V.; Nam, N. H.; Dat, N. T.; Huong, P. T. T.; Diep, C. N.; Kiem, P. V.; Minh, C. V., A new prenylated aurone from *Artocarpus altilis*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2012**, *14* (9), 923-928.

140. Song, Y.-x.; Ma, Q.; Li, J., A new aurone glycoside with antifungal activity from marine-derived fungus *Penicillium sp. FJ-1*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2015**, *40* (6), 1097-1101.

141. Haudecoeur, R.; Boumendjel, A., Recent Advances in the Medicinal Chemistry of Aurones. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19* (18), 2861-2875.

142. Bandgar, B. P.; Patil, S. A.; Korbadi, B. L.; Biradar, S. C.; Nile, S. N.; Khobragade, C. N., Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated aurone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, *45* (7), 3223-3227.

143. Kayser, O.; Kiderlen, A. F., Leishmanicidal Activity of Aurones. *Tokai journal of experimental and clinical medicine* **1998**, *23* (6), 423-426.

144. Lawrence, N. J.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A., The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: aurones and flavones as anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2003**, *13* (21), 3759-3763.

145. Meguellati, A.; Ahmed-Belkacem, A.; Yi, W.; Haudecoeur, R.; Crouillère, M.; Brillet, R.; Pawlotsky, J.-M.; Boumendjel, A.; Peuchmaur, M., B-ring modified aurones as promising allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *European journal of medicinal chemistry* **2014**, *80*, 579-592.

146. Meguellati, A.; Ahmed-Belkacem, A.; Nurisso, A.; Yi, W.; Brillet, R.; Berqouch, N.; Chavoutier, L.; Fortuné, A.; Pawlotsky, J.-M.; Boumendjel, A.; Peuchmaur, M., New pseudodimeric aurones as palm pocket inhibitors of Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *European journal of medicinal chemistry* **2016**, *115*, 217-229.

147. Marková, E.; Kotik, M.; Křenková, A.; Man, P.; Haudecoeur, R.; Boumendjel, A.; Hardré, R.; Mekmouche, Y.; Courvoisier-Dezord, E.; Réglie, M.; Martínková, L., Recombinant Tyrosinase from *Polyporus arcularius*: Overproduction in *Escherichia coli*, Characterization, and Use in a Study of Aurones as Tyrosinase Effectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64* (14), 2925-2931.

148. Haudecoeur, R.; Gouron, A.; Dubois, C.; Jamet, H.; Lightbody, M.; Hardré, R.; Milet, A.; Bergantino, E.; Bubacco, L.; Belle, C.; Réglie, M.; Boumendjel, A., Investigation of Binding-Site Homology between Mushroom and Bacterial Tyrosinases by Using Aurones as Effectors. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2014**, *15* (9), 1325-1333.

149. Morales-Camilo, N.; Salas, C. O.; Sanhueza, C.; Espinosa-Bustos, C.; Sepúlveda-Boza, S.; Reyes-Parada, M.; Gonzalez-Nilo, F.; Caroli-Rezende, M.; Fierro, A., Synthesis, Biological Evaluation, and

Molecular Simulation of Chalcones and Aurones as Selective MAO-B Inhibitors. *Chemical biology & drug design* **2015**, *85* (6), 685-695.

150. Li, Y.; Qiang, X.; Luo, L.; Li, Y.; Xiao, G.; Tan, Z.; Deng, Y., Synthesis and evaluation of 4-hydroxyl aurone derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**, *24* (10), 2342-2351.

151. Maynard, C. J.; Bush, A. I.; Masters, C. L.; Cappai, R.; Li, Q.-X., Metals and amyloid- β in Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology* **2005**, *86* (3), 147-159.

152. Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T., High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *European journal of medicinal chemistry* **2003**, *38* (3), 223-232.

153. Liew, K.-F.; Chan, K.-L.; Lee, C.-Y., Blood-brain barrier permeable anticholinesterase aurones: Synthesis, structure-activity relationship, and drug-like properties. *European journal of medicinal chemistry* **2015**, *94*, 195-210.

154. Ono, M.; Maya, Y.; Haratake, M.; Ito, K.; Mori, H.; Nakayama, M., Aurones serve as probes of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* **2007**, *361* (1), 116-21.

155. Ono, M.; Ikeoka, R.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Fuchigami, T.; Haratake, M.; Saji, H.; Nakayama, M., $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, *20* (19), 5743-8.

156. Ono, M.; Yoshida, N.; Ishibashi, K.; Haratake, M.; Arano, Y.; Mori, H.; Nakayama, M., Radioiodinated Flavones for *in Vivo* Imaging of β -Amyloid Plaques in the Brain. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48* (23), 7253-7260.

157. Watanabe, H.; Ono, M.; Kimura, H.; Kagawa, S.; Nishii, R.; Fuchigami, T.; Haratake, M.; Nakayama, M.; Saji, H., A dual fluorinated and iodinated radiotracer for PET and SPECT imaging of β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**, *21* (21), 6519-22.

158. Watanabe, H.; Ono, M.; Saji, H., Novel PET/SPECT Probes for Imaging of Tau in Alzheimer's Disease. *The Scientific World Journal* **2015**, *2015*, 6.

159. von Bergen, M.; Friedhoff, P.; Biernat, J.; Heberle, J.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., Assembly of τ protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ($^{306}\text{VQIVYK}^{311}$) forming β structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (10), 5129-5134.

160. von Bergen, M.; Barghorn, S.; Li, L.; Marx, A.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E., Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (51), 48165-74.

161. Goux, W. J.; Kopplin, L.; Nguyen, A. D.; Leak, K.; Rutkofsky, M.; Shanmuganandam, V. D.; Sharma, D.; Inouye, H.; Kirschner, D. A., The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (26), 26868-75.

162. Mohamed, T.; Hoang, T.; Jelokhani-Niaraki, M.; Rao, P. P., Tau-derived-hexapeptide 306VQIVYK311 aggregation inhibitors: nitrocatechol moiety as a pharmacophore in drug design. *ACS chemical neuroscience* **2013**, *4* (12), 1559-70.

163. Dufour, E. Inhibiteurs et modèles moléculaires de fibres amyloïdes τ et tau impliquées dans la maladie d'Alzheimer : conception, synthèse et caractérisation. Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble, **2013**.

164. Street, A. G.; Mayo, S. L., Intrinsic β -sheet propensities result from van der Waals interactions between side chains and the local backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96* (16), 9074-9076.

165. Li, W.; Lee, V. M. Y., Characterization of Two VQIXXK Motifs for Tau Fibrillization *in Vitro*. *Biochemistry* **2006**, *45* (51), 15692-15701.

166. Barré, P.; Eliezer, D., Structural transitions in tau K18 on micelle binding suggest a hierarchy in the efficacy of individual microtubule-binding repeats in filament nucleation. *Protein Science* **2013**, *22* (8), 1037-1048.

167. Peterson, D. W.; Zhou, H.; Dahlquist, F. W.; Lew, J., A Soluble Oligomer of Tau Associated with Fiber Formation Analyzed by NMR. *Biochemistry* **2008**, *47* (28), 7393-7404.
168. Moore, C. L.; Huang, M. H.; Robbenolt, S. A.; Voss, K. R.; Combs, B.; Gamblin, T. C.; Goux, W. J., Secondary Nucleating Sequences Affect Kinetics and Thermodynamics of Tau Aggregation. *Biochemistry* **2011**, *50* (50), 10876-10886.
169. Rojas Quijano, F. A.; Morrow, D.; Wise, B. M.; Brancia, F. L.; Goux, W. J., Prediction of nucleating sequences from amyloidogenic propensities of tau-related peptides. *Biochemistry* **2006**, *45* (14), 4638-52.
170. Li, D.-W.; Mohanty, S.; Irbäck, A.; Huo, S., Formation and Growth of Oligomers: A Monte Carlo Study of an Amyloid Tau Fragment. *PLoS Comput Biol* **2008**, *4* (12), e1000238.
171. Inouye, H.; Sharma, D.; Goux, W. J.; Kirschner, D. A., Structure of Core Domain of Fibril-Forming PHF/Tau Fragments. *Biophysical Journal* **2006**, *90* (5), 1774-1789.
172. Inoue, M.; Hirata, A.; Tainaka, K.; Morii, T.; Konno, T., Charge-Pairing Mechanism of Phosphorylation Effect upon Amyloid Fibrillation of Human Tau Core Peptide. *Biochemistry* **2008**, *47* (45), 11847-11857.
173. Inoue, M.; Kaida, S.; Nakano, S.; Annoni, C.; Nakata, E.; Konno, T.; Morii, T., Phosphorylation regulates fibrillation of an aggregation core peptide in the second repeat of microtubule-binding domain of human tau. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2014**, *22* (22), 6471-6480.
174. Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S., Macrocyclic β -sheet peptides that inhibit the aggregation of a tau-protein-derived hexapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (9), 3144-57.
175. Zheng, J.; Baghkhani, A. M.; Nowick, J. S., A hydrophobic surface is essential to inhibit the aggregation of a tau-protein-derived hexapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (18), 6846-52.
176. Sievers, S. A.; Karanicolas, J.; Chang, H. W.; Zhao, A.; Jiang, L.; Zirafi, O.; Stevens, J. T.; Munch, J.; Baker, D.; Eisenberg, D., Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature* **2011**, *475* (7354), 96-100.
177. Frenkel-Pinter, M.; Tal, S.; Scherzer-Attali, R.; Abu-Hussien, M.; Alyagor, I.; Eisenbaum, T.; Gazit, E.; Segal, D. *Naphthoquinone-Tryptophan Hybrid Inhibits Aggregation of the Tau-Derived Peptide PHF6 and Reduces Neurotoxicity*; 1875-8908; IOS Press: 2016; pp 165-178.
178. Larini, L.; Gessel, M. M.; LaPointe, N. E.; Do, T. D.; Bowers, M. T.; Feinstein, S. C.; Shea, J.-E., Initiation of assembly of tau(273-284) and its Δ K280 mutant: an experimental and computational study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (23), 8916-8928.
179. Levine, Z. A.; Larini, L.; LaPointe, N. E.; Feinstein, S. C.; Shea, J.-E., Regulation and aggregation of intrinsically disordered peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (9), 2758-2763.
180. Hirohata, M.; Hasegawa, K.; Tsutsumi-Yasuhara, S.; Ohhashi, Y.; Ookoshi, T.; Ono, K.; Yamada, M.; Naiki, H., The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro* by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry* **2007**, *46* (7), 1888-99.
181. Hudson, S. A.; Ecroyd, H.; Kee, T. W.; Carver, J. A., The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS Journal* **2009**, *276* (20), 5960-5972.
182. Zhang, X.; Tian, Y.; Li, Z.; Tian, X.; Sun, H.; Liu, H.; Moore, A.; Ran, C., Design and Synthesis of Curcumin Analogues for *in Vivo* Fluorescence Imaging and Inhibiting Copper-Induced Cross-Linking of Amyloid Beta Species in Alzheimer's Disease. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (44), 16397-16409.
183. Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S., Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of structural biology* **2005**, *151* (3), 229-238.
184. Daebel, V.; Chinnathambi, S.; Biernat, J.; Schwalbe, M.; Habenstein, B.; Loquet, A.; Akoury, E.; Tepper, K.; Muller, H.; Baldus, M.; Griesinger, C.; Zweckstetter, M.; Mandelkow, E.; Vijayan, V.; Lange,

A., β -Sheet core of tau paired helical filaments revealed by solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (34), 13982-9.

185. Schweers, O.; Mandelkow, E. M.; Biernat, J.; Mandelkow, E., Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the *in vitro* assembly of paired helical filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92* (18), 8463-8467.

186. Landino, L. M.; Skreslet, T. E.; Alston, J. A., Cysteine Oxidation of Tau and Microtubule-associated Protein-2 by Peroxynitrite: Modulation of Microtubule Assembly Kinetics by the Thioredoxin Reductase System. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (33), 35101-35105.

187. Sillen, A.; Barbier, P.; Landrieu, I.; Lefebvre, S.; Wieruszkeski, J.-M.; Leroy, A.; Peyrot, V.; Lippens, G., NMR Investigation of the Interaction between the Neuronal Protein Tau and the Microtubules. *Biochemistry* **2007**, *46* (11), 3055-3064.

188. Ahn, J. S.; Lee, J. H.; Kim, J. H.; Paik, S. R., Novel method for quantitative determination of amyloid fibrils of α -synuclein and amyloid β /A4 protein by using resveratrol. *Analytical biochemistry* **2007**, *367* (2), 259-65.

189. Pietrzak, M.; Wieczorek, Z.; Stachelska, A.; Darzynkiewicz, Z., Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. *Biophysical chemistry* **2003**, *104* (1), 305-313.

190. Haudecoeur, R.; Ahmed-Belkacem, A.; Yi, W.; Fortuné, A.; Brillet, R.; Belle, C.; Nicolle, E.; Pallier, C.; Pawlowsky, J.-M.; Boumendjel, A., Discovery of Naturally Occurring Aurones That Are Potent Allosteric Inhibitors of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54* (15), 5395-5402.

191. Lunven, L.; Bonnet, H.; Yahiaoui, S.; Yi, W.; Da Costa, L.; Peuchmaur, M.; Boumendjel, A.; Chierici, S., Disruption of Fibers from the Tau Model AcPHF6 by Naturally Occurring Aurones and Synthetic Analogues. *ACS chemical neuroscience* **2016**, *7* (7), 995-1003.

192. Okombi, S.; Rival, D.; Bonnet, S.; Mariotte, A.-M.; Perrier, E.; Boumendjel, A., Discovery of Benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (Aurones) as Inhibitors of Tyrosinase Derived from Human Melanocytes. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49* (1), 329-333.

193. Boumendjel, A., Aurones: A Subclass of Flavones with Promising Biological Potential. *Current Medicinal Chemistry* **2003**, *10* (23), 2621-2630.

194. Geissman, T. A.; Heaton, C. D., Anthochlor Pigments. IV. The Pigments of *Coreopsis grandiflora*, Nutt. l. *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65* (4), 677-683.

195. Sato, T.; Nakayama, T.; Kikuchi, S.; Fukui, Y.; Yonekura-Sakakibara, K.; Ueda, T.; Nishino, T.; Tanaka, Y.; Kusumi, T., Enzymatic formation of aurones in the extracts of yellow snapdragon flowers. *Plant Science* **2001**, *160* (2), 229-236.

196. Nakayama, T.; Yonekura-Sakakibara, K.; Sato, T.; Kikuchi, S.; Fukui, Y.; Fukuchi-Mizutani, M.; Ueda, T.; Nakao, M.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Nishino, T., Aureusidin Synthase: A Polyphenol Oxidase Homolog Responsible for Flower Coloration. *Science* **2000**, *290* (5494), 1163-1166.

197. Ono, E.; Fukuchi-Mizutani, M.; Nakamura, N.; Fukui, Y.; Yonekura-Sakakibara, K.; Yamaguchi, M.; Nakayama, T.; Tanaka, T.; Kusumi, T.; Tanaka, Y., Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (29), 11075-11080.

198. Ono, E.; Hatayama, M.; Isono, Y.; Sato, T.; Watanabe, R.; Yonekura-Sakakibara, K.; Fukuchi-Mizutani, M.; Tanaka, Y.; Kusumi, T.; Nishino, T.; Nakayama, T., Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **2006**, *45* (2), 133-43.

199. Miosic, S.; Knop, K.; Hölscher, D.; Greiner, J.; Gosch, C.; Thill, J.; Kai, M.; Shrestha, B. K.; Schneider, B.; Crecelius, A. C.; Schubert, U. S.; Svatoš, A.; Stich, K.; Halbwirth, H., 4-Deoxyaurone Formation in *Bidens ferulifolia* (Jacq.) DC. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e61766.

200. Kaintz, C.; Molitor, C.; Thill, J.; Kampatsikas, I.; Michael, C.; Halbwirth, H.; Rompel, A., Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. *FEBS Lett* **2014**, *588* (18), 3417-26.

201. Sullivan, M. L., Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in plant science* **2014**, *5*, 783.

202. Wong, E., Occurrence and biosynthesis of 4',6-dihydroxyaurone in soybean. *Phytochemistry* **1966**, 5 (3), 463-467.
203. Wong, E., Aurone biosynthesis—II. *Phytochemistry* **1967**, 6 (9), 1227-1233.
204. Farag, M. A.; Deavours, B. E.; de Fátima, Â.; Naoumkina, M.; Dixon, R. A.; Sumner, L. W., Integrated Metabolite and Transcript Profiling Identify a Biosynthetic Mechanism for Hispidol in *Medicago truncatula* Cell Cultures. *Plant Physiology* **2009**, 151 (3), 1096-1113.
205. Sekizaki, H., Synthesis of 2-Benzylidene-3(2H)-benzofuran-3-ones (Aurones) by Oxidation of 2'-Hydroxychalcones with Mercury(II) Acetate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1988**, 61 (4), 1407-1409.
206. Kasahara, A.; Izumi, T.; Ooshima, M., A New Method of Preparing Flavones. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1974**, 47 (10), 2526-2528.
207. Agrawal, N. N.; Soni, P. A., A new process for the synthesis of aurones by using mercury (II) acetate in pyridine and cupric bromide in dimethyl sulfoxide. *Indian Journal of Chemistry* **2006**, 45B, 1301-1303.
208. Ashok, D.; Ravi, S.; Ganesh, A.; Lakshmi, B. V.; Adam, S.; Murthy, S. D. S., Microwave-assisted synthesis and biological evaluation of carbazole-based chalcones, aurones and flavones. *Medicinal Chemistry Research* **2016**, 25 (5), 909-922.
209. Narsinghani, T.; Sharma, M. C.; Bhargav, S., Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. *Medicinal Chemistry Research* **2013**, 22 (9), 4059-4068.
210. Zwick, V.; Chatzivasileiou, A.-O.; Deschamps, N.; Roussaki, M.; Simões-Pires, C. A.; Nurisso, A.; Denis, I.; Blanquart, C.; Martinet, N.; Carrupt, P.-A.; Detsi, A.; Cuendet, M., Aurones as histone deacetylase inhibitors: Identification of key features. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2014**, 24 (23), 5497-5501.
211. Elhadi, A. A.; Osman, H.; Iqbal, M. A.; Rajeswari, S. K.; Ahamed, M. B. K.; Abdul Majid, A. M. S.; Rosli, M. M.; Razak, I. A.; Majid, A. S. A., Synthesis and structural elucidation of two new series of aurone derivatives as potent inhibitors against the proliferation of human cancer cells. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, 24 (9), 3504-3515.
212. Thakkar, K.; Cushman, M., A novel oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones to 4-methoxyaurones by thallium (III) nitrate. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35 (35), 6441-6444.
213. Thakkar, K.; Cushman, M., A Novel Oxidative Cyclization of 2'-Hydroxychalcones to 4,5-Dialkoxyaurones by Thallium(III) Nitrate. *The Journal of organic chemistry* **1995**, 60 (20), 6499-6510.
214. Thanigaimalai, P.; Yang, H. M.; Sharma, V. K.; Kim, Y.; Jung, S. H., The scope of thallium nitrate oxidative cyclization of chalcones; synthesis and evaluation of isoflavone and aurone analogs for their inhibitory activity against interleukin-5. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, 18 (12), 4441-5.
215. Donnelly, J. A.; Fox, M. J.; Sharma, T. C., α -Halogenoketones—XI. *Tetrahedron* **1979**, 35 (7), 875-879.
216. Donnelly, J. A.; Higginbotham, C. L., Flavone formation in the wheeler aurone synthesis. *Tetrahedron* **1990**, 46 (20), 7219-7226.
217. Bose, G.; Mondal, E.; Khan, A. T.; Bordoloi, M. J., An environmentally benign synthesis of aurones and flavones from 2'-acetoxychalcones using n-tetrabutylammonium tribromide. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (50), 8907-8909.
218. Khan, A. T.; Goswami, P., A highly efficient and environmentally benign synthesis of 6,8-dibromoflavones, 8-bromoflavones, 5,7-dibromoaurones and 7-bromoaurones. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46 (30), 4937-4940.
219. Ragab, F. A.; Yahya, T. A. A.; El-Naa, M. M.; Arafa, R. K., Design, synthesis and structure-activity relationship of novel semi-synthetic flavonoids as antiproliferative agents. *European journal of medicinal chemistry* **2014**, 82, 506-520.
220. Weng, Y.; Chen, Q.; Su, W., Copper-catalyzed intramolecular tandem reaction of (2-halogenphenyl)(3-phenyloxiran-2-yl)methanones: synthesis of (Z)-aurones. *The Journal of organic chemistry* **2014**, 79 (9), 4218-24.

221. Garcia, H.; Iborra, S.; Primo, J.; Miranda, M. A., 6-Endo-Dig vs. 5-Exo-Dig ring closure in *o*-hydroxyaryl phenylethynyl ketones. A new approach to the synthesis of flavones and aurones. *The Journal of organic chemistry* **1986**, *51* (23), 4432-4436.
222. Jong, T.-T.; Leu, S.-J., Intramolecular cyclisation catalysed by silver(I) ion; a convenient synthesis of aurones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1990**, (2), 423-424.
223. Liu, C.; Zhang, Z.; Zhang, J.; Liu, X.; Xie, M., Regioselective Synthesis of Aurone Derivatives via PBU₃-Catalyzed Cyclization of 2-Alkynoylphenols. *Chinese Journal of Chemistry* **2014**, *32* (12), 1233-1237.
224. Taylor, C.; Bolshan, Y., Metal-free methodology for the preparation of sterically hindered alkynoylphenols and its application to the synthesis of flavones and aurones. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (29), 4392-4396.
225. Harkat, H.; Blanc, A.; Weibel, J.-M.; Pale, P., Versatile and Expedient Synthesis of Aurones via AuI-Catalyzed Cyclization. *The Journal of organic chemistry* **2008**, *73* (4), 1620-1623.
226. Kraus, G. A.; Gupta, V., Divergent Approach to Flavones and Aurones via Dihalocacrylic Acids. Unexpected Dependence on the Halogen Atom. *Organic letters* **2010**, *12* (22), 5278-5280.
227. Geissman, T. A.; Harborne, J. B., Anthochlor Pigments. X. Aureusin and Cernuoside. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77* (17), 4622-4624.
228. Varma, R. S.; Varma, M., Alumina-mediated condensation. A simple synthesis of aurones. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33* (40), 5937-5940.
229. Kumar, S., An improved one-pot and eco-friendly synthesis of aurones under solvent-free conditions. *Green Chemistry Letters and Reviews* **2014**, *7* (1), 95-99.
230. Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Beney, C., An efficient synthesis of 4,6-dimethoxyaurones. *Heterocycles* **2001**, *55*, 967-972.
231. Thomas, M. G.; Lawson, C.; Allanson, N. M.; Leslie, B. W.; Bottomley, J. R.; McBride, A.; Olusanya, O. A., A series of 2(Z)-2-Benzylidene-6,7-dihydroxybenzofuran-3[2H]-ones as inhibitors of chorismate synthase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2003**, *13* (3), 423-426.
232. Cheng, H.; Zhang, L.; Liu, Y.; Chen, S.; Cheng, H.; Lu, X.; Zheng, Z.; Zhou, G.-C., Design, synthesis and discovery of 5-hydroxyaurone derivatives as growth inhibitors against HUVEC and some cancer cell lines. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, *45* (12), 5950-5957.
233. Lee, Y. H.; Shin, M. C.; Yun, Y. D.; Shin, S. Y.; Kim, J. M.; Seo, J. M.; Kim, N.-J.; Ryu, J. H.; Lee, Y. S., Synthesis of aminoalkyl-substituted aurone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2015**, *23* (1), 231-240.
234. Zheng, X.; Wang, H.; Liu, Y.-M.; Yao, X.; Tong, M.; Wang, Y.-H.; Liao, D.-F., Synthesis, Characterization, and Anticancer Effect of Trifluoromethylated Aurone Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2015**, *52* (1), 296-301.
235. Alvarado-Cendan, J. M.; Verguese, K. I., Process for the extraction of alumina. *PCT WO9322238* **1993**.
236. Ono, K.; Yoshiike, Y.; Takashima, A.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **2003**, *87* (1), 172-181.
237. Lee, C.-Y.; Chew, E.-H.; Go, M.-L., Functionalized aurones as inducers of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 that activate AhR/XRE and Nrf2/ARE signaling pathways: Synthesis, evaluation and SAR. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, *45* (7), 2957-2971.
238. Zhao, W.; Sun, J.; Xiang, H.; Zeng, Y.-y.; Li, X.-b.; Xiao, H.; Chen, D.-y.; Ma, R.-l., Synthesis and biological evaluation of new flavonoid fatty acid esters with anti-adipogenic and enhancing glucose consumption activities. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2011**, *19* (10), 3192-3203.
239. Wallez, V.; Durieux-Poissonnier, S.; Chavatte, P.; Boutin, J. A.; Audinot, V.; Nicolas, J.-P.; Bennejean, C.; Delagrangé, P.; Renard, P.; Lesieur, D., Synthesis and Structure–Affinity–Activity Relationships of Novel Benzofuran Derivatives as MT2 Melatonin Receptor Selective Ligands. *Journal of medicinal chemistry* **2002**, *45* (13), 2788-2800.
240. Sim, H. M.; Loh, K. Y.; Yeo, W. K.; Lee, C. Y.; Go, M. L., Aurones as Modulators of ABCG2 and ABCB1: Synthesis and Structure–Activity Relationships. *ChemMedChem* **2011**, *6* (4), 713-724.

241. Venkateswarlu, S.; Panchagnula, G. K.; Subbaraju, G. V., Synthesis and Antioxidative Activity of 3',4',6,7-Tetrahydroxyaurone, a Metabolite of *Bidens frondosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2004**, *68* (10), 2183-2185.
242. Buechi, G.; Weinreb, S. M., Total syntheses of aflatoxins M1 and G1 and an improved synthesis of aflatoxin B1. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (3), 746-752.
243. Zou, H. B.; Dong, S. Y.; Zhou, C. X.; Hu, L. H.; Wu, Y. H.; Li, H. B.; Gong, J. X.; Sun, L. L.; Wu, X. M.; Bai, H.; Fan, B. T.; Hao, X. J.; Stöckigt, J.; Zhao, Y., Design, synthesis, and SAR analysis of cytotoxic sinapyl alcohol derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14* (6), 2060-2071.
244. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie* **2002**, *114* (14), 2708-2711.
245. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of organic chemistry* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
246. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (8), 2952-3015.
247. Maya, Y.; Ono, M.; Watanabe, H.; Haratake, M.; Saji, H.; Nakayama, M., Novel Radioiodinated Aurones as Probes for SPECT Imaging of β -Amyloid Plaques in the Brain. *Bioconjugate chemistry* **2009**, *20* (1), 95-101.
248. Ono, K.; Li, L.; Takamura, Y.; Yoshiike, Y.; Zhu, L.; Han, F.; Mao, X.; Ikeda, T.; Takasaki, J.; Nishijo, H.; Takashima, A.; Teplow, D. B.; Zagorski, M. G.; Yamada, M., Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287* (18), 14631-43.
249. Ushikubo, H.; Watanabe, S.; Tanimoto, Y.; Abe, K.; Hiza, A.; Ogawa, T.; Asakawa, T.; Kan, T.; Akaishi, T., 3,3',4',5,5'-Pentahydroxyflavone is a potent inhibitor of amyloid β fibril formation. *Neuroscience letters* **2012**, *513* (1), 51-6.
250. Carvalho, J. F.; Louvel, J.; Doornbos, M. L.; Klaasse, E.; Yu, Z.; Brussee, J.; AP, I. J., Strategies to reduce HERG K⁺ channel blockade. Exploring heteroaromaticity and rigidity in novel pyridine analogues of dofetilide. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56* (7), 2828-40.
251. Plourde, L. G.; Spaetzle, R. R., Regioselective Protection of the 4-Hydroxyl of 3,4-Dihydroxybenzaldehyde. *Molecules* **2002**, *7* (9).
252. Zhang, Q.; Shrestha, J. P.; Chang, C.-W. T., Synthesis of bioactive 1-alkyl-1*H*-naphtho[2,3-*d*][1,2,3]triazole-4,9-diones and *N*-aryl-2-aminomethylene-1,3-indanediones using water as the solvent. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (10), 1839-1842.
253. Ouberai, M.; Dumy, P.; Chierici, S.; Garcia, J., Synthesis and Biological Evaluation of Clicked Curcumin and Clicked KLVFFA Conjugates as Inhibitors of β -Amyloid Fibril Formation. *Bioconjugate chemistry* **2009**, *20* (11), 2123-2132.
254. Dufour, E.; Moni, L.; Bonnat, L.; Chierici, S.; Garcia, J., 'Clickable' 2,5-diketopiperazines as scaffolds for ligation of biomolecules: their use in A β inhibitor assembly. *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, *12* (27), 4964-74.
255. Wood, S. J.; Wetzel, R.; Martin, J. D.; Hurle, M. R., Prolines and Amyloidogenicity in Fragments of the Alzheimer's Peptide β /A4. *Biochemistry* **1995**, *34* (3), 724-730.
256. Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, A. R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C., Arrest of β -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (15), 8545-8548.
257. Hetényi, C.; Körtvélyesi, T.; Penke, B., Mapping of Possible Binding Sequences of Two β -Sheet Breaker Peptides on β Amyloid Peptide of Alzheimer's Disease. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2002**, *10* (5), 1587-1593.
258. Frenkel-Pinter, M.; Richman, M.; Belostozky, A.; Abu-Mokh, A.; Gazit, E.; Rahimipour, S.; Segal, D., Selective Inhibition of Aggregation and Toxicity of a Tau-Derived Peptide using Its Glycosylated Analogues. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22* (17), 5945-5952.

259. Oh, K.; Guan, Z., A convergent synthesis of new β -turn mimics by click chemistry. *Chemical Communications* **2006**, (29), 3069-3071.
260. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48* (52), 9879-83.
261. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Organic letters* **2004**, *6* (17), 2853-2855.
262. Barolli, M. G.; Pomilio, A. B., Synthesis of [¹³¹I]-iodinated quercetin. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1997**, *39* (11), 927-933.
263. Salacinski, P. R. P.; McLean, C.; Sykes, J. E. C.; Clement-Jones, V. V.; Lowry, P. J., Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycoluril (Iodogen). *Analytical biochemistry* **1981**, *117* (1), 136-146.
264. Tetsuo, N.; Takayoshi, O.; Hirotsu, K.; Nae, S.; Hirofumi, N.; Masanao, A.; Akiko, T.; Teruki, H.; Shigeyuki, Y.; Keiko, T.; Hitomi, Y., Preparation of 2-[(1*H*-indol-3-yl)methylene]benzofuran-3(2*H*)-one derivatives and their azaindole analogs as selective pim-1 kinase inhibitors and anticancer agents. *European Patent 2565192A1* **2011**.
265. Talekar, R. S.; Chen, G. S.; Lai, S.-Y.; Chern, J.-W., Nonreductive Deiodination of *ortho*-Iodo-Hydroxylated Arenes Using Tertiary Amines. *The Journal of organic chemistry* **2005**, *70* (21), 8590-8593.
266. Bu, X. L.; Rao, P. P.; Wang, Y. J., Anti-amyloid Aggregation Activity of Natural Compounds: Implications for Alzheimer's Drug Discovery. *Molecular neurobiology* **2015**.
267. Pelter, A.; Ward, R. S.; Heller, H. G., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of (Z)- and (E)-aurones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1979**, (0), 328-329.
268. Meguellati, A. Synthèse de biomolécules agissant comme inhibiteurs de l'ARN polymérase ARN dépendante du virus de l'hépatite C et développement de nouveaux surfactants comme stabilisants des protéines membranaires par réseaux de ponts salins. Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble, **2015**.
269. Pal, M.; Parasuraman, K.; Yeleswarapu, K. R., Palladium-Catalyzed Cleavage of O/N-Propargyl Protecting Groups in Aqueous Media under a Copper-Free Condition¹. *Organic letters* **2003**, *5* (3), 349-352.
270. Haudecoeur, R. Pharmacochimie des aurones pour la modulation d'enzymes. Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble, **2011**.

SYNTHESE ET EVALUATION D'AURONES SUR DES MODELES DE FIBRES DE TAU

Résumé :

La fibrillation anormale de la protéine tau est un phénomène présent dans de nombreuses maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer, et conduit à la formation de fibres amyloïdes appelées dégénérescences neurofibrillaires. L'utilisation de molécules organiques capables de marquer ces fibres ou d'inhiber leur formation revêt un intérêt à la fois diagnostic et thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer. Une série d'aurones a été synthétisée et leur capacité à interagir et interférer avec le processus de fibrillation a été évaluée *in vitro* sur des modèles de fibres de tau développés ou optimisés lors de ce projet. Ce travail a permis de montrer que des aurones polyhydroxylées sont capables d'agir comme sonde et/ou comme inhibiteur du processus de fibrillation. Afin d'élargir les applications possibles des aurones, la ligation d'aurones avec des biomolécules ou encore leur radiomarquage a également été évaluée.

Mots clés : tau, aurones, Alzheimer, fibres amyloïdes, inhibiteur, sonde.

SYNTHESIS AND EVALUATION OF AURONES WITH MODELS OF TAU FIBRES

Abstract:

The fibrillation of the tau protein occurs in many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, and leads to the formation of amyloid fibres called neurofibrillary tangles. Using organic molecules able to mark these fibres or inhibit their formation provides an interest both in diagnosis and therapy in Alzheimer's disease. A series of aurones was synthesized and their ability to interfere with the fibrillation process was evaluated *in vitro* on models of tau fibres developed in this project. This work shows that polyhydroxylated aurones are able to act both as probes and as inhibitors of the fibrillation process. The ligation of these aurones with biomolecules or their radiolabelling has also been investigated.

Key words: tau, aurones, Alzheimer, amyloid fibres, inhibitor, probe.

¹ Equipe I2BM, Département de Chimie Moléculaire (CNRS-UMR 5052)
570 rue de la chimie, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

² Equipe MedChem, Département de Pharmacochimie Moléculaire (CNRS-UMR 5063)
470 rue de la chimie, BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France